

Table des matières

Résumé	iii
Summary.....	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations et sigles	x
Remerciements	xi
Avant-propos	xii
Chapitre 1 – Introduction générale	1
1.1 Le glaucome.....	1
La médication du glaucome : le travoprost	2
1.2 Les nanoparticules d'or.....	6
Méthodes de synthèse.....	6
La liaison or-soufre (Au-S)	8
La résonance plasmonique de surface	9
Utilisation des AuNP en nanomédecine.....	10
Toxicité.....	11
1.3 Le polyéthylène glycol.....	12
1.4 Le film pré-cornéen et les mucines.....	14
Les mucines.....	15
Chapitre 2 – Problématique, hypothèse et objectifs	16
2.1 Problématique	16
2.2 Hypothèse	17
2.3 Objectifs.....	19
Chapitre 3 – Synthèse de nanoparticules d'or	20
3.1 Introduction.....	20
3.2 Matériel et méthodes.....	20
Matériel	20
Synthèse	20

Purification.....	21
Échange de ligand	22
Caractérisation.....	22
3.3 Résultats.....	28
3.4 Discussion	31
3.5 Conclusion partielle	34
3.6 Annexe	35
A - Synthèse des AuNP 2000.....	35
B - Extraction	36
C - Lavage des tubes de dialyse en cellulose (adapté de Sigma-Aldrich) ¹⁰¹	36
D - Dialyse des nanoparticules d'or	37
E - Lyophilisation.....	38
F - Échange de ligand.....	38
G - Calcul de la masse molaire.....	39
Chapitre 4 – Vectorisation d'un médicament par des nanoparticules d'or.....	40
4.1 Introduction.....	40
4.2 Matériel et méthodes.....	40
Matériel	40
Protocole d'encapsulation	40
Spectroscopie UV-visible.....	40
Diffusion dynamique de la lumière	41
4.3 Résultats.....	41
4.4 Discussion	45
4.5 Conclusion partielle	47
Chapitre 5 – Mucoadhésion (article en préparation)	48
Chapitre 6 – Conclusion générale et perspectives	73
6.1 Autres méthodes de synthèse des nanoparticules d'or.....	74
6.2 Autres maladies, autres médicaments, autres muqueuses.....	75
Bibliographie	77

Liste des tableaux

Tableaux de l'article

Table 1: DLS analysis of the mucoadhesion of AuNP 2000 and AuNP double thiol.....	62
---	----

Liste des figures

Figures du mémoire

Figure 1 : Molécule de travoprost.....	3
Figure 2 : Méthode de Brust	7
Figure 3 : Résonance plasmonique de surface.....	9
Figure 4 : Le polyéthylène glycol.....	13
Figure 5 : Représentation du film pré-cornéen	14
Figure 6 : Représentation de l'hypothèse de recherche	17
Figure 7 : Représentation de la première stratégie de mucoadhésion	18
Figure 8 : Échange de ligand	22
Figure 9 : Différence entre les informations fournies par la diffusion dynamique de la lumière (DLS) et par la microscopie électronique en transmission (TEM)	25
Figure 10 : Nanoparticules d'or synthétisées avec du PEG 2000-SH	29
Figure 11 : Nanoparticules d'or synthétisées avec du PEG 2000-SH et ayant subi un échange de ligand PEG 1000 double thiol	30
Figure 12 : Spectre UV-visible des nanoparticules d'or synthétisées avec du PEG 2000-SH avant et après échange de ligand PEG 1000 double thiol.....	31
Figure 13 : Analyse de l'encapsulation du travoprost dans les AuNP 800 par diffusion dynamique de la lumière (DLS)	41
Figure 14 : Analyse de l'encapsulation du travoprost dans les AuNP 6000 par diffusion dynamique de la lumière (DLS)	42
Figure 15 : Analyse par spectroscopie UV-visible de l'encapsulation du travoprost dans les AuNP 2000	43
Figure 16 : Détermination par spectroscopie UV-visible de l'effet de l'encapsulation du travoprost sur la bande plasmon des AuNP 2000.....	44
Figure 17 : Analyse par spectroscopie UV-visible de l'encapsulation du travoprost dans les AuNP double thiol	45

Figures de l'article

Figure 1: Characterization of the AuNP synthesised using PEG 2000 (AuNP 2000).....	58
Figure 2: Characterization of the AuNP double thiol obtained from ligand exchange on AuNP 2000.....	59
Figure 3: Normalised UV-vis spectra obtained before (AuNP 2000) and after (AuNP double thiol) ligand exchange	59
Figure 4: UV-vis spectrum obtained after the addition of mucins to AuNP 2000 and the simulated additive spectrum of mucins alone and AuNP alone.....	61
Figure 5: Emission spectra of mucins during mucoadhesion of AuNP 2000 and AuNP double thiol.....	64
Figure 6: Subtracted spectra of the PAS coloration used to assess the mucoadhesive properties of AuNP 2000 and AuNP 2000 from synthesis #2.....	66
Figure 7: Histogram representing the percentage and the mass of adsorbed mucins according to the different AuNP analysed by PAS coloration.....	68
Figure S1: UV-vis spectra of AuNP 2000 in presence of different PAS coloration reagents (after subtraction of the reagents spectra taken alone).....	70
Figure S2: Raw spectra of the PAS coloration used to assess the mucoadhesion properties of AuNP 2000 and AuNP 2000 from synthesis #2.....	71
Figure S3: Centrifugation of AuNP 2000.....	72

Liste des abréviations et sigles

AuNP	Nanoparticule d'or
BAK	Chlorure de benzalkonium
CTAB	Bromure de cetyltriméthylammonium
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
HSAB (principe)	Principe des acides et bases durs et mous
OCT	Tomographie en cohérence optique
PAS (coloration)	Coloration à l'acide périodique et au réactif de Schiff
PEG	Polyéthylène glycol
PIO	Pression intraoculaire
RMN	Résonance magnétique nucléaire
TEM	Microscopie électronique en transmission
TOAB	Bromure de tétraoctylammonium
UV-vis	Spectroscopie UV-visible

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier chaleureusement ma directrice de recherche, Dre Élodie Boisselier, pour m'avoir accordé sa confiance afin d'être son premier étudiant dans son nouveau laboratoire. Elle est non seulement un mentor exceptionnel, mais son optimisme contagieux et sa joie de vivre vous motivent chaque jour à vous dépasser. Merci d'avoir toujours été aussi disponible pour répondre à mes questions et me donner une foule de conseils tellement pertinents.

Je voudrais aussi remercier tous les collègues que j'ai eu la chance de côtoyer et qui sont rapidement devenus de véritables amis : Quentin, Mahmoud, Xiaolin et Mélissa pour ne nommer qu'eux, de même que tous les stagiaires et les étudiants en immersion. J'ai beaucoup appris à vos côtés; que de belles et riches cultures qui se mélangent au sein de notre laboratoire!

Je pense aussi à tous les autres membres du CUO-Recherche, étudiants, professionnels de recherche et professeurs, qui rendent cet endroit si unique.

Enfin je tiens à remercier spécialement ma famille, qui a toujours cru en moi et qui m'appuie depuis le départ dans ce magnifique projet de maîtrise.

À tous, merci beaucoup de m'avoir permis d'évoluer tant au point de vue humain que professionnel.

Avant-propos

Ce mémoire de maîtrise est divisé en six chapitres. Le 1^{er} chapitre se veut une introduction générale du projet, abordant la théorie et les connaissances actuelles s'y rapportant. Le 2^e chapitre présente la problématique, l'hypothèse et les objectifs du projet. Le 3^e chapitre est consacré à la synthèse de nanoparticules d'or et à leur caractérisation. Le 4^e chapitre fait état des études qui ont été menées concernant la capacité des nanoparticules d'or synthétisées à encapsuler un médicament utilisé pour traiter le glaucome.

Le 5^e chapitre de ce mémoire est constitué d'un article actuellement en écriture concernant la mucoadhésion des nanoparticules d'or, un des trois principaux aspects du présent projet de recherche. Il sera nommé « *The mucoadhesive properties of gold nanoparticles* ». Il reste encore quelques résultats à obtenir, mais la plupart des données d'intérêt figurent déjà dans le manuscrit présenté. J'en suis l'auteur principal, et j'ai conçu les protocoles expérimentaux et effectué toutes les manipulations à l'exception de la synthèse des nanoparticules d'or identifiées comme « *Synthesis #2* » dans la section sur la coloration PAS. Ces nanoparticules ont été synthétisées par Mahmoud Omar, étudiant au doctorat dans notre laboratoire. Tous les travaux ont été effectués sous la supervision de Dre Élodie Boisselier, notre directrice de recherche. Mahmoud Omar est également en codirection avec Dr Vincent Pernet. Tous les auteurs révisent le manuscrit, qui sera prochainement prêt à être soumis à un éditeur.

Finalement, le 6^e chapitre est une conclusion générale résumant mes principales contributions au projet et aborde quelques perspectives quant aux travaux qu'il serait intéressant de mener.

Le mémoire présente par ailleurs des informations reliées à un brevet provisoire.

Chapitre 1 – Introduction générale

1.1 Le glaucome

On estime que plus de 70 millions de personnes à travers le monde souffrent actuellement d'un glaucome.¹ Le glaucome est un groupe de neuropathies optiques progressives, caractérisées par la dégénération des cellules ganglionnaires rétiniennes et les changements en résultant dans la tête du nerf optique.¹

Bien qu'étant la deuxième cause de cécité dans le monde,² les bases biologiques de l'apparition d'un glaucome demeurent encore mal comprises et les facteurs contribuant à sa progression ne sont pas tous caractérisés.¹ Il est néanmoins reconnu que l'augmentation de la pression intraoculaire (PIO) constitue un important facteur de risque dans le développement et la progression d'un glaucome.³ Par exemple, une mauvaise évacuation de l'humeur aqueuse par le trabéculum, un petit canal qui peut se retrouver bouché, est susceptible de causer une accumulation pathologique de liquide dans l'œil. Cet excès de liquide fait augmenter la pression intraoculaire, ce qui endommage alors le nerf optique. Il en résulte une perte progressive et irréversible de la vision.

L'*Advanced Glaucoma Intervention Study* (AGIS) a déterminé que les patients présentant une pression intraoculaire inférieure à 18 mm Hg à chaque visite chez leur professionnel de la vue présentaient peu ou aucune perte de champ visuel durant les six années de l'étude.⁴ À l'inverse, on estime de manière générale que les patients qui ont régulièrement une PIO supérieure à 21 mm Hg devraient être évalués plus en détail pour le glaucome.⁵

Le glaucome évolue habituellement lentement et sans douleur, sauf dans le cas d'une crise aigüe, ce qui rend sa détection difficile pour la personne atteinte. Un dépistage précoce et un suivi efficace de la PIO par un professionnel de la santé sont donc essentiels pour personnaliser au mieux le traitement de chaque patient, car la réduction de la pression intraoculaire est la seule méthode prouvée qui permette traiter la maladie.¹ En effet, en cas de pression intraoculaire élevée, chaque mm Hg de réduction permettrait de diminuer le risque de progression d'un glaucome de 10 %.³

Malgré les avancées importantes réalisées dans les traitements au laser et autres microchirurgies, l'utilisation de gouttes ophtalmiques appliquées de manière topique pour réduire la PIO demeure la première option chez la grande majorité des patients.⁶

La médication du glaucome : le travoprost

Historiquement, les médicaments antiglaucome devaient être appliqués plusieurs fois par jour, ce qui posait le problème majeur de la non-observance de la médication. Par exemple, selon une étude menée au début des années 1980, 25 % des patients omettaient plus de 40 % des doses qu'ils devaient s'administrer, alors que 19 % en omettaient plus de 60 %.⁷

L'arrivée sur le marché des analogues de la prostaglandine F_{2a} , des médicaments ne nécessitant qu'une seule application par jour,⁸ constitue une avancée importante pour les patients d'autant plus que ces composés sont les plus efficaces pour réduire la pression intraoculaire.^{6, 9} Le premier analogue de la prostaglandine, le latanoprost, a été commercialisé en 1996. Le travoprost et le bimatoprost ont pour leur part fait leur apparition en 2001.¹⁰ Depuis plus d'une décennie, cette classe de médicaments est devenue la référence dans le domaine. Par ailleurs, les ophtalmologistes du Centre universitaire d'ophtalmologie (CUO) du CHU de Québec utilisent principalement le travoprost pour traiter leurs patients atteints de glaucome.

Le travoprost (Figure 1) est en fait l'ester isopropylique de l'énanthiomère (+) du fluprosténol, un agoniste du récepteur FP de la prostaglandine F_{2a} utilisé en médecine vétérinaire depuis 40 ans. La forme acide libre du travoprost, c'est-à-dire l'énanthiomère (+)-fluoprostenol (+ FP), est un agoniste puissant et sélectif du récepteur.^{11, 12}

Le Travatan® et le Travatan Z® sont deux médicaments manufacturés par Alcon Laboratories Inc. qui contiennent du travoprost à une concentration de 0,004 % m/v. À l'origine, le Travatan® contenait du chlorure de benzalkonium (BAK) comme agent de conservation. Couramment utilisé pour préserver les médicaments ophtalmiques appliqués de manière topique, l'exposition chronique au BAK finit néanmoins par être associé à de nombreux effets secondaires indésirables. Par exemple, des inflammations légères de la

conjonctive, des perturbations du film lacrymal et de la sécheresse ou de l'irritation oculaire ont été rapportées.^{13, 14}

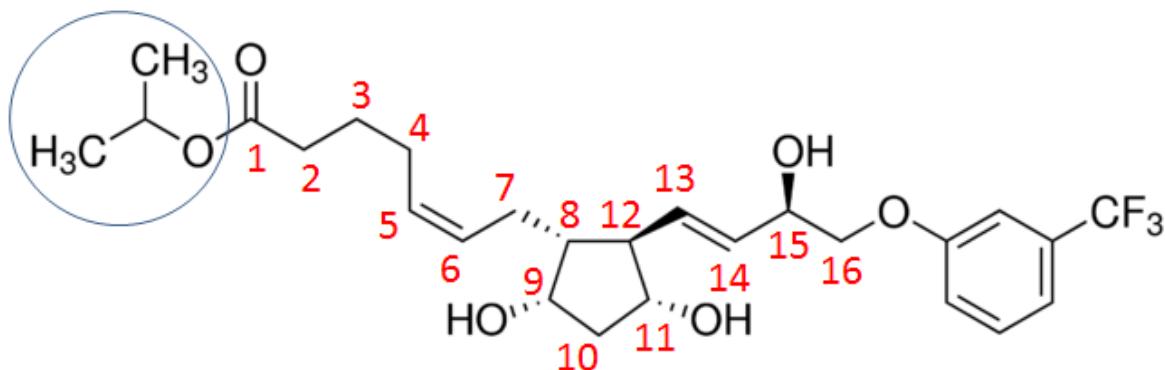


Figure 1 : Molécule de travoprost avec identification de la chaîne de carbone principale. L'ester isopropylique (promédicament) est encerclé.

Pour remédier à la situation, plusieurs compagnies pharmaceutiques ont développé des agents de conservation alternatifs. Par exemple, Alcon utilise maintenant le *sofZia*® dans le Travatan Z®. Il s'agit du premier analogue de la prostaglandine n'utilisant pas de BAK comme agent de conservation.¹³ Le *sofZia*® est un mélange d'acide borique, de propylène glycol, de sorbitol et de chlorure de zinc¹⁵ qui permet, de plus, de réduire significativement les dommages à l'épithélium cornéen et l'inflammation de la conjonctive lors de l'application.¹⁶ Notons par ailleurs que dans une étude récente, lorsque des patients souffrant de kératite ponctuée superficielle (SPK) chronique étaient traitées simultanément pour un glaucome avec du latanoprost contenant du BAK, leur condition de SPK se retrouvait améliorée lorsque leur médication était changée pour du travoprost contenant du *sofZia*®.¹⁷ Leur pression intraoculaire demeurait toutefois semblable, ce qui n'est pas surprenant puisque les analogues de la prostaglandine permettent d'obtenir une baisse de la pression intraoculaire équivalente.^{12, 18}

Le travoprost est un promédicament (ou prodrogue) administré sous forme d'ester isopropylique (Figure 1) afin d'améliorer le passage au travers les différentes couches de la cornée et diminuer l'irritation oculaire par rapport à sa forme acide carboxylique libre. Une fois dans les tissus de l'œil, la molécule est toutefois rapidement hydrolysée par des

estérases. De cette façon, le médicament est plus efficace et peut donc être administré moins souvent, ce qui augmente par ailleurs l'observance du patient à son traitement.¹⁹

Le travoprost à 0,004 % offre une diminution de la pression intraoculaire efficace pour une période de 24 heures, qu'il soit appliqué le matin ou le soir. Cependant, l'application en soirée démontre une efficacité diurne légèrement améliorée, avec une plus faible distribution de la pression sur une période de 24 heures.²⁰ Pour cette raison, le médicament doit être appliqué le soir.¹⁵ L'effet maximal du travoprost est en effet atteint une douzaine d'heures suite à son application, soit le matin, au moment où la pression intraoculaire est habituellement la plus élevée.²¹

Le récepteur FP possède une très forte affinité pour la forme acide libre du travoprost, avec un K_d de $33,8 \pm 2,9$ nM.²² En fait, l'acide libre du travoprost est l'agoniste complet du récepteur, alors que les autres analogues de la prostaglandine sont des agonistes partiels.²³ L'acide libre du travoprost est environ 10 fois plus efficace pour activer le récepteur que l'acide libre du latanoprost.¹² Par ailleurs, au cours des différentes études menées sur les analogues de la prostaglandine, certains auteurs ont suggéré que le travoprost permettait d'atteindre un pic d'activité plus rapidement qu'avec le latanoprost.¹² Malgré tout, aucune différence d'efficacité de réduction de la pression intraoculaire n'est notée à long terme.

Le récepteur FP est un récepteur couplé à une protéine $G_{\alpha}q$ ²⁴ qui, dans l'œil, est retrouvé dans le muscle ciliaire et dans le sphincter de l'iris.²¹ Comme les autres analogues de la prostaglandine, le travoprost réduit la pression intraoculaire par stimulation du drainage de l'humeur aqueuse, principalement grâce à un meilleur écoulement uvéoscléral.⁸ Cet écoulement uvéoscléral est lui-même causé par la relaxation du muscle ciliaire et le remodelage de la matrice extracellulaire dans le corps ciliaire.⁶ Des effets sur l'écoulement dans le trabéculum ont aussi été rapportés.⁸

Lors d'une étude de 9 mois utilisant du travoprost à 0,004 %, la pression intraoculaire (PIO) des sujets était diminuée en moyenne de 8,0 à 8,9 mm Hg par rapport à la ligne de base (30,0 à 33,1 % de diminution).²¹ Diverses autres études obtiennent des résultats semblables. Par exemple, une étude de 3 mois rapportait une PIO diminuée en moyenne de 7,3 à 8,5 mm Hg par rapport à la ligne de base.¹⁴ Une autre étude, plus courte, a permis

d'observer une diminution de plus de 6 mm Hg (environ 20-30 % par rapport à la ligne de base) jusqu'à 60h après l'administration de la dernière dose.¹³

Enfin, la désensibilisation ou la down-régulation du récepteur FP pourrait expliquer la réduction de l'efficacité ou même l'augmentation de la pression intraoculaire lors d'une combinaison de thérapie par des analogues de la prostaglandine ou une augmentation dans la fréquence d'administration de cette classe de médicament.³

Une goutte de Travatan Z® contient environ 1,2 µg de travoprost.¹² Tel qu'abordé précédemment, le travoprost est absorbé à travers la cornée avant d'être hydrolysé sous forme d'acide libre. Chez le lapin, la concentration maximale dans l'humeur aqueuse était atteinte en une à deux heures suite à l'administration.¹⁵ Chez l'humain, suite à l'administration topique d'une seule goutte de solution de travoprost à 0,004 %, la concentration plasmatique maximale de la molécule sous sa forme d'acide libre reste faible, c'est-à-dire de 25 pg/mL ($0,5 \times 10^{-10}$ M) ou moins. Elle est atteinte dans les 30 minutes.¹⁵ Par ailleurs, suite à une administration dans les deux yeux, elle atteint 10^{-10} M et il n'y a pas de différence entre les jours 1 à 7, indiquant l'absence d'accumulation significatives.¹² La molécule est finalement biotransformée par β -oxydation de sa chaîne α (acide carboxylique), par oxydation du groupement hydroxyle en position 15, et par réduction de la liaison double entre les carbones en position 13 et 14 (Figure 1).¹⁵

En somme, le Travatan Z®, d'Alcon Laboratories Inc., contient du travoprost, un analogue de la prostaglandine $F_{2\alpha}$, à une concentration de 0,004 % m/v. Comme les autres médicaments de la même classe, grâce à son efficacité, son risque minimal d'effets secondaires oculaires et systémiques (notamment grâce à l'agent de conservation *sofZia*®), et son application une seule fois par jour, il est régulièrement employé en tant qu'agent de première ligne pour le traitement de la pression intraoculaire élevée, en présence ou non d'un glaucome.^{6, 15}

Notons enfin que les analogues de la prostaglandine ne sont pas les seules molécules actuellement utilisés pour réduire la pression intraoculaire. En effet, différentes classes de médicaments comme les bêta-bloquants (par exemple le timolol) sont également employées, bien que leur efficacité soit généralement considérée comme moindre.⁶

Malgré l'avancée que représentent les analogues de la prostaglandine, le problème majeur qui leur est associé est leur faible biodisponibilité au sein de l'œil menant à une efficacité limitée, tel qu'expliqué en détails dans le chapitre 2.

1.2 Les nanoparticules d'or

Il existe plusieurs types de vecteurs de médicaments ophtalmiques, tels que des nanoparticules polymériques,²⁵ des liposomes²⁶ ou des micelles.²⁷ Mais puisque les travaux présentés dans ce mémoire portent sur l'utilisation de nanoparticules d'or (AuNP), il convient ici d'apporter quelques précisions sur leurs méthodes de synthèse, leurs propriétés physicochimiques, leurs utilisations et leur toxicité.

Méthodes de synthèse

En 1994, l'équipe du Dr Brust publie un article²⁸ dans lequel il décrit la synthèse de nanoparticules d'or (AuNP) en réduisant l'acide chloraurique, HAuCl_4 , par du borohydrure de sodium, NaBH_4 , en présence de ligands thiolés (un thiol, dénoté $-\text{SH}$, est un groupement fonctionnel possédant un atome de soufre). L'or, au départ oxydé sous forme Au^{3+} , est au final réduit en Au^0 (sous forme métallique), où il commence à se lier avec d'autres atomes d' Au^0 . La synthèse de nanoparticules d'or via la méthode de Brust suit un processus de nucléation-croissance-stabilisation caractéristique.²⁹ En effet, un grand ratio molaire soufre:or produit des nanoparticules plus petites. Également, une addition rapide d'agent réducteur dans des solutions froides produit des nanoparticules plus petites et plus monodisperses. Enfin, stopper la réaction immédiatement après la réduction conduirait à des nanoparticules particulièrement petites ($\leq 2 \text{ nm}$).

La méthode originale de Brust utilise du bromure de tétraoctylammonium (TOAB), un agent de transfert de phase qui sert également d'agent de stabilisation. Étant donné que les AuNP sont dans ce cas stabilisées par des groupements alcanethiols, il est nécessaire de pouvoir amener le HAuCl_4 , un sel soluble dans l'eau, dans une phase organique (du toluène) afin que l'or puisse former un polymère avec le thiol avant la réduction par le NaBH_4 . Le TOAB permet donc d'une part de solubiliser l'acide chloraurique dans la phase

organique, et, d'autre part, de stabiliser le cœur nanoparticulaire en croissance lors de la réduction par le NaBH_4 . Perala et Kumar³⁰ ont publié une excellente revue de l'état actuel des connaissances sur la méthode de Brust. La Figure 2 en résume brièvement le mécanisme. Notons que le polymère or-thiol est en fait composé d'or qui a été réduit de Au^{3+} à Au^{1+} par les thiols du ligand.³⁰ Cela explique le changement de coloration de la solution qui est observé dans ce cas.

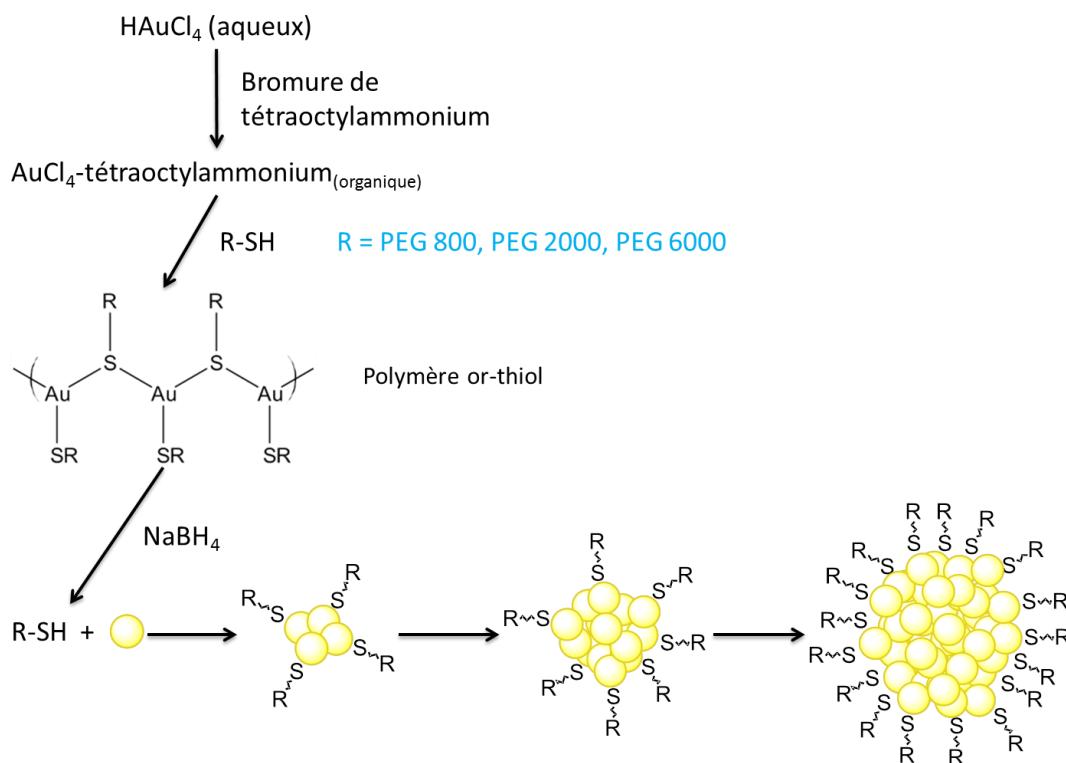


Figure 2 : Méthode de Brust. Adapté de Sardar et al.³¹ Dans le cas de nos synthèses (voir le chapitre 3), nous utilisons un ligand polyéthylène glycol, représenté en bleu, au lieu d'un alcanethiol comme dans la publication originale de Brust.²⁸

Une autre méthode de synthèse très employée pour synthétiser des AuNP est la méthode de Turkevich.³² Développée dès 1951, elle est ensuite raffinée par Frens en 1973.³³ Cette méthode est basée sur la réduction lente du HAuCl_4 par le citrate de sodium lorsque la solution aqueuse est amenée à ébullition. Ici, c'est également le citrate qui sert à stabiliser le cœur nanoparticulaire en croissance et aucun autre surfactant n'est employé.

Dans le cadre des travaux présentés dans ce mémoire, les nanoparticules d'or ont été synthétisées suivant une méthode de Brust modifiée. Le chapitre 3 est consacré à cet aspect du projet.

La liaison or-soufre (Au-S)

La méthode de Brust permet de former des nanoparticules d'or qui sont très rapidement stabilisées par des groupements thiols. En effet, la liaison or-soufre est particulièrement forte puisqu'elle a non seulement un caractère électrostatique, mais également covalent.³⁴ Le caractère covalent de la liaison or-soufre est plus important que pour la liaison à d'autres métaux, par exemple l'argent ou le cuivre. On explique aussi la force de la liaison Au-S par le fait que l'or est un acide mou et le thiolate est une base molle (principe HSAB – *Hard and Soft Acids and Bases*).^{35, 36} Notons que des AuNP qui sont stabilisées par des citrates (méthode de synthèse de Turkevich) ne sont pas aussi stables que si elles l'étaient par des ligands thiolés, précisément parce que l'alcool et les acides carboxyliques du citrate ne sont pas des bases molles, mais dures. Ainsi, le citrate est facilement déplaçable par l'ajout d'un ligand thiolé.³⁷

Si la liaison Au-S est forte, il n'en demeure pas moins qu'elle est dynamique. En effet, on peut par exemple placer des nanoparticules stabilisées par un ligand thiolé en présence d'un excès d'un second ligand thiolé, et au fil du temps, un équilibre statistique finira par s'établir et le ligand initial aura été en partie déplacé par le nouveau.³⁸

Échange de ligand

Le phénomène d'échange de ligand possédant un groupement thiol sur des nanoparticules d'or, ainsi que sa cinétique, sont complexes. Un équilibre est éventuellement atteint, mais tous les ligands ne sont pas échangeables, ce qui rend difficile la détermination d'une constante d'équilibre.³⁹ Par exemple, une petite molécule de butanethiol (molécule hydrophobe qui compte 4 carbones), est en mesure d'être presque complètement échangée, mais des molécules un peu plus grosses (12 ou 16 carbones) ne sont déplaçables qu'à 80 % environ.⁴⁰ Cette réaction incomplète, même avec de larges excès de thiols, indique que les interactions chaîne-chaîne sont des facteurs importants de stabilisation de la monocouche

de ligand qui recouvre la nanoparticule. Une réorganisation de la surface d'or, ou une migration du ligand d'un site plus échangeable vers un site moins échangeable, peuvent également expliquer le phénomène.

