

Introduction générale de la thèse	1
Chapitre I : Contexte bibliographique	5
A. Nanomédecine	5
1. Contexte appliqué au cancer	5
2. Solutions pour améliorer la distribution d'une substance active à l'organisme	6
a) Formation de sels et modification locale du pH	6
b) Contrôle de la cristallisation du principe actif	6
c) Utilisation de cosolvants et de tensioactifs	6
d) Utilisation de nanovecteurs	7
e) Classification des nanovecteurs	8
(1) Nanovecteurs inorganiques	8
(a) Nanoparticules de silice	8
(b) Nanoparticules d'or	8
(c) Oxydes de fer	9
(d) Fullerène, graphène et nanotubes de carbones	9
(2) Nanovecteurs organiques	10
(a) Liposomes	10
(b) Nanovecteurs à base de polymères	10
f) Caractérisation d'auto-assemblages à base de copolymères	13
B. La thérapie photodynamique	16
1. Origine historique	16
a) La photothérapie	16
b) La thérapie photodynamique	16
2. Principe	16
3. Les photosensibilisateurs	17
a) Propriétés du photosensibilisateur idéal	17
b) Photosensibilisateurs de première génération	18
c) Photosensibilisateurs de seconde génération	18
d) Photosensibilisateurs de troisième génération	19
e) Vectorisation de photosensibilisateurs	19
f) Encapsulation des photosensibilisateurs	19
C. Interactions entre nanovecteurs et membranes	21

1. La membrane cellulaire.....	21
a) Les lipides	21
(1) Phosphoglycérides	21
(2) Sphingolipides	22
(3) Stérols	22
(4) Composition en lipides de la membrane	22
b) Les protéines membranaires	23
c) Particularité des procaryotes	24
2. Effets de nanovecteurs à base de copolymère sur des cellules	24
a) Cultures cellulaires	24
(1) Type de cellules.....	24
(2) Méthode de culture	24
b) Mesures sur des cellules	25
3. Les modèles de membranes	26
a) Types de modèles de membranes	27
(1) Géométrie	27
(a) Modèles de membranes sphériques.....	27
(b) Modèles de membranes planes.....	29
(2) Composition	30
4. Méthode de caractérisation des membranes modèles.....	30
a) Techniques de diffusion	30
b) Microscopie	30
c) Calorimétrie	31
d) Tension de surface	31
e) Spectroscopie	32
f) Autres techniques de caractérisation	32
5. Interactions entre membranes et nanovecteurs à base de copolymères à blocs.....	33
a) Modélisation par dynamique moléculaire	33
b) Mesures sur des monocouches lipidiques	34
c) Mesures sur des bicouches lipidiques supportées.....	34
d) Mesures sur des liposomes.....	35
D. Objectifs de la thèse.....	36

Chapitre II : Etude des propriétés physico-chimiques de nanovecteurs à base de copolymères à blocs encapsulant un photosensibilisateur	39
A. Propriétés spectroscopiques	39
B. Affinité du phéophorbide-a pour les différents types d'objets	42
C. Transfert du phéophorbide-a des micelles vers les modèles de membranes	45
1. Mesures par fluorescence.....	45
2. Etude d'un mélange de micelles et de liposomes par AF4	49
D. Conclusion	51
 Chapitre III : Etude des effets sur des modèles de membranes de nanovecteurs à base de copolymères à blocs encapsulant un photosensibilisateur sous irradiation lumineuse	57
A. Suivi des modifications de perméabilité des modèles de membranes à la suite d'une irradiation lumineuse	57
1. Recherche des conditions expérimentales	57
2. Mesure de la production d'oxygène singulet	61
3. Suivi des modifications de perméabilité des membranes	64
B. Suivi de l'oxydation des modèles de membranes	68
C. Conclusion	74
 Conclusions générales de la thèse	79
 Annexe 1: Matériels et méthodes.....	85
Annexe 2 : Références.....	97

Liste des abréviations :

ADPA : acide dipropionique d'anthracène

AF4 : asymetrical flow field-flow fractionation / fractionnement flux-force flux asymétrique

AFM : atomic force microscopy /microscopie à force atomique

ATP : adénosine triphosphate

CBF : carboxyfluoresceine

DMPC : 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DOPC : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DOPE : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine

DOPG : : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)

DPH : diphenyl-1,3,5-hexatriene

DPPC : 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DSC : differential scanning calorimetry / calorimétrie différentielle à balayage

EPR : enhanced permeability and retention / perméabilité et rétention augmentées

FFF : field-flow fractionation / fractionnement flux-force

FRAP : fluorescence recovery after photobleaching / fluorescence après photoblanchiment

FRET : Förster resonance energy transfer / transfert d'énergie par résonance de type Förster

GUV : giant unilamellar vesicle / vésicule unilamellaire géante

IRM : imagerie par résonance magnétique

ITC : isothermal titration calorimetry / titrage calorimétrique isotherme

LDH : lactate déshydrogénase

LUV : large unilamellar vesicle / vésicule unilamellaire large

MLV : multilamellar vesicle / vésicule multilamellaires

OMS : organization mondiale de la santé

PBS : phosphate buffered saline / tampon phosphate salin

PC : phosphatidylcholine

PCL : poly(ϵ -caprolactone)

PDMS : poly(diméthylsiloxane)

PDT : photodynamic therapy / thérapie photodynamique

PE : phosphatidyléthanolamine

PEG : poly(éthylène glycol)

PEO : poly(ethylene oxide) / poly(oxyde d'éthylène)

PGA : poly(glycolic acid) / poly(acide glycolique)

PGMA : poly(glycidyl methacrylate) / poly(methacrylate de glycidyle)

PI : phosphatidylinositol

PIC : poly ion complex / complexe poly ionique

PLA : poly(lactic acid) / poly (acide lactique)

POPC : 1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine

PPO : poly(propylene oxide) / poly(oxyde de propylène)

PS (polymère) : poly(styrène)

PS (lipide) : phosphatidylsérine

RMN : résonance magnétique nucléaire

ROS : reactive oxygen species / espèces réactives de l'oxygène

RPE : résonance paramagnétique électronique

SM : sphingomyéline

SUV : small unilamellar vesicle / vésicule unilamellaire petite

SVD : singular value decomposition / décomposition en valeurs singulières

TEMP : 2,2,6,6 tetramethylpiperidine

Introduction générale de la thèse

Introduction générale de la thèse

La nanomédecine est l'utilisation des nanotechnologies pour la prévention, le diagnostic et le traitement de maladies. Parmi ses applications, l'encapsulation de principes actifs joue un rôle prépondérant dans le développement de nouvelles thérapies et de nouveaux diagnostics. Elle est intimement liée à l'essor de la chimie de synthèse qui a permis à la médecine de faire un bond en avant via la conception de molécules actives plus complexes. Cela a eu pour effet de produire des molécules bien souvent peu solubles dans l'eau, les rendant incompatibles avec une administration directe par voie orale ou par injection. Dans ce cas, il est possible de passer par une substance tierce qui servira d'interface entre le médicament et l'organisme. Une des manières de procéder est d'utiliser des objets de taille de l'ordre de la dizaine à la centaine de nanomètre, un nanovecteur, pouvant accueillir en son sein la substance active et l'acheminer à sa cible. Le vecteur idéal est non-toxique, biodégradable, avec un temps de circulation dans l'organisme assez long pour assurer une bonne distribution de la substance active.

De nombreuses familles de vecteurs ont été développées, se différenciant notamment par leur composition. Celle nous intéressant est la famille des nanoparticules à base de polymère et notamment à base de copolymères à blocs amphiphiles. Ces molécules peuvent s'auto-assembler en milieu aqueux pour former des objets stables présentant des compartiments hydrophobes et hydrophiles, ce qui leur permet d'accueillir tous types de molécules.

Une des thérapies contre le cancer pour laquelle l'encapsulation de principe actif présente un grand intérêt est la thérapie photodynamique (PDT). La PDT repose sur l'utilisation de molécules, appelées photosensibilisateurs, capables sous irradiation lumineuse de produire des espèces réactives de l'oxygène, entraînant la mort des cellules de manière localisée. De manière générale, les photosensibilisateurs sont des molécules très peu solubles dans l'eau. Des études sur des vecteurs encapsulant des photosensibilisateurs ont été menées et ont montré une augmentation de leur efficacité, allant jusqu'à leur approbation par les autorités de santé. Le développement de nouvelles formulations est toujours en cours mais il est très souvent compliqué de savoir quel paramètre changer pour améliorer l'efficacité de la formulation.

En effet, de manière générale, le développement de nouvelles formulations passe par des tests sur des cultures cellulaires et dans ce cas, la complexité et la variabilité intrinsèque au vivant peuvent compliquer la compréhension des mécanismes. Il est possible de simplifier ces systèmes en réduisant la cellule à son interface avec l'extérieur, la membrane. Les modèles de membranes sont des structures auto-assemblées composées de lipides de taille et de géométrie variées. Ils permettent d'utiliser des techniques analytiques qui seraient impossible à utiliser sur des cellules.

Ce projet de thèse s'ancre dans une dynamique enclenchée depuis de nombreuses années au sein de l'équipe Ideas du laboratoire des IMRCP. Des nanovecteurs à base de copolymères à blocs ont été développés au fur et à mesure des années permettant d'avoir accès à une bibliothèque d'objets variant à la fois par la nature du polymère utilisé et par leur géométrie¹. Lors d'un projet de thèse précédent, des nanovecteurs encapsulant du phéophorbide-a ont

été développés et caractérisés, allant jusqu'à leur utilisation sur des cultures cellulaires 2D et 3D. Il a été montré des différences d'internalisation du phéophorbide-a en fonction de la nature du vecteur utilisé mais aussi une variabilité en fonction du type de culture et de lignée cellulaire utilisée^{2,3}. Pour mieux comprendre les mécanismes liés à l'utilisation de ces formulations, il a été décidé de simplifier le système en remplaçant les cellules par des modèles de membranes. Des premières expériences sur des vésicules lipidiques géantes mélangées à des micelles encapsulant du phéophorbide-a ont montré des modifications de leur intégrité lors de l'irradiation du photosensibilisateur⁴.

Dans un premier chapitre, nous introduirons les concepts permettant la bonne compréhension de notre sujet. Nous parlerons des principes clés de la nanomédecine, notamment à travers la problématique de l'encapsulation de principes actifs. Nous nous intéresserons ensuite à l'application centrale de ce projet qu'est la thérapie photodynamique en exposant son fonctionnement et les principes actifs principalement utilisés dans ce cadre, les photosensibilisateurs, renforçant de nouveau l'intérêt de l'encapsulation. Nous insisterons tout particulièrement sur l'utilisation de nanovecteurs à base de copolymère à blocs pour l'encapsulation de photosensibilisateurs. Nous finirons ce chapitre par une partie consacrée à l'une des cibles principales de la thérapie photodynamique, la membrane plasmique. Après quelques rappels sur les éléments constituant la membrane, nous verrons quels sont les moyens d'étudier les interactions entre nanovecteurs et les membranes. Nous introduirons alors le concept de modèle de membranes et leur utilisation pour décrypter les mécanismes d'actions de substances actives encapsulées.

Le second chapitre de ce manuscrit portera sur l'étude du principe actif modèle que nous avons utilisé, le phéophorbide-a, encapsulé dans des micelles à base de copolymère à bloc. Nous étudierons ses propriétés spectrales en fonction de son environnement et les utiliserons pour quantifier son affinité pour les micelles ainsi que pour le modèle de membrane utilisé, des liposomes. Nous chercherons ensuite à mettre en évidence le transfert du phéophorbide-a des micelles vers les liposomes.

Dans un troisième chapitre, nous explorerons les phénomènes en jeu lors de l'irradiation du phéophorbide-a encapsulé dans les micelles en présence de modèles de membranes. Nous nous intéresserons à la production d'oxygène singulet par le photosensibilisateur et verrons son impact sur l'intégrité des liposomes.

Pour finir, nous conclurons sur ce projet et nous pencherons sur les pistes à explorer pour parfaire notre compréhension de ce système.

Chapitre I : Contexte bibliographique

Chapitre I : Contexte bibliographique

Dans ce chapitre bibliographique, nous allons introduire les idées et concepts clés permettant de remettre cette thèse dans le contexte approprié.

Dans la première partie, nous parlerons de la nanomédecine et de la nécessité parfois d'utiliser des vecteurs pour délivrer des substances actives, notamment dans les thérapies anticancéreuses. Nous nous concentrerons plus en détails sur l'utilisation de nanovecteurs à base de copolymères à blocs.

Ensuite dans la seconde partie, nous nous intéresserons à l'application thérapeutique qui nous servira de modèle dans notre étude, la thérapie photodynamique. Nous verrons son principe, les principes actifs qui peuvent être utilisés et des formulations de ces principes actifs encapsulés dans des auto-assemblages à base de copolymères à bloc.

Enfin dans la dernière partie, nous aborderons la problématique au cœur de cette thèse, c'est-à-dire les interactions entre nanovecteurs à base de copolymères et membranes cellulaires. Nous introduirons les outils nous permettant de rationaliser l'efficacité de ces vecteurs utilisés en thérapie photodynamique et notamment les modèles de membranes qui seront la cible modèle de notre étude. Après quelques rappels de biologie cellulaire, nous définirons les modèles de membranes, leurs intérêts et leurs limitations avant de donner des exemples de caractérisation de ces modèles et des effets potentiels de nanovecteurs sur ces derniers.

A. Nanomédecine

1. Contexte appliqué au cancer

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), en 2015 le cancer était l'une des deux premières causes de décès avant 70 ans dans 91 des 172 pays référencés et à la troisième ou quatrième position dans 22 autres pays⁵. En 2018, 18,1 millions de nouveaux cas de cancer ont été déclarés dans le monde contre 12,7 millions en 2008. Cette augmentation peut être due à de nombreuses causes (effets de l'environnement, dégradation de l'hygiène de vie, diagnostics plus précoces et plus efficaces, ...). Une fois le diagnostic établi, les principales techniques pour traiter un cancer sont la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie, la thérapie hormonales et la thérapie ciblée. Elles sont généralement utilisées en complément les unes des autres. Hormis la chirurgie et la radiothérapie, toutes les autres formes de traitement reposent sur l'utilisation d'une ou plusieurs substances actives qui auront pour effets de détruire les cellules cancéreuses ou de retarder leur croissance.

Ces substances actives sont souvent très peu solubles dans l'eau car relativement hydrophobes. Cette hydrophobicité est intrinsèque au développement même des principes actifs. En effet, il a été montré que le couplage entre un récepteur et sa cible était guidé en partie par des interactions hydrophobes^{6,7}, ce qui tend à pousser le développement de nouvelles substances actives vers des molécules plus hydrophobes. Une autre raison possible de cette insolubilité peut être la nature d'acide faible ou de base faible des molécules, les rendant alors insolubles sur certaines gammes de pH. A l'heure actuelle, 90% des substances actives en cours de développement sont peu soluble dans l'eau⁸.

En fonction du mode d'administration du médicament, principalement par voie orale ou intraveineuse, il faudra faire face à différentes complications lors de l'utilisation de ces substances peu solubles. Lors d'administration par voie orale, une solubilité trop faible ou une dissolution trop lente de la substance active ralentit son assimilation par le patient, ce qui va diminuer la concentration en principe actif dans le sang. Il en est de même pour les administrations par voie intraveineuse si la substance active est présente en trop faible quantité à cause de sa faible solubilité dans le sang, sous forme d'agrégats ou de cristaux se dissolvant lentement. Une trop faible concentration en principe actif disponible dans le sang va nécessiter soit d'augmenter la quantité initiale de substance active soit d'augmenter le temps de passage de la substance dans l'organisme avec le risque d'augmenter en conséquence la probabilité d'effets secondaires souvent associé aux principes actifs utilisés dans le traitement de cancers.

2. Solutions pour améliorer la distribution d'une substance active à l'organisme

Plusieurs méthodes existent pour améliorer la distribution d'une substance active, soit en augmentant sa solubilité ou en augmentant son assimilation par l'organisme. La méthode utilisée va dépendre des propriétés chimiques des molécules à solubiliser, notamment de leur hydrophobicité ou de leur pKa dans le cas d'acides ou de bases faibles.

a) Formation de sels et modification locale du pH

Près de 70% des substances actives présentes sur la liste des substances actives essentielles de l'OMS sont ionisables à un pH situé entre 2 et 12⁹. En fonction du mode et de la zone d'administration du médicament, la solubilité de ces substances variera fortement. Il est possible de contrôler cette solubilité en adjoignant à la substance active un contre-ion. De manière générale, les formes salines d'une substance active ont une solubilité plus élevée que celle de l'acide ou de la base libre¹⁰. En choisissant soigneusement le contre-ion, il est possible de moduler la solubilité du sel obtenu en fonction du pH. Cette méthode est particulièrement utilisée pour des formulations de substances actives administrées par voie orale. En utilisant les différences de pH au sein de l'appareil digestif, il est possible de choisir un contre-ion de manière à ce que le sel obtenu se solubilise préférentiellement dans une des parties de l'appareil digestif. Il est aussi possible d'adjoindre à la substance active un tampon qui sera choisi de manière à ramener le pH local dans une gamme adaptée à une bonne solubilité de la substance active. Ces tampons sont adaptés à la fois aux formulations à administration orale¹¹ ou intraveineuse¹².

b) Contrôle de la cristallisation du principe actif

Dans les cas où la molécule active n'est pas ionisable, il est parfois possible de l'obtenir sous forme cristalline. En contrôlant la manière dont elle cristallise, il est possible d'obtenir un polymorphe avec la solubilité voulue¹³. Il est aussi possible de cocrystalliser le principe actif avec un autre composé qui se solubiliserait dans les conditions voulues et entraînerait la dispersion et la dissolution de la substance active¹⁴.