La résonance plasmonique de surface

Lorsque des nanoparticules métalliques, comme des nanoparticules d'or, sont beaucoup plus petites que la longueur d'onde de la lumière (ex. : nanoparticules de l'ordre d'une dizaine de nm vs. 400-700 nm pour la lumière visible), il se crée une résonance des électrons en surface de la nanoparticule avec la composante électromagnétique de la lumière. Cela cause une oscillation en résonance, à une certaine fréquence, des électrons dans la bande de conduction. Si cette fréquence est située dans la région du visible, les AuNP absorberont alors une partie de la lumière visible, ce qui les rendra colorées.⁴¹ La Figure 3 illustre le phénomène. Lors de l'analyse par spectroscopie UV-visible, il sera possible d'observer un pic caractéristique nommé « bande plasmon ».

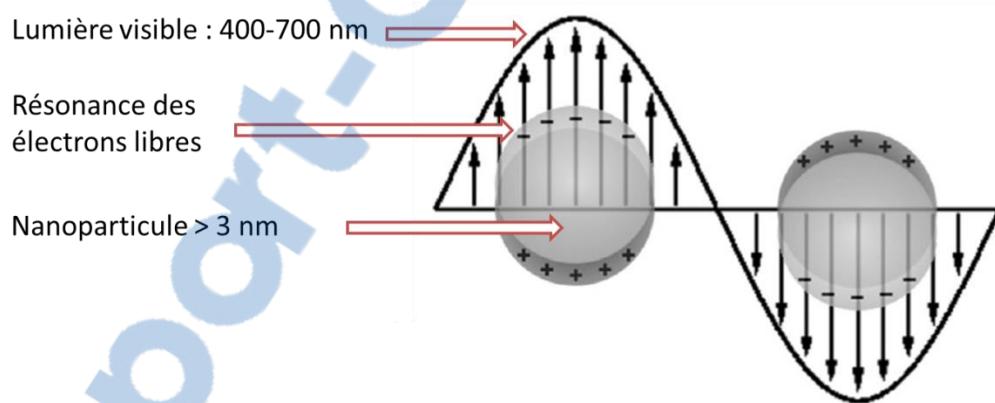


Figure 3 : Résonance plasmonique de surface. Adapté de Moores et al.⁴²

Notons que la bande plasmon est affectée par de multiples facteurs comme la taille, la forme, les ligands, les propriétés diélectriques de l'environnement, les interactions physiques ou chimiques à la surface de la nanoparticule, l'agrégation, la distance interparticules, etc.^{41, 43} La bande plasmon n'est observable que pour des AuNP de plus de 3 nm. En-dessous de cette taille, il n'est en effet plus possible de les considérer comme des

surfaces métalliques, et elles sont dans ce cas mieux définies comme des molécules (avec des orbitales moléculaires).³⁵ À cet effet, le terme « *cluster* » convient mieux à de telles entités que « nanoparticule ».

Utilisation des AuNP en nanomédecine

L'utilisation de nanoparticules d'or en nanomédecine est de plus en plus importante, et plusieurs excellents articles de revue résument l'état actuel des techniques dans le domaine.^{35, 44} Sans prétendre aborder tous les domaines dans lesquels des recherches sont actuellement menées, quelques sujets particulièrement d'actualité sont exposés dans les prochains paragraphes.

D'abord, des médicaments peuvent être encapsulés dans des nanoparticules d'or, avant d'être relargués. On retrouve par exemple plusieurs études concernant la vectorisation d'agents anticancéreux.⁴⁵⁻⁴⁷

Différents types de nanoparticules d'or ont permis de faire avancer la photothérapie thermique pour traiter divers types de tumeurs cancéreuses.⁴⁸ Le principe général est que l'irradiation des AuNP dans la région où l'on retrouve la bande plasmon est suivie d'une conversion rapide de la lumière en chaleur (de l'ordre de la picoseconde).³⁵ Étant donné qu'il est possible de moduler la bande plasmon des nanoparticules d'or selon différentes méthodes de synthèse, l'emploi de nanoparticules d'or ayant leur bande plasmon dans la région du visible/proche infrarouge (700-1000 nm environ) est privilégié. En effet, la radiation infrarouge est capable de pénétrer les tissus jusqu'à quelques centimètres, contrairement à la lumière visible, et elle n'est pas intrinsèquement dangereuse (contrairement aux rayons UV, par exemple).³⁵ Lorsque les AuNP sont bien acheminées aux tumeurs via le transport physiologique ou à l'aide d'anticorps, par exemple, la technique de la photothérapie thermique est très efficace pour détruire les tissus ciblés. En effet, des augmentations de température locales de 37 °C à près de 50 °C ont été rapportées. Un essai clinique est présentement en cours, après avoir complété avec succès des essais pré-cliniques.^{48, 49}

Des nanoparticules composées de silice et d'or ont aussi été employées de manière efficace en photothérapie thermique contre l'athérosclérose lors d'un essai clinique.⁵⁰

En imagerie, des nouveaux agents de contraste sont développés pour l'emploi en radiographie (rayons X) et en tomodensitométrie en employant des nanosphères ou des nanobâtonnets d'or.⁵¹ Il est intéressant de noter que des nanobâtonnets d'or peuvent être employés simultanément en imagerie et pour le relargage de médicament, par exemple dans le cas de cancer de la prostate.⁵² Des progrès ont aussi été réalisés dans le domaine de la tomographie en cohérence optique – ou OCT – grâce à des nanobâtonnets d'or.^{53, 54} Il s'agit d'une technique grandement utilisée en ophtalmologie pour visualiser les différents tissus de l'œil. Dans ce cas, contrairement aux applications en photothérapie, il est essentiel de s'assurer que l'irradiation des nanoparticules d'or soit de courte durée (de l'ordre des millisecondes vs. quelques minutes) pour ne pas endommager les tissus analysés.⁵⁵

Toxicité

La toxicité des nanoparticules d'or dépend de divers facteurs comme leur taille, leurs ligands ou leur charge. En ce qui concerne la taille, il a été rapporté que les nanoobjets d'or de moins de 12 nm de diamètre peuvent traverser la barrière hémato-rétinienne, alors que ceux de moins de 30 nm peuvent pénétrer dans les cellules par endocytose.⁵⁶ Par ailleurs, les cœurs métalliques des particules de plus de 5 nm sont généralement considérés comme étant inertes, alors que sous 3 nm la réactivité peut être différente. Tel que cela a été abordé précédemment, plusieurs types de nanomatériaux sont actuellement développés pour diverses applications biomédicales et ceci requiert une bonne innocuité. C'est dans cette optique que le ligand doit être choisi de manière judicieuse. La section 1.3 de ce mémoire, consacrée au polyéthylène glycol (PEG), aborde plus en détail les principaux avantages d'employer ce polymère, notamment afin de rendre les nanoparticules d'or biocompatibles. Par exemple, dans le cas des nanobâtonnets d'or utilisés en OCT, le ligand avec lequel ceux-ci sont synthétisés doit être remplacé par du PEG.⁵³ Sinon, le surfactant qui les stabilise (du CTAB – ou bromure de cétyltriméthylammonium) est fortement cytotoxique. En effet, le CTAB est cationique et peut donc interagir avec la membrane cellulaire, car la bicoche lipidique est globalement chargée négativement.⁵⁷ L'interaction peut alors mener

à la lyse de la cellule. Notons que les nanoparticules neutres ou chargées négativement sont généralement moins toxiques – et plus stables en milieu biologique – que celles qui sont chargées positivement.⁵⁷⁻⁵⁹

Une revue publiée par Cole et al.⁵¹ concernant l'utilisation de nanoparticules d'or comme agent de contraste en imagerie aux rayons-x chez l'animal recense plus d'une dizaine d'études dans lesquelles des AuNP de différentes tailles sont stabilisées par divers ligands (citrate, PEG acide folique, etc.). Dans tous les cas, aucune toxicité n'a été démontrée.

Par ailleurs, Lee et al.⁶⁰ ont démontré que lors d'une seule injection intraveineuse de AuNP dans des souris (1 mg/kg), leur circulation dans le sang et les voies d'excrétion dépendent du ligand employé. Des AuNP stabilisées par du PEG s'accumulent par exemple principalement dans les ganglions lymphatiques mésentériques, dans les reins, au cerveau et dans les testicules. Dans les ganglions lymphatiques, près de 12 µg de ces nanoparticules par gramme d'organe étaient retrouvés 24 heures post-injection, alors qu'environ 4 µg/g étaient toujours présents au bout de 6 mois. *In vivo*, les AuNP de cette étude n'ont cependant démontré aucune toxicité, mais la quantification des AuNP dans l'urine et la bile a permis de déterminer que l'élimination des organes était lente.

Lors des quelques essais cliniques mentionnés précédemment, aucune toxicité n'a été démontrée.^{49, 50} Néanmoins, notons que malgré toutes les recherches récentes, les impacts à long terme des nanoparticules d'or sur la santé humaine mais également sur l'environnement demeurent encore largement méconnus.⁵⁶

1.3 Le polyéthylène glycol

Le polyéthylène glycol, ou PEG, est le polymère qui a été choisi pour servir de ligand aux nanoparticules d'or synthétisées. Dans notre cas, le PEG doit posséder un groupement thiol pour pouvoir stabiliser adéquatement les nanoparticules (Figure 4), tel que cela a été expliqué précédemment. Le fait d'avoir un groupement thiol améliore par ailleurs habituellement le caractère mucoadhésif des polymères,⁶¹ tel qu'abordé à la section 1.4 et présenté plus détaillé au chapitre 6. C'est dans cette optique que du PEG possédant un thiol à ses deux extrémités est aussi employé, de manière à en avoir un qui stabilise la

nanoparticule et un second qui devrait être plus disponible à la surface de celle-ci (voir la synthèse des AuNP au chapitre 3). Brièvement, la littérature présente deux aspects contradictoires du caractère mucoadhésif du PEG.⁶² Il en ressort généralement que ce polymère peut effectivement présenter un caractère mucoadhésif intrinsèque,⁶³ grâce notamment à l'entrelacement ou à l'interpénétration de ses longues chaînes avec les mucines. Mais au contraire, il est rapporté que le PEG de faible masse molaire n'est par exemple pas mucoadhésif lorsque présent à haute densité à la surface de nanoparticules de polystyrène (dans ce cas, les cœurs hydrophobes des particules polymériques ne sont plus disponibles).^{63, 64}

Enfin, le caractère à la fois hydrophile et hydrophobe du PEG lui permet d'être soluble dans l'eau et dans les solvants organiques. Différentes longueurs (masses molaires) et fonctions en bout de chaîne sont disponibles. Le PEG est un polymère sécuritaire et non toxique, et la FDA a approuvé plusieurs produits contenant du PEG pour l'usage sur les êtres humains. Il capte 2 ou 3 molécules d'eau par monomère, augmentant considérablement la solubilité et diminuant l'agrégation des composés qui lui sont liés. Il réduit également leur l'immunogénicité, et notamment en ce qui concerne les AuNP.^{35, 65} Par ailleurs, le PEG est déjà utilisé dans des vecteurs de médicaments, par exemple pour des molécules anticancéreuses. Les détails concernant les propriétés d'encapsulation de médicaments des AuNP développées pour ce projet sont présentés au chapitre 4.

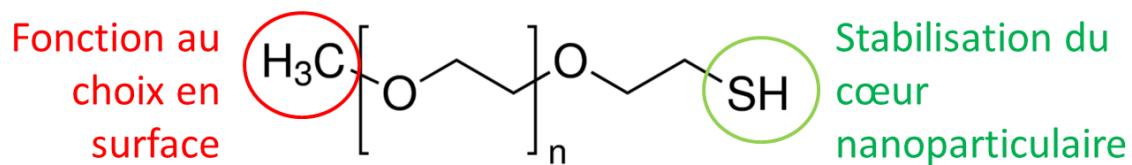


Figure 4 : Le polyéthylène glycol. Pour la synthèse de nanoparticules d'or, il faut qu'une des extrémités contienne un groupement thiol (-SH). L'autre extrémité de la molécule peut être constituée de divers groupements. Ici, le groupement méthyle rend la molécule chimiquement inerte.

1.4 Le film pré-cornéen et les mucines

Afin d'améliorer l'administration topique de médicaments contre le glaucome, il est important de connaître la structure de la surface de l'œil. Le film pré-cornéen – ou film lacrymal – est une structure trilamellaire qui repose sur l'épithélium cornéen (Figure 5). Il est constitué, en surface, d'une couche lipidique composée de lipides polaires comme des phospholipides, et de lipides non polaires comme des esters de cholestérol ou des esters de cires.⁶⁶ Les lipides contribuent notamment à empêcher l'évaporation excessive des larmes.⁶⁷ On retrouve, sous la couche lipidique, une couche aqueuse qui provient majoritairement des glandes lacrymales, mais également des cellules épithéliales de la cornée et de la conjonctive.⁶⁷ On y retrouve différents électrolytes, des métabolites, de même que des protéines. Plusieurs de ces protéines sont impliquées, entre autres, dans la réponse inflammatoire ou dans le processus de réparation des blessures.⁶⁶ Finalement, la troisième couche du film pré-cornéen est la couche dite « mucoïde ». Elle est constituée principalement d'eau, d'électrolytes et de mucines, qui sont des protéines de hauts poids moléculaires (0,5 à 20 MDa) fortement glycosylées.^{67, 68}

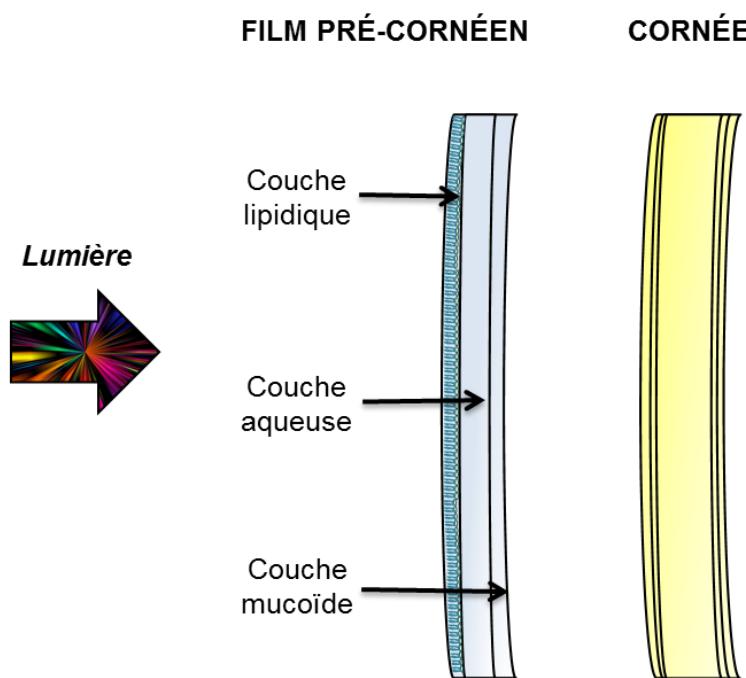


Figure 5 : Représentation du film pré-cornéen, qui repose sur la cornée. Il est composé de trois couches : la couche lipidique, en surface, la couche aqueuse, et la couche mucoïde.

Les mucines

Les mucines sont soit transmembranaires ou soit sécrétées. Dans le cas où elles sont sécrétées, elles sont divisées en deux catégories : celles qui peuvent former un gel, et celles qui n'en forment pas.⁶⁷ Les mucines sont produites par plusieurs systèmes du corps humain (digestif, reproducteur, respiratoire, etc.), et leur composition varie selon l'organe et l'individu.⁶⁹ Dans tous les cas, elles sont enrobées d'oligosaccharides (environ 5-15 monomères) via *N*- et *O*-glycosylation de leurs résidus asparagine, et sérines/thréonines, respectivement.⁶⁸⁻⁷⁰ Jusqu'à 80 % de la masse d'une mucine peut provenir des différents sucres qui la composent (N-acétylgalactosamine, N-acétylglucosamine, etc.), le 20 % restant étant attribuable à la protéine centrale. Il est important de noter que les mucines comportent certaines régions particulièrement riches en cystéines (>10 % des acides aminés), et donc en groupements thiols.⁶⁸ Elles peuvent par conséquent former de nombreux ponts disulfures, et donc des dimères ou des multimères.⁶⁷ Les mucines comptent pour 2 à 5 % de la masse totale du mucus gastro-intestinal, cervical, oculaire, nasal et respiratoire, le reste étant majoritairement attribuable à l'eau (90-98 %).⁷¹ Au moins 20 gènes de mucines ont été identifiés chez l'humain, et ceux-ci produisent MUC1, **MUC2**, MUC3A, MUC3B, MUC4, **MUC5AC**, **MUC5B** (aussi connu sous le nom de MUC9), **MUC6**, **MUC7**, **MUC8**, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, **MUC19**, MUC20 et MUC21. Les mucines sécrétées sont indiquées en gras; celles qui forment un gel sont MUC2, MUC5AC et MUC5B, MUC6 et MUC19, alors que celles ne formant pas de gel sont MUC7 et MUC8. Les autres mucines sont transmembranaires.⁶⁷

La mince couche mucoïde de la surface oculaire atteint environ 1 μm d'épaisseur.⁶⁷ Les mucines sécrétées sont produites majoritairement par les cellules à gobelet de la conjonctive, alors que les cellules apicales de la cornée expriment pour leur part des mucines transmembranaires pour former le glycocalyx.^{67, 72} Les mucines ont plusieurs fonctions importantes, dont celles de stabiliser l'ensemble des trois couches du film pré-cornéen, d'hydrater et lubrifier la surface oculaire et servir d'antiadhésif pour les cellules de la cornée et de la conjonctive lors du clignement des yeux. Elles contribuent enfin à la barrière épithéliale qui empêche les pathogènes de pénétrer dans l'oeil.⁶⁷ Les principales mucines que l'on retrouve à la surface oculaire sont MUC 1, 4, 5AC et 16.⁶⁷

Chapitre 2 – Problématique, hypothèse et objectifs

2.1 Problématique

La biodisponibilité des médicaments ophtalmiques appliqués par voie topique est toujours très faible. En effet, de nombreuses études pharmacocinétiques ont démontré qu'une très petite quantité de molécules actives ainsi administrées parviennent à atteindre la chambre antérieure de l'œil (de 0,0006% à 0,02% environ).⁷³⁻⁷⁶ Cela s'explique par plusieurs facteurs. Par exemple, le faible volume du cul-de-sac conjonctival, permettant de retenir les liquides dans l'œil, n'est que d'environ 10 µL, soit 1/5 du volume d'une goutte. Le drainage nasolacrymal est également 100 fois plus important que le taux d'absorption cornéenne.⁷⁷ Il s'en suit une dilution et un écoulement du médicament. Outre le clignement des yeux et le larmoiement, la molécule doit ensuite traverser le film pré-cornéen ainsi que trois barrières cornéennes : l'épithélium (et les jonctions serrées), le stroma et l'endothélium.^{77, 78} En conséquence, pour contrer la faible biodisponibilité des médicaments, les doses (concentrations) des médicaments appliqués doivent être relativement importantes.

Bien qu'on ne leur attribue pas d'effets secondaires systémiques, les analogues de la prostaglandine sont néanmoins associés à quelques effets secondaires locaux qui sont susceptibles de diminuer l'observance du patient à son traitement, et donc d'affecter l'efficacité de la médication.² En effet, il est rapporté que ces molécules peuvent changer la couleur des yeux en accentuant la composante brune de l'iris. Elles peuvent aussi accentuer la couleur des cils et en accroître la longueur, l'épaisseur et le nombre.^{6, 15}

Il a été proposé que le travoprost pourrait être encore plus sécuritaire si sa concentration était diminuée. À cet effet, une formulation de travoprost ayant une concentration de 0,003 % au lieu de 0,004 % est présentement en développement. Une étude récente (2015) fait état d'une diminution de la pression intraoculaire aussi efficace sur 3 mois lorsque la concentration de l'agent actif est diminuée jusqu'à cette concentration.² En revanche, la comparaison concernant les effets secondaires est difficile, car les deux solutions de travoprost ne contenaient pas le même agent de conservation : celle à 0,004 % contenait du

BAK, contrairement à celle à 0,003 % qui contenait du polyquaternium-1, qui est, comme le *sofZia®*, un produit mieux toléré causant moins d'hyperémie (yeux rouges).²

2.2 Hypothèse

En optimisant le mode d'administration par voie topique du travoprost, il devrait être possible de diminuer la concentration du principe actif et de réduire sa fréquence d'application. En effet, si un vecteur de médicament adhère mieux à la surface oculaire, le temps de résidence ainsi que l'efficacité du médicament seront augmentées.

Notre hypothèse pour ce projet est que des nanoparticules d'or peuvent servir de vecteurs afin d'encapsuler des médicaments et se lier, de manière réversible, aux mucines du film pré-cornéen afin d'assurer un relargage plus efficace des médicaments antiglaucomes. La Figure 6 illustre le processus.

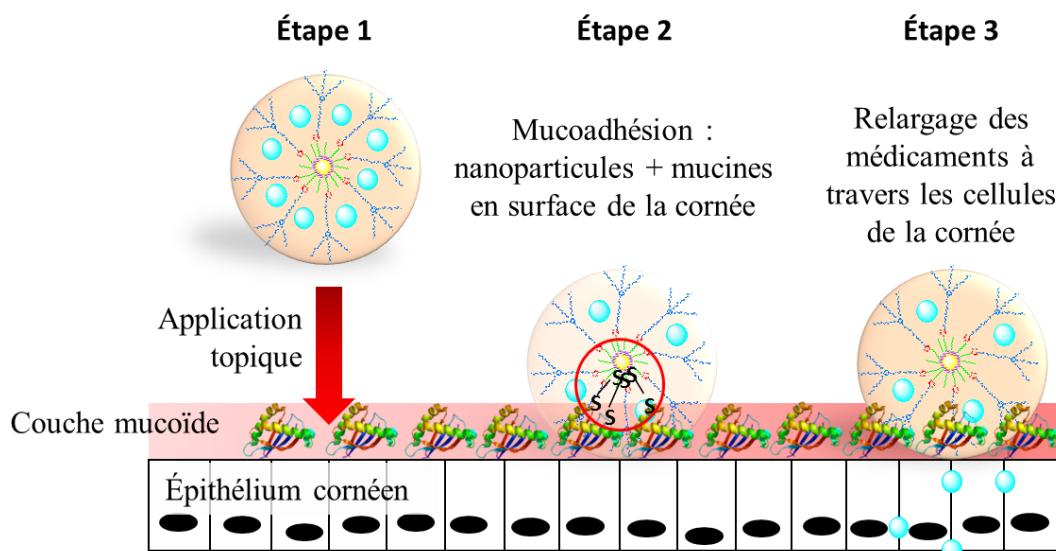


Figure 6 : Représentation de l'hypothèse de recherche. Une nanoparticule d'or ayant encapsulé des médicaments antiglaucome (boules bleues) se lie aux mucines du film pré-cornéen avant de relarguer son contenu. La liaison mucine-AuNP via l'interaction des cystéines de la protéine est représentée à l'étape 2.

Les AuNP peuvent se lier aux mucines principalement de deux manières. La première stratégie de la mucoadhésion, tel qu'abordée brièvement dans la partie consacrée au PEG, est illustrée par l'entrelacement ou l'interpénétration des mucines et des ligands d'une particule (par exemple les longues chaînes de PEG). Ces interactions surviennent par le biais de ponts hydrogène, ou encore par des interactions électrostatiques ou hydrophobes.^{62, 78, 79} La Figure 7 représente cette stratégie.

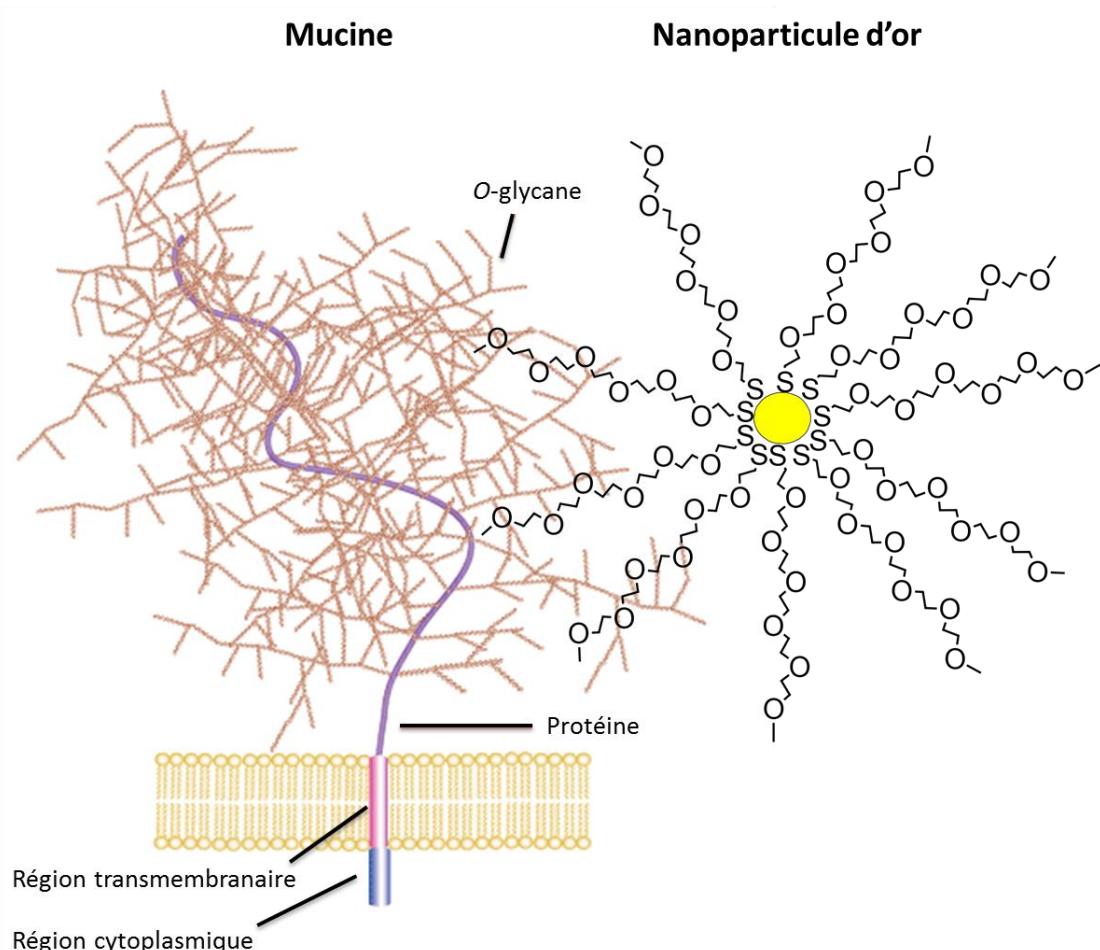


Figure 7 : Représentation de la première stratégie de mucoadhésion. La nanoparticule d'or peut interagir avec les mucines via l'entrelacement de ses grands ligands PEG. Image adaptée de Sigma-Aldrich Co.⁸⁰

Une approche plus récente et plus prometteuse consiste à tenir compte des cystéines présentes dans les mucines pour se lier avec les particules qui servent dans le cas présent de

vecteurs de médicaments. De plus en plus de thiomères (polymères comportant des soufres) sont en effet développés dans cette optique. Par exemple, des microparticules d'acide polyacrylique (PAA) voyaient leurs propriétés mucoadhésives tripler lorsque le PAA était thiolé.⁶¹ La thiolation de l'alginate, de dérivés de cellulose, de pectine et de chitosan ont également démontré des résultats similaires.⁶¹ L'avantage d'utiliser des nanoparticules d'or pour ce projet est qu'elles sont stabilisées par des groupements polyéthylène glycol thiolés, ce qui signifie qu'une seule nanoparticule contient un très grand nombre de fonctions thiols qui sont donc susceptibles d'interagir avec les cystéines des mucines.⁶¹ Par ailleurs, les cystéines pourraient aussi se lier directement au cœur métallique. C'est cette stratégie récente qui est représentée à la Figure 6 décrivant notre hypothèse de recherche. Jusqu'à maintenant, il n'existe pas d'informations dans la littérature concernant la mucoadhésion des nanoparticules d'or. La nouveauté de ce projet de recherche repose donc sur les éventuelles propriétés mucoadhésives des AuNP.