c) Utilisation de cosolvants et de tensioactifs

Lorsque la solubilité de la substance active ne dépend pas du pH ou que les méthodes précédentes ne suffisent pas pour atteindre la concentration désirée, il existe d'autres

manières pour augmenter la concentration en principe actif. Une possibilité est de lui adjoindre un cosolvant, solvant organique miscible à l'eau, qui changera localement les propriétés physico-chimiques du milieu pour augmenter la solubilité du principe actif. Les cosolvants les plus couramment utilisés sont l'éthanol, le propylène glycol, la glycérine ou encore des polyéthylène glycol de petit poids moléculaire. Un des inconvénients de l'utilisation de cosolvant est qu'ils peuvent avoir des effets délétères sur l'organisme, qu'ils soient administrés par voie orale ou par injection. A cause de cela, ils doivent être utilisés en petit volume concentré ou dilué dans une solution aqueuse. Une manière de diminuer la quantité de cosolvant nécessaire pour solubiliser une substance active est de l'utiliser conjointement à des tensioactifs non-ioniques. Parmi les tensioactifs non-ioniques très utilisés pour solubiliser des principes actifs on retrouve les molécules de la famille des Span (esters de sorbitane) et des Tween (esters de sorbitane pegylé) ou encore du Kolliphor/Cremophor (mélange principalement de mono, di et triesters d'acides gras, extraits de l'huile de ricin, pegylés). Les tensioactifs permettront d'obtenir micelles et émulsions qui pourront alors servir de réservoir hydrophobe pour solubiliser le principe actif. Cette méthode, étudiée¹⁵ et utilisée depuis des années, entre dans la fabrication de médicaments anticancéreux commerciaux tels que le Taxol¹⁶, solution de paclitaxel, de Kolliphor et d'éthanol, ou encore le Taxotere¹⁷, solution de docetaxel, de tween 80 et d'éthanol. Elle nécessite tout de même de diluer la solution avant de l'injecter mais, malgré cette dilution, il subsiste toujours des effets secondaires liés aux cosolvants et aux tensioactifs en circulation dans l'organisme.

d) Utilisation de nanovecteurs

Pour pallier à une partie de ces effets secondaires, il est possible d'utiliser des systèmes plus stables qui seront moins affectés par la dilution dans l'organisme. Ceci repose sur l'encapsulation de la substance active, de manière covalente ou non, dans ou à la surface d'un objet de taille nanométrique, un nanovecteur. En jouant sur les propriétés du nanovecteur utilisé et sur la manière dont la substance active lui est liée, il est possible de contrôler la distribution de la substance active dans l'organisme, tant sur le plan spatial que temporel.

L'aspect spatial de la distribution est lié à plusieurs notions importantes telles que le ciblage actif ou passif et l'effet EPR. Le ciblage est la capacité qu'aura le nanovecteur à s'accumuler préférentiellement dans les tissus cibles. Ceci peut être obtenu en décorant le nanovecteur de molécules pouvant se lier à des récepteurs spécifiques situés sur la cible, on parle dans ce cas de ciblage actif. L'exemple le plus répandu est le ciblage de récepteurs du folate, surexprimés par les cellules tumorales, en greffant de l'acide folique sur les nanovecteurs¹⁸. Il est possible d'effectuer un ciblage dit passif en utilisant un effet appelé effet EPR (pour Enhanced Permeability and Retention soit Perméabilité et Rétention Augmentées). Cet effet repose sur une hétérogénéité de la vascularisation des cellules cancéreuses (Figure 1).

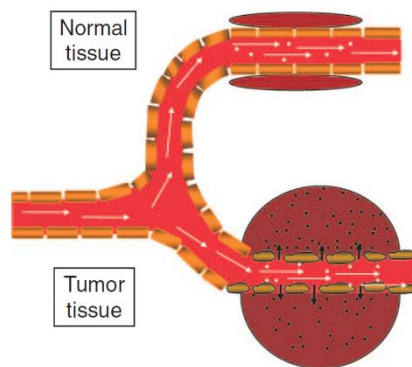


Figure 1 : Illustration de l'effet EPR (adapté de ¹⁹)

En effet, puisqu'elles ont besoin d'une grande quantité de nutriments et d'oxygène pour proliférer, les tumeurs sont plus vascularisées avec une perméabilité des vaisseaux sanguins qui est plus grande qu'ailleurs dans le corps²⁰. Ainsi, en utilisant des nanovecteurs avec une durée de circulation dans l'organisme et une taille adéquate, entre 10 et 500 nm²¹, ils pourront s'accumuler au niveau des tumeurs, permettant une distribution localisée d'un agent thérapeutique encapsulé.

En ce qui concerne l'aspect temporel de la distribution d'un nanovecteur dans l'organisme, plusieurs paramètres peuvent influencer sa durée de circulation dans l'organisme. Le facteur principal de l'élimination des nanoparticules dans l'organisme est sa captation par le système réticuloendothélial, la part du système immunitaire chargée d'éliminer les éléments étrangers à l'organisme. En jouant sur la taille de la nanoparticule ou sur la présence de chaînes de polymère à sa surface, il est possible de diminuer son élimination par l'organisme²². On parle alors de furtivité de la nanoparticule.

e) Classification des nanovecteurs

Il est possible de différencier les nanovecteurs en fonction de leur nature et de leur composition. On peut distinguer deux grandes catégories, les nanovecteurs inorganiques et les nanovecteurs organiques.

(1) Nanovecteurs inorganiques

Il existe de nombreuses sortes de nanoparticules inorganiques utilisées comme nanovecteur.

(a) Nanoparticules de silice

Les matériaux à base de silice mésoporeuse, bien connus et dont la synthèse est parfaitement maîtrisée depuis les années 1990²³, ont été utilisés pour leur capacité à pouvoir absorber des substances et à les relarguer lentement au cours du temps²⁴. Utilisés comme implants²⁵, ces matériaux présentent une très faible toxicité ce qui en fait de bons candidats en tant que nanovecteurs. Des nanoparticules de silice mésoporeuse ont ainsi été synthétisées en vue d'encapsuler des substances actives dans les années 2000²⁶. Hautement fonctionnalisables et possédant une grande surface spécifique, elles ont été utilisées pour vectoriser divers types de substances et leurs applications ont été décrites en détail dans la littérature²⁷⁻³⁰.

(b) Nanoparticules d'or

Bien qu'étant un concept moderne, on retrouve des utilisations de nanoparticules d'or aussi loin qu'au 4^{ème} siècle à travers le travail du verre effectué par les artisans de l'Empire Romain.

L'exemple le plus connu est la coupe de Lycurgue, dont le verre contenant des nanoparticules d'un alliage d'or et d'argent change de couleur en fonction de la direction selon laquelle il est illuminé, grâce à un effet de résonance de plasmon de surface qui est maintenant bien connu³¹. Ce ne fut qu'en 1857 que Faraday décrivit pour la première fois la synthèse³² à proprement dit de nanoparticules d'or. Cette synthèse, reposant sur l'oxydation de sels d'or par du citrate de sodium pour obtenir de l'or métallique, fut modernisée dans les années 1950 par Turkevitch³³ puis par Frens dans les années 1970³⁴ et reste une des méthodes de référence pour obtenir des dispersions colloïdales contrôlées d'or. L'intérêt principal de ces dispersions est leur grande surface spécifique. L'affinité de l'or pour le soufre permet de fonctionnaliser la surface des nanoparticules avec toutes sortes de composés contenant un groupement thiol. Ceci donne aux nanoparticules d'or une grande versatilité, ce qui leur permet de trouver leur place dans de nombreuses applications³⁵⁻³⁷.

(c) Oxydes de fer

Les nanoparticules d'oxyde de fer sont déjà couramment utilisées dans le domaine médical notamment pour la bioimagerie. Leurs propriétés magnétiques en font de bons agents de contraste pour l'imagerie par résonance nucléaire (IRM) mais elles ont aussi été exploitées dans des applications à visée thérapeutique. Une de ces applications est l'hyperthermie locale induite par champs magnétique, qui permet de faire détruire par élévation de la température des tumeurs³⁸. Il est aussi possible de fonctionnaliser ces nanoparticules pour y adsorber des principes actifs. Les propriétés magnétiques des oxydes de fer permettent alors de suivre leur trajet dans l'organisme par IRM^{39,40}, voire même de le guider jusqu'à leur cible à l'aide d'un champ magnétique⁴¹.

(d) Fullerène, graphène et nanotubes de carbone.

Le fullerène est une des formes allotropiques du carbone. Prédit théoriquement dans les années 1970 et isolé en 1985 par irradiation laser de graphite⁴², le Buckminsterfullerene est le premier fullerène décrit et le plus fréquent. Il s'agit d'une molécule en forme de cage sphérique, appelée buckyball, composée de 60 atomes de carbone. Outre ce C₆₀, d'autres buckyballs ont pu être synthétisées et isolées. En plus de celles-ci, parmi les nanomatériaux de carbone, on retrouve aussi les nanotubes de carbone et les feuillets de graphène (Figure 2).

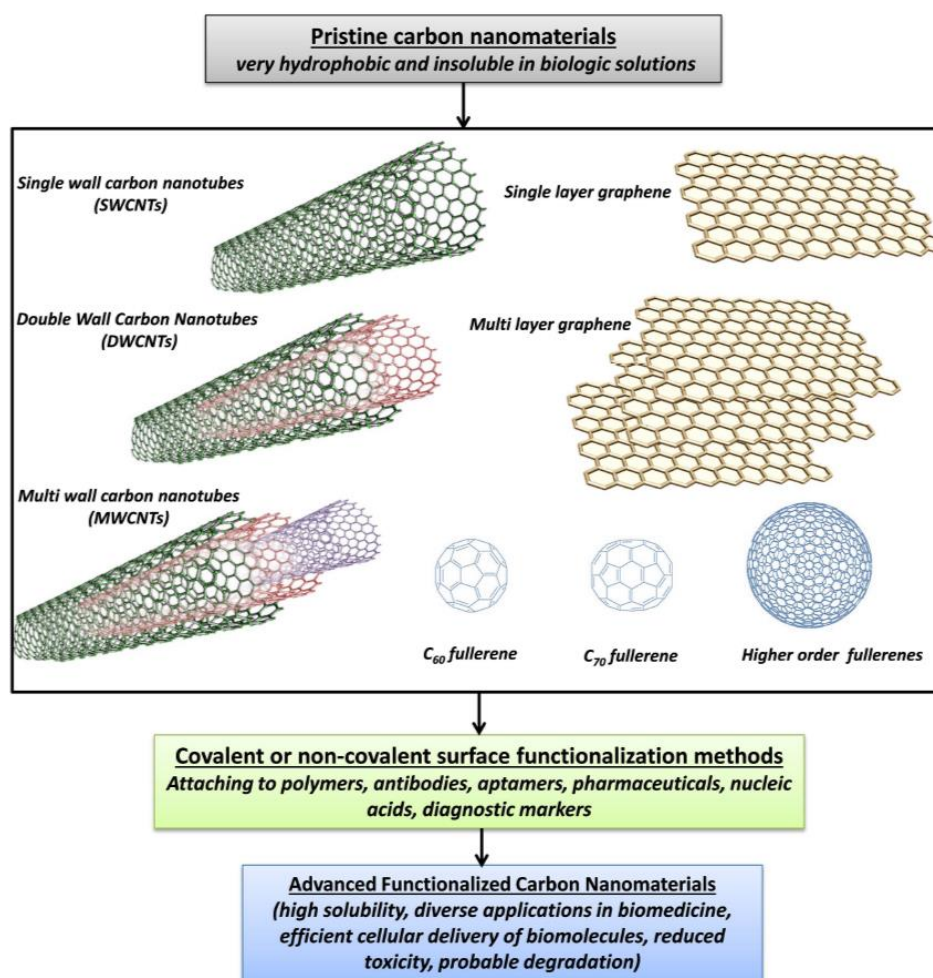


Figure 2 : Représentation schématique de nanomatériaux à base de carbone (extrait de ⁴³)

Ces objets ont été modifiés en surface pour pouvoir être utilisés dans la vectorisation de substance active^{43,44}.

(2) Nanovecteurs organiques

L'autre grande famille de nanovecteur est celle des nanovecteurs organiques. Ils sont composés de molécules organiques, d'origine naturelle ou de synthèse.

(a) Liposomes

Une famille de nanovecteurs organiques couramment utilisé est celle des liposomes. Ces auto-assemblages à base de lipides sont connus depuis les années 1960⁴⁵ et ont fait leur preuve en tant que nanovecteurs. Cette application sera discutée plus loin dans ce chapitre. Leur structure en bicouche lipidique leur permet d'encapsuler à la fois des molécules hydrophiles dans leur cœur aqueux et des molécules hydrophobes au sein de la bicouche. Il est aussi possible de modifier les lipides utilisés pour donner aux liposomes des propriétés de ciblage ou de furtivité.

(b) Nanovecteurs à base de polymères

D'autres molécules permettant la formulation de nanovecteurs sont les polymères. Ils peuvent être à base de molécules d'origine naturelle, telles que des polysaccharides (par

exemple le chitosan⁴⁶, le dextran⁴⁷ ou la cellulose⁴⁸), ou des protéines (par exemple l'albumine⁴⁹ ou le collagène), ou de molécules de synthèse. Avec l'essor de la chimie des polymères, permettant d'obtenir des microstructures contrôlées, de nombreux types de nanoparticules à base de polymères sont maintenant accessibles.

(i) Nanovecteurs à base d'homopolymères

Une manière de classer les différents types de nanovecteurs que l'on peut obtenir à partir de polymères de synthèse est de les distinguer en fonction de la structure du polymère utilisé. Par exemple avec des homopolymères, polymères synthétisés à partir d'un seul monomère, il est possible d'obtenir des objets nanométriques ayant des propriétés proches du monomère utilisé. A partir de l'acrylamide, molécule hydrophile, il est possible de synthétiser le polyacrylamide de manière à former des particules qui peuvent encapsuler une substance active hydrophobe présente dans le milieu réactionnel initial⁵⁰. Ces particules, elles-mêmes hydrophiles et dispersables dans l'eau, permettent d'acheminer la substance active jusqu'à sa cible. Il est aussi possible de formuler des nanoparticules à partir d'homopolymères hydrophobes. Une des techniques les plus utilisées est la nanoprécipitation. Le polymère est dissous dans un bon solvant, un solvant organique volatil, et est ajouté au goutte à goutte à un mauvais solvant, une phase aqueuse. Ce changement de solvant va entraîner l'agrégation du polymère qui formera alors des nanoparticules⁵¹. En ajoutant une substance active hydrophobe lors de la dissolution initiale du polymère, elle se retrouvera au cœur des objets ainsi formés. On peut citer notamment les applications de telles particules faites de polyacide lactique (PLA) pour encapsuler et délivrer différents types de substances⁵². Même si l'utilisation d'homopolymère pour formuler des nanoparticules donne des résultats intéressants, elle reste limitée par les propriétés chimiques du polymère utilisé. Pour pallier à ces limitations, il est possible de modifier la surface des nanoparticules pour leur apporter des propriétés supplémentaires.

(ii) Nanovecteurs à base de copolymères

(a) Structure des copolymères

Une autre solution est d'utiliser la chimie de synthèse moderne, pour obtenir des polymères issus de la copolymérisation de plusieurs monomères, permettant ainsi de combiner leurs propriétés chimiques. Les copolymères les plus souvent utilisés lors de la formulation de nanoparticules sont les copolymères à blocs. Il s'agit de polymères composés d'au moins deux monomères différents structurés en groupe (—AAABBB—). Les cas les plus couramment utilisés sont les di-blocs (AA—AABB—BB) et les tri-blocs (AA—AABB—BBCC—CC) (Figure 3-a, b et c). Une autre famille de copolymères utilisée dans la conception de nanoparticules est celle des copolymères greffés (Figure 3-d). Dans ce cas, sur une chaîne principale sont greffées plusieurs chaînes composées d'un autre type d'unités monomère. Notons le cas particulier des dendrimères, polymères hyper-ramifiés issus d'une croissance par générations successives d'un ou plusieurs groupements fonctionnels (Figure 3-e). Leur structure se présente en trois zones : une surface pouvant être modifiée chimiquement, une couronne externe possédant une microstructure contrôlée et un cœur protégé de l'extérieur⁵³. Il est possible d'encapsuler en ce cœur des molécules d'intérêt qui seront alors protégées du milieu extérieur et de fonctionnaliser la surface pour lui apporter des propriétés de solubilité, de furtivité ou de ciblage.

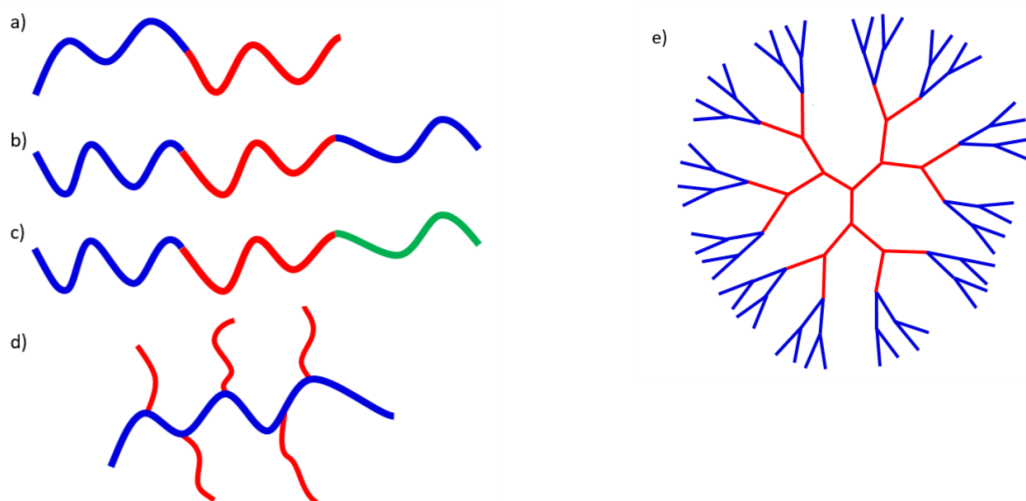


Figure 3 : Différents types de copolymères a) di-bloc AB, b) tri-bloc ABA, c) tri-bloc ABC, d) greffés et e) dendrimère

(b) Principes de l'auto-assemblage

Qu'ils soient à blocs ou greffés, les copolymères utilisés dans l'encapsulation de substances actives sont composés de monomères aux propriétés différentes qui permettront de guider la formation des objets. Un de ces paramètres le plus souvent utilisé est l'hydrophilie des chaînes. En effet, lorsque l'une des chaînes possède un caractère plus hydrophile que l'autre, le copolymère amphiphile obtenu suivra des principes d'auto-assemblages similaires à ceux s'appliquant à de plus petites molécules amphiphiles. Dans le cas des tensioactifs, la structure des objets obtenus dépend notamment d'un paramètre P appelé paramètre de packing défini par $P = \frac{v}{a_0 l_c}$ où v est le volume de la chaîne hydrophobe, a_0 est la surface optimale de la chaîne polaire et l_c est la longueur de la chaîne hydrophobe. Il a été montré que les auto-assemblages à base de petites molécules amphiphiles obtenus pour des valeurs de P inférieur à $1/3$ sont majoritairement des micelles sphériques, pour une valeur de P comprise entre $1/3$ et $1/2$ des micelles allongées et pour une valeur de P comprise entre $1/2$ et 1 des vésicules⁵⁴. Par analogie, ce facteur P peut aussi être adapté dans le cas d'auto-assemblages à base de copolymères à blocs pour prévoir la morphologie des auto-assemblages⁵⁵. Ces valeurs sont indicatives car la structure des auto-assemblages obtenus dépend aussi de la nature chimique ou la taille des blocs^{1,56,57}. Dans certains cas, la température, le pH ou la salinité du milieu peuvent aussi faire varier la structure des auto-assemblages si le copolymère y est sensible. Dans le cas des copolymères à blocs, les morphologies observées expérimentalement sont très variées et ne se limitent pas à celles en Figure 4 qui sont les plus fréquentes. Un autre facteur influençant grandement la manière dont les nano-objets seront structurés est la façon dont ils ont été formulés car il ne s'agit pas de structures à l'équilibre thermodynamique, mais figés cinétiquement⁵⁸.