2.3 Objectifs

L'objectif principal de mon projet de recherche consiste à concevoir un nouveau vecteur de médicaments à base de AuNP permettant d'améliorer la médication contre le glaucome. Le premier objectif spécifique porte sur la synthèse, la purification et la caractérisation physicochimique de divers types de nanoparticules d'or. Ensuite, le deuxième objectif spécifique consiste à étudier leur capacité à encapsuler la molécule de travoprost. Enfin, le troisième objectif spécifique vise à évaluer les propriétés mucoadhésives des différentes AuNP.

Chapitre 3 – Synthèse de nanoparticules d’or

3.1 Introduction

Dans la suite du texte, les nanoparticules d’or stabilisées par du PEG 800-SH, du PEG 2000-SH ou du PEG 6000-SH sont nommées AuNP 800, AuNP 2000 et AuNP 6000, respectivement. Les AuNP 2000 qui sont également stabilisées par du PEG 1000 double thiol, suite à un échange de ligand, sont nommées AuNP double thiol.

Dans ce chapitre, l’accent est porté sur la synthèse et la caractérisation des AuNP 2000 et AuNP double thiol, car c’est avec ces nanoparticules qu’une grande partie des résultats de vectorisation de médicaments (chapitre 4) et presque la totalité des résultats de mucoadhésion (chapitre 5) ont été obtenus. D’autres AuNP ont été synthétisées (AuNP 800 et 6000), mais avec l’obtention de résultats de mucoadhésion prometteurs pour les AuNP 2000, nous avons alors orienté nos études principalement sur ces nanoparticules et sur leur équivalent possédant une fonction thiol en surface (AuNP double thiol) à des fins de comparaison.

3.2 Matériel et méthodes

Matériel

L’acide chloraurique trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), le bromure de tétraoctylammonium (TOAB), le borohydrure de sodium (NaBH_4), l’acide chlorhydrique (HCl), l’acide nitrique (HNO_3), le chlorure de sodium (NaCl) et le sulfure de sodium (Na_2S) ont été achetés chez VWR. Le polyéthylène glycol méthyléther thiol de 800 g/mol (PEG 800-SH), le PEG 6000-SH et le PEG 1000 double thiol (ou dithiol) ont été achetés chez Sigma. Le PEG 2000-SH a été acheté chez Laysan Bio. Le dichlorométhane (CH_2Cl_2) et le méthanol (MeOH) proviennent de chez Fisher.

Synthèse

Nous utilisons une méthode de synthèse des nanoparticules d’or adaptée de Oliveira.⁴⁵ Il s’agit en fait d’une méthode de Brust modifiée, car elle est réalisée en une seule phase

(*single phase*) et ne requiert par conséquent pas d'agent de transfert de phase (le TOAB), qui sert également d'agent de stabilisation. Pour les applications médicales, il s'agit d'une bonne chose puisque cela permet d'éviter la contamination ionique de ce composé.⁸¹ Le polyéthylène glycol (PEG) étant soluble à la fois dans l'eau et dans les solvants organiques, il est possible de réaliser toute la synthèse dans l'eau, jusqu'à l'étape de l'extraction.

Les synthèses des différents types de AuNP ont dû être adaptées pour tenir compte des particularités de chaque polymère, comme par exemple leur capacité à bien stabiliser le cœur nanoparticulaire. L'annexe A du présent chapitre décrit en détail comment ont été synthétisées les AuNP 2000.

Un excès de 10 équivalents de NaBH₄ par rapport à la quantité d'or (HAuCl₄) est employé, ce qui est généralement le cas pour la méthode de Brust.⁸² Un tel excès est nécessaire pour assurer une croissance homogène des nanoparticules. D'autre part, l'excès de NaBH₄ est important puisqu'il permet de réduire des possibles ponts disulfure qui auraient été pu être créés entre deux groupements thiol du PEG, ce qui permet de s'assurer que la stabilisation du cœur nanoparticulaire en croissance s'effectue uniquement par des thiols et non par des ponts disulfure.⁸² Également, puisque nous ajoutons le NaBH₄ lentement durant la réaction afin d'éviter la réduction trop rapide de l'or et l'agrégation des nanoparticules, il est important de s'assurer qu'il y aura suffisamment d'agent réducteur dans le milieu réactionnel et qu'il n'aura pas été tout consommé en réagissant avec l'eau (formation bien visible de bulles générées par la formation d'hydrogène).

Purification

Les AuNP sont purifiées par extraction au dichlorométhane, puis par dialyse. Notons que les tubes de dialyse doivent être préalablement nettoyés afin d'éliminer diverses impuretés résultant de leur fabrication. Les procédures détaillées figurent dans les annexes B, C et D de ce chapitre.

On peut finalement lyophiliser un volume connu de AuNP puis peser le solide afin de déterminer leur concentration (annexe E de ce chapitre).

Échange de ligand

La Figure 8 illustre l'échange de ligand qui a lieu lorsqu'un second ligand thiolé est mis en présence de nanoparticules d'or stabilisées par un premier ligand thiolé. Un exemple détaillé d'échange de ligand réalisé (excès de 8 équivalents de PEG 1000 double thiol, durant 5 jours) est présenté en annexe F de ce chapitre.

On peut aussi modifier les conditions de l'échange (temps, nombre d'équivalents de PEG 1000 double thiol) de manière à évaluer quels sont les effets de ces changements sur la composition finale des AuNP double thiol.

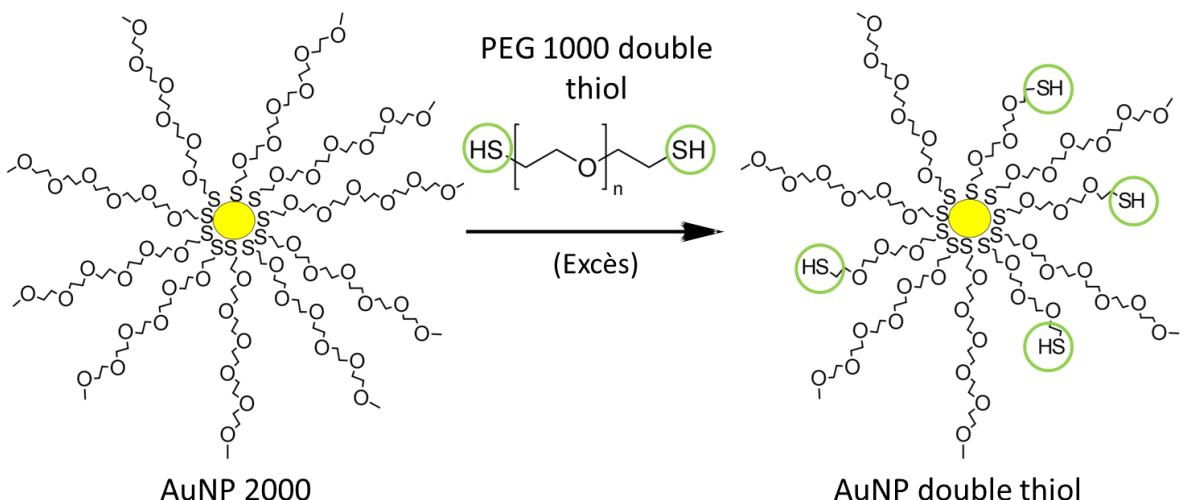


Figure 8 : Échange de ligand. Le PEG 2000-SH des AuNP est ici remplacé par du PEG 1000 double thiol.

Caractérisation

Certaines des techniques présentées dans cette section ont été utilisées dans les autres chapitres du mémoire, mais elles sont expliquées ici pour plus de clarté. Lors de la caractérisation, les propriétés générales des suspensions de nanoparticules seront décrites. Elles peuvent définir une propriété globale de la solution (spectroscopie UV-visible et analyse élémentaire) ou décrire la distribution des différentes nanoparticules présentes (diamètre hydrodynamique en diffusion dynamique de la lumière, diamètre du cœur métallique en microscopie électronique en transmission, et potentiel zéta).

Spectroscopie UV-visible

La spectroscopie UV-visible (UV-vis) est une technique d'analyse non destructive qui permet d'étudier l'environnement chimique autour des AuNP, grâce à la bande plasmon, de même que d'estimer leur taille, leur concentration et leur niveau d'agrégation.⁴³

Il est par exemple possible d'estimer la taille des AuNP en ne sachant que la longueur d'onde du pic de la bande plasmon, ou comparant l'absorbance au maximum de la bande plasmon à l'absorbance à 450 nm à l'aide de tables développées par Haiss et al.⁸³ Leurs résultats ont été obtenus pour des AuNP stabilisées par des citrates, qui sont des molécules très petites et qui ne contribuent que de manière négligeable au diamètre total. Ils ont également déterminé qu'il est possible d'estimer la concentration molaire de nanoparticules d'or en solution, grâce à leurs calculs du coefficient d'extinction molaire (ϵ) pour des nanoparticules allant de 2 à 100 nm de diamètre. Cependant, les AuNP de moins de 5 ou 10 nm, soit environ la taille de nos propres nanoparticules, sont très petites et donc sujettes à des effets de surface qui compliquent l'estimation des différents paramètres étudiés. Par ailleurs, nos AuNP ne sont pas stabilisées par des citrates mais plutôt par un polymère, qui modifie l'indice de réfraction de la surface (et conséquemment la bande plasmon).⁸³

On note souvent visuellement que des AuNP qui contiennent plus d'agrégats sont de couleur différente, plutôt bleues que rouges, et plus foncées. Cette observation est corrélée par des mesures en spectroscopie UV-vis, car quand des AuNP agrègent, leur bande plasmon se déplace à une plus grande longueur d'onde et devient plus large (effet de couplage de plasmon).⁸⁴

L'appareil utilisé au laboratoire est le Cary 50 UV-vis, de Varian. Lors des analyses, il faut s'assurer que l'intensité d'absorbance des échantillons ne dépasse pas 1 dans la région d'intérêt afin que la loi de Beer-Lambert soit valide et que l'absorbance demeure proportionnelle à la concentration.

Diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière, ou DLS, permet de prendre des mesures en conservant l'échantillon dans son environnement en solution. Les informations tirées

donnent des informations sur le diamètre hydrodynamique des particules. En effet, l'échantillon est illuminé par un laser dont la lumière est diffusée à différentes intensités par la présence de particules en solution. L'appareil analyse ces fluctuations d'intensité, qui peuvent être corrélées au mouvement brownien (mouvement aléatoire des particules dans un fluide), et, par conséquent, à la taille des particules. L'équation de Stokes-Einstein, qui prend notamment en compte la viscosité du milieu, est employée.⁸⁵ La DLS permet donc de déterminer la taille de particules du nanomètre au micromètre. Ses applications sont nombreuses pour déterminer la taille de diverses particules. Notons que la DLS ne mesure pas une propriété directe des nanoparticules, contrairement à la microscopie électronique en transmission, et elle « assume » par conséquent plusieurs conditions de départ comme la sphéricité des particules et une distribution unimodale (pour la méthode des cumulants). De plus, cette technique dépend de plusieurs facteurs définis par l'utilisateur tel que l'indice de réfraction, qui peuvent varier selon les matériaux et être difficiles à mesurer lorsqu'ils ne sont pas rapportés dans la littérature.

L'appareil qui a d'abord été employé, sur le campus de l'Université Laval, est le Zetasizer Nano ZS, de Malvern.⁸⁵ Puis, au laboratoire, nous avons acheté l'appareil NanoBrook Omni, de Brookhaven Instruments Corporation.⁸⁶ Lors des analyses, des valeurs des tailles en Intensité, en Volume et en Nombre sont obtenues. Les valeurs en Intensité sont « brutes », car elles proviennent directement de l'analyse des résultats bruts (la fonction de corrélation) par le logiciel. Le problème avec des données en Intensité est que la présence de très peu de grosses particules aura un effet considérable sur la quantité de lumière diffusée. En effet, suivant certaines approximations, la diffusion de la lumière est proportionnelle à la sixième puissance du diamètre (d^6).⁸⁷ Cela peut complètement masquer le signal de particules plus petites. Pour tenir compte de cet effet, des transformations mathématiques permettent d'obtenir des valeurs en Volume, puis éventuellement en Nombre. Également, le détecteur est placé de manière à capter la lumière qui est diffusée à 173° (*backscattering*) afin de réduire l'impact de possibles contaminations par des grosses particules (ex. de la poussière), qui diffusent principalement la lumière à de faibles angles.

L'image de gauche de la Figure 9 représente le diamètre hydrodynamique d'une nanoparticule d'or. Le cœur nanoparticulaire, en jaune au centre, les ligands qui y sont liés, de même que la sphère de solvatation contribuent au diamètre total.

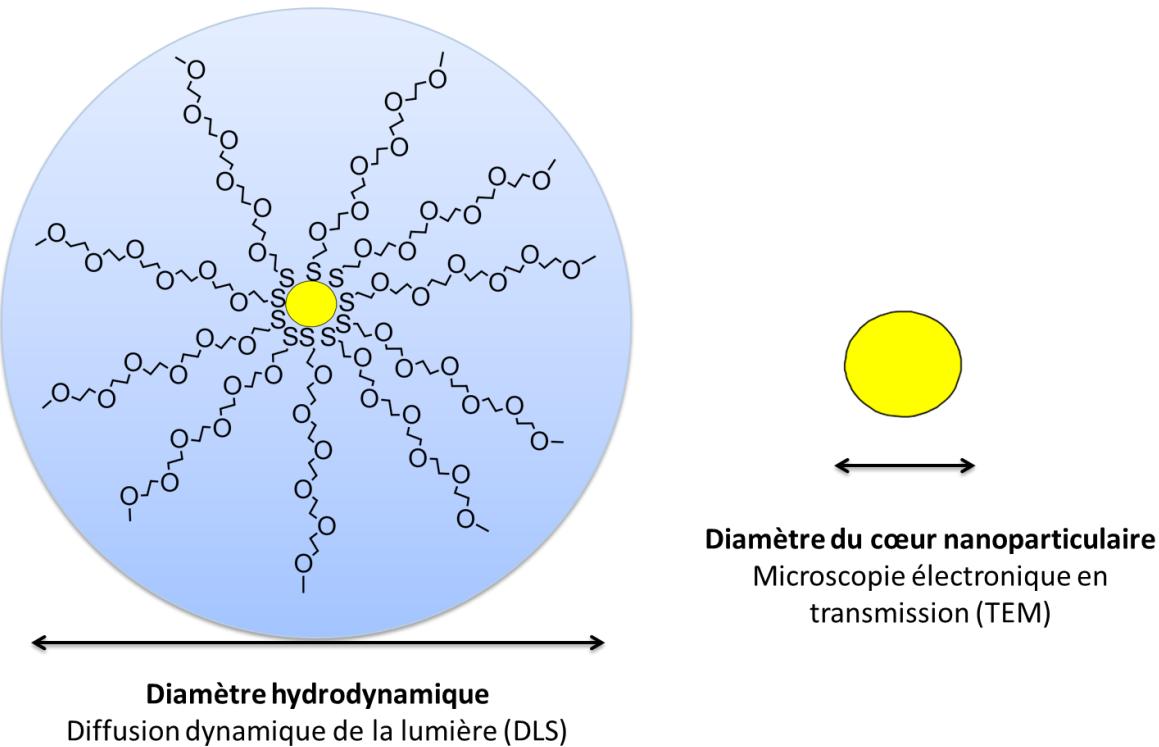


Figure 9 : Différence entre les informations fournies par la diffusion dynamique de la lumière (DLS) et par la microscopie électronique en transmission (TEM).

Mesure du potentiel zéta

Quand une nanoparticule d'or est en solution, il se produit un réarrangement des ions libres environnants pour former une fine région de densité de charge non nulle à proximité de l'interface. On nomme « double couche électrique » l'arrangement des charges à l'interface solide-liquide avec la présence de contre-ions. Directement contre la surface solide chargée, on retrouve une mince couche de contre-ions portant le nom de « couche compacte ». Ceux-ci sont immobiles à cause de la forte interaction électrostatique. Les contre-ions situés à l'extérieur de cette couche sont mobiles; ils font partie de la « couche diffuse ». Le

potentiel zêta (ζ) représente le potentiel électrostatique à la frontière entre la couche compacte et la couche diffuse.⁸⁸

Le potentiel Zeta étant calculé à partir de la mobilité électrophorétique, c'est-à-dire la vitesse à laquelle les particules bougent dans un champ électrique, il faut donc effectuer les mesures dans une solution conduisant l'électricité et non pas uniquement dans l'eau. De manière assez générale, une dispersion de colloïdes est très stable quand le potentiel zêta est inférieur à -30 mV ou supérieur à +30 mV.⁸⁹ En effet, la répulsion électrique entre les particules permet de les tenir à distance l'une de l'autre. Cependant, il ne s'agit pas du seul facteur dictant leur stabilité en solution; les interactions stériques y contribuent également. En outre, il est intéressant de noter que le PEG est connu pour sa capacité à stabiliser les nanoparticules tout en diminuant (en valeur absolue) le potentiel zêta.⁸⁹ D'ailleurs, la règle du -30/+30 mV n'est véritablement valable que pour la stabilité d'une solution de colloïdes; en ce qui a trait à la stabilité en milieu biologique, cela a été abordé à la section 1.2, il est préférable d'avoir des particules possédant une surface neutre ou négative. Notons également que le potentiel zêta peut varier grandement selon la force ionique (et la nature des ions) de la solution. En ce sens, le signe du potentiel zêta est souvent plus important que sa valeur absolue, qui change selon les conditions.

Les appareils ayant été employés pour mesurer le potentiel zêta sont les mêmes que pour prendre les mesures en DLS, et les mesures ont été analysées avec le modèle de Smoluchowski.

Microscopie électronique en transmission

La microscopie électronique en transmission (TEM), tout comme la DLS, est l'une des méthodes les plus utilisées pour déterminer le diamètre des AuNP. Tel que représenté à droite dans la Figure 9, cette technique ne permet cependant que de déterminer le diamètre du cœur nanoparticulaire.⁹⁰ En effet, une forte densité d'électrons dans le matériau étudié est nécessaire pour obtenir une image en TEM. Les cœurs métalliques des AuNP sont suffisamment denses pour bien les distinguer, mais les ligands ne le sont pas. On utilise donc la TEM pour déterminer la taille moyenne des cœurs nanoparticulaires des AuNP et leur distribution de taille. Par rapport à la DLS, il est par contre plus difficile de faire des

analyses de routine. En effet, il n'est pas possible de prendre des mesures rapidement ou de vérifier en temps réel la taille des nanoparticules. La TEM étant une technique d'analyse d'image, il faut donc compter un grand nombre de particules afin d'avoir des statistiques représentatives (plus de 50, mais idéalement environ 300 provenant d'images différentes).

L'appareil employé est le JEOL JEM 1230, disponible à l'Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes de l'Université Laval. Les grilles ont été préparées par M. Richard Janvier. brièvement, une goutte de solution de AuNP est déposée sur une grille de carbone, et laissée sécher durant au moins 5 jours. Les images ont ensuite été prises à un grossissement de 50 000x, avant d'être analysées avec le logiciel ImageJ afin de déterminer le nombre et la taille des nanoparticules d'or.

Analyse élémentaire

L'analyse élémentaire apporte des informations sur la composition (pourcentage massique) des éléments d'intérêt dans un composé donné. Dans le cas qui nous intéresse, il est utile d'avoir la composition en or et en soufre des AuNP. L'analyse élémentaire, lorsqu'elle est effectuée sur des nanoparticules ayant également été caractérisées en TEM, permet de déterminer la masse molaire moyenne des nanoparticules.

Pour l'analyse élémentaire, les échantillons sont envoyés aux Geoanalytical Laboratories du Saskatchewan Research Council (SRC). L'analyse du soufre s'effectue grâce à une fournaise à induction du modèle SC-144DR C/S, manufacturé par LECO. Le principe général est le suivant : l'échantillon est chauffé à très haute température sous oxygène pur. Lors de la combustion, le carbone est libéré en CO₂ et le soufre, en SO₂. Des cellules infrarouge (IR) mesurent éventuellement la concentration des gaz.⁹¹ En ce qui concerne le contenu en or des nanoparticules, il est déterminé par pyroanalyse (*fire assay*). L'échantillon est d'abord pesé, puis mélangé avec un fondant qui diminue notamment le point de fusion et favorise la séparation des composés indésirables. Un collecteur est également ajouté, par exemple du plomb. L'échantillon est alors chauffé, et le collecteur fusionne et s'amalgame avec les métaux précieux pour former un « bouton ». Une fois le bouton séparé du reste de l'échantillon (impuretés), les métaux précieux sont extraits du collecteur via un procédé de coupellation. Durant ce processus, le plomb est oxydé et

absorbé dans la coupelle, en ne laissant finalement qu'une goutte de métaux précieux, appelée « doré ». Le doré peut alors être dissout dans l'eau régale pour analyse (différentes techniques sont possibles).⁹² Dans le cas présent, l'analyse s'effectue par ICP-AES (spectroscopie d'émission atomique à plasma à couplage inductif). L'échantillon est aspiré dans un plasma extrêmement chaud, où l'or est détecté à une longueur d'onde caractéristique lorsque ses électrons ayant été excités perdent leur énergie en émettant un photon. Comme l'échantillon est ici analysé globalement, la purification préalable des échantillons est essentielle afin d'éviter une contamination qui pourrait faire varier les valeurs (par exemple avec du PEG non lié ou des sels d'or non-réduits).

À l'aide des images de TEM permettant de déterminer la taille du cœur nanoparticulaire, il est possible de calculer le nombre d'atomes d'or dans celui-ci. Puis, le nombre de soufre dans les nanoparticules est déterminé.³⁸ Un exemple détaillé de calcul de masse molaire pour les AuNP 2000 figure en annexe G.

3.3 Résultats

La Figure 10 montre les résultats de la synthèse de nanoparticules d'or stabilisées par du PEG 2000-SH (AuNP 2000). La coloration rouge des nanoparticules d'or (A) est causée par leur pic d'absorption caractéristique dans le spectre visible (appelé bande plasmon) à 521 nm, tel que mesuré par spectroscopie UV-visible (B). Les images en microscopie électronique en transmission (C) ont permis de déterminer que le diamètre moyen du cœur métallique est de 7 ± 3 nm. L'histogramme de distribution du diamètre du cœur est également présenté (D).

Notons que le diamètre hydrodynamique des AuNP 2000 est de 15 ± 3 nm et que celui des AuNP double thiol est de 27 ± 6 nm. Ces résultats, obtenus par DLS, sont présentés dans le manuscrit de l'article sur la mucoadhésion présenté au chapitre 5 mais sont néanmoins discutés dans le présent chapitre (section 3.4).

En ce qui concerne les AuNP 800 et AuNP 6000, les diamètres de leurs cœurs nanoparticulaires sont respectivement de 4 ± 2 nm et 5 ± 4 nm (résultats non montrés). Leurs diamètres hydrodynamiques sont de $11,1 \pm 0,1$ nm et $30,6 \pm 0,6$ nm (valeurs des pics

en Volume). Ces résultats sont présentés à la section 4.3 du prochain chapitre consacré à la vectorisation de médicaments mais sont également discutés dans le présent chapitre.

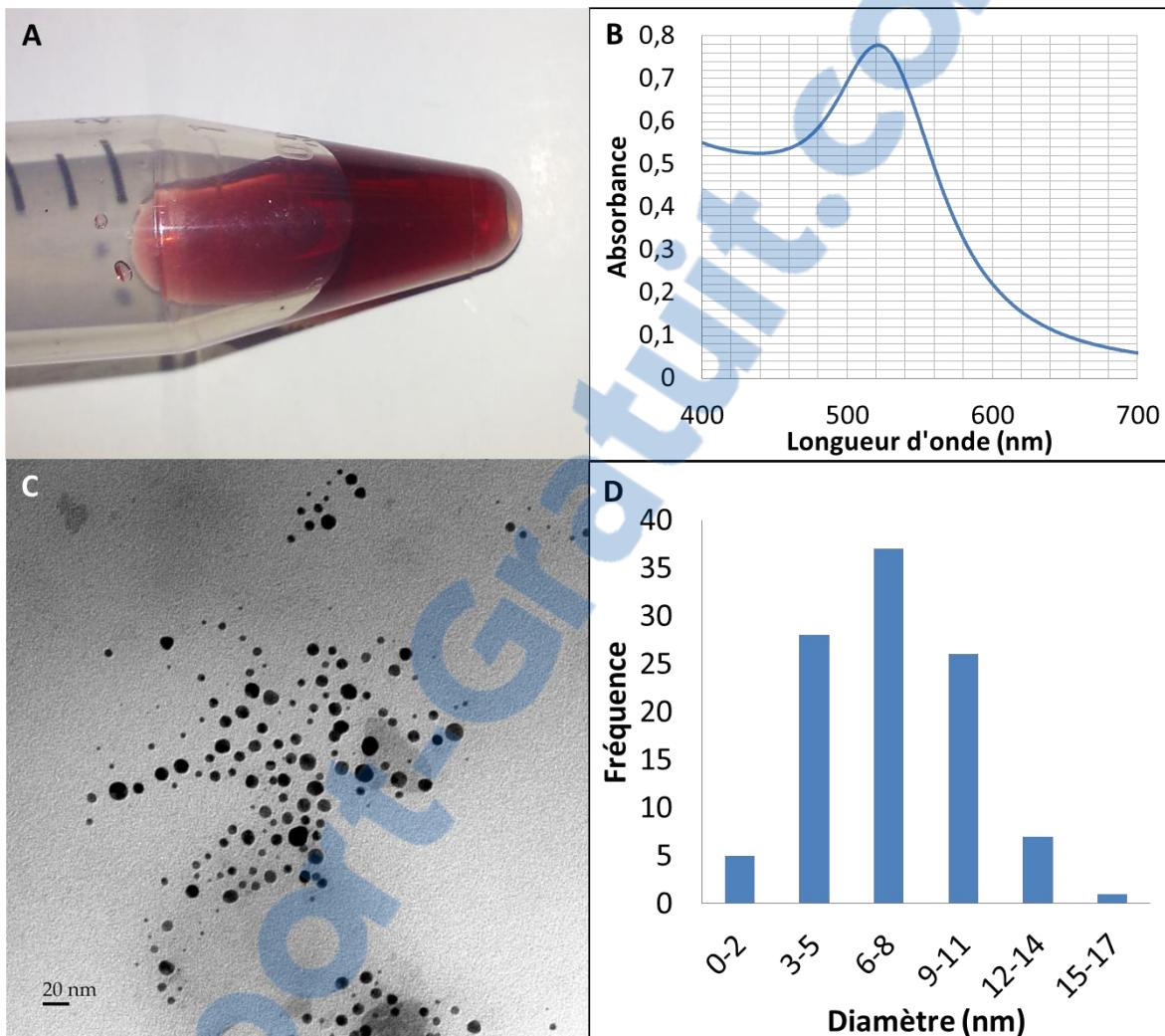


Figure 10 : Nanoparticules d'or synthétisées avec du PEG 2000-SH. Le panneau (A) présente une photo des nanoparticules d'or; celui en (B) leur spectre UV-visible; celui en (C) une image en TEM; et celui en (D) l'histogramme de distribution du diamètre du cœur nanoparticulaire obtenu en TEM.

La caractérisation des AuNP double thiol obtenues suite à un échange de ligand (excès de 8 équivalents, 5 jours) est détaillée sur la Figure 11. La microscopie électronique en transmission (A) a permis de déterminer que le diamètre moyen du cœur métallique est

également de 7 ± 3 nm. L'histogramme de distribution du diamètre nanoparticulaire (B) obtenu par TEM est aussi présenté.

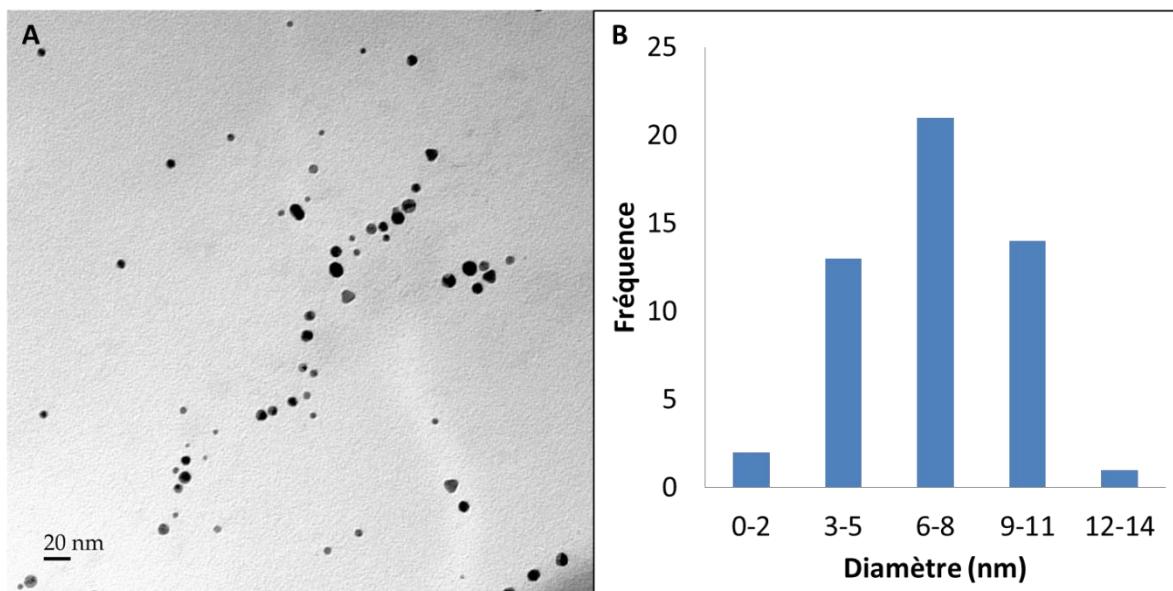


Figure 11 : Nanoparticules d'or synthétisées avec du PEG 2000-SH et ayant subi un échange de ligand PEG 1000 double thiol (excès de 8 équivalents, 5 jours). Le panneau (A) présente une image en TEM et celui en (B) l'histogramme de distribution du diamètre du cœur nanoparticulaire.