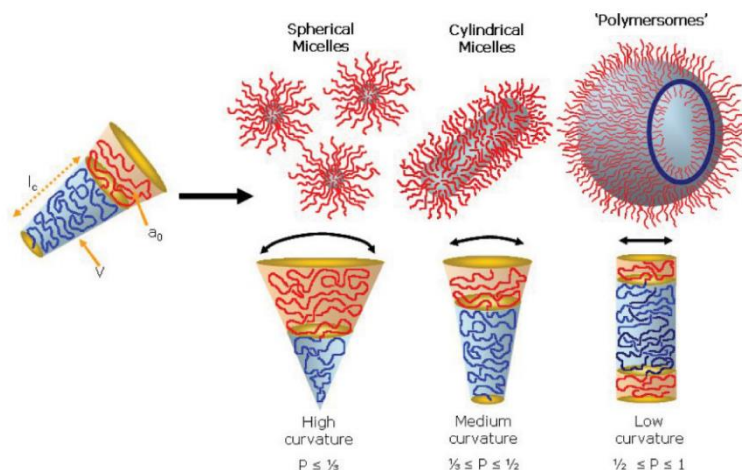


Figure 4 : Structure des auto-assemblages formés à partir d'un copolymère à blocs en fonction de P (extrait de ⁵⁵)

(c) Nature chimique des copolymères

De par leurs applications à visée thérapeutique, les copolymères utilisés pour formuler des nano-vecteurs se doivent d'être biocompatibles et biodégradables. Contrôler la vitesse de biodégradation et d'élimination du copolymère, et donc de la nanoparticule, permet aussi de contrôler la vitesse de relargage et le temps de circulation de la substance active dans le corps. Deux des familles de polymère parmi les plus utilisées pour formuler des nanovecteurs sont les polyesters et les polyéthers. Connu depuis le 19^{ième} siècle⁵⁹, le polyoxyde d'éthylène (PEO), aussi appelé polyéthylène glycol (PEG), est un des polymères hydrophiles le plus utilisé en application biomédicale. Ce polyéther, stable et biocompatible, est utilisé greffé sur des protéines⁶⁰ ou sur des liposomes⁶¹ par exemple. Il leur prodigue une meilleure solubilisation dans l'eau et une augmentation du temps de circulation dans l'organisme. Il est aussi souvent utilisé en tant que partie hydrophile de copolymère où il sera alors associé à un autre polymère plus hydrophobe. En ce qui concerne les polyesters, ils ont très tôt été étudiés pour leur propriété de biodégradabilité. Historiquement, l'acide polyglycolique (PGA) fut un des premiers polymères biodégradables synthétisés pour fabriquer des matériaux pour des applications médicales⁶², suivi du PLA⁶³ et des copolymères des deux⁶⁴. Ces copolymères rentrent aussi dans la formulation de nanovecteurs⁶⁵. Plus récemment, des copolymères de PEO ont été associés avec divers polyesters dans la formulation de nanovecteurs. Citons notamment les copolymères PEO-PLA⁶⁶⁻⁶⁸ ainsi que les copolymères contenant de la poly-ε-caprolactone (PCL)^{1,57,69}. On peut aussi noter l'utilisation de copolymères contenant un bloc polystyrène (PS) comme bloc hydrophobe qui, bien qu'ils ne soient pas biodégradables, sont utilisés pour formuler des nanovecteurs. En effet, via la présence de cycles aromatiques, ils apportent aux auto-assemblages des propriétés de rétention de substances actives aromatiques par π -stacking. Même si le PEO reste le bloc hydrophile de référence dans les copolymères utilisés pour formuler des nanovecteurs, d'autres polymères sont utilisés tel que les polyoxazolines^{70,71}, les polyvinylpyrrolidone⁷²⁻⁷⁴.

f) Caractérisation d'auto-assemblages à base de copolymères

Il existe de nombreuses manières de caractériser la structure d'auto-assemblages à base de copolymères à blocs. Les plus utilisées sont les techniques de diffusion et la microscopie qui permettent d'obtenir des informations sur la taille et la structure des nano-objets étudiés. Les

techniques de diffusion, mesurant un grand nombre de particules à la fois, vont donner une meilleure représentation statistique de l'échantillon analysé mais elles perdent en précision lorsque que celui-ci est composé de plusieurs populations d'objets de tailles et structures différentes. De manière générale, les techniques de diffusion, qu'elles soient des rayons X, des neutrons ou de la lumière, statique (SLS pour Static Light Scattering) ou dynamique (DLS pour Dynamic Light Scattering), permettent, par le biais de modèles mathématiques, d'accéder à différents rayons observables des objets, à savoir le rayon de giration, le rayon hydrodynamique ou encore le rayon du cœur de la particule (Figure 5). En combinant les techniques, il est possible d'accéder aux facteurs de formes des objets renseignant sur leur morphologie. Dans le cas des mesures par microscopie, qu'il s'agisse de microscopie optique, électronique ou à balayage, il est possible d'imager directement les objets et d'obtenir leur taille et structure sans avoir à passer par des modèles mathématiques. Ceci permet d'analyser des échantillons polydisperses mais nécessite un grand nombre d'observations pour atteindre une précision statistique garantissant une mesure objective. De plus, bien souvent les techniques de microscopie opèrent sur des échantillons séchés, ce qui génère un biais lors de l'étude d'auto-assemblages dans l'eau.

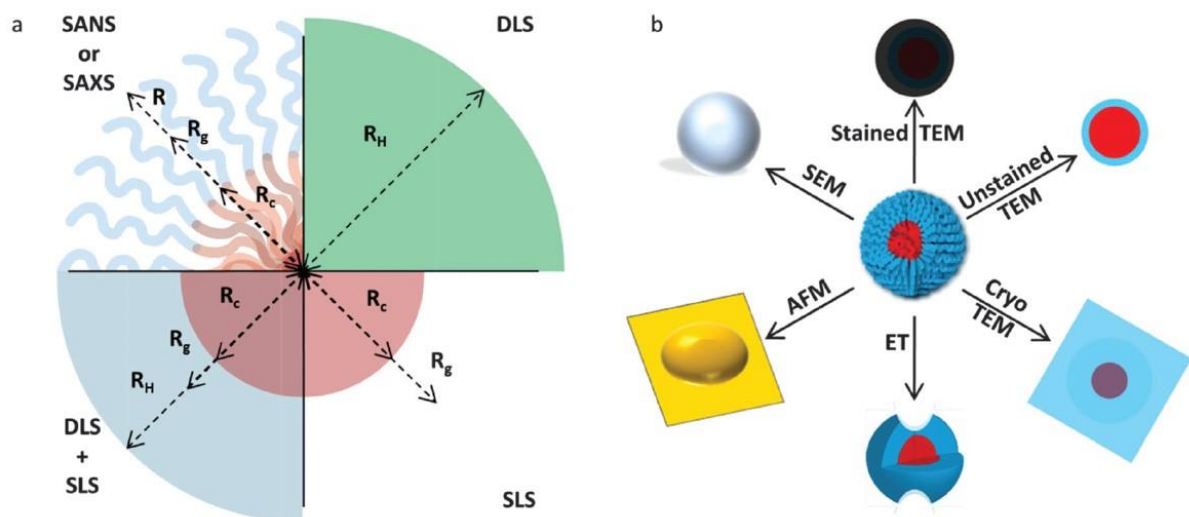


Figure 5 : a) Types de mesures pouvant être obtenues par différentes techniques de diffusion et b) types d'images d'une micelle sphérique de polymères obtenues par différentes techniques de diffusion (extrait de ⁷⁵)

Technique moins répandue, le fractionnement flux force (ou FFF) possède un grand potentiel pour caractériser les auto-assemblages. Décrite pour la première fois en 1976 par Giddings et al.⁷⁶ puis améliorée durant les deux décennies suivantes jusqu'à sa commercialisation, cette technique permet de séparer les constituants d'un échantillon avant de les analyser. Son fonctionnement repose sur la mise en écoulement linéaire d'un flux d'éluant dans un canal de faible épaisseur générant alors un champ de vecteur vitesse de profil parabolique. Une force est appliquée perpendiculairement à l'écoulement. Cette force peut être un contre-flux d'éluant, un gradient de température, un potentiel électrique ou encore une force centrifuge. L'échantillon y est injecté et, en fonction de la nature de la force, les constituants de l'échantillon vont répondre en fonction de leurs propriétés physico-chimiques et iront se placer dans le canal à des hauteurs différentes subissant des vitesses de flux différentes. De cette

manière, les divers constituants de l'échantillon pourront être séparés durant l'élution (Figure 6). Divers outils d'analyses peuvent être ensuite placés en série à la sortie du canal. Pour l'analyse de nanoparticules, il s'agit généralement d'un détecteur d'absorbance UV-visible, d'un détecteur de diffusion de la lumière multi-angles et d'un détecteur d'indice de réfraction, ce qui permet d'obtenir des informations sur la taille, la masse molaire et la concentration des particules.