La Figure 12 présente les spectres UV-visibles des AuNP avant (en bleu) et après (en rouge) l'échange de ligand. Le pic de la bande plasmon passe de 521 nm à 527 nm.

Enfin, les résultats de l'analyse élémentaire permettent de calculer la masse molaire des AuNP. Pour les ligands utilisés, chaque atome de soufre est lié à un groupement PEG. En additionnant la masse du cœur et celle des ligands, on détermine la masse totale des AuNP. La masse molaire des AuNP 2000 est d'environ 7 460 000 g/mol, et celle des AuNP double thiol de 6 255 000 g/mol.

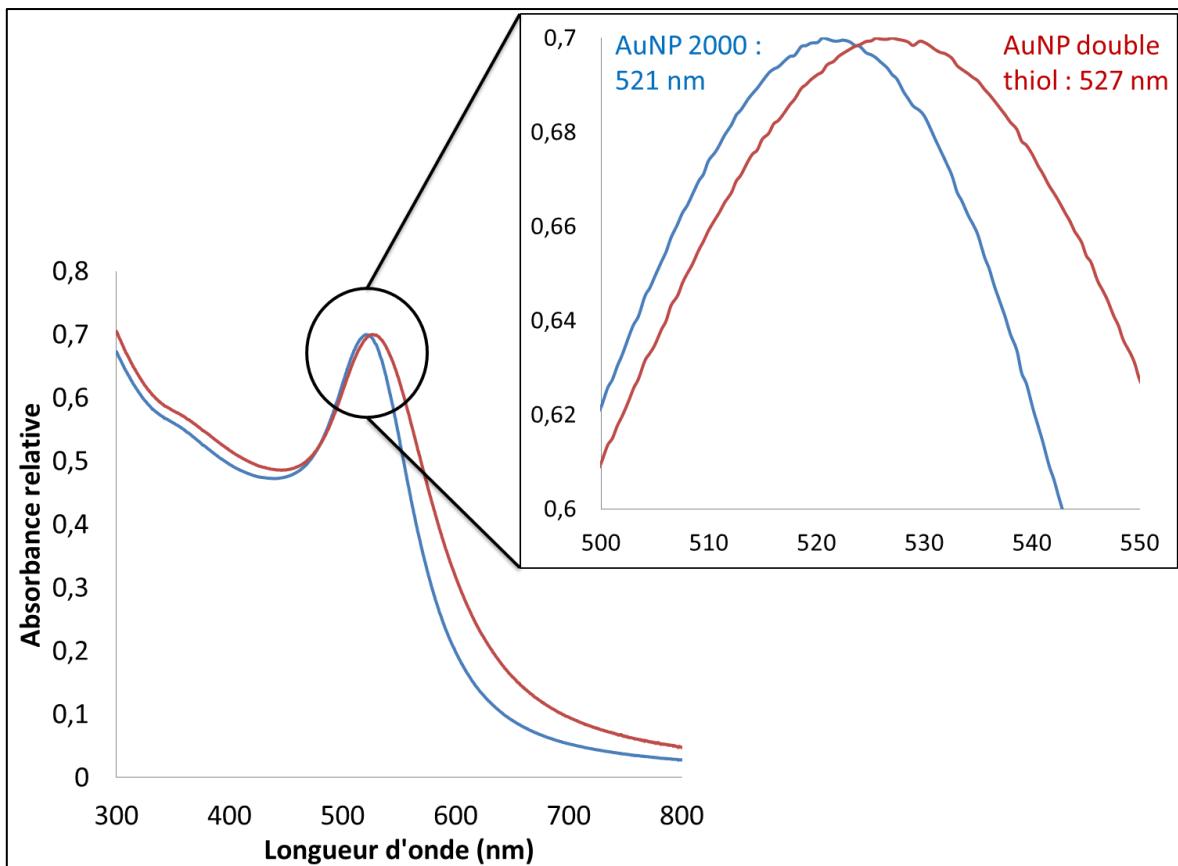


Figure 12 : Spectre UV-visible des nanoparticules d'or synthétisées avec du PEG 2000-SH avant (en bleu) et après (en rouge) échange de ligand PEG 1000 double thiol.

3.4 Discussion

Nos premières synthèses de AuNP étaient effectuées à l'aide d'agent stabilisant (le TOAB), mais il était préférable de tenter de s'en débarrasser le plus tôt possible lors du développement de nos méthodes, en vue de futures applications *in vivo*. C'est pourquoi les méthodes de synthèse sans cet agent ont été développées, en les adaptant de la littérature.⁴⁵ Des nanoparticules d'or ont donc été synthétisées selon une méthode de Brust modifiée. Pour les AuNP 800 et 2000, il a été possible d'effectuer la synthèse sans utiliser d'agent de stabilisation (le TOAB). Par ailleurs, comme le PEG est déjà très soluble dans l'eau, il n'est de toute façon pas utile d'utiliser ses propriétés d'agent de transfert de phase. Tel que mentionné précédemment, cela évite de possibles contaminations de ce composé toxique. Par contre, la stabilisation du cœur nanoparticulaire en croissance des AuNP 6000 semble

plus difficile; il faut donc quand même utiliser le TOAB dans ce cas. En effet, étant donné que ce sont les thiols qui stabilisent la nanoparticule, ils doivent pouvoir interagir rapidement avec le cœur. Or, le PEG 6000-SH possède une masse molaire élevée par rapport aux autres ligands utilisés. En conséquence, il est possible que le thiol de la molécule soit plus difficile d'accès à cause de l'encombrement stérique.

La mauvaise reproductibilité de la synthèse de nanoparticules d'or d'un lot à l'autre est bien connue.³⁹ Si la synthèse des nanoparticules d'or est délicate et très sensible aux conditions de synthèse dans le cas de la méthode de Brust originale, elle l'est encore plus en absence d'agent de stabilisation. D'abord, la taille du cœur nanoparticulaire dépend du ratio thiol:or utilisé, de la vitesse d'addition de l'agent réducteur, et de la température.^{82, 93} Dans la méthode employant l'agent de stabilisation, il a été proposé que lors d'une addition lente du NaBH₄, de très petites nanoparticules sont formées initialement (à cause d'un ratio thiol:or plus élevé), alors que plus tard dans le processus, de plus grosses nanoparticules sont formées car des thiols ont déjà été consommés. Cela augmente donc la polydispersité. En revanche, lors d'une addition rapide de NaBH₄, la nucléation s'effectue de manière plus rapide, à un ratio thiol:or plus constant, ce qui produit des cœurs nanoparticulaires plus uniformes.⁹³ Le problème, lorsqu'aucun agent de stabilisation n'est employé, est que l'ajout rapide du NaBH₄ (généralement sur une dizaine de seconde⁹³) mène inévitablement à une croissance incontrôlée des nanoparticules et donc à leur agrégation.

Par ailleurs, il est connu que certains PEG complexent et réduisent l'Au³⁺ en Au⁰ (donc en nanoparticule d'or – ou AuNP) via le clivage oxydatif du lien C-O par l'Au³⁺.⁹⁴ Ainsi, dans le cas des AuNP synthétisées avec du PEG, toutes ces réactions ont lieu :

- la réduction de l'Au³⁺ en AuNP (ou Au⁰) par le PEG;
- la réduction de l'Au³⁺ en Au⁺¹ par les groupements thiols présents sur le PEG;³⁰
- la réduction complète par le NaBH₄.

À noter que dans le cas des AuNP 2000, par exemple, il était possible de laisser le HAuCl₄ en présence du PEG 2000-SH pendant 3 heures sans problème avant l'addition de NaBH₄. En revanche, lorsque du PEG 800-SH était utilisé, il se formait de l'agrégation au bout de moins 45 minutes et la solution devenait foncée. Ce résultat était inattendu, car il est rapporté qu'augmenter la longueur de chaîne du PEG conduit au contraire habituellement à

une meilleure réduction de l'or.⁹⁵ Mais cela pourrait s'expliquer par le fait que la synthèse était effectuée avec un nombre de mole plus élevé de PEG 800-SH que de PEG 2000-SH.

La taille du cœur nanoparticulaire des AuNP 800 est de 4 ± 2 nm, ce qui est semblable à ce qui a été obtenu lors de la synthèse des AuNP 6000 (5 ± 4 nm). Cela s'explique par le fait que la méthode de Brust produit toujours des nanoparticules ayant un cœur de petit diamètre. En revanche, tel que cela sera présenté plus en détail dans le prochain chapitre consacré à la vectorisation de médicaments, leurs tailles en DLS sont différentes. Cela est attribuable aux ligands utilisés, car ils confèrent aux AuNP un diamètre hydrodynamique différent. Dans ce cas, les AuNP 6000 sont plus grosses que les AuNP 800 ($30,6 \pm 0,6$ nm vs. $11,1 \pm 0,1$ nm) parce que le ligand est plus volumineux.

Les images de microscopie électronique en transmission à la Figure 10 et à la Figure 11 indiquent que l'échange de ligand sur les AuNP 2000 (excès de PEG 1000 double thiol de 8 équivalents durant 5 jours) n'induit pas d'agrégation des nanoparticules d'or, puisque la taille du cœur nanoparticulaire demeure la même pour les AuNP double thiol (7 ± 3 nm). C'est ce à quoi nous nous attendions, car lorsqu'un ligand est échangé pour un second, la nanoparticule reste tout de même stabilisée par ses autres ligands tout au long du processus d'échange.^{38, 96} En revanche, la Figure 12 illustre que le spectre UV-visible des AuNP double thiol est modifié suite à l'échange de ligand. La bande plasmon est affectée, passant de 521 à 527 nm. Ce décalage vers le rouge (*redshift*) de 6 nm est significatif, et on peut l'attribuer au fait que l'environnement chimique autour du cœur nanoparticulaire est modifié. Le déplacement de la bande plasmon est caractéristique des nanoparticules sur lesquelles on modifie les ligands. Par exemple, il est rapporté que passer de ligands aliphatiques à des ligands aromatiques a pour effet d'induire un important décalage vers le rouge, car la délocalisation des charges à la surface du cœur nanoparticulaire est facilitée, et la nature des transitions électroniques est modifiée.⁹⁷ Dans notre cas, cependant, le ligand reste du polyéthylène glycol et le décalage ne peut pas s'expliquer par une telle modification de la nature des ligands. Il est en revanche possible que l'ajout de PEG double thiol aux AuNP 2000 puisse 1) s'échanger contre un ou plusieurs PEG 2000-SH, et peut-être se replier pour se lier à l'or via ses deux groupements thiols et 2) augmenter la densité des ligands présents sur la nanoparticule, le PEG supplémentaire arrivant à s'insérer au

milieu des molécules déjà présentes.⁸² Quoi qu'il en soit, il est probable que le décalage vers le rouge observé soit causé par une augmentation du nombre de groupements thiols sur le cœur de la nanoparticule. Cela a pour effet de réduire la densité d'électrons libres à la surface, ce qui réduit la fréquence de la résonance des électrons, menant par le fait même à un décalage vers le rouge de la bande plasmon (fréquence plus faible = longueur d'onde plus grande).⁹⁸ La différence dans le diamètre hydrodynamique des AuNP 2000 et AuNP double thiol (15 ± 3 nm vs. 27 ± 6 nm) est justement attribuable au fait que suite à l'échange de ligand, plus de chaînes de PEG sont probablement présentes sur la nanoparticule, ce qui augmente le diamètre hydrodynamique. L'augmentation de la densité de ligands⁸² ou la formation de polymères entre les AuNP double thiol et les ligands PEG dithiol peuvent expliquer ce diamètre hydrodynamique accru.

Notons que les AuNP double thiol pouvaient être redissoutes dans l'eau lorsqu'elles avaient été séchées par lyophilisation, mais si elles étaient séchées à l'évaporateur rotatif (en chauffant), elles devenaient alors complètement insolubles. Cela peut s'expliquer par le fait que les AuNP qui sont stabilisées par un groupement thiol sont très stables dans des conditions de lyophilisation.⁸⁴ En revanche, chauffer du PEG résulte en une contraction de la pelote (*coil*),⁹⁹ ce qui pourrait dans notre cas expliquer l'agrégation observée si les AuNP double thiol forment trop de ponts disulfure entre elles. Les AuNP 2000 étaient pour leur part faciles à redissoudre peu importe le mode de séchage.

Enfin, une étude est présentement en cours afin de déterminer quels sont les effets de la quantité de ligand en excès et du temps durant un échange de ligand. Il devrait à terme être possible de déterminer les conditions expérimentales nécessaires afin d'obtenir un certain pourcentage d'échange de ligand. Bien sûr, il est fort probable que le choix du ligand influence l'échange, et il faudra vérifier si les résultats obtenus sont généralisables ou non.

3.5 Conclusion partielle

Différents types de nanoparticules d'or ont été synthétisées : AuNP 800, AuNP 2000, AuNP 6000, de même que AuNP 2000 ayant subi un échange de ligand PEG 1000 double thiol. Les AuNP 2000 et AuNP double thiol ont fait l'objet d'une caractérisation plus

poussée, car ces AuNP se sont révélées prometteuses lors de tests de mucoadhésion effectués en parallèle (chapitre 5). Dans chaque cas, les conditions de synthèse ont dû être adaptées. Les AuNP ont finalement pu être caractérisées à l'aide d'appareils disponibles directement à l'Hôpital du Saint-Sacrement, ou encore sur le campus de l'Université Laval. Il en ressort que procéder à un échange de ligand sur les AuNP 2000 ne change pas la taille du cœur nanoparticulaire. En revanche, cela modifie leur bande plasmon puisque l'environnement chimique est alors modifié autour du cœur.

3.6 Annexe

A - Synthèse des AuNP 2000

Laver toute la vaisselle à l'eau régale avant utilisation. Pour ce faire, ajouter 1 volume de HNO_3 à 3 volumes de HCl , puis laisser la coloration jaunâtre se développer avant d'utiliser immédiatement. Ne pas entreposer l'excédent. Attention, l'eau régale est extrêmement corrosive.

Note : le $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ commercial (1 g) a été dissout dans 10 mL d'eau dans une bouteille ambrée pour avoir une concentration de 0,100 g/mL. C'est la solution stock; une telle solution est stable dans le temps.¹⁰⁰

- 1- Fixer un erlenmeyer muni d'un bouchon sur la plaque agitatrice à l'aide d'un support métallique.
- 2- Ajouter 0,5 mL de la solution stock de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ à 0,100 g/mL (0,050 g, 0,127 mmol) à 15 mL d'eau et 15 mL de méthanol.
- 3- Ajouter 0,048 g (0,024 mmol) de PEG 2000-SH dissout dans 20 mL de méthanol.
- 4- Laisser agiter durant 1h30 (400 rpm) en recouvrant l'rlenmeyer de papier d'aluminium.

Pendant ce temps, mettre environ 50 mL d'eau dans un bêcher et 20 mL d'eau dans un cylindre gradué. Les refroidir au frigo. 15 minutes avant la fin du 1h30, faire passer de l'eau froide du bêcher dans la pompe péristaltique pour la refroidir et s'assurer qu'elle soit bien propre.

- 5- Ajouter une solution de 0,040 g (1,057 mmol) de NaBH₄ dissout dans 20 mL d'eau froide goutte à goutte à l'aide de la pompe péristaltique (1 mL/minute) en agitant vigoureusement.
- 6- Laisser agiter 3h⁸² en recouvrant l'erlenmeyer de papier d'aluminium.

B - Extraction

- 7- Transférer dans un ballon et évaporer le méthanol à l'évaporateur rotatif.
 - 8- Extraire avec 30 mL de dichlorométhane (2x 15 mL) en utilisant quelques mL de saumure pour forcer les AuNP à changer de phase.
- Note : Cette étape permet d'éliminer les différents sels le plus rapidement possible avant de procéder à la dialyse, qui éliminera le PEG excédentaire.
- 9- Évaporer le dichlorométhane à l'évaporateur rotatif.
 - 10- Redissoudre dans 10 mL d'eau en attendant de procéder à la dialyse.
 - 11- Conserver les nanoparticules à l'obscurité.

C - Lavage des tubes de dialyse en cellulose (adapté de Sigma-Aldrich)¹⁰¹

- 1- Couper la longueur de tube qui sera nécessaire et le mouiller le tube à ses extrémités pour l'ouvrir.

Éliminer le glycérol (inclus comme humectant)

- 2- Laver le tube (intérieur et extérieur) quelques fois à l'aide d'une pissette d'eau.
- 3- Mettre le tube vide dans 1 L d'eau dans un bécher de 4 L durant environ 1 heure; changer l'eau 3-4 fois entre temps.

Éliminer les composés soufrés

- 4- Mettre 4 bêcher d'eau (d'environ 300 ou 400 mL) à chauffer sous la hotte.
- 5- Parallèlement, préparer une solution d'acide sulfurique à 0,2 % V/V (0,2 mL/100 mL) dans un autre bécher de même taille.
- 6- Dans un des bêchers d'eau chaude, dissoudre du sulfure de sodium à 0,3 % m/V (0,3 g/100 mL). L'amener à 80 °C et conserver les 3 autres bêchers d'eau à 60 °C.
- 7- Plonger le tube dans la solution de sulfure de sodium durant 1 minute.

- 8- Laver le tube dans un des bêchers d'eau chaude à 60 °C durant 1 minute.
- 9- Transférer le tube dans un 2^e bêcher d'eau chaude à 60 °C durant 1 minute.
- 10- Plonger le tube dans la solution d'acide sulfurique pendant 3 minutes.
- 11- Plonger le tube dans le dernier bêcher d'eau chaude pendant 2 minutes.
- 12- Préparer un dernier bêcher d'eau à température de la pièce et y plonger le tube pendant la préparation de l'étape suivante.
- 13- Le tube de dialyse ainsi nettoyé est conservé vide, bien immergé dans l'eau, dans un tube de 50 mL.

Le tube de dialyse employé permet à des molécules de 12 000-16 000 g/mol de le traverser. Ainsi, le PEG et les sels peuvent être éliminés, mais les AuNP restent dans le tube.

D - Dialyse des nanoparticules d'or

- Replier 2 fois une extrémité d'un tube de dialyse préalablement nettoyé avant de la fermer à l'aide d'une pince.
- Mettre 1 mL de la solution de AuNP dans le tube de dialyse avec une micropipette et vérifier son étanchéité.
- Remplir le tube puis fermer la 2^e extrémité en laissant un peu d'air pour aider à la flottabilité. Vérifier l'étanchéité.
- Rincer l'extérieur du tube avec une pissette d'eau au-dessus d'un bêcher. Il ne devrait pas y avoir de coloration provenant des nanoparticules.
- Procéder à la dialyse sous agitation dans 3 L d'eau. Attention à la vitesse d'agitation; s'assurer que le tube n'est pas entraîné vers le fond.
- Protéger les AuNP de la lumière en recouvrant le gros bêcher de papier d'aluminium.
- *1ere dialyse : laisser au moins 2 heures, puis changer l'eau.*
- *2e dialyse : laisser au moins 3 heures, puis changer l'eau.*
- *3e dialyse : laisser au moins 16 heures.*

Note : dans le cas de très grosses synthèses ou lors d'un échange de ligand où l'on utilise beaucoup de PEG, il est nécessaire de dialyser plus longtemps.

- À la fin, vider le tube dans un bécher, puis transférer avec une micropipette les AuNP dans une bouteille ambrée en calculant le volume de la solution.
- Conserver les nanoparticules à l'obscurité.

E - Lyophilisation

- 1- Peser un tube vide de 2 mL, avec son bouchon, à l'aide d'une microbalance.
- 2- Mettre 200 μ L de la solution d'AuNP dans le tube.
- 3- **A)** Mettre le tube au congélateur à -20 °C durant 45 minutes.
B) Pendant ce temps, percer 2-3 trous dans un autre bouchon à l'aide d'une aiguille la plus fine possible chauffée à la flamme.
C) 5 minutes avant la fin du 45 minutes, ouvrir le lyophilisateur pour lui laisser le temps de refroidir au moins sous -40 °C.
- 4- Au bout de 45 minutes, sortir le tube du congélateur et rapidement remplacer le bouchon par un bouchon percé. Mettre à lyophiliser immédiatement.
- 5- Laisser lyophiliser environ 5 heures.
- 6- Arrêter la lyophilisation et rapidement remettre le bouchon non percé. Garder le bouchon percé pour utilisation ultérieure.
- 7- Laisser le tube reprendre la température ambiante, le peser et soustraire la masse du tube vide.

F - Échange de ligand

L'exemple suivant est pour un excès de PEG 1000 double thiol de 8 équivalents, et le temps de réaction est de 5 jours.

- a) Transférer les AuNP 2000 dans un ballon de 50 mL, puis ajouter 0,192 g (0,192 mmol) du ligand PEG 1000 double thiol.
- b) Mettre de l'argon dans le ballon puis bien le boucher.
- c) Couvrir de papier d'aluminium et laisser agiter durant 5 jours

Finalement, les AuNP ayant subi l'échange de ligand sont purifiées par dialyse, tel que décrit précédemment, mais cette fois-ci durant 5 jours.

G - Calcul de la masse molaire

Le volume d'un atome d'or Au(0) dans le cœur métallique est de 17 Å³.³⁸

Avec la TEM, on détermine le rayon des AuNP (en Å). Les équations suivantes peuvent alors être utilisées afin de déterminer le nombre d'atomes d'or dans le cœur nanoparticulaire. Pour les AuNP 2000 d'un diamètre de 7 nm, le rayon est de 35 Å :

$$\text{Volume du cœur nanoparticulaire} = \frac{4\pi \times (35 \text{ \AA})^3}{3} = 179594 \text{ \AA}^3$$

$$\text{Nombre d'atomes d'or dans le cœur} = \frac{179594 \text{ \AA}^3}{17 \text{ \AA}^3} = 10564 \text{ atomes}$$

Avec l'analyse élémentaire, on détermine le nombre de ligands sur le cœur nanoparticulaire. Pour les AuNP 2000, il y a 32,1 % d'or et 1,33 % de soufre (en masse).

$$\frac{10564 \text{ atomes d'or} \times 196,97 \text{ g/mol}}{32,1 \%} = \frac{\text{nombre d'atomes de soufre} \times 32,065 \text{ g/mol}}{1,33 \%}$$

$$\text{nombre d'atomes de soufre} = 2689$$

Un ligand est attaché à chaque soufre. Il y a donc 2689 ligands PEG 2000-SH dans ce cas.

On calcule finalement la masse molaire en additionnant le cœur et les ligands :

$$\text{Masse molaire} = 10564 \times 196,97 \text{ g/mol} + 2689 \times 2000 \text{ g/mol} = 7\,458\,791 \text{ g/mol}$$

Chapitre 4 – Vectorisation d'un médicament par des nanoparticules d'or

4.1 Introduction

Ce chapitre est consacré à l'étude de l'encapsulation du travoprost dans les nanoparticules d'or. Les analyses ont été réalisées majoritairement en parallèle avec la synthèse des différents types de AuNP (chapitre 3), principalement avant que les études de mucoadhésion ne soient commencées (chapitre 5). Lorsque les premiers résultats prometteurs de mucoadhésion ont été obtenus, notre étude s'est alors réorientée sur cet aspect du projet et un autre étudiant a pris la relève concernant les travaux de vectorisation.

4.2 Matériel et méthodes

Matériel

Le travoprost a été acheté chez Sigma.

Protocole d'encapsulation

Le protocole général utilisé pour procéder à l'encapsulation du travoprost par les AuNP est le suivant. Pour préparer une solution mère de 400 μL de travoprost à 130 μM , 2,6 μL de travoprost commercial (500,548 g/mol, 0,02 mol/L dans l'éthanol) est d'abord prélevé, puis séché sous argon. Suite à l'ajout de 400 μL d'eau, la solution est alors soniquée 5 minutes, puis laissée sous agitation durant 30 minutes. Rapidement, le volume nécessaire de cette solution mère est prélevé pour être mélangé aux solutions de AuNP. Le mélange est laissé sous agitation durant 4 jours.⁹⁶

Spectroscopie UV-visible

Le principe de la spectroscopie UV-vis de même que les conditions d'analyse ont été discutées au chapitre 3.

Diffusion dynamique de la lumière

Le fonctionnement et les informations que l'on peut obtenir de mesures en DLS ont été présentés au chapitre 3.

4.3 Résultats

La Figure 13 présente l'analyse de l'encapsulation du travoprost dans les AuNP 800 par diffusion dynamique de la lumière (DLS). Le diamètre hydrodynamique des AuNP 800 (0,15 mg/mL) est de $11,1 \pm 0,1$ nm (valeur du pic en Volume) avant l'encapsulation du travoprost ($3,44 \mu\text{M}$). Suite à l'encapsulation, il est de $11,9 \pm 0,9$ nm. Une image de AuNP 800 encapsulant la molécule est aussi représentée (voir la section Discussion à cet effet).

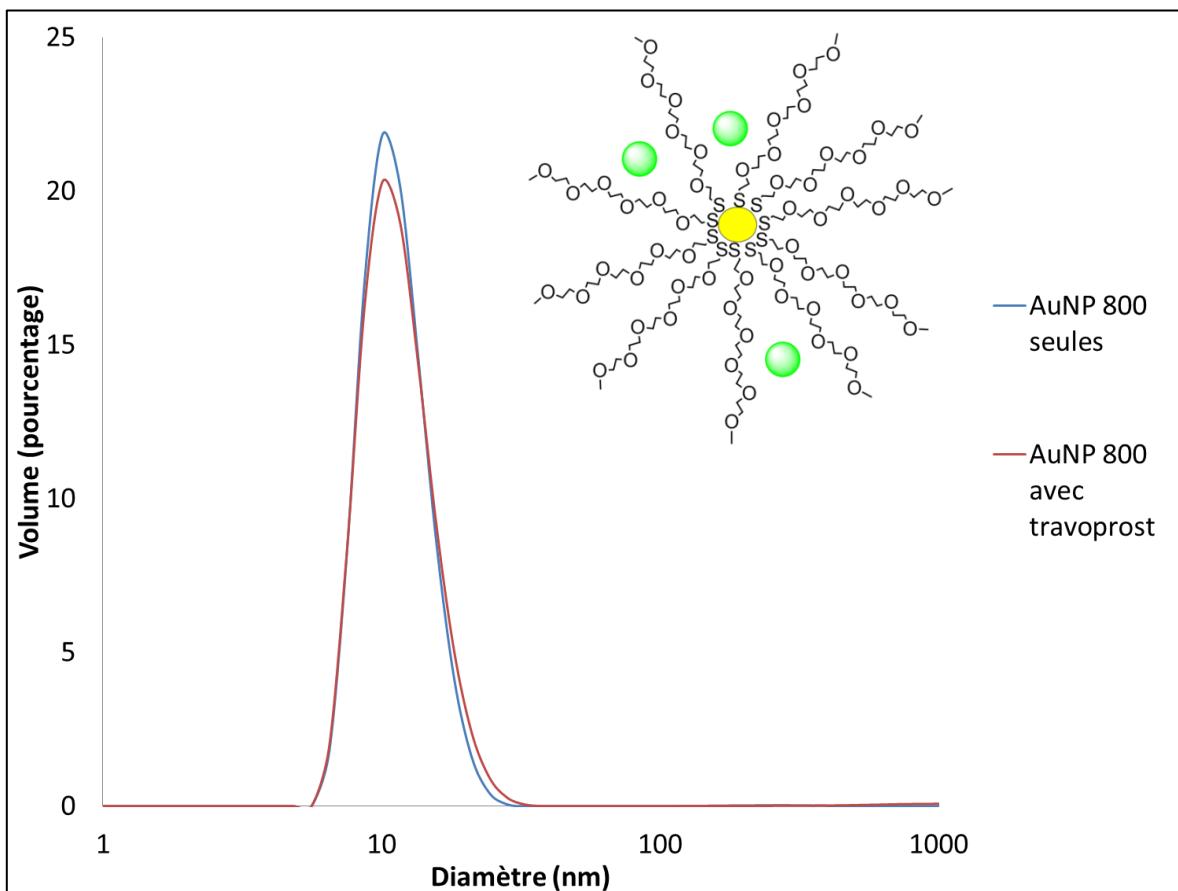


Figure 13 : Analyse de l'encapsulation du travoprost dans les AuNP 800 par diffusion dynamique de la lumière (DLS).

La Figure 14 présente l'analyse de l'encapsulation du travoprost dans les AuNP 6000, également par DLS. Le diamètre hydrodynamique des AuNP 6000 (0,45 mg/mL) est de $30,6 \pm 0,6$ nm. En présence du médicament (2,60 μ M), leur taille est de $27,4 \pm 0,8$ nm. Une image de AuNP 6000 encapsulant la molécule est aussi représentée (voir la section Discussion à cet effet).

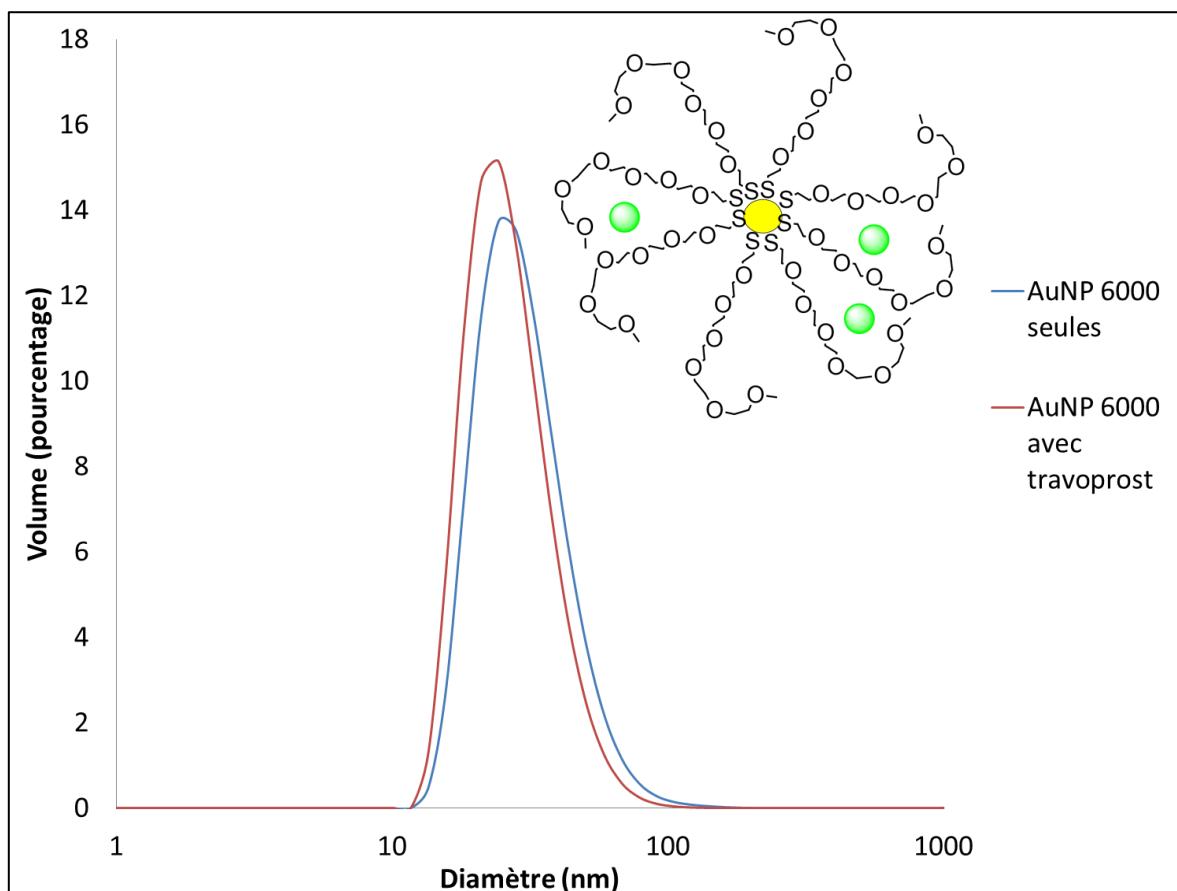


Figure 14 : Analyse de l'encapsulation du travoprost dans les AuNP 6000 par diffusion dynamique de la lumière (DLS).

À la Figure 15, une analyse de l'encapsulation du travoprost dans les AuNP 2000 est réalisée par spectroscopie UV-visible. Le spectre du travoprost (80 μ M) dans la région de 200 à 300 nm, seul puis en présence des AuNP (0,28 mg/mL), est représenté (A). L'effet de la présence du travoprost sur la bande plasmon des AuNP est également indiqué (B). Cet impact de la présence du médicament sur la bande plasmon est représenté plus en détail à la

Figure 16, où il est démontré que la soustraction du spectre des AuNP 2000 seules du spectre de l'encapsulation produit un pic à 555 nm.

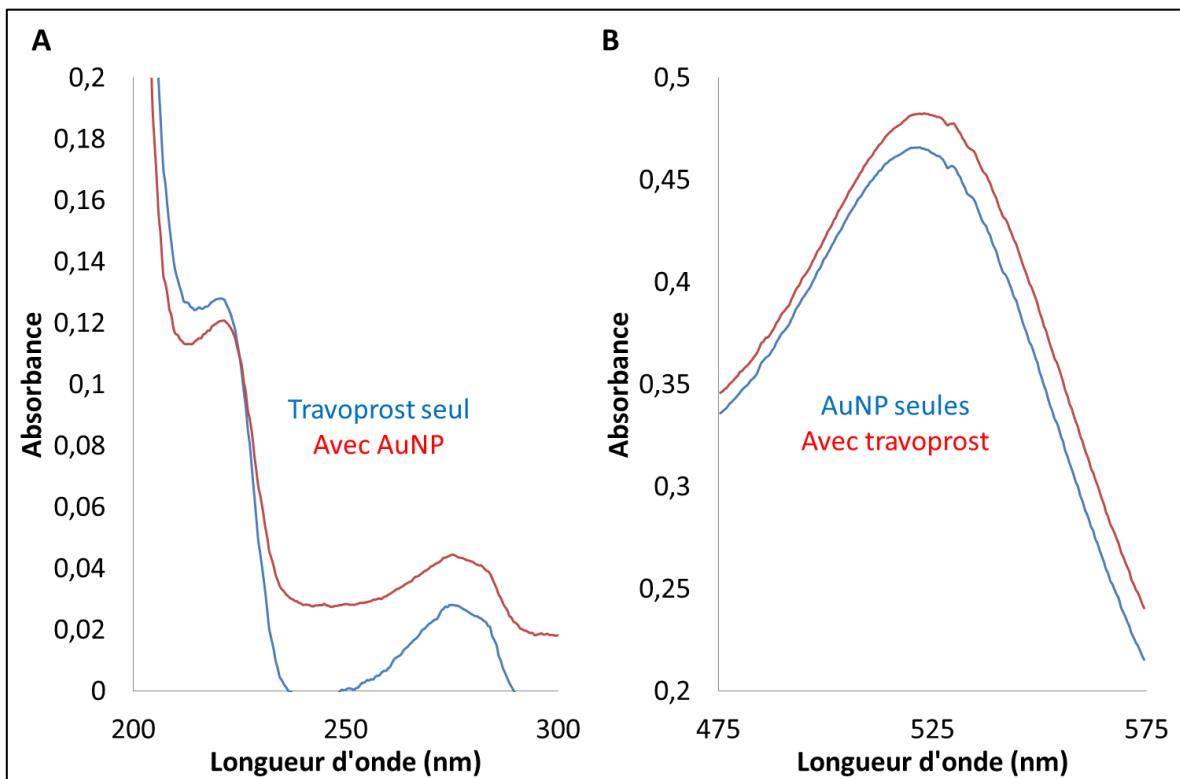


Figure 15 : Analyse par spectroscopie UV-visible de l'encapsulation du travoprost dans les AuNP 2000.

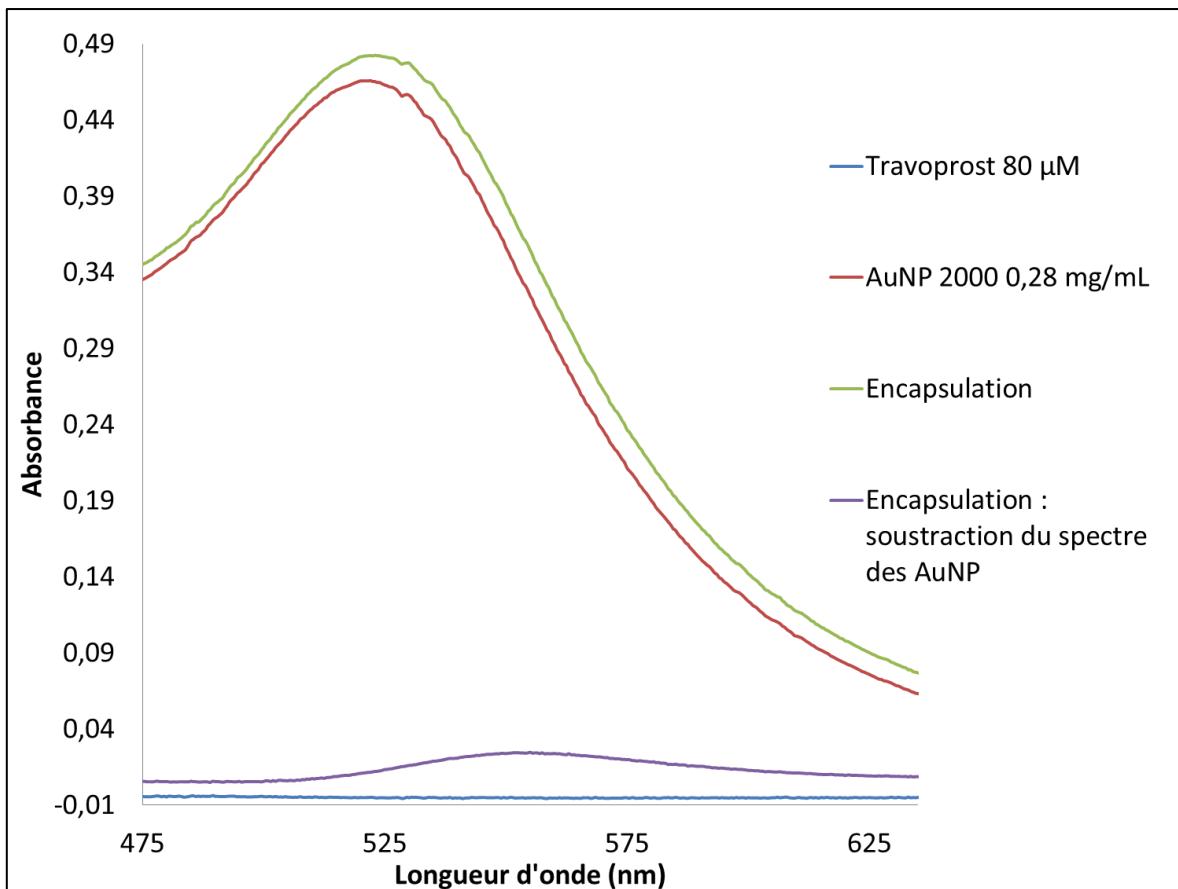


Figure 16 : Détermination par spectroscopie UV-visible de l'effet de l'encapsulation du travoprost sur la bande plasmon des AuNP 2000.

De manière semblable, des mesures par spectroscopie UV-visible ont été réalisées pour étudier l'encapsulation du travoprost par les AuNP double thiol (Figure 17). L'effet des AuNP (0,14 mg/mL) sur le travoprost (80 μ M) est représenté (A), de même que l'effet du travoprost sur la bande plasmon des AuNP (B).

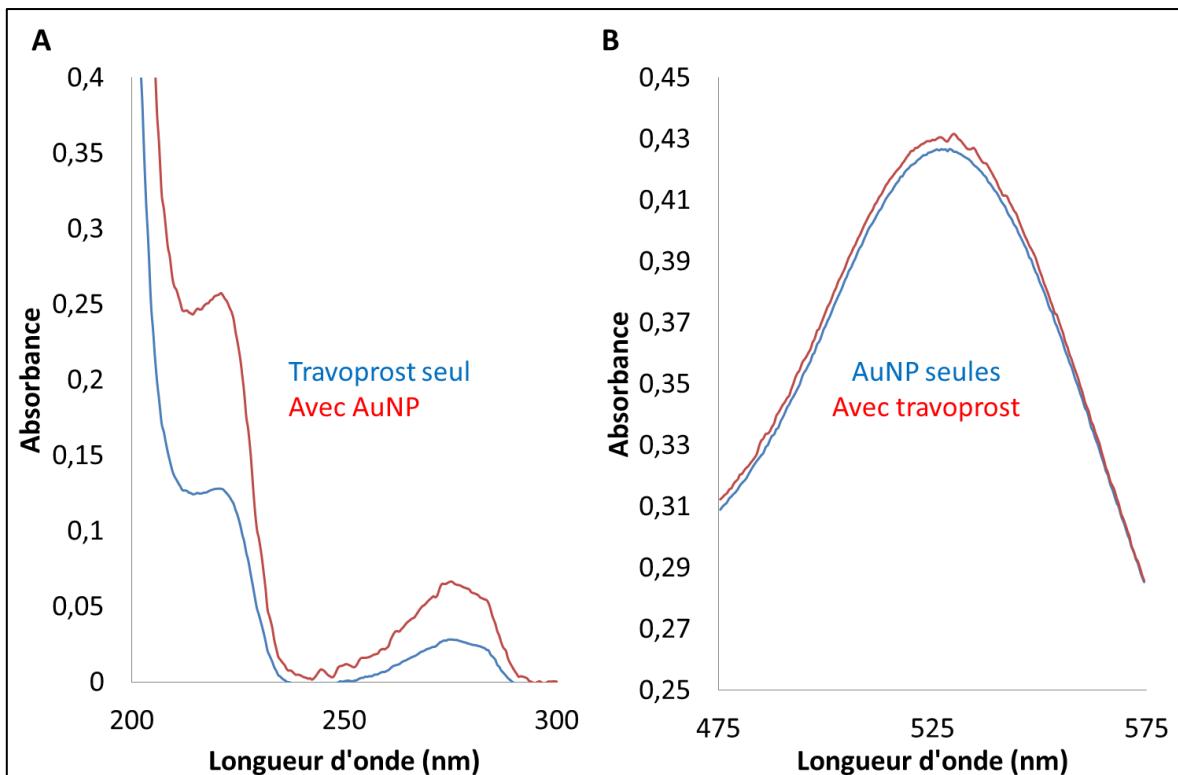


Figure 17 : Analyse par spectroscopie UV-visible de l'encapsulation du travoprost dans les AuNP double thiol.

4.4 Discussion

Le travoprost est une molécule pratiquement insoluble dans l'eau¹⁵ qui est actuellement commercialisée en étant formulée avec de l'huile de ricin modifiée, à laquelle du PEG a été greffé. Les AuNP utilisées dans ce projet étant elles-mêmes stabilisées par des groupements PEG, il était possible de prévoir un bon effet sur la solubilité du travoprost. Cette hypothèse a pu être vérifiée à l'aide de la DLS et de la spectroscopie UV-visible.

Des analyses en DLS ont été réalisées afin d'étudier l'interaction entre le travoprost et les nanoparticules d'or. La Figure 13 montre l'encapsulation du travoprost par des AuNP 800. Le diamètre hydrodynamique passe de $11,1 \pm 0,1$ à $11,9 \pm 0,9$ nm, ce qui n'est pas considéré comme une différence significative. Par contre, lors de l'emploi des AuNP 6000 (Figure 14), la taille passe de $30,6 \pm 0,4$ nm à $27,4 \pm 0,8$ suite à l'encapsulation du

médicament. Cette diminution pourrait être causé par la formation de poches hydrophobes, tel que schématisé à la Figure 14. Le PEG 6000-SH ayant environ 136 unités de répétition d'éthylène glycol, on peut imaginer que les ligands sont suffisamment longs pour se déformer et créer une telle cavité où le travoprost pourrait s'enfouir via des interactions hydrophobes. En revanche, le PEG 800-SH n'ayant que 18 unités de répétition en moyenne, cela ne serait peut-être pas possible. Quoi qu'il en soit, le PEG constitue donc un environnement favorable pour une molécule hydrophobe. Il a par ailleurs déjà été rapporté dans la littérature que des AuNP, stabilisées en grande partie par des ligands PEG, voyaient effectivement leur taille en DLS réduite lors de l'encapsulation d'un médicament hydrophobe.⁹⁶

Lors de mesures par spectroscopie UV-visible, il a été noté que mettre les AuNP 2000 en présence de travoprost (Figure 15) a pour effet d'affecter la bande plasmon, indiquant une modification de l'environnement chimique proche du cœur métallique. Notons toutefois qu'une augmentation de l'absorbance n'est pas uniquement observée dans la région de la bande plasmon (vers 520 nm), mais également jusqu'à la région de 200-300 nm, là où l'on retrouve les pics du travoprost. En effet, pour le travoprost seul, l'intensité entre les pics (à 220 et 275 nm) diminue pour être presque nulle entre 235 et 255 nm. Or, avec les AuNP 2000, la ligne de base est augmentée à une absorbance de 0,03. Malgré cette augmentation, le pic à 220 nm est plus faible lors de la présence des AuNP 2000. Étant donné que la diminution de l'intensité du spectre UV-visible d'un médicament est caractéristique de son encapsulation au sein d'une nanoparticule d'or,⁹⁶ cela suggère que le travoprost est bel et bien enfoui.

Il est possible de déterminer à quel point la bande plasmon est affectée. À la Figure 16, on note que la soustraction du spectre des AuNP 2000 seules du spectre de l'encapsulation produit un pic à 555 nm montrant l'influence de la présence du médicament. Le travoprost engendre le déplacement de la bande plasmon; il y a donc une différence non seulement dans l'intensité de la bande plasmon, mais aussi un décalage vers les plus grandes longueurs d'onde (vers le rouge).

Le résultat obtenu précédemment est à mettre en perspective avec l'emploi des AuNP double thiol (Figure 17). En effet, on note que la bande plasmon demeure inchangée, mais

qu'au contraire les pics du travoprost sont environ deux fois plus importants qu'en absence de nanoparticules. On explique ce phénomène par le fait que la molécule a sans doute tendance à rester à l'extérieur ou en surface de la nanoparticule, mais sa solubilité est tout de même augmentée par la présence des ligands PEG. En fait, il est possible qu'avoir plus thiols disponibles en surface des AuNP les fasse interagir entre les unes avec les autres, et qu'elles ne soient alors plus assez disponibles ou plus en mesure de bien encapsuler un médicament.

4.5 Conclusion partielle

Une étude en DLS de l'encapsulation du travoprost dans des AuNP stabilisées par des ligands courts (PEG 800) ou longs (PEG 6000) a été réalisée afin de confirmer que les AuNP synthétisées constituent un environnement favorable pour le médicament. Puis, les AuNP 2000 et AuNP double thiol ont été employées pour des études en spectroscopie UV-vis. Les résultats obtenus permettent de suggérer que la nature du ligand joue un rôle important dans les propriétés d'encapsulation des AuNP.

Chapitre 5 – Mucoadhésion (article en préparation)

The mucoadhesive properties of gold nanoparticles

Mathieu Ouellette, Mahmoud Omar, Vincent Pernet, Élodie Boisselier*

CUO-Recherche, Hôpital du Saint-Sacrement, Centre de recherche du CHU de Québec and Département d'ophtalmologie, Faculté de médecine, Université Laval, Québec (Québec) Canada.

Keywords: Gold nanoparticles, PEG, mucoadhesion, bioadhesion, mucin

***Corresponding author:** Élodie Boisselier, CUO-Recherche, Centre de recherche du CHU de Québec, Hôpital du Saint-Sacrement, Bureau JS2-06, 1050 Chemin Ste-Foy, Québec (Québec) Canada, G1S 4L8. Phone: 418-682-7511 # 84429; Fax: 418-682-8000. E-mail: Elodie.Boisselier@fmed.ulaval.ca

Résumé

Nous avons étudié les propriétés mucoadhésives de nanoparticules d'or (AuNP) synthétisées selon une méthode de Brust modifiée. Les AuNP stabilisées avec du PEG 2000 (AuNP 2000) ont démontré des propriétés mucoadhésives supérieures aux AuNP 2000 ayant subi un échange de ligand avec du PEG 1000 dithiol (AuNP double thiol). Une méthode d'analyse colorimétrique utilisant de l'acide periodique et le réactif de Schiff (coloration PAS) a été adaptée de la littérature pour permettre l'analyse de nos nanoparticules. Les AuNP 2000 étaient en mesure de lier jusqu'à 70 % des mucines en solution alors que les AuNP double thiol ne semblaient pas mucoadhésives. Comparativement, des AuNP 2000 synthétisées selon une méthode alternative avec plus de PEG et dans différents solvants liaient 10 % des mucines, d'où l'influence des conditions de synthèse sur leurs propriétés mucoadhésives.

Abstract

The development of efficient drug delivery systems is a crucial point for the improvement of the ophthalmic medication. Indeed, most of this medication is topically administrated but less than 0.02% of the active products are found near their site of action in the anterior chamber. The nasolacrimal drainage, tear film and blinking, among other things, hinder the drug penetration into the eye and lead to a high administration frequency of concentrated ophthalmic drops. Mucoadhesive drug delivery systems can improve the efficiency of drug because of their interaction with the corneal mucins, leading to longer residency times. The mucoadhesive properties of gold nanoparticles (AuNP) were thus investigated. Different techniques such as fluorescence spectroscopy, dynamic light scattering and an adapted quantitative colorimetric method were used to gather information on the mucoadhesion of AuNP. Different stabilizing ligands and synthesis were tested and led to different mucoadhesive properties. This new mucoadhesive property of AuNP, never described before, could extend the residence time of drugs and largely improve the medication administrated with ophthalmic drops.

1. Introduction

The current issue of topically administered ocular drugs is their bioavailability. Indeed, blinking, nasolacrimal drainage, the small volume of the conjunctival cul-de-sac (30 μ L at most)¹⁰² and the three corneal layers (the epithelium with the tight junctions, the stroma and the endothelium) are mainly responsible for the quick washout of the drugs and their low permeability into the eye. As a result, only 0.0006% to 0.02% of the active molecules are able to reach the anterior chamber of the eye.⁷³⁻⁷⁶ In order to improve the bioavailability and thus the efficiency of ophthalmic drugs, mucoadhesive drug delivery systems can be used to increase their residency time.²⁵

Mucoadhesive particles bind to mucins, which are heavily glycosylated proteins having a mass of 0.5-20 MDa.⁶⁸ Mucins are either membrane-spanning or secreted. Secreted ones are further classified as gel-forming or non-gel-forming (soluble) proteins.⁶⁷ They are produced by a variety of systems in the body (digestive, reproductive, respiratory, etc.), and

their composition varies according to the organ and the individual.⁶⁹ Mucins are coated with a large amount of oligosaccharides (around 5-15 monomers) via *N*- or *O*-glycosylation of their serine and threonine residues.^{68, 69} Mucins play an important role in preventing the entry of chemicals, dusts and pathogens into the eye.⁶⁷ Some regions are rich in cysteines (>10% of the amino acids),⁶⁸ and therefore in thiol groups, leading to the formation of many disulfide bonds and dimers or multimers.⁶⁷ There are different strategies used to produce mucoadhesive drug delivery vectors. For example, polymeric nanoparticles are known to bind mucins through hydrogen bonding, entanglement of the chains and hydrophobic interactions.⁶³ One can also covalently bind sialic acid molecules found on the mucins²⁵ or use thiolated polymers to interact with cysteine groups via disulfide bonds.⁶¹

In this paper, the mucoadhesive properties of gold nanoparticles (AuNP) were investigated. Indeed, the thiol groups stabilizing the gold core can interact with mucins and improve their mucoadhesive properties. AuNP are of outmost interest in nanomedicine. For example, drugs can be encapsulated in AuNP before being more efficiently released at their site of action. The vectorization of anticancer agents is one of many examples.⁴⁵⁻⁴⁷ Different types of AuNP were developed to treat cancerous tumors by thermal phototherapy.⁴⁸ Similarly, silica-gold nanoparticles were also used in thermal phototherapy to successfully treat atherosclerosis in a clinical trial.⁵⁰ In imagery, new contrast agents such as gold nanospheres or nanorods were developed for x-ray imaging and computed tomography.^{51, 52} However, the mucoadhesion of AuNP was never highlighted previously. In this paper, their mucoadhesive properties were assessed by UV-visible spectroscopy (UV-vis), dynamic light scattering (DLS), zeta potential measurements, microrheometry, spectrofluorimetry and by a specially optimised quantitative colorimetric method (PAS coloration).

2. Materials & Methods

Gold chloride trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), sodium borohydride (NaBH_4), chlorhydric acid (HCl), nitric acid (HNO_3), sodium chloride (NaCl), basic fuchsine (pararosaniline hydrochloride) and sodium metabisulfite were purchased from VWR International. Polyethylene glycol 1000 dithiol (referred to as PEG double thiol) and periodic acid were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Polyethylene glycol 2000 methyl ether

thiol (referred to as PEG 2000) was purchased from Laysan Bio (Arab, AL). Dichloromethane and methanol were purchased from Fisher Scientific, and mucins from bovine submaxillary gland were purchased from Cedarlane Laboratories (Burlington, ON).

All the glassware used for the synthesis of AuNP was first thoroughly washed with *aqua regia* (3:1 HCl:HNO₃) and rinsed with nanopure water.

2.1 Synthesis of gold nanoparticles

Gold nanoparticles coated with PEG 2000 (referred to as AuNP 2000) were synthesized using a single phase Brust method modified from a technique previously published.⁴⁵ A significant advantage of this procedure is the absence of tetraoctylammonium bromide, thus avoiding residual ionic contamination of this toxic compound. First, a stock solution of aqueous gold chloride was prepared by dissolving 1 g of HAuCl₄·3H₂O to a final concentration of 0.1 mg/mL. Then, 0.5 mL (0.127 mmol) of this stock solution was added to 30 mL of a 1:1 methanol:water solution. 0.048 g (0.024 mmol) of PEG 2000 and 20 mL of methanol were then added, and the solution was agitated during 90 minutes. 0.040 g (1.057 mmol) of NaBH₄ dissolved in 20 mL of ice-cold water was then added dropwise under vigorous stirring using a peristaltic pump. The solution was left to agitate for 3h to ensure proper particle growth and stabilization.⁸² The methanol was then evaporated under reduced pressure, and the nanoparticles were extracted with dichloromethane using a minimal amount of a saturated NaCl solution. AuNP were then dissolved in 10 mL of water and dialysed over two days. The nanoparticles were recovered and kept in solution in water in amber glass bottles in the dark. Unless otherwise specified, all the AuNP 2000 used in this paper came from this synthesis method.

A second synthesis, called synthesis #2, was performed using a different ratio of PEG 2000 to gold and different solvents compared the one previously described (data not shown). These AuNP were only used in one specific experiment for comparison (PAS coloration; sections 2.11 and 3.2.6) and their synthesis will be discussed in a further publication.

2.2 Ligand exchange

8 molar equivalents of PEG 1000 double thiol, with respect to the amount of PEG 2000 used for the initial synthesis, were dissolved in the AuNP solution. The mixture was left to agitate for 5 days in the dark. The AuNP were then purified by extensive dialysis over 4 days. The resulting nanoparticles, referred to as AuNP double thiol, were recovered and kept in solution in amber glass bottles in the dark.

2.3 Elemental analysis

The samples were sent to Saskatchewan Research Council (SRC) Geoanalytical Laboratories. Sulfur and gold content of the AuNP were determined by induction furnace and fire assay, respectively.

2.4 Preparation of the mucins solution

Typically, a stock solution of mucins from bovine submaxillary glands was prepared by dissolving the crude powder in water to a final concentration of 0.40 mg/mL. The solution was sonicated for 30 minutes and the pH was adjusted to 7.4. The solution was then kept at 4 °C if not used immediately. A sonication of 30 minutes was realized before each new dilution.

2.5 TEM

After leaving a droplet of AuNP solution to dry on a carbon grid for at least 5 days, TEM images were taken with the JEOL JEM 1230. The zoom factor was 50 000x. The images were then analyzed with ImageJ to determine the number and the diameter of the gold cores.

2.6 UV-vis spectroscopy

UV-visible spectra were recorded using the Cary 50 UV-vis, from Varian. Disposable plastic cuvettes from Brand® (#759200) were used.

2.7 DLS

DLS measurements were performed with the NanoBrook Omni from Brookhaven Instruments Corporation. The solutions were analyzed in phosphate-buffered saline (PBS) at 37 °C by backscattering (173°) with the NNLS mode. 5 measurements of 100 seconds were performed for each sample and the values were reported as the mean diameter by Volume. Disposable plastic cuvettes from Eppendorf® (#952010051) were used.