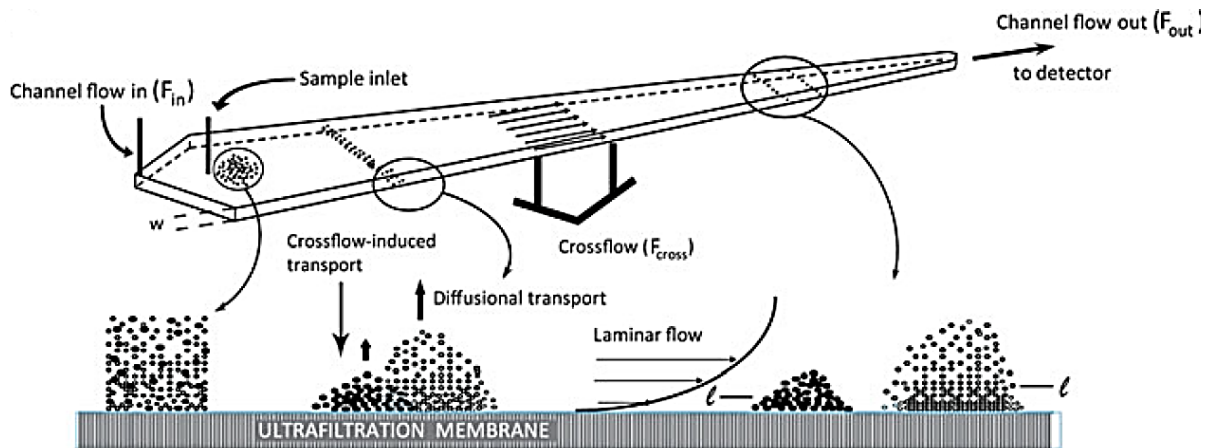


Figure 6 : Principe du fractionnement flux-force (extrait de « Field-Flow Fractionation in Biopolymer Analysis »⁷⁷)

D'autres techniques de caractérisation permettent d'accéder à des propriétés différentes des auto-assemblages. À l'aide de la spectroscopie de fluorescence, il est possible, via l'utilisation de sondes de fluorescence adaptées, de remonter à la concentration et la température critique de micellisation du polymère, la microviscosité et la micropolarité des nanoparticules, ou encore leur capacité à encapsuler des molécules.

B. La thérapie photodynamique

1. Origine historique

a) La photothérapie

Les bienfaits thérapeutiques de l'exposition à la lumière du soleil sont connus depuis l'antiquité. Les Egyptiens, Chinois et Indiens l'utilisaient pour traiter des maladies telles que le vitiligo, le psoriasis, le rachitisme ou encore des psychoses. Formalisée en Grèce, notamment par Hérode, considéré comme le père de l'héliothérapie, l'utilisation de la lumière naturelle pour soigner est liée de manière plus générale à un culte du Soleil qui est la base de beaucoup des anciennes croyances d'Europe, d'Asie et d'Amérique. Avec la montée de christianisme, ces croyances et les principes guérisseurs de la lumière du Soleil furent relégués au rang de pratiques païennes. Il fallut attendre le 19^{ième} siècle pour que les scientifiques se réapproprient l'héliothérapie et montre son utilité dans le traitement de nombreuses affections⁷⁸. A la fin du 19^{ième} siècle, Finsen fut le premier à utiliser une source lumineuse artificielle, une lampe à arc, et des lentilles de quartz permettant d'isoler les ultra-violets du spectre de la lampe. Ses travaux portant sur le traitement de pathologies cutanées marquent le début de la photothérapie dermatologique moderne et lui valurent un prix Nobel en 1903⁷⁹. Dans les années 1950, Cremer et al. proposèrent une méthode de traitement de la jaunisse néonatale en exposant des bébés prématurés à la lumière du soleil ou à une source de lumière artificielle⁸⁰. Cette méthode, perfectionnée depuis, est toujours appliquée à l'heure actuelle.

b) La thérapie photodynamique

La lumière peut aussi être utilisée pour activer une substance exogène dite photosensibilisatrice. Depuis l'antiquité, des extraits de plantes appliqués sur la peau puis exposés à la lumière du soleil ont été utilisés pour traiter des maladies cutanées. Dans des écrits indiens remontant au 12^{ième} siècle avant J.C., il est fait mention de l'utilisation d'extrait de graines de *Psoralea corylifolia* pour traiter ce qui est maintenant connu sous le nom de vitiligo⁸¹. Ce n'est que durant la première moitié du 20^{ième} siècle que la substance active présente dans ces graines, le psoralène, a pu être isolée de différentes sources et synthétisée en vue d'être utilisée avec la lumière en traitement d'affections de la peau⁸¹. Parallèlement, en s'intéressant au mécanisme d'action de diverses substances actives dans le traitement de la malaria, Von Tappeiner et son équipe remarquèrent que l'acridine, un colorant dérivé de la houille, était toxique pour le parasite à l'origine de la maladie *in vitro* mais pas *in vivo*. Ils observèrent alors que la substance n'était active que lorsqu'elle se retrouvait sous irradiation lumineuse. Ils notèrent aussi que la présence d'oxygène était indispensable à la photosensibilisation et furent les premiers à utiliser le terme de « Thérapie Photodynamique » (PDT) pour décrire ce phénomène, évitant ainsi la confusion avec le terme photosensibilisation appliqué à la photographie. Ils furent aussi les premiers à appliquer la PDT au traitement de tumeurs⁸².

2. Principe

La PDT repose sur l'utilisation d'un photosensibilisateur dont un diagramme de Jablonski modèle est présenté sur la Figure 7. Après avoir absorbé des photons à une longueur d'onde bien précise, cette molécule passe de son état fondamental (S_0) à un état excité singulet (S_1). A ce niveau énergétique, la molécule peut soit se désexciter par émission de fluorescence soit

passer par conversion intersystème vers un état excité triplet (T_1). Cette conversion $S_1 \rightarrow T_1$ est moins probable mais l'état excité T_1 possède un temps de vie relativement long (de 10^{-6} à 1 seconde⁸³) avant de retourner à l'état fondamental S_0 par phosphorescence, ce qui laisse le temps à une molécule à l'état T_1 de pouvoir réagir avec d'autres molécules présents dans le milieu. Il existe deux types de réaction mettant en jeu un état excité T_1 , celles dites de type I où la molécule excitée va réagir avec un substrat pour produire une espèce radicalaire qui pourra à son tour réagir avec d'autres composés présents dans le milieu, et celles dites de type II où la molécule excitée va transférer son énergie à une molécule d'oxygène triplet 3O_2 qui passe alors à l'état d'oxygène singulet 1O_2 . Ces deux types de réaction peuvent avoir lieu simultanément et forment des espèces réactives de l'oxygène (ROS pour Reactive Oxygen Species).

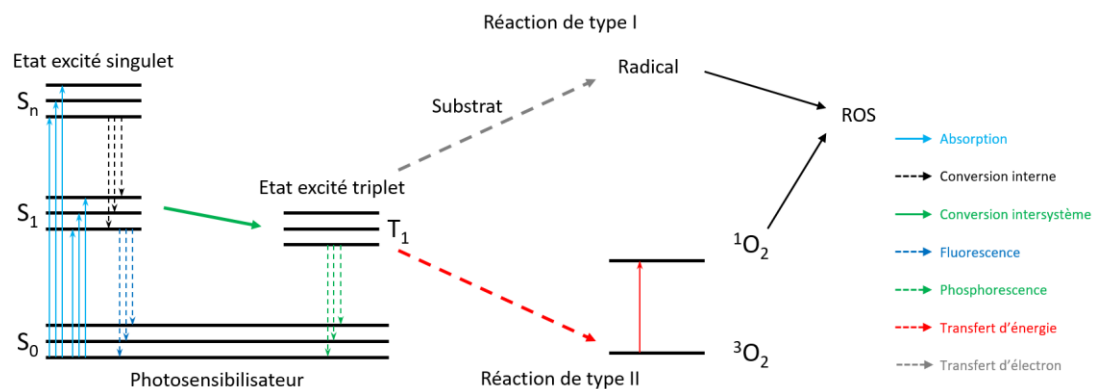


Figure 7 : Diagramme de Jablonski modifié schématisant la production de ROS par un photosensibilisateur (adapté de ⁸⁴).

La nature et la quantité de ROS produites vont dépendre de la nature du photosensibilisateur utilisé, de la concentration locale en oxygène ou en substrat. Bien qu'elles aient une durée de vie courte, elles sont très réactives et vont pouvoir réagir avec les composés biologiques présents à proximité tels que des acides aminés⁸⁵, des lipides ou de l'ADN⁸⁶. Ces modifications vont entraîner une cascade de processus biologiques qui iront jusqu'à la mort de cellules de manière localisée⁸⁷. Cet aspect fait de la PDT une thérapie particulièrement adaptée au traitement de tumeurs bien vascularisées et accessibles à la lumière.