2.8 Zeta potential

The NanoBrook Omni was used and the solutions were analyzed in PBS at 23 °C with the Smoluchowski equation model. Disposable 4.5 mL polystyrene cuvettes (BI-SCP) and an electrode for aqueous solutions (BI-ZEL) were used.

2.9 Microrheometry

Microrheometry experiments were performed with the m-VROC, from RheoSense. A type “A” chip was used, which is suitable for low viscosity samples.

2.10 Spectrofluorimetry with corrections for the inner filter effect

The fluorescence spectra of mucins were obtained with the Fluorolog-3 (Horiba). A 10x2 mm light path quartz cuvette from Hellma Analytics was used (#115F-QS). The samples were incubated at 37 °C for 2 hours prior to analysis. Excitation wavelength showed optimal results at 285 nm and the scans for emission were thus recorded from 300 to 500 nm.

Fluorescence intensities were corrected for the inner filter effect, taking both excitation and emission into account.^{103, 104} First, the excitation light used to illuminate the fluorophore, *f*, can also be absorbed by another component, *i*, present in the sample. Given that the total absorbance (Abs_t) is expressed as $\text{Abs}_t = \text{Abs}_i + \text{Abs}_f$, the correction factor (C1) for the excitation, at the excitation wavelength, is obtained by eq. 1.

$$C1 = \frac{\text{Abs}_t}{\text{Abs}_i} \left(\frac{1-10^{-\text{Abs}_i}}{1-10^{-\text{Abs}_t}} \right) \quad \text{eq. 1}$$

Also, fluorescence emission may be re-absorbed by another component, *e*, in the sample. In this case, the correction factor (C2) for the emission, at the emission wavelength, is given by eq. 2. Abs_e is the absorbance of the other component.

$$C2 = \frac{2.303 \text{Abs}_e}{1-10^{-\text{Abs}_e}} \quad \text{eq. 2}$$

The concentrations of AuNP in the samples were kept low so that the absorbance intensities were not above 1 at the two wavelengths.

2.11 Periodic Acid/Schiff's Reagent (PAS) coloration

2.11.1 Determining the centrifugation conditions

Before proceeding to the coloration, the “softest” conditions of centrifugation (i.e. the slowest speed and minimal time required to pellet all the AuNP) must be determined. In our case, 30 minutes of centrifugation at 60 000 rpm (128 000 *g*) at 4 °C were used.

2.11.2 Preparation of the coloration reagents

Periodic acid reagent: First, a 1 mL stock solution of aqueous 50% periodic acid (kept at 4 °C protected from light) and a 70 mL stock solution of aqueous 7% acetic acid were prepared. Just before proceeding to the coloration, 5 µL of the periodic acid solution was mixed with 3.5 mL of the acetic acid solution.

Schiff's reagent: 20 mL of 1M HCl was added to 100 mL of an aqueous 1% solution of basic fuchsin in a beaker. Just before proceeding to the coloration, 0.050 g of sodium

metabisulfite was added to 3 mL of the fuchsin solution, covered with Parafilm® and then incubated for 2 hours at 37 °C.

2.11.3 Preparation of the samples

Standards of mucins were prepared to a final concentration of 50, 100 and 150 µg in 1 mL of water. A blank of water was also needed. Mucoadhesion samples initially had the same amount of mucins as one of the sample (e.g. 150 µg). For each mucoadhesion sample (containing both the mucins and the AuNP), one corresponding blank containing only AuNP was also prepared.

2.11.4 Coloration protocol

The standards and samples were agitated and incubated for 2 hours at 37 °C. They were then centrifuged using the pre-established “soft” conditions. These conditions were used to gently bring the nanoparticles and the bounded mucins to the bottom of the tube. The centrifugation was immediately repeated using “stronger” conditions (in our case, 100 000 rpm – or 356 000 g – for 15 minutes at 4 °C). 600 µL of the supernatant was recovered and 180 µL of the periodic acid reagent was added. The samples were left to incubate for two hours. Thereafter, 60 µL of the Schiff’s reagent was added to the samples for exactly 30 minutes before UV-vis spectra acquisitions (300-800 nm).

2.11.5 Analysis

The water blank spectrum was subtracted from the other mucins standards, and each mucoadhesion blank was subtracted from the corresponding mucoadhesion sample. A calibration curve was drawn using the maxima of the standards peaks at 575 nm.

3. Results & Discussion

3.1 Synthesis of gold nanoparticles and ligand exchange

The Brust synthesis method²⁸ is based on the use of thiolated ligands, allowing a rapid and strong stabilisation of the gold core by thiol groups. Ionic and covalent characters of the strong gold-sulfur bond (Au-S) lead to stable nanoparticles.³⁴ The AuNP here described were stabilised by thiolated polyethylene glycol (PEG) groups. PEG is a non-toxic ligand that is also used to provide a good solubility to nanoparticles.⁶⁵

The AuNP synthesized using a modified Brust method (section 2.1) do not contain TOAB, an ionic stabilizing/phase transfer agent, because their synthesis is performed in water where both the gold salt (HAuCl_4) and the PEG are soluble. This procedure allows avoiding the use of cationic surfactants whose toxicity is due to their binding to the negatively charged cell membrane.⁵⁷

The AuNP 2000 obtained show characteristic UV-vis absorbance peak at 521 nm that is caused by the surface plasmon resonance (Figure 1).³⁵ A ligand exchange was performed with PEG double thiol, as detailed in the section 2.2, to introduce thiol groups in the AuNP periphery. It was determined by TEM that they have the same core diameter before and after the ligand exchange: 7 ± 3 nm (Figure 1 and Figure 2). This result was expected because changing the ligands around the gold core does not destabilize it or produce aggregates.^{38, 96}

Figure 3 shows the normalized UV-vis spectra of the AuNP before and after the ligand exchange reaction. A redshift of the plasmon band from 521 to 527 nm is noted. This indicates that the chemical environment around the gold core is modified, presumably by the increased number of thiol groups that lowers the density of free electrons at the surface, hence reducing the frequency of the plasma resonance and leading to a redshift.⁹⁸

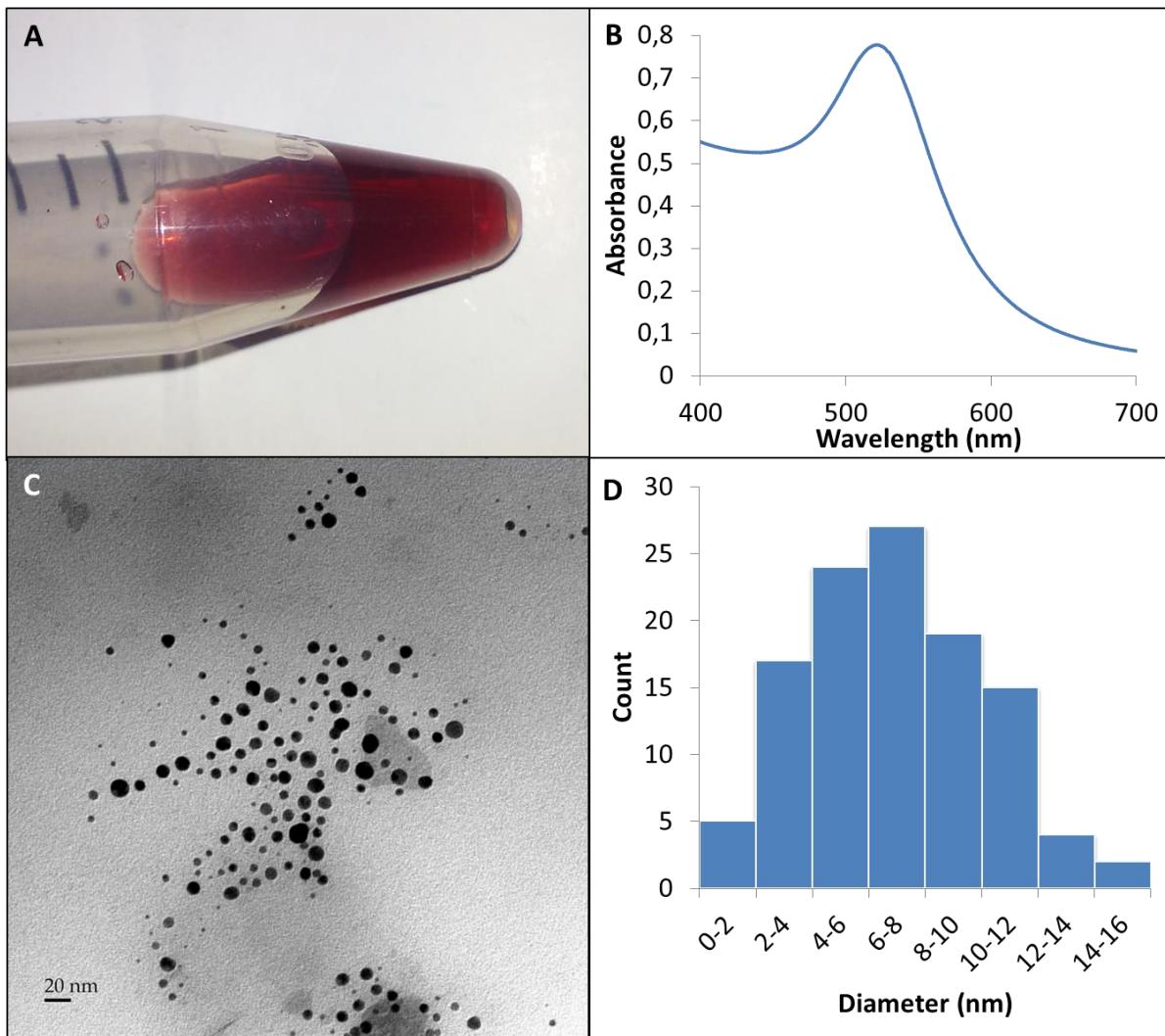


Figure 1: Characterization of the AuNP synthesised using PEG 2000 (AuNP 2000). The red coloration (A) is caused by the characteristic absorbance peak in the visible region (521 nm), as recorded by UV-vis spectroscopy (B). A TEM image (C) was obtained at a zoom of 50 000x and the core diameter distribution was plotted (D).

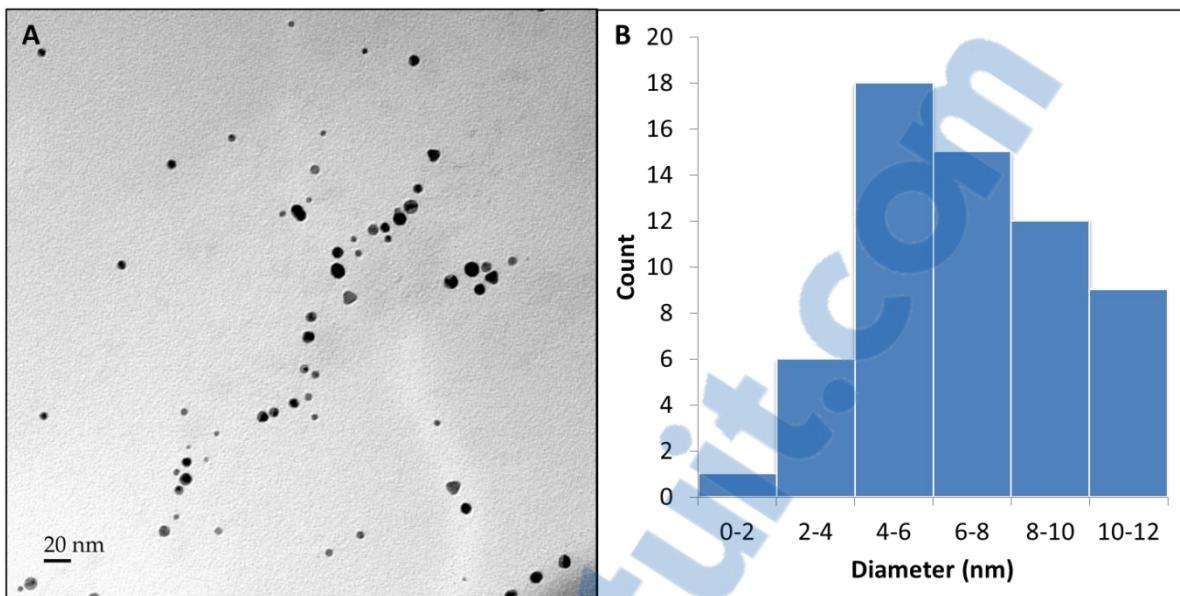


Figure 2: Characterization of the AuNP double thiol obtained from ligand exchange on AuNP 2000. A TEM image was obtained (A) and the core diameter distribution was plotted (B).

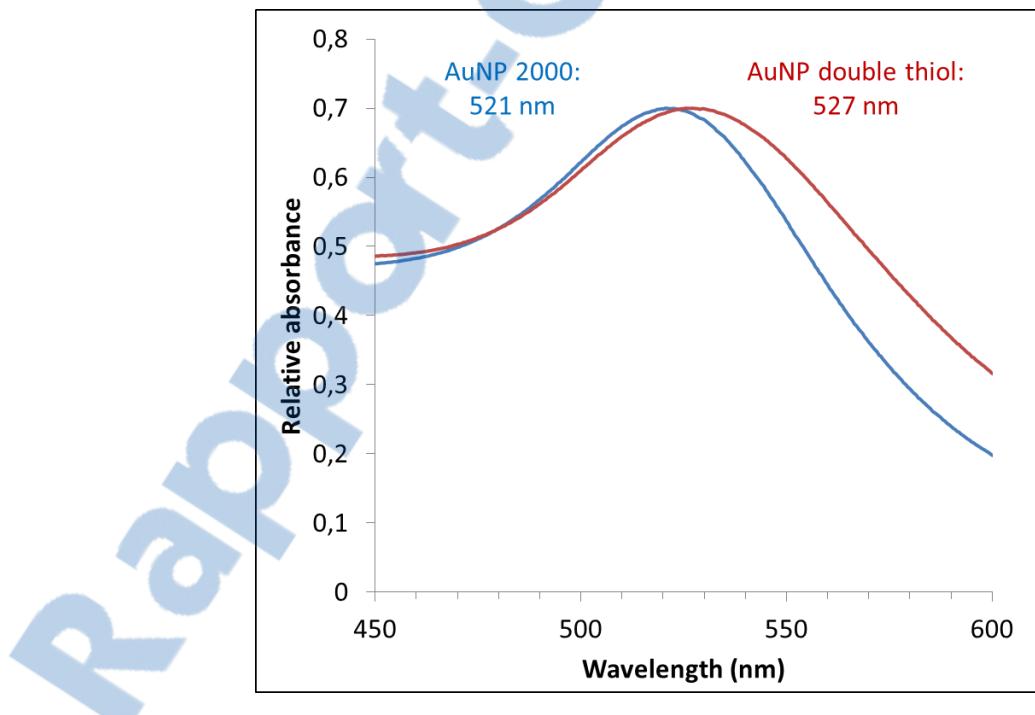


Figure 3: Normalised UV-vis spectra obtained before (in blue; AuNP 2000) and after (in red, AuNP double thiol) ligand exchange.

Interestingly, AuNP double thiol that had been freeze dried could be redissolved, but after a drying by rotary evaporation and heating, the nanoparticles became almost completely insoluble. Indeed, thiol-protected AuNP have been reported to be highly stable when subjected to freeze drying.⁸⁴ However, the heating of PEG results in a contraction of the coil,⁹⁹ leading in this case to aggregation due to the formation of many disulfide bonds between the nanoparticles. On the other hand, AuNP 2000 can be redissolved easily following both ways of drying.

Combining the TEM images with the results of elemental analysis (32.1% Au, 1.33% S for AuNP 2000 and 30.5% Au, 1.83% S for AuNP double thiol), the molar mass of the AuNP was then determined.³⁸ The molecular mass of AuNP 2000 and AuNP double thiol are respectively 7 460 000 and 6 255 000 g/mol.

3.2 Mucoadhesion

There has been a controversy concerning the mucoadhesive and mucopenetrating properties of pegylated nanoparticles.⁶² While PEG is sometimes considered mucoadhesive,⁶³ it is also reported to be non-mucoadhesive, in part because it is not charged. Moreover, low molecular weight PEG present at a high density on a particle can shield its surface (that may otherwise be reactive with mucins) and reduce the formation of hydrogen bonds and PEG/mucin entanglement.^{62-64, 105} Hence, PEG is often used to make a nanoparticle mucopenetrative.

In either case, despite the evident opposition between these two aspects, it has been noted that drug vectorisation by these systems could be improved.⁶¹ It is of course important to take into account the localisation where the drug has to be applied. In ocular drug delivery, mucoadhesive nanoparticles are preferred.

3.2.1 UV-vis spectroscopy

First, the mucoadhesion of AuNP was assessed by UV-vis spectroscopy. The mucins were incubated with the AuNP for 30 minutes at 37 °C. The presence of mucins (0.076 mg/mL) affects the plasmon band of AuNP 2000 (0.10 mg/mL) (Figure 4). Indeed, the UV-vis

spectrum obtained after the addition of mucins to AuNP is different from the simulated additive spectrum of mucins and AuNP alone. It shows an increased and shifted plasmon band (522 nm instead of 518 nm), indicating that the chemical environment around the gold core is modified. However, the spectrum of AuNP double thiol was not affected and their plasmon band remained unchanged at 528 nm (data not shown).

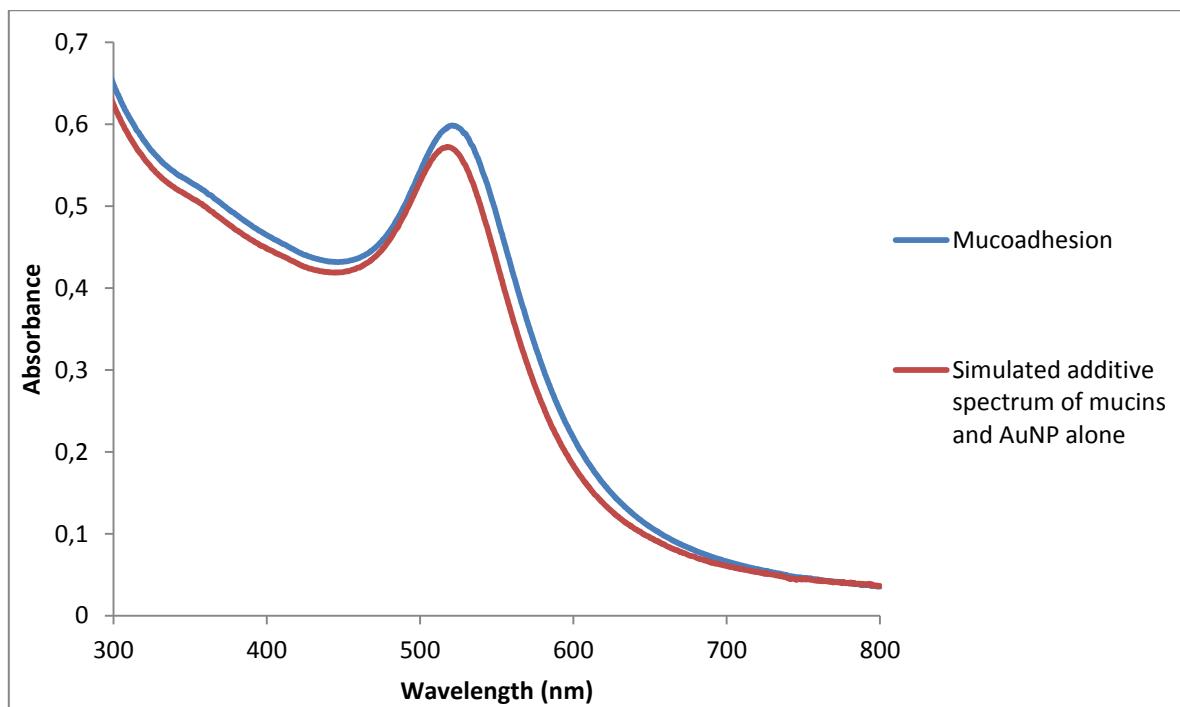


Figure 4: UV-vis spectrum obtained after the addition of mucins to AuNP 2000 and the simulated additive spectrum of mucins alone and AuNP alone.

3.2.2 DLS

The results of the study of mucoadhesion by DLS are shown in Table 1. Different solutions of AuNP alone, mucins alone and mucoadhesion samples (AuNP + mucins) were incubated for 3 hours at 37 °C under agitation (400 rpm).

Sample	Mean diameter by Volume (nm)
AuNP 2000	15 ± 3
AuNP double thiol	27 ± 6
Mucins	40 ± 10
Mucoadhesion of AuNP 2000	39 ± 16
Mucoadhesion of AuNP double thiol	23 ± 5

Table 1: DLS analysis of the mucoadhesion of AuNP 2000 (0.10 mg/mL) and AuNP double thiol (0.09 mg/mL). The concentration of mucins was set at 0.25 mg/mL.

The hydrodynamic diameter of AuNP 2000 obtained by DLS is 15 ± 3 nm. As a comparison, AuNP double thiol have a hydrodynamic diameter of 27 ± 6 nm. This increase can be explained by the fact that following ligand exchange, more PEG may be coating the gold core even though the PEG 1000 double thiol is roughly twice smaller than the initial thiolated PEG 2000. Hence, the hydrodynamic diameter is increased.⁸² Also, AuNP double thiol could be forming polymers with the dithiol PEG or with other AuNP double thiol, leading to a similar increase in their size.

The hydrodynamic diameter of mucins is 40 ± 10 nm. The DLS data show that some aggregates are present at around 130 and 240 nm. As a comparison, Madsen et al. reported the value of 50 nm (in Intensity) for similar bovine submaxillary mucins that they further purified.¹⁰⁶

The mucoadhesion sample of AuNP 2000 was no different from mucins alone (39 ± 16 nm), which may indicate that the nanoparticles are trapped in the mucins since the signal of AuNP 2000 is not detected anymore. More aggregates were nonetheless present at around 240 nm compared to mucins taken alone.

The mucoadhesion sample of AuNP double thiol, by opposition, was similar in size to AuNP double thiol alone (23 ± 5 nm). In this case, the AuNP are presumably not entrapped in the mucins since it is still possible to detect them. However, the apparent loss of the mucins signal may be caused by the fact that the resolution of DLS is low, and particles should have a 3-fold difference in their sizes in order to distinguish them adequately.⁸⁹

3.2.3 Zeta potential

3.2.4 Microrheometry

3.2.5 Spectrofluorimetry

The emission spectra of mucins in presence of different concentrations of AuNP are shown in Figure 5. These spectra present corrected intensities taking into account the inner filter effect previously described (section 2.10). Using 285 nm as the excitation wavelength means that both tryptophan and tyrosine residues were excited.¹⁰⁷

Using a constant concentration of mucins of 0.0879 mg/mL, AuNP 2000 (A) were able to quench up to 17% of the fluorescence (when using 0.15 mg/mL of AuNP). In similar conditions, AuNP double thiol (B) quenched only 8% of the fluorescence. This observation suggests that AuNP 2000 have a better interaction with fluorescent amino acids, and thus the core protein, than AuNP double thiol. Since tryptophan and tyrosine are hydrophobic, AuNP 2000 must be able to reach the protein coil more deeply.

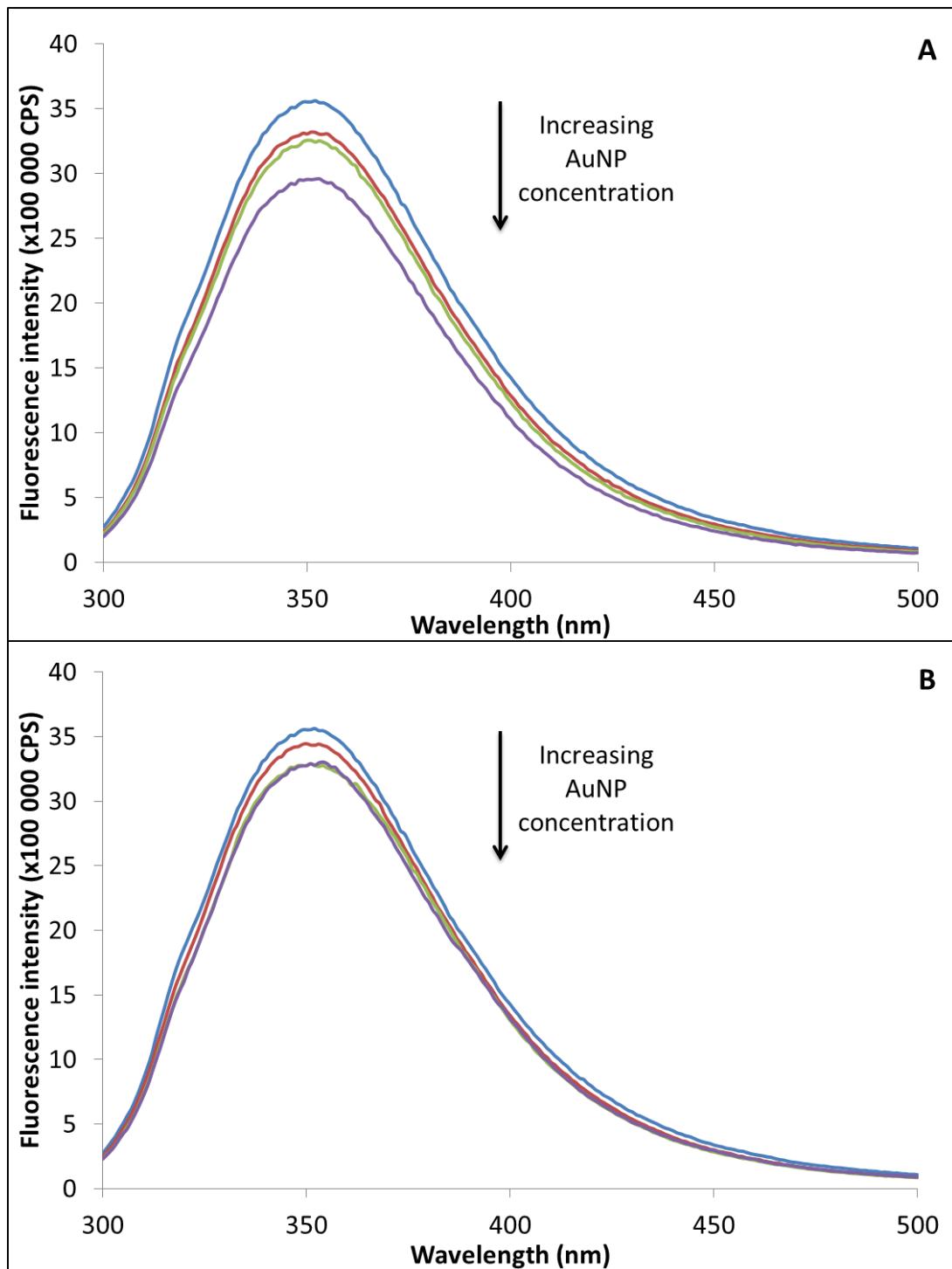


Figure 5: Emission spectra of mucins during mucoadhesion of AuNP 2000 (A) and AuNP double thiol (B). The excitation wavelength is 285 nm. The concentration of mucins is fixed at 0.0879 mg/mL, and the concentration of AuNP is increased (0.05, 0.10 and 0.15 mg/mL).

3.2.6 PAS coloration

A new protocol used to quantify mucin has been adapted from different sources in order to study the mucoadhesion of AuNP (section 2.11). The periodic acid/Schiff's reagent (PAS) coloration was initially proposed by Mantle and Allen¹⁰⁸ in 1978 and is used to analyze the mucin content of different samples or the properties of mucoadhesive materials.¹⁰⁹⁻¹¹¹ Periodate first oxidizes vicinal hydroxyl groups of the saccharides to aldehydes.¹¹¹ In parallel, basic fuchsin, initially colored, is decolored by the addition of sodium metabisulfite; the central carbon of the triarylmethane system becomes saturated and its electrons are no longer highly delocalised.¹¹² Upon mixing the oxidized mucins and the decolored fuchsin, the compounds react and the fuchsin regains a highly delocalized pi system.

The challenge associated with probing the binding of mucins to AuNP with this method is that the red color appearing in the process is usually analyzed at 555 nm. However, AuNP have a high absorbance at this wavelength because of their plasmon band. It is thus crucial that all the AuNP are removed from the solution before proceeding to the coloration of the samples, because even a small amount left can influence the UV-vis spectra once the coloration reagents are added. Figure S1 shows the effect of the periodic acid and the Schiff's reagent on AuNP 2000 in solution. The plasmon band of the AuNP is greatly affected by the presence of both reagents.