3. Les photosensibilisateurs

a) Propriétés du photosensibilisateur idéal

Pour qu'une molécule ou un objet macromoléculaire puisse être utilisé en tant que photosensibilisateur pour la PDT, il doit posséder certaines propriétés particulières⁸⁸. Ainsi le photosensibilisateur idéal ne doit pas présenter de toxicité lorsqu'il n'est pas irradié et avoir une bonne photostabilité. Il doit pouvoir être retenu par les tissus proches de la cible et être ensuite excrété rapidement par l'organisme. Il doit avoir une bonne absorbance et un grand coefficient d'extinction molaire entre 600 et 800 nm, gamme où la pénétration de la lumière dans les tissus est la plus grande et où les photons sont assez énergétiques pour atteindre l'état excité singulet. Il lui faut aussi avoir un bon rendement de conversion à l'état triplet avec un temps de vie de cet état assez long pour maximiser la production de ROS.

b) Photosensibilisateurs de première génération

Isolé du sang pour la première fois par Scherer dans les années 1840, il fallut attendre les années 1910 pour que Meyer-Betz découvre les propriétés de photosensibilisation de l'hématoporphyrine. Au cours du 20^{ème} siècle, les recherches autour de la famille des porphyrines, macrocycles tétra-pyrroliques très aromatiques, ont pu mettre en évidence leur efficacité dans le diagnostic et le traitement de tumeurs. Ces recherches ont mené au premier photosensibilisateur commercial, le Photofrin, un mélange de monomères, dimères et oligomères de dérivés d'hématoporphyrine. Cette formulation a été utilisée pour traiter différents types de cancer⁸⁹. En revanche, le fait qu'elle absorbe la lumière hors de la gamme de transparence des tissus limite son utilisation à des tumeurs superficielles.

c) Photosensibilisateurs de seconde génération

Le développement de nouveaux photosensibilisateurs dit de seconde génération fut orienté avec l'objectif d'améliorer leur absorption de photons dans le proche infrarouge, d'augmenter leur rendement de production de ROS ou encore leur solubilité dans l'eau. Ainsi, l'attention s'est portée par exemple sur l'acide 5-aminolevulinique, un acide aminé précurseur de la biosynthèse de la protoporphyrine IX. Cette molécule et ses dérivés ont montré une bonne efficacité pour traiter différents types de tumeurs^{90,91}. D'autres dérivés de porphyrines ont été développés pour augmenter leur solubilité via l'ajout de groupements sulfonates ou carboxylates ou pour décaler leur absorption vers le rouge en remplaçant les azotes du cycle par d'autres hétéroatomes⁹². D'autres familles de composés sont utilisées pour leurs propriétés photosensibilisatrices, telles que les chlorines et les bactériochlorines. La structure générale de ces molécules ne diffère de celles des porphyrines que par la réduction de respectivement une et deux insaturations. Ces modifications entraînent un décalage vers de plus grande longueurs d'onde et une plus grande intensité des bandes Q de ces molécules (Figure 8). En utilisant la même chimie ayant servi à améliorer les propriétés des porphyrines, de nombreux dérivés de chlorines ont ainsi été synthétisés et utilisés pour la PDT jusqu'à obtenir l'approbation pour pouvoir être appliqué au traitement de cancer de la tête et du cou en Europe⁹³.

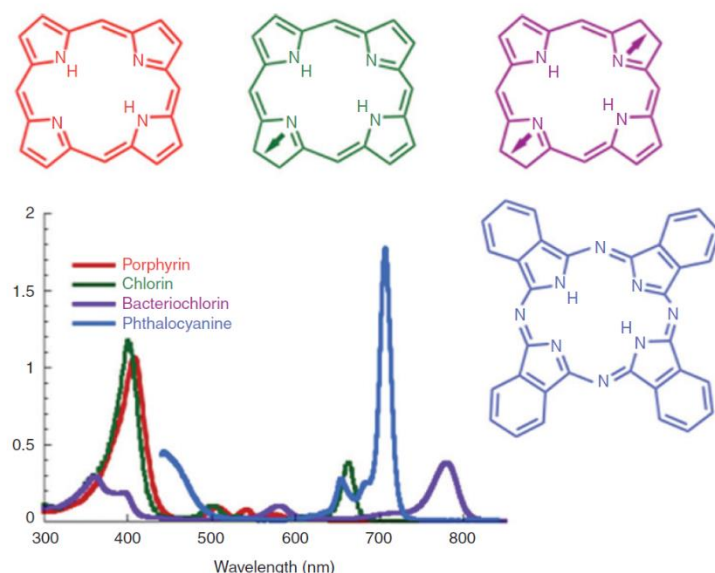


Figure 8 : Structures et spectres d'absorbance des principales familles de photosensibilisateurs (extrait de ⁹⁴)

Il est aussi important de noter l'utilisation d'une autre famille de macrocycles tétra-pyrroliques, les phthalocyanines, qui possèdent leur gamme d'absorption de la lumière située de 700 à 850 nm, soit dans le haut de la fenêtre thérapeutique. En revanche, ces molécules possèdent une faible solubilité, demandant alors l'ajout de groupements hydrophiles, et peuvent nécessiter la complexation de métaux pour arriver à une cytotoxicité suffisante pour pouvoir être utilisées dans le traitement de cancers^{95,96}.

Il existe évidemment aussi des photosensibilisateurs non-porphyriques. Il s'agit parfois de molécules déjà connues et possédant d'autres applications. Par exemple, le bleu de méthylène, colorant connu depuis le 19^{ème} siècle et utilisé dans le traitement de différentes pathologies, présente la capacité de pouvoir produire des ROS sous irradiation et a donc trouvé sa place en tant que photosensibilisateur^{97,98}. Il en est de même pour un autre colorant classique, le rose Bengale⁹⁹. L'hypéricine, molécule polycyclique aromatique pouvant être extraite du millepertuis, connue pour ses propriétés antidépressive, antimicrobienne et antivirale, se révèle aussi être un photosensibilisateur¹⁰⁰. On peut noter aussi que les fullerènes, qui via leur système π -conjugué très étendu, possèdent les propriétés d'absorption de la lumière nécessaires et peuvent être fonctionnalisés pour permettre une production de ROS suffisante pour pouvoir être utilisés en PDT¹⁰¹.

d) Photosensibilisateurs de troisième génération

La troisième génération de photosensibilisateurs se démarque de la précédente par une orientation accrue de la recherche vers un ciblage spécifique des zones tumorales. Ce ciblage est obtenu en utilisant la reconnaissance spécifique de certains ligands par les cellules tumorales. Par exemple, en greffant des sucres ou des peptides sur le photosensibilisateur, il a été montré que sa solubilité et son absorption par les cellules s'en retrouvaient augmentées^{102,103}.

e) Vectorisation de photosensibilisateurs

Un paramètre important et commun à la plupart des photosensibilisateurs est leur grande hydrophobicité. Elle découle bien souvent de la présence de cycles aromatiques nécessaires à l'obtention des propriétés spectrales essentielles pour que le photosensibilisateur soit efficace. Il en résulte très souvent que ces composés s'agrègent en milieu aqueux ce qui limite leur biodisponibilité et diminue aussi leur efficacité à générer des ROS. De nombreux travaux de recherches ont été menés pour modifier chimiquement des photosensibilisateurs classiques pour augmenter leur solubilité et leur biodisponibilité¹⁰⁴ ou pour trouver de nouvelles familles de photosensibilisateurs pouvant présenter des propriétés pharmacocinétiques intéressantes¹⁰⁵. En revanche, parmi ces travaux, peu comparent les propriétés photosensibilisatrices de ces molécules, suscitant des interrogations sur leur efficacité thérapeutique potentielle.

f) Encapsulation des photosensibilisateurs

Il reste toujours possible d'utiliser des photosensibilisateurs peu solubles dans l'eau mais efficaces en condition PDT en les encapsulant. Les stratégies d'encapsulation des photosensibilisateurs sont les mêmes que celles décrites dans la partie I du chapitre. Ainsi, on retrouve les photosensibilisateurs encapsulés dans des liposomes¹⁰⁶⁻¹⁰⁹, des nanoparticules

de silice^{110–113}, ou encore des nanoparticules de copolymères. Nous allons rentrer plus en détail dans cette dernière catégorie.

Les copolymères biocompatibles, non-toxiques et approuvés par la Food and Drug Administration, l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux, sont les plus utilisés pour encapsuler des photosensibilisateurs. Parmi ces copolymères, on retrouve les pluronics^{114–119} ou des polyesters aliphatiques biodégradables tels que les poly(ϵ -caprolactone) ou poly(acide lactique)^{120–125}. La dégradation des polyesters *in vivo* en fait un excellent choix pour la délivrance contrôlée de principes actifs¹²⁶.

Des copolymères présentant un bloc acrylate ont aussi été utilisés, leurs chaînes latérales pouvant être fonctionnalisées pour augmenter l'affinité du photosensibilisateur pour le polymère et augmenter le taux de chargement du nanovecteur¹²⁷. Il est possible d'augmenter la solubilisation du photosensibilisateur dans le nanovecteur en utilisant d'autres interactions que celles hydrophobes. Des interactions électrostatiques peuvent améliorer le chargement du photosensibilisateur dans le cas de l'utilisation de copolymères comprenant des blocs chargés de type poly(lysine)^{128,129} ou poly(acide aspartique)^{130,131} pouvant former des complexes polyioniques (PIC pour Poly Ion Complexes). En revanche, l'utilisation de PIC peut avoir un effet délétère sur la production de ROS, des micelles de PIC ayant été par exemple proposées comme antioxydants^{132,133}. La complexation de type hôte-invité de porphyrines dans des cyclodextrines a été également proposée pour former des auto-assemblages pour la PDT^{134–136}.