Interestingly, when performing a full UV-vis scan after the coloration procedure, we found that the characteristic peak of the red coloration developing over time is at 575 nm (for mucins alone), and not at 555 nm where single point measurements are usually taken in the literature. Indeed, although it is true that raw spectra were usually showing a peak at around 555 nm (Figure S2), the subtracted spectra $[(\text{AuNP} + \text{mucins}) - \text{AuNP alone}]$ shown in Figure 6 indicate that the color evolution is most intense at 575 nm. It would thus be more accurate to take single point measurements at this higher wavelength, but it is even a better choice to record full spectra. In Figure S2, four standards having different amounts of mucins (0, 50, 100 and 150 μg) are used to compare two mucoadhesion samples (AuNP 2000 + mucins, and AuNP 2000 from synthesis #2 + mucins) and their corresponding blanks (AuNP alone). For the mucoadhesion samples, 1 mg of AuNP was used in each case

in presence of 150 μg of mucins. Figure 6 presents the subtracted spectra. In this case, the standards are normalized so that 0 μg of mucins represents an absorbance of 0, and the mucoadhesion samples are normalized by subtracting the corresponding blanks. The absorbance of the AuNP 2000 sample was at its maximum at 562 nm, and the sample of AuNP 2000 from synthesis #2 had its peak at 575 nm (like the mucins alone). The absorbance values at these wavelengths were used in a calibration curve ($R^2 > 0.999$, data not shown) to determine the amount of mucins that were bounded to the AuNP.

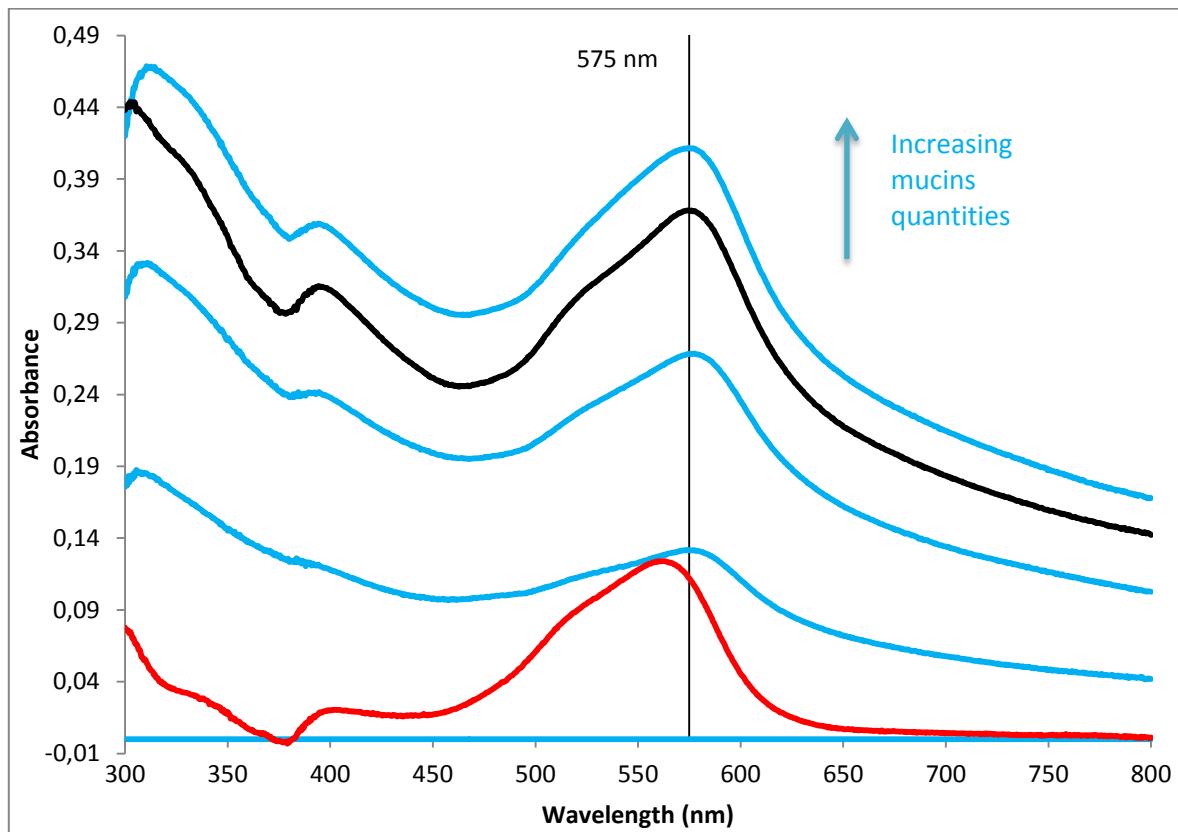


Figure 6: Subtracted spectra of the PAS coloration used to assess the mucoadhesive properties of AuNP 2000 (in red) and AuNP 2000 from synthesis #2 (in black). The different standards of mucins are in blue (0, 50, 100 and 150 μg). For the mucoadhesion samples, 1 mg of AuNP was in each case used in presence of 150 μg of mucins.

In a similar experiment, 1 mg of AuNP 2000 (which corresponds to 134 pmol) was compared to the same number of mole of AuNP double thiol (134 pmol; 0.84 mg). Like before, the absorbance of the AuNP 2000 sample was used at the peak of its subtraction spectrum, which was 565 nm. The absorbance of the AuNP double thiol sample had its peak at 572 nm. Both mucoadhesion samples also initially contained 150 μ g of mucins, like the fourth standard.

Figure 7 summarizes the percentage of mucoadhesion by PAS coloration for the AuNP 2000, the AuNP 2000 from synthesis #2, and the AuNP double thiol samples. The mucoadhesion of AuNP 2000 was tested on two separate experiments and the results were reproducible. They bind significantly more mucins than the other AuNP tested. As shown in the figure, up to 70% of the mucins (105 μ g out of 150 μ g) are removed by 1 mg (134 pmol) of AuNP 2000, whereas 134 pmol of AuNP double thiol do not seem to have any mucoadhesive properties. Actually, the intensity of the PAS coloration was even slightly higher for AuNP double thiol compared to the mucins standard of 150 μ g, but this value was within the uncertainty of the calibration curve ($R^2 = 0.984$, data not shown). The binding is therefore represented as 0%. In the case of AuNP 2000 from synthesis #2, they were only able to bind 10% of the mucins (15 μ g).

As a comparison, Lian et al. were able to remove about 220 out of 500 μ g of mucins (44%) with 2 mg of nanomicelles in another PAS coloration experiment.¹⁰⁹ Dhawan et al. used a much larger amount of microspheres (20 mg) to bind, at best, around 150 out of 500 μ g of mucins (30%).¹¹⁰

It is noteworthy that in our case, the high-speed centrifugation required to pellet the AuNP might affect the efficiency of the PAS coloration protocol. Indeed, the formation of the strong Au-S bond is slow and requires the protein to be, at first, deformed onto the surface of the particle via electrostatic interactions.¹¹³ Despite this challenge, AuNP 2000 demonstrated promising mucoadhesive properties.

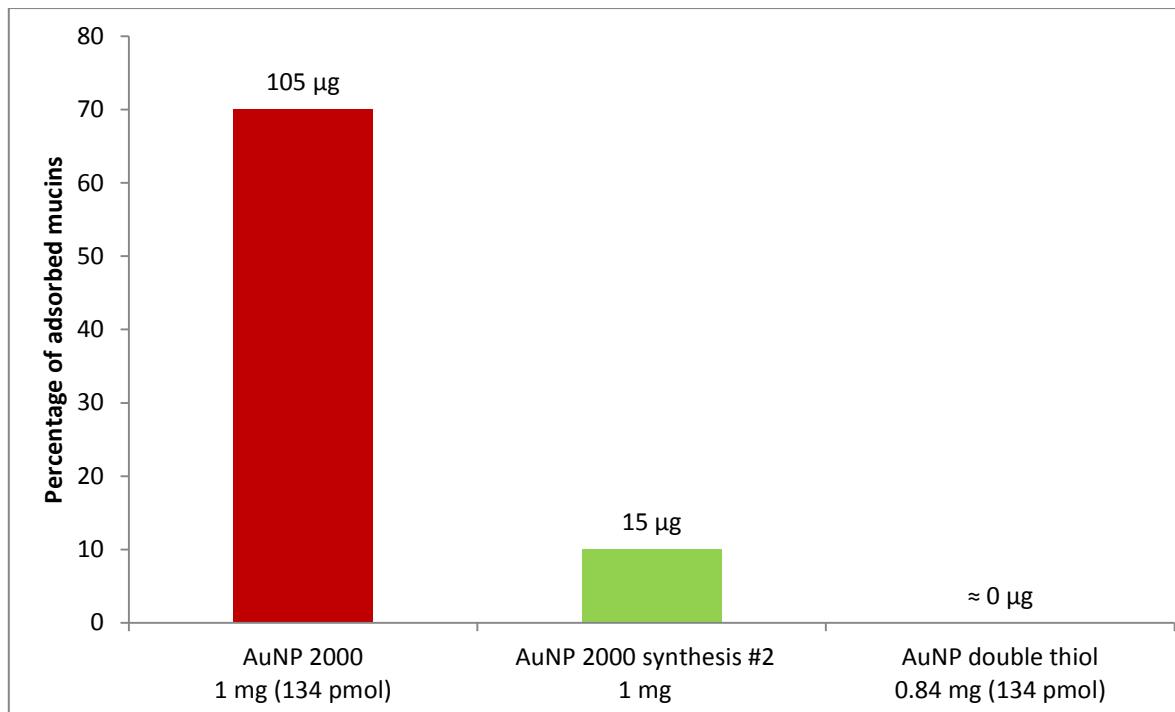


Figure 7: Histogram representing the percentage and the mass of adsorbed mucins according to the different AuNP analysed by PAS coloration. The samples initially contained 150 μg of mucins. AuNP 2000 were tested on two separate experiments and the results were highly reproducible.

It was rather surprising that AuNP double thiol were much less mucoadhesive than AuNP 2000, because it is widely acknowledged that thiolating polymers usually improves the mucoadhesive potential of a given particle.⁶¹ In this case, it is possible that AuNP 2000 were initially not capped at a high density by the PEG 2000 and that the gold core and the thiols were more available to react with the mucins. Upon ligand exchange, although resulting in an increased number of thiols available on the surface of the nanoparticle, the gold core might have been shielded by the new ligand and the density of PEG around the core increased. AuNP 2000 from synthesis #2 were used as a comparison (section 2.1). They were probably densely capped, which would explain their high stability upon centrifugation. In fact, they could be resuspended in water easily, whereas the main synthesis of AuNP 2000 produced nanoparticles that were unstable in the same conditions. Indeed, the “soft” conditions used for the PAS coloration are still quite harsh because the AuNP are very soluble and much smaller than nanomicelles or chitosan microspheres used

in similar PAS coloration protocols.^{109, 110} Figure S3 shows the UV-vis spectra of AuNP 2000 once they were resolubilised after different centrifugation cycles: they gradually aggregate with an increasing centrifugation force. AuNP double thiol were also not affected by centrifugation, which indicates that they may indeed have been more densely capped and stable than the AuNP 2000. All the AuNP used were nonetheless very stable (>6 months) when kept in normal conditions, and their plasmon band did not show any variation. It is also possible that AuNP double thiol were less available for interaction with mucins because they were interacting with each other through disulfide bonds.

To explain the results obtained in this paper, our hypothesis is that AuNP can exhibit strong mucoadhesive properties because their binding to the mucins could occur mainly via two specific assets of AuNP: 1) by direct interaction of the cysteine groups with the gold core through the formation of new Au-S bonds and 2) by the formation of new S-S bonds with the many thiol groups that are already present on the nanoparticle. Additionally, the PEG chains can also get entangled with the sugar-rich domains of the mucins, which is already known to explain the mucoadhesive properties of polymeric nanoparticles.

4. Conclusion

The mucoadhesive properties of AuNP were investigated. AuNP stabilized by PEG 2000 (AuNP 2000) show better mucoadhesive properties than AuNP 2000 on which dithiol PEG 1000 has been added by ligand exchange (AuNP double thiol). Although a surprising result, this could be explained by the density of the PEG coating and the availability of the gold to interact with surrounding mucins. Clearly, the mucoadhesive properties of AuNP are highly dependent on the method of synthesis used. Even when they are stabilized by the same ligands, the synthesis parameters of the AuNP have an influence.

Eventually, since it is known that AuNP have good drug encapsulation properties, it should be possible to produce AuNP for drug delivery that are highly mucoadhesive and that would improve the medication thanks to their longer residence time on their mucous target. In particular, medication for ocular diseases that require topical application might be enhanced.

Supporting informations

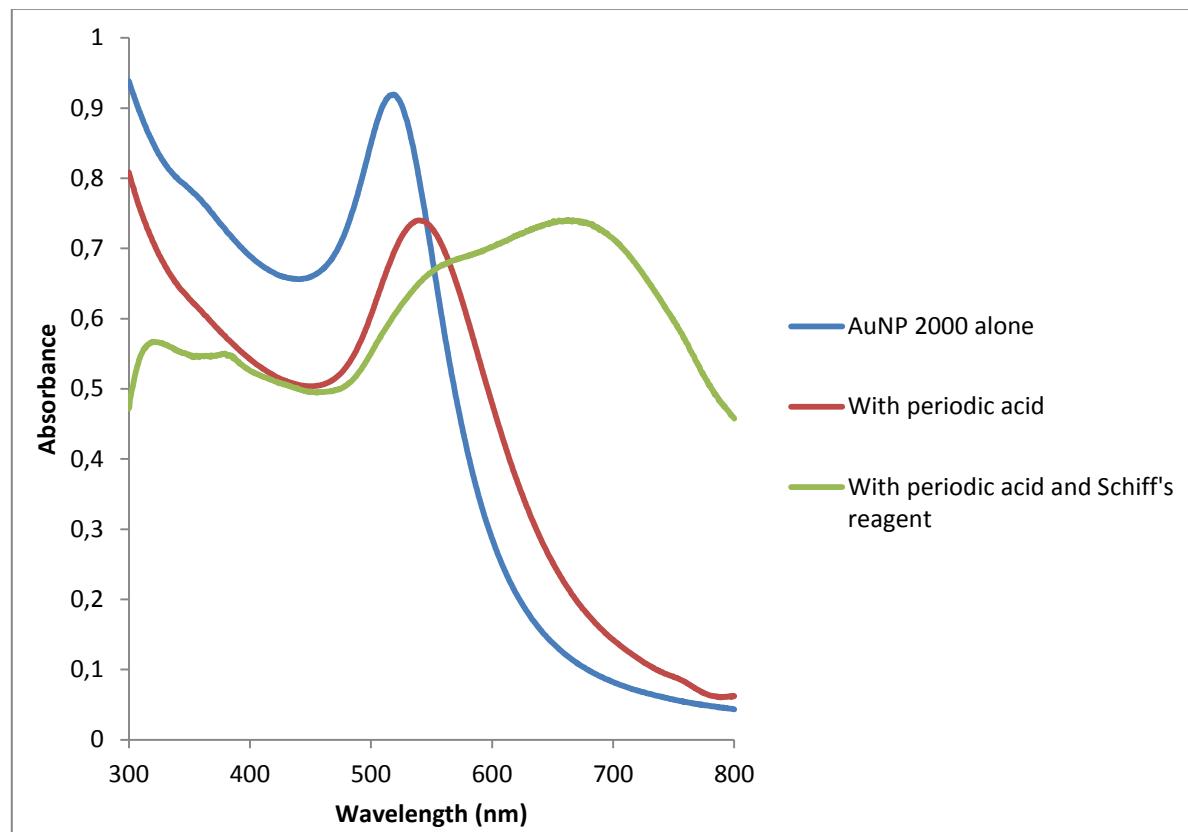


Figure S1: UV-vis spectra of AuNP 2000 in presence of different PAS coloration reagents (after subtraction of the reagents spectra taken alone).

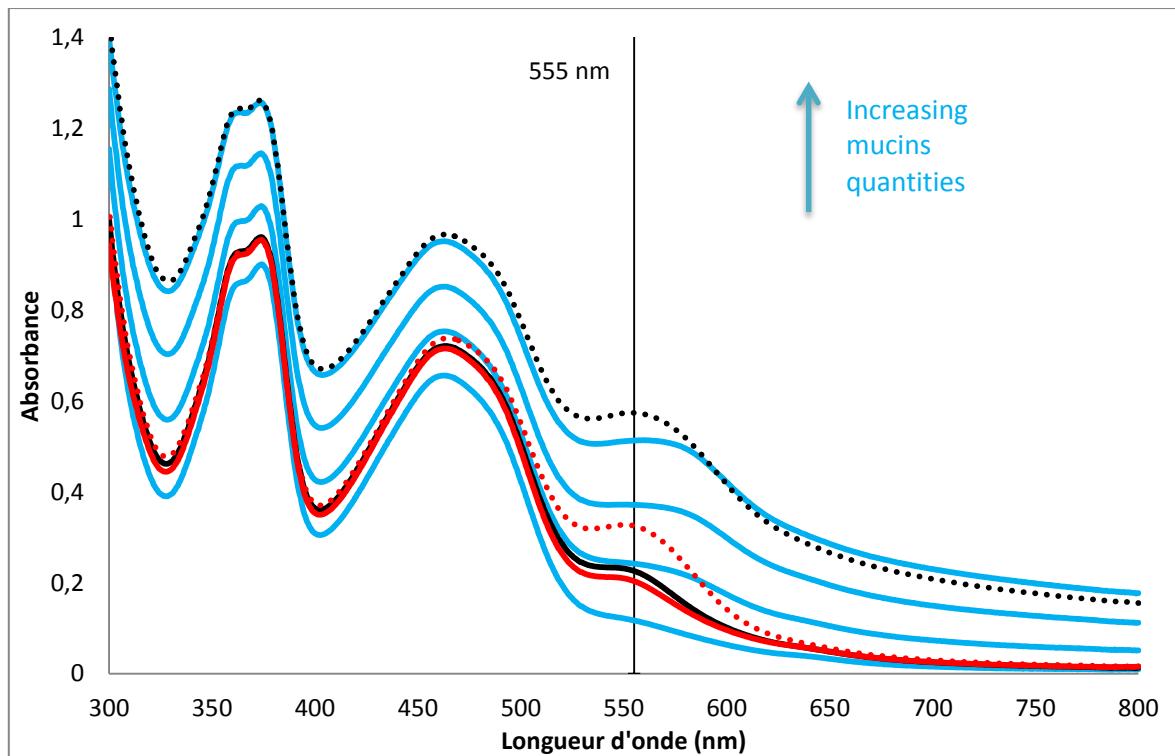


Figure S2: Raw spectra of the PAS coloration used to assess the mucoadhesion properties of AuNP 2000 (in red) and AuNP 2000 from synthesis #2 (in black). Four standards (in blue) having different quantities of mucins (0, 50, 100 and 150 μ g) are used to compare two samples of mucoadhesion (dotted lines; AuNP 2000 + mucins, in red, and AuNP 2000 from synthesis #2 + mucins, in black) and their corresponding blanks (AuNP alone; full line). The amount of AuNP used was 1 mg in each case.

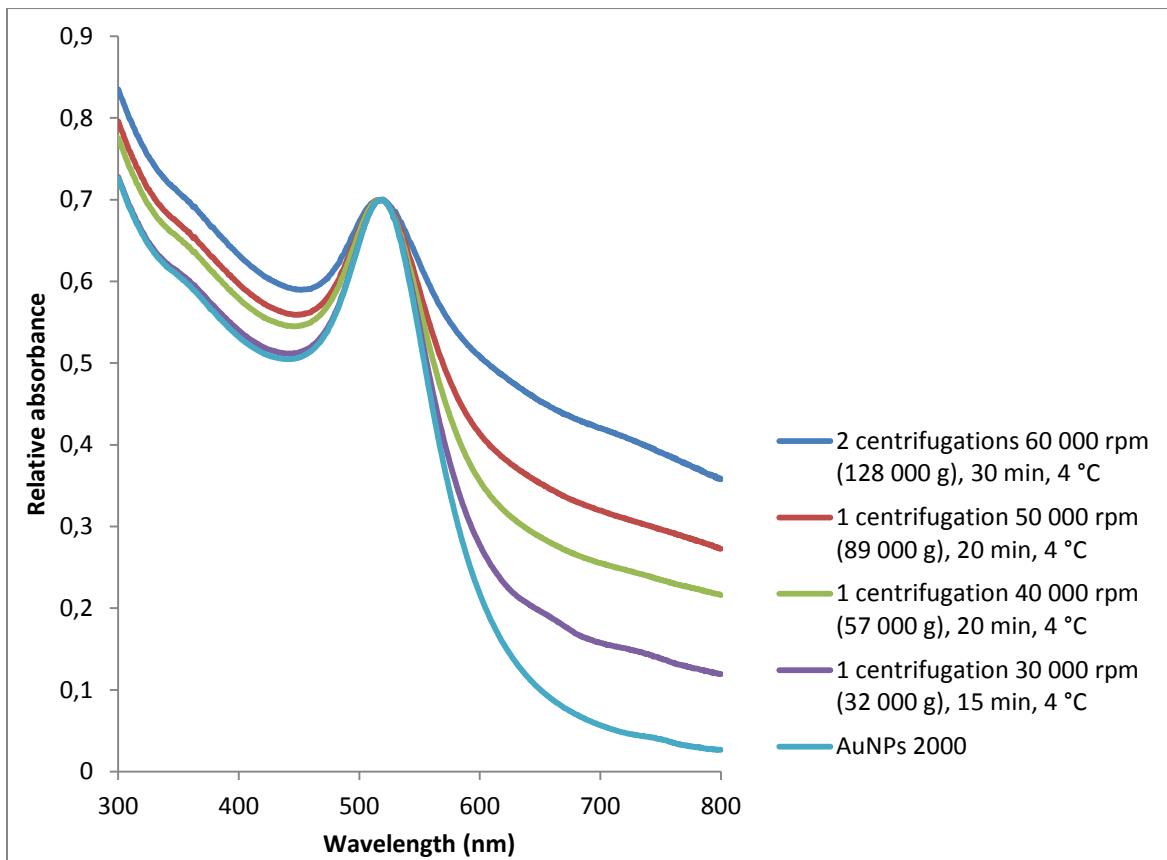


Figure S3: Centrifugation of AuNP 2000. The absorbance values were normalized at 521 nm to assess the centrifugation effect on the general profile of the spectrum and the stability of the AuNP.

Chapitre 6 – Conclusion générale et perspectives

Les travaux menés dans le cadre de ce projet sont effectués en réponse à la nécessité d'améliorer la médication appliquée de manière topique contre le glaucome. En effet, les médicaments oculaires appliqués de cette manière ont une faible biodisponibilité, ce qui engendre une mauvaise efficacité de la médication. Pour remédier à la situation, des nanoparticules d'or synthétisées par une méthode de Brust modifiée et stabilisées par divers groupements PEG ont été synthétisées, purifiées, puis caractérisées.

Concernant l'encapsulation du travoprost dans les vecteurs développés, il s'avère que des nanoparticules d'or stabilisées par du PEG constituent un environnement favorable pour un médicament hydrophobe, tel que cela était prévu. Selon le type de synthèse réalisée, il semble que le médicament peut soit s'encapsuler au sein de la nanoparticule, ou soit rester plus proche de la surface (en périphérie), étant dans ce cas simplement mieux solubilisé. En perspective sur cet aspect, il serait pertinent de réaliser une étude du relargage du médicament par diverses méthodes, comme par exemple par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Plusieurs groupes étudient également la cinétique du relargage d'un médicament par dialyse. Cette technique est appréciée pour sa simplicité, mais elle est néanmoins plus délicate qu'il n'y paraît et les résultats obtenus doivent être analysés de manière critique. En effet, de nombreux auteurs ignorent le fait que lorsque la molécule quitte la nanoparticule, la membrane de dialyse peut alors déterminer en grande partie la cinétique de libération du médicament dans la solution de recueil en agissant comme une barrière qui retient le composé.¹¹⁴

Concernant le potentiel mucoadhésif des AuNP, il a été démontré qu'elles sont effectivement en mesure d'interagir avec les mucines. Les AuNP stabilisées par du PEG thiolé terminé par une fonction méthyle (inerte) en surface semble à l'heure actuelle plus efficaces que lorsque l'on ajoute également du PEG double thiol. Tel que cela a été abordé, il se pourrait que les AuNP double thiol soient en réalité plus densément recouvertes par du PEG, ce qui masquerait le cœur métallique. En raison de la nature des nanoparticules développées, il est cependant difficile de comparer les résultats de mucoadhésion à la littérature. Par exemple, lors de la coloration PAS, la petite taille et la grande solubilité des

AuNP implique une centrifugation bien plus importante que ce qui est employé dans la littérature pour séparer des nanomicelles¹⁰⁹ ou des microsphères de chitosan¹¹⁰ de la solution de mucines. En conséquence, tel que cela a été discuté, il se pourrait que les mucines et les AuNP soient décrochées l'une de l'autre si leurs interactions ne sont pas suffisamment fortes, ce qui aurait pour effet d'abaisser leur potentiel mucoadhésif tel que déterminé par cette technique. La mucoadhésion des nanoparticules d'or n'était pas du tout étudiée dans la littérature et était à l'origine de l'hypothèse de mon projet de recherche. En effet, notre hypothèse portait sur le fait que les cystéines des mucines peuvent se lier avec les nombreux thiols stabilisant les AuNP développées, ou encore directement avec leur cœur métallique. Outre les méthodes d'étude de la mucoadhésion employées, plusieurs autres sont également utilisées dans la littérature pour évaluer l'interaction entre des protéines et des nanoparticules : dichroïsme circulaire, résonance magnétique nucléaire (RMN), électrophorèse, etc.¹¹⁵ Il sera donc intéressant, prochainement, de compléter l'analyse avec ces techniques. À moyen terme, il serait pertinent de faire des tests de mucoadhésion avec des mucines oculaires humaines qui pourraient être prélevées par des ophtalmologistes, puis qui seraient purifiées selon des protocoles déjà établis.^{116, 117}

6.1 Autres méthodes de synthèse des nanoparticules d'or

Présentement, nos nanoparticules sont très petites et seulement passivées par du PEG thiolé. Mais la chimie des nanoparticules d'or et des polymères étant de plus en plus riche, il sera intéressant pour le groupe de continuer à développer d'autres méthodes de synthèse permettant de moduler la taille ou même la forme des nano-objets d'or (ex. : nanobâtonnets,^{118, 119} nanocages^{120, 121}) et de les fonctionnaliser au choix.

La méthode de synthèse des nanoparticules d'or employée dans le cadre des travaux présentés dans ce mémoire est la méthode de Brust. Or, c'est la méthode de Turkevich, présentée brièvement en introduction (chapitre 1), que l'on retrouve présentement le plus dans la littérature pour les applications biomédicales. Cette méthode offre en effet la possibilité d'obtenir une grande gamme de tailles nanoparticulaires.

Une réaction nommée « chimie Click » est également employée dans la littérature pour fonctionnaliser les nanoparticules d'or. En synthétisant tout d'abord une AuNP stabilisée par un ligand inerte (ex. un alcane), il est possible de procéder à un échange de ligand pour obtenir ce même ligand mais terminé par un bromure à la surface de la nanoparticule. De là, le bromure peut être facilement remplacé par un azoture, qu'il est par la suite possible de faire réagir avec un autre ligand (par exemple un PEG) terminé par un alcyne.^{38, 94, 122} Cette réaction implique généralement l'utilisation d'un catalyseur de cuivre mais de nouveaux types de chimie Click permettent dorénavant de réaliser ces réactions en l'absence de métaux, ce qui est nécessaire en vue d'applications biomédicales.¹²³⁻¹²⁵

Enfin, différents autres polymères sont disponibles pour la synthèse de nanoparticules d'or, par exemple le chitosan.¹²⁶ Ce polymère a des groupements amine qui sont protonés au pH physiologique. Leur charge positive peut donc interagir avec les mucines transmembranaires, par exemple MUC1, qui sont chargées négativement à cause de résidus d'acide sialique. Il y a également de nombreux ponts hydrogène qui contribuent à l'interaction entre les deux composés.¹²⁷ Pour réduire la toxicité du chitosan (les composés chargés positivement sont souvent plus ou moins toxiques)⁵⁸, des systèmes hybrides sont développés en ajoutant par exemple de l'acide hyaluronique ou de la cyclodextrine. Il est également intéressant de noter que des nanocapsules de poly- ϵ -caprolactone enrobées de chitosan sont retenues dans les couches superficielles de l'épithélium cornéen, alors que celles qui sont enrobées de PEG accélèrent le transport des nanocapsules à travers tout l'épithélium.¹²⁸

6.2 Autres maladies, autres médicaments, autres muqueuses

Si à plus long terme les propriétés d'encapsulation et de mucoadhésion des divers types de nanoparticules d'or qui seront développées se confirment, il serait envisageable d'encapsuler différentes classes de médicaments afin de traiter d'autres maladies, et de cibler différentes muqueuses (ex. digestives, sexuelles ou respiratoires). Entre temps, les nanoparticules d'or développées dans notre laboratoire ont déjà commencé à être étudiées *in vivo* par un autre étudiant sur un modèle de souris glaucomateuses développé en

collaboration avec un autre chercheur de notre département. L'efficacité et la toxicité du traitement seront ainsi étudiées.

Bibliographie

- [1] Weinreb, R. N., Aung, T., and Medeiros, F. A. (2014) The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review, *JAMA* 311, 1901-1911.
- [2] Peace, J. H., Ahlberg, P., Wagner, M., Lim, J. M., Wirta, D., and Branch, J. D. (2015) Polyquaternium-1-Preserved Travoprost 0.003% or Benzalkonium Chloride-Preserved Travoprost 0.004% for Glaucoma and Ocular Hypertension, *Am. J. Ophthalmol.* 160, 266-274.e261.
- [3] Lee, A. J., and McCluskey, P. (2010) Clinical utility and differential effects of prostaglandin analogs in the management of raised intraocular pressure and ocular hypertension, *Clin. Ophthalmol.* 4, 741-764.
- [4] VanVeldhuisen, P. C., Ederer, F., Gaasterland, D. E., Sullivan, E. K., Beck, A., Prum, B. E., Cyrlin, M. N., Weiss, H., and the AGIS Investigators. (2000) The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS): 7. The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration, *Am. J. Ophthalmol.* 130, 429-440.
- [5] Doughty, M. J., and Zaman, M. L. (2000) Human corneal thickness and its impact on intraocular pressure measures: a review and meta-analysis approach, *Surv. Ophthalmol.* 44, 367-408.
- [6] Sambhara, D., and Aref, A. A. (2014) Glaucoma management: relative value and place in therapy of available drug treatments, *Ther. Adv. Chronic Dis.* 5, 30-43.
- [7] Zimmermann, T. J., and Zalta, A. H. (1983) Facilitating Patient Compliance In Glaucoma Therapy, *Surv. Ophthalmol.* 28, 252-257.
- [8] Toris, C. B., Gabelt, B. T., and Kaufman, P. L. (2008) Update on the Mechanism of Action of Topical Prostaglandins for Intraocular Pressure Reduction, *Surv. Ophthalmol.* 53, S107-S120.
- [9] van der Valk, R., Webers, C. A., Schouten, J. S., Zeegers, M. P., Hendrikse, F., and Prins, M. H. (2005) Intraocular Pressure-Lowering Effects of All Commonly Used Glaucoma Drugs: A Meta-analysis of Randomized Clinical Trials, *Ophthalmology* 112, 1177-1185.
- [10] Actis, A. G., and Rolle, T. (2014) Ocular Surface Alterations and Topical Antiglaucomatous Therapy: A Review, *Open Ophthalmol. J.* 8, 67-72.
- [11] McCue, B. A., Cason, M. M., Curtis, M. A., Faulkner, R. D., and Dahlin, D. C. (2002) Determination of travoprost and travoprost free acid in human plasma by electrospray HPLC/MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28, 199-208.
- [12] Bean, G. W., and Camras, C. B. (2008) Commercially Available Prostaglandin Analogs for the Reduction of Intraocular Pressure: Similarities and Differences, *Surv. Ophthalmol.* 53, S69-S84.
- [13] Gross, R. L., Peace, J. H., Smith, S. E., Walters, T. R., Dubiner, H. B., Weiss, M. J., and Ochsner, K. I. (2008) Duration of IOP reduction with travoprost BAK-free solution, *J. Glaucoma* 17, 217-222.
- [14] Lewis, R. A., Katz, G. J., Weiss, M. J., Landry, T. A., Dickerson, J. E., James, J. E., Hua, S. Y., Sullivan, E. K., Montgomery, D. B., Wells, D. T., Bergamini, M. V., and the Travoprost BAC-free Study Group. (2007) Travoprost 0.004% with and without benzalkonium chloride: a comparison of safety and efficacy, *J. Glaucoma* 16, 98-103.

- [15] Alcon Canada Inc. (January 6, 2016) TRAVATAN® Z (Travoprost Ophthalmic Solution 0.004% w/v) - Product Monograph. Available online.
- [16] Kahook, M. Y., and Noecker, R. J. (2008) Comparison of corneal and conjunctival changes after dosing of travoprost preserved with sofZia, latanoprost with 0.02% benzalkonium chloride, and preservative-free artificial tears, *Cornea* 27, 339-343.
- [17] Aihara, M., Ikeda, Y., Mizoue, S., Arakaki, Y., Kita, N., and Kobayashi, S. (2015) Effect of Switching to Travoprost Preserved With SofZia in Glaucoma Patients With Chronic Superficial PunctateKerati is While Receiving BAK-preserved Latanoprost, *J. Glaucoma*, [Epub ahead of print].
- [18] Parrish, R. K., Palmberg, P., and Sheu, W.-P. (2003) A comparison of latanoprost, bimatoprost, and travoprost in patients with elevated intraocular pressure, *Am. J. Ophthalmol.* 135, 688-703.
- [19] Rautio, J., Kumpulainen, H., Heimbach, T., Oliyai, R., Oh, D., Jarvinen, T., and Savolainen, J. (2008) Prodrugs: design and clinical applications, *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 255-270.
- [20] Konstas, A. G. P., Mikropoulos, D., Kaltsos, K., Jenkins, J. N., and Stewart, W. C. (2006) 24-Hour Intraocular Pressure Control Obtained with Evening- versus Morning-Dosed Travoprost in Primary Open-Angle Glaucoma, *Ophthalmology* 113, 446-450.
- [21] Goldberg, I., Cunha-Vaz, J., Jakobsen, J. E., Nordmann, J. P., Trost, E., Sullivan, E. K., and the International Travoprost Study Group. (2001) Comparison of topical travoprost eye drops given once daily and timolol 0.5% given twice daily in patients with open-angle glaucoma or ocular hypertension, *J. Glaucoma* 10, 414-422.
- [22] Sharif, N. A., Davis, T. L., and Williams, G. W. (1999) [3H]AL-5848 ([3H]9beta-(+)-Fluprostostenol). Carboxylic acid of travoprost (AL-6221), a novel FP prostaglandin to study the pharmacology and autoradiographic localization of the FP receptor, *J. Pharm. Pharmacol.* 51, 685-694.
- [23] Whitson, J. T. (2005) Travoprost – a new prostaglandin analogue for the treatment of glaucoma, *Expert Opin. Pharmacother.* 3, 965-977.
- [24] Liang, Y., Woodward, D. F., Guzman, V. M., Li, C., Scott, D. F., Wang, J. W., Wheeler, L. A., Garst, M. E., Landsverk, K., Sachs, G., Krauss, A. H. P., Cornell, C., Martos, J., Pettit, S., and Fliri, H. (2008) Identification and pharmacological characterization of the prostaglandin FP receptor and FP receptor variant complexes, *Br. J. Pharmacol.* 154, 1079-1093.
- [25] Liu, S., Dozois, M. D., Chang, C. N., Ahmad, A., Ng, D. L., Hileeto, D., Liang, H., Reyad, M. M., Boyd, S., Jones, L. W., and Gu, F. X. (2016) Prolonged Ocular Retention of Mucoadhesive Nanoparticle Eye Drop Formulation Enables Treatment of Eye Diseases Using Significantly Reduced Dosage, *Mol. Pharm.* 13, 2897-2905.
- [26] Mishra, G. P., Bagui, M., Tamboli, V., and Mitra, A. K. (2011) Recent applications of liposomes in ophthalmic drug delivery, *J. Drug Deliv.* 2011, 863734.
- [27] Vaishya, R. D., Khurana, V., Patel, S., and Mitra, A. K. (2014) Controlled ocular drug delivery with nanomicelles, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 6, 422-437.
- [28] Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J., and Whyman, R. (1994) Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid–Liquid system, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 801-802.

- [29] Templeton, A. C., Wuelfing, W. P., and Murray, R. W. (2000) Monolayer-Protected Cluster Molecules, *Acc. Chem. Res.* 33, 27-36.
- [30] Perala, S. R., and Kumar, S. (2013) On the mechanism of metal nanoparticle synthesis in the Brust-Schiffrin method, *Langmuir* 29, 9863-9873.
- [31] Sardar, R., Funston, A. M., Mulvaney, P., and Murray, R. W. (2009) Gold nanoparticles: past, present, and future, *Langmuir* 25, 13840-13851.
- [32] Turkevich, J., Stevenson, P. C., and Hillier, J. (1951) A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discuss. Faraday Soc.* 11, 55-75.
- [33] Frens, G. (1973) Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions, *Nature Physical Science* 241, 20-22.
- [34] Pakiari, A. H., and Jamshidi, Z. (2010) Nature and Strength of M-S Bonds (M) Au, Ag, and Cu) in Binary Alloy Gold Clusters, *J. Phys. Chem. A* 14, 9212-9221.
- [35] Boisselier, E., and Astruc, D. (2009) Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity, *Chem. Soc. Rev.* 38, 1759-1782.
- [36] Ho, T.-L. (1975) Hard soft acids bases (HSAB) principle and organic chemistry, *Chem. Rev.* 75, 1-20.
- [37] Mei, B. C., Oh, E., Susumu, K., Farrell, D., Mountziaris, T. J., and Matoussi, H. (2009) Effects of ligand coordination number and surface curvature on the stability of gold nanoparticles in aqueous solutions, *Langmuir* 25, 10604-10611.
- [38] Boisselier, E., Salmon, L., Ruiz, J., and Astruc, D. (2008) How to very efficiently functionalize gold nanoparticles by "click" chemistry, *Chem. Commun.*, 5788-5790.
- [39] Caragheorgheopol, A., and Chechik, V. (2008) Mechanistic aspects of ligand exchange in Au nanoparticles, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 10, 5029-5041.
- [40] Hostetler, M. J., Templeton, A. C., and Murray, R. W. (1999) Dynamics of Place-Exchange Reactions on Monolayer-Protected Gold Cluster Molecules, *Langmuir* 15, 3782-3789.
- [41] Eustis, S., and A., E.-S. M. (2006) Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes, *Chem. Soc. Rev.* 35, 209-217.
- [42] Moores, A., and Goettmann, F. (2006) The plasmon band in noble metal nanoparticles: an introduction to theory and applications, *New J. Chem.* 30, 1121-1132.
- [43] Amendola, V., and Meneghetti, M. (2009) Size Evaluation of Gold Nanoparticles by UV-vis Spectroscopy, *J. Phys. Chem. C* 113, 4277-4285.
- [44] Yang, X., Yang, M., Pang, B., Vara, M., and Xia, Y. (2015) Gold Nanomaterials at Work in Biomedicine, *Chem. Rev.* 115, 10410-10488.
- [45] de Oliveira, R., Zhao, P., Li, N., de Santa Maria, L. C., Vergnaud, J., Ruiz, J., Astruc, D., and Barratt, G. (2013) Synthesis and in vitro studies of gold nanoparticles loaded with docetaxel, *Int. J. Pharm.* 454, 703-711.
- [46] Ajnai, G., Chiu, A., Kan, T., Cheng, C.-C., Tsai, T.-H., and Chang, J. (2014) Trends of Gold Nanoparticle-based Drug Delivery System in Cancer Therapy, *J. Exp. Clin. Med.* 6, 172-178.
- [47] Brown, S. D., Nativo, P., Smith, J. A., Stirling, D., Edwards, P. R., Venugopal, B., Flint, D. J., Plumb, J. A., Graham, D., and Wheate, N. J. (2010) Gold Nanoparticles

- for the Improved Anticancer Drug Delivery of the Active Component of Oxaliplatin, *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 4678-4684.
- [48] Abadeer, N. S., and Murphy, C. J. (2016) Recent Progress in Cancer Thermal Therapy Using Gold Nanoparticles, *J. Phys. Chem. C* **120**, 4691-4716.
- [49] Anselmo, A. C., and Mitragotri, S. (2016) Nanoparticles in the clinic, *Bioeng. Transl. Med.* **1**, 10-29.
- [50] Kharlamov, A. N., Tyurnina, A. E., Veselova, V. S., Kovtun, O. P., Shur, V. Y., and Gabinsky, J. L. (2015) Silica-gold nanoparticles for atheroprotective management of plaques: results of the NANOM-FIM trial, *Nanoscale* **7**, 8003-8015.
- [51] Cole, L. E., Ross, R. D., Tilley, J. M., Vargo-Gogola, T., and Roeder, R. K. (2015) Gold nanoparticles as contrast agents in x-ray imaging and computed tomography, *Nanomedicine (Lond.)* **10**, 321-341.
- [52] Kim, D., Jeong, Y. Y., and Jon, S. (2010) A drug-loaded aptamer-gold nanoparticle bioconjugate for combined CT imaging and therapy of prostate cancer, *ACS Nano* **4**, 3689-3696.
- [53] de la Zerda, A., Prabhulkar, S., Perez, V. L., Ruggeri, M., Paranjape, A. S., Habte, F., Gambhir, S. S., and Awdeh, R. M. (2015) Optical coherence contrast imaging using gold nanorods in living mice eyes, *Clin. Experiment. Ophthalmol.* **43**, 358-366.
- [54] Tong, L., Wei, Q., Wei, A., and Cheng, J. X. (2009) Gold nanorods as contrast agents for biological imaging: optical properties, surface conjugation and photothermal effects, *Photochem. Photobiol.* **85**, 21-32.
- [55] Adler, D. C., Huang, S.-W., Huber, R., and Fujimoto, J. G. (2008) Photothermal detection of gold nanoparticles using phase-sensitive optical coherence tomography, *Opt. Express* **16**, 4376-4393.
- [56] Alkilany, A. M., and Murphy, C. J. (2010) Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far?, *J. Nanopart. Res.* **12**, 2313-2333.
- [57] Goodman, C. M., McCusker, C. D., Yilmaz, T., and Rotello, V. M. (2004) Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains, *Bioconjugate Chem.* **15**, 897-900.
- [58] Frohlich, E. (2012) The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles, *Int. J. Nanomedicine* **7**, 5577-5591.
- [59] Moore, T. L., Rodriguez-Lorenzo, L., Hirsch, V., Balog, S., Urban, D., Jud, C., Rothen-Rutishauser, B., Lattuada, M., and Petri-Fink, A. (2015) Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions, *Chem. Soc. Rev.* **44**, 6287-6305.
- [60] Lee, J. K., Kim, T. S., Bae, J. Y., Jung, A. Y., Lee, S. M., Seok, J. H., Roh, H. S., Song, C. W., Choi, M. J., Jeong, J., Chung, B. H., Lee, Y. G., Jeong, J., and Cho, W. S. (2015) Organ-specific distribution of gold nanoparticles by their surface functionalization, *J. Appl. Toxicol.* **35**, 573-580.
- [61] Netsomboon, K., and Bernkop-Schnurch, A. (2016) Mucoadhesive vs. mucopenetrating particulate drug delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **98**, 76-89.
- [62] Wang, Y. Y., Lai, S. K., Suk, J. S., Pace, A., Cone, R., and Hanes, J. (2008) Addressing the PEG mucoadhesivity paradox to engineer nanoparticles that "slip" through the human mucus barrier, *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 9726-9729.
- [63] Lai, S. K., Wang, Y. Y., and Hanes, J. (2009) Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 158-171.

- [64] Wang, Y. Y., Lai, S. K., So, C., Schneider, C., Cone, R., and Hanes, J. (2011) Mucoadhesive nanoparticles may disrupt the protective human mucus barrier by altering its microstructure, *PLoS One* 6, e21547.
- [65] Kolate, A., Baradia, D., Patil, S., Vhora, I., Kore, G., and Misra, A. (2014) PEG - A versatile conjugating ligand for drugs and drug delivery systems, *J. Control. Release* 192C, 67-81.
- [66] Patterson, M., Vogel, H. J., and Prenner, E. J. (2016) Biophysical characterization of monofilm model systems composed of selected tear film phospholipids, *Biochim. Biophys. Acta* 1858, 403-414.
- [67] Hodges, R. R., and Dartt, D. A. (2013) Tear film mucins: front line defenders of the ocular surface; comparison with airway and gastrointestinal tract mucins, *Exp. Eye Res.* 117, 62-78.
- [68] Bansil, R., and Turner, B. S. (2006) Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 11, 164-170.
- [69] Watanabe, H. (2002) Significance of Mucin on the Ocular Surface, *Cornea* 21, S17-S22.
- [70] Helenius, A. (2001) Intracellular Functions of N-Linked Glycans, *Science* 291, 2364-2369.
- [71] Lai, S. K., Wang, Y. Y., Wirtz, D., and Hanes, J. (2009) Micro- and macrorheology of mucus, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 86-100.
- [72] Shen, J., Wang, Y., Ping, Q., Xiao, Y., and Huang, X. (2009) Mucoadhesive effect of thiolated PEG stearate and its modified NLC for ocular drug delivery, *J. Control. Release* 137, 217-223.
- [73] Maurice, D. M. (2002) Drug delivery to the posterior segment from drops, *Surv. Ophthalmol.* 47, S41-S52.
- [74] Joshi, A., Maurice, D., and Paugh, J. R. (1996) A new method for determining corneal epithelial barrier to fluorescein in humans, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 1008-1016.
- [75] Kessler, C., Bleckmann, H., and Kleintges, G. (1991) Influence of the concentration of metipranolol eye drops on the drug concentration in human aqueous humour, *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 229, 487-491.
- [76] Loftsson, T., Jansook, P., and Stefansson, E. (2012) Topical drug delivery to the eye: dorzolamide, *Acta Ophthalmol.* 90, 603-608.
- [77] Bänniger, P. B., and Becht, C. N. (2011) Comment un médicament atteint-il son site d'action dans l'oeil?, *Forum Med Suisse* 11, 192-195.
- [78] Edsman, K., and Hagerstrom, H. (2005) Pharmaceutical applications of mucoadhesion for the non-oral routes, *J. Pharm. Pharmacol.* 57, 3-22.
- [79] Serra, L., Domenech, J., and Peppas, N. A. (2006) Design of poly(ethylene glycol)-tethered copolymers as novel mucoadhesive drug delivery systems, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 63, 11-18.
- [80] Sigma-Aldrich Co. Mucin. Available online. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/structural-proteins/mucin.html> (accessed November 17, 2016).
- [81] Rowe, M. P., Plass, K. E., Kim, K., Kurdak, Ç., Zellers, E. T., and Matzger, A. J. (2004) Single-Phase Synthesis of Functionalized Gold Nanoparticles, *Chem. Mater.* 16, 3513-3517.

- [82] Oh, E., Susumu, K., Goswami, R., and Matoussi, H. (2010) One-phase synthesis of water-soluble gold nanoparticles with control over size and surface functionalities, *Langmuir* 26, 7604-7613.
- [83] Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J., and Fernig, D. G. (2007) Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra, *Anal. Chem.* 79, 4215-4221.
- [84] Alkilany, A. M., Abulataeffeh, S. R., Mills, K. K., Yaseen, A. I., Hamaly, M. A., Alkhatib, H. S., Aiedeh, K. M., and Stone, J. W. (2014) Colloidal stability of citrate and mercaptoacetic acid capped gold nanoparticles upon lyophilization: effect of capping ligand attachment and type of cryoprotectants, *Langmuir* 30, 13799-13808.
- [85] Malvern Instruments Ltd. Zetasizer Nano ZS. Available online. <http://www.malvern.com/fr/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs/> (accessed May 31, 2016).
- [86] Brookhaven Instruments Corporation. NanoBrook Omni - Particle Sizer and Zeta Potential Analyzer. Available online. <http://www.brookhaveninstruments.com/pdf/Zeta%20Potential/NanoBrook-Omni.pdf> (accessed August 1, 2016).
- [87] Coronado, E. A., Encina, E. R., and Stefani, F. D. (2011) Optical properties of metallic nanoparticles: manipulating light, heat and forces at the nanoscale, *Nanoscale* 3, 4042-4059.
- [88] Sze, A., Erickson, D., Ren, L., and Li, D. (2003) Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow, *J. Colloid Interface Sci.* 261, 402-410.
- [89] Bhattacharjee, S. (2016) DLS and zeta potential - What they are and what they are not?, *J. Control. Release* 235, 337-351.
- [90] Daniel, M.-C., and Astruc, D. (2004) Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology, *Chem. Rev.* 104, 293-346.
- [91] LECO Corporation. SC-144DR Series Sulfur/Carbon. Available online. http://fr.leco-europe.com/wp-content/uploads/leco_docs/product-files/sc144dr-bro-209-134.pdf (accessed July 14, 2016).
- [92] SGS Canada Inc. Au, Pt, Pd by Fire Assay. Available online. <http://www.sgs.ca/~/media/Local/Canada/Documents/Flyers%20and%20Leaflets/S GS-1033-Precious-Metal-Assays-and-Analysis-French.pdf> (accessed July 14, 2016).
- [93] Hostetler, M. J., Wingate, J. E., Zhong, C.-J., Harris, J. E., Vachet, R. W., Clark, M. R., Londono, J. D., Green, S. J., Stokes, J. J., Wignall, G. D., Glish, G. L., Porter, M. D., Evans, N. D., and Murray, R. W. (1998) Alkanethiolate Gold Cluster Molecules with Core Diameters from 1.5 to 5.2 nm: Core and Monolayer Properties as a Function of Core Size, *Langmuir* 14, 17-30.
- [94] Boisselier, E., Diallo, A. K., Salmon, L., Ornelas, C., Ruiz, J., and Astruc, D. (2010) Encapsulation and Stabilization of Gold Nanoparticles with “Click” Polyethyleneglycol Dendrimers, *J. Am. Chem. Soc.* 132, 2729–2742.
- [95] Sakai, T., and Alexandridis, P. (2005) Mechanism of gold metal ion reduction, nanoparticle growth and size control in aqueous amphiphilic block copolymer solutions at ambient conditions, *J. Phys. Chem. B* 109, 7766-7777.

- [96] Francois, A., Laroche, A., Pinaud, N., Salmon, L., Ruiz, J., Robert, J., and Astruc, D. (2011) Encapsulation of docetaxel into PEGylated gold nanoparticles for vectorization to cancer cells, *ChemMedChem* 6, 2003-2008.
- [97] Goldmann, C., Lazzari, R., Paquez, X., Boissière, C., Ribot, F., Sanchez, C., Chanéac, C., and Portehault, D. (2015) Charge Transfer at Hybrid Interfaces: Plasmonics of Aromatic Thiol-Capped Gold Nanoparticles, *ACS Nano* 9, 7572-7582.
- [98] Zijlstra, P., Paulo, P. M., Yu, K., Xu, Q. H., and Orrit, M. (2012) Chemical interface damping in single gold nanorods and its near elimination by tip-specific functionalization, *Angew. Chem. Int. Ed.* 51, 8352-8355.
- [99] Bjoerling, M., Karlstroem, G., and Linse, P. (1991) Conformational adaption of poly(ethylene oxide): A carbon-13 NMR study, *J. Phys. Chem.* 95, 6706-6709.
- [100] Andreescu, D., Sau, T. K., and Goia, D. V. (2006) Stabilizer-free nanosized gold sols, *J. Colloid Interface Sci.* 298, 742-751.
- [101] Sigma-Aldrich Co. Dialysis tubing cellulose membrane. Available online. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d9777?lang=en®ion=CA> (accessed May 31, 2016).
- [102] Achouri, D., Alhanout, K., Piccerelle, P., and Andrieu, V. (2013) Recent advances in ocular drug delivery, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 39, 1599-1617.
- [103] Coutinho, A., and Prieto, M. (1993) Ribonuclease T1 and alcohol dehydrogenase fluorescence quenching by acrylamide: A laboratory experiment for undergraduate students, *J. Chem. Educ.* 70, 425-428.
- [104] Komarnicka, U. K., Starosta, R., Plotek, M., de Almeida, R. F., Jezowska-Bojczuk, M., and Kyziol, A. (2016) Copper(I) complexes with phosphine derived from sparfloxacin. Part II: a first insight into the cytotoxic action mode, *Dalton Trans.* 45, 5052-5063.
- [105] Liu, M., Zhang, J., Shan, W., and Huang, Y. (2015) Developments of mucus penetrating nanoparticles, *Asian J. Pharm. Sci.* 10, 275-282.
- [106] Madsen, J. B., Svensson, B., Abou Hachem, M., and Lee, S. (2015) Proteolytic Degradation of Bovine Submaxillary Mucin (BSM) and Its Impact on Adsorption and Lubrication at a Hydrophobic Surface, *Langmuir* 31, 8303-8309.
- [107] Lakowicz, J. R. (2006) Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed., Springer, New York.
- [108] Mantle, M., and Allen, A. (1978) A colorimetric assay for glycoproteins based on the periodic acid/Schiff stain, *Biochem. Soc. Trans.* 6, 607-609.
- [109] Lian, H., Zhang, T., Sun, J., Liu, X., Ren, G., Kou, L., Zhang, Y., Han, X., Ding, W., Ai, X., Wu, C., Li, L., Wang, Y., Sun, Y., Wang, S., and He, Z. (2013) Enhanced oral delivery of paclitaxel using acetylcysteine functionalized chitosan-vitamin E succinate nanomicelles based on a mucus bioadhesion and penetration mechanism, *Mol. Pharm.* 10, 3447-3458.
- [110] Dhawan, S., Singla, A. K., and Sinha, V. R. (2004) Evaluation of Mucoadhesive Properties of Chitosan Microspheres Prepared by Different Methods, *AAPS PharmSciTech* 5, E67.
- [111] Kilcoyne, M., Gerlach, J. Q., Farrell, M. P., Bhavanandan, V. P., and Joshi, L. (2011) Periodic acid-Schiff's reagent assay for carbohydrates in a microtiter plate format, *Anal. Biochem.* 416, 18-26.

- [112] Robins, J. H., Abrams, G. D., and Pincock, J. A. (1980) The structure of Schiff reagent aldehyde adducts and the mechanism of the Schiff reaction as determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Can. J. Chem.* 58, 339-347.
- [113] Siriwardana, K., Wang, A., Vangala, K., Fitzkee, N., and Zhang, D. (2013) Probing the effects of cysteine residues on protein adsorption onto gold nanoparticles using wild-type and mutated GB3 proteins, *Langmuir* 29, 10990-10996.
- [114] Zambito, Y., Pedreschi, E., and Di Colo, G. (2012) Is dialysis a reliable method for studying drug release from nanoparticulate systems?-A case study, *Int. J. Pharm.* 434, 28-34.
- [115] Mahmoudi, M., Lynch, I., Ejtehadi, M. R., Monopoli, M. P., Bombelli, F. B., and Laurent, S. (2011) Protein-nanoparticle interactions: opportunities and challenges, *Chem. Rev.* 111, 5610-5637.
- [116] Chao, C. C., Butala, S. M., and Herp, A. (1988) Studies on the isolation and composition of human ocular mucin, *Exp. Eye Res.* 47, 185-196.
- [117] Corfield, A. P., Carrington, S. D., Hicks, S. J., Berry, M., and Ellingham, R. (1997) Ocular Mucins: Purification, Metabolism and Functions, *Prog. Retin. Eye Res.* 16, 627-656.
- [118] Stone, J., Jackson, S., and Wright, D. (2011) Biological applications of gold nanorods, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 3, 100-109.
- [119] Vigderman, L., Khanal, B. P., and Zubarev, E. R. (2012) Functional gold nanorods: synthesis, self-assembly, and sensing applications, *Adv. Mater.* 24, 4811-4841.
- [120] Chen, J., Saeki, F., Wiley, B. J., Cang, H., Cobb, M. J., Li, Z. Y., Au, L., Zhang, H., Kimmey, M. B., Li, X., and Xia, Y. (2005) Gold nanocages: bioconjugation and their potential use as optical imaging contrast agents, *Nano Lett.* 5, 473-477.
- [121] Skrabalak, S. E., Chen, J., Sun, Y., Lu, X., Au, L., Cobley, C. M., and Xia, Y. (2008) Gold nanocages: synthesis, properties, and applications, *Acc. Chem. Res.* 41, 1587-1595.
- [122] Boisselier, E., Diallo, A. K., Salmon, L., Ruiz, J., and Astruc, D. (2008) Gold nanoparticles synthesis and stabilization via new "clicked" polyethyleneglycol dendrimers, *Chem. Commun.*, 4819-4821.
- [123] Baskin, J. M., Prescher, J. A., Laughlin, S. T., Agard, N. J., Chang, P. V., Miller, I. A., Lo, A., Codelli, J. A., and Bertozzi, C. R. (2007) Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 16793-16797.
- [124] Jewett, J. C., and Bertozzi, C. R. (2010) Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology, *Chem. Soc. Rev.* 39, 1272-1279.
- [125] Jewett, J. C., Sletten, E. M., and Bertozzi, C. R. (2010) Rapid Cu-Free Click Chemistry with Readily Synthesized Biarylazacyclooctynones, *J. Am. Chem. Soc.* 132, 3688-3690.
- [126] Bhumkar, D. R., Joshi, H. M., Sastry, M., and Pokharkar, V. B. (2007) Chitosan reduced gold nanoparticles as novel carriers for transmucosal delivery of insulin, *Pharm. Res.* 24, 1415-1426.
- [127] du Toit, L. C., Pillay, V., Choonara, Y. E., Govender, T., and Carmichael, T. (2011) Ocular drug delivery – a look towards nanobioadhesives, *Expert Opin. Drug Deliv.* 8, 71-94.
- [128] De Campos, A. (2003) The effect of a PEG versus a chitosan coating on the interaction of drug colloidal carriers with the ocular mucosa, *Eur. J. Pharm. Sci.* 20, 73-81.