Un désavantage de ce genre de système où le photosensibilisateur est simplement solubilisé dans le domaine hydrophobe de l'auto-assemblage est le risque de fuite de la substance active avant qu'elle n'atteigne la cible. Pour résoudre ce problème, différentes solutions existent. Il est possible d'utiliser des systèmes qui vont pouvoir répondre à certaines propriétés caractéristiques de l'environnement des tumeurs ou encore à un stimulus externe et relarguer le photosensibilisateur à l'endroit désiré. Il est par exemple possible d'utiliser les variations de pH de l'environnement local des tumeurs pour déclencher le relargage de l'agent thérapeutique. Ceci peut être obtenu en utilisant des copolymères contenant un bloc présentant des groupements ionisables, tels que les pipéridines dont la valeur du pK_a est proche du pH des tumeurs¹²⁰, ou encore certains PIC sensibles au pH¹³⁷. Une autre manière de résoudre le problème de fuite précoce du photosensibilisateur est de le lier de façon covalente au nanovecteur. Ce lien peut ensuite être rompu sous l'action de divers stimuli. Par exemple, il est possible de lier le photosensibilisateur au copolymère à l'aide de liaisons disulfures qui pourront être réduites dans la cellule pour libérer l'agent thérapeutique¹³⁸ ou à l'aide de liaisons sensibles au pH telles que des liaisons acétals¹³⁹.

C. Interactions entre nanovecteurs et membranes

Les copolymères à blocs proposés dans la littérature pour des applications en PDT sont généralement testés *in vitro* et parfois *in vivo* afin de vérifier leur efficacité dans le traitement. Pour être efficace, le nanovecteur doit optimiser l'internalisation du photosensibilisateur dans la cellule et le protéger de la dégradation. La membrane plasmique des cellules eucaryotes est une barrière hautement sélective qui protège toutes les cellules vivantes du microenvironnement environnant et limite efficacement l'entrée et la sortie de biomolécules et d'ions. Ainsi, les nanovecteurs développés dans le domaine de l'administration de médicaments doivent surmonter cette barrière physique pour pénétrer dans les cellules.

1. La membrane cellulaire

La cellule est le point commun à tous les êtres vivants, des organismes unicellulaires, tels que les bactéries, les protozoaires ou les levures, aux organismes pluricellulaires que sont les algues, les plantes terrestres ou les animaux. C'est au niveau de l'organisation des cellules que se fait la différence entre les êtres vivants. La vie se divise principalement en deux grandes familles, les cellules procaryotes et eucaryotes. Les cellules procaryotes ont une organisation relativement simple, un compartiment unique, pas ou peu d'organites et notamment pas de noyau. Les cellules eucaryotes ont quant à eux une organisation plus complexe. Elles sont multi-compartmentées, possèdent un noyau contenant leur matériel génétique et de nombreuses organites assurant différentes fonctions. En dépit de toutes ces différences, il subsiste un point commun général à toutes ces cellules : elles possèdent toutes une membrane qui les définit, les protège et leur permet d'échanger avec l'extérieur.

Les membranes sont la séparation physique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule ou de l'un de ces compartiments. Elles ont des compositions et des structures différentes en fonction des espèces et de la fonction qu'elles doivent assurer. De manière générale, elles sont majoritairement composées de lipides organisés en une bicouche au sein de laquelle sont incorporés des protéines.

a) Les lipides

Les lipides sont la base de la membrane. Très souvent amphiphiles, ils forment spontanément des auto-assemblages en milieu aqueux et notamment des bicouches. Les lipides qui composent les membranes sont des phosphoglycérides, des sphingolipides et des stérols.

(1) Phosphoglycérides

Les lipides les plus abondants des membranes, les phosphoglycérides sont composés de deux acides gras estérifiés aux hydroxyles d'un glycérol-3-phosphate auquel est lié un groupement dit tête polaire. C'est la nature de cette tête polaire qui définit le type du phosphoglycéride (Figure 9). Les chaînes grasses varient en longueur mais sont typiquement composées de 16 à 18 carbones et peuvent présenter jusqu'à deux insaturations. Il existe un type particulier de phosphoglycérides, les plasmalogènes, dont l'une des chaînes grasses n'est pas issues d'un acide gras mais d'un acyle et est attachée au glycérol par une liaison ester.

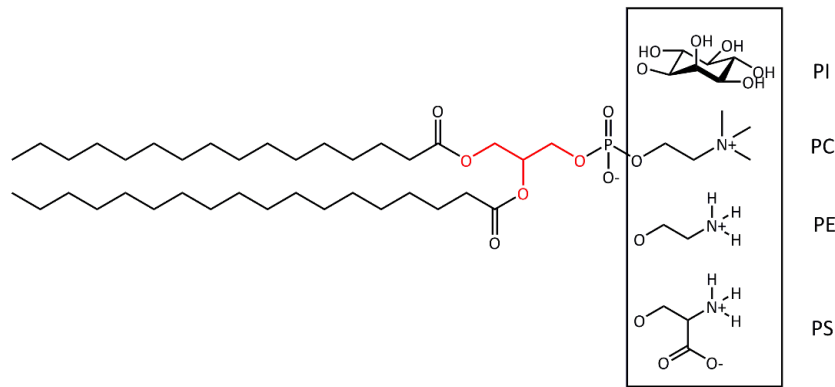


Figure 9 : Structure des principaux phosphoglycérides : le phosphatidylcholine (PC), le phosphatidylethanolamine (PE), le phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylinositol (PI).

(2) Sphingolipides

Les sphingolipides sont des dérivés de la sphingosine à laquelle est attachée par une liaison amide un acide gras. On distingue les différents sphingolipides en fonction de la nature de leur tête polaire. Le plus abondant est la sphingomyéline (SM) possédant une tête phosphocholine (Figure 10-a). On retrouve aussi des glycosphingolipides où, dans ce cas, la tête polaire est un sucre ou un polysaccharide.

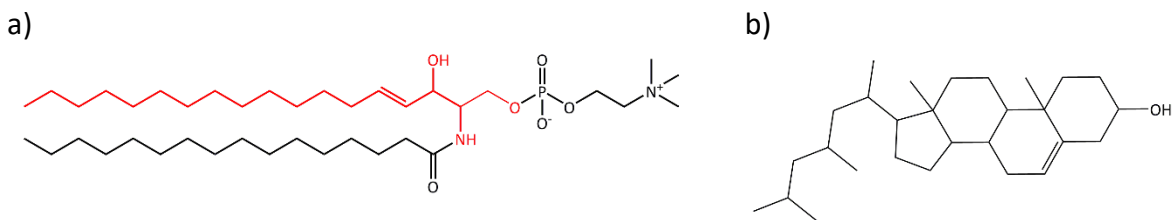


Figure 10 : Structures a) de la sphingomyéline et b) du cholestérol

(3) Stérols

Les stérols sont des triterpénoïdes tétracycliques. Leur caractère amphiphile leur est apporté par la présence d'un groupe hydroxyle sur l'un des cycles qui fait office de tête polaire. Les stérols ne peuvent pas former de bicouches seuls mais ils vont pouvoir s'insérer entre les autres lipides, où ils vont permettre de maintenir la fluidité de la membrane tout en assurant une certaine rigidité. Le cholestérol (Figure 10-b) est présent en relativement grande quantité dans la membrane des cellules animales mais est absent de la plupart des cellules procaryotes et totalement des cellules de plantes. Dans les autres organismes, d'autres stérols jouent ce rôle tels que le stigmasterol chez les plantes ou l'ergostérol chez les champignons.

(4) Composition en lipides de la membrane

La composition en lipide d'une membrane va grandement influencer ses propriétés physico-chimiques et va dépendre du rôle que la membrane doit jouer. Le rapport phosphoglycérides/sphingolipides va avoir une influence sur la stabilité de la membrane vis-à-vis de l'environnement extérieur. En effet, une membrane plus riche en sphingolipides sera plus stable grâce à un plus grand nombre d'interactions hydrogène via le groupement OH libre de la sphingosine. La longueur et le degré d'insaturation des chaînes lipidiques a une influence sur la fluidité de la membrane à une température donnée. Les interactions de van der Waals vont tendre à faire s'agréger les chaînes grasses entre elles et former une phase ressemblant à un gel. Plus les chaînes sont longues, plus ces interactions sont importantes. La

présence de double liaison C=C en configuration cis va faire diminuer les interactions entre lipides et va augmenter la fluidité de la membrane. La présence de stérols aura un effet qui dépendra grandement de sa concentration. A concentration faible, ils auront pour effet de limiter les interactions entre chaînes, augmentant la fluidité de la membrane mais à concentration plus élevée, les stérols vont limiter le mouvement des chaînes, ce qui va diminuer la fluidité de la membrane et augmenter son épaisseur. La nature des têtes polaire des lipides, notamment leur taille et charge, va influencer l'aire que va occuper chaque lipide. À partir de cette aire et du volume occupé par les chaînes hydrophobes, il est possible de calculer le paramètre de packing P qui va définir le rayon de courbure de la membrane (voir Figure 4). Les compositions de certaines membranes caractéristiques sont indiquées dans le Tableau 1.

Types de membrane	Composition (% _{mol})			
	PC	PE + PS	SM	Cholestérol
Membrane plasmique (érythrocytes humains)	21	29	21	26
Membrane de myéline (neurones humains)	16	37	13	34
Membrane plasmique (<i>E. Coli</i>)	0	85	0	0
Membrane de réticulum endoplasmique (rat)	57	26	5	7
Membrane de Golgi (rat)	45	20	13	13
Membrane mitochondriale interne (rat)	45	45	2	7
Membrane mitochondriale externe (rat)	34	46	2	11

Tableau 1 : Composition en lipides de certaines membranes (extrait de ¹⁴⁰)

b) Les protéines membranaires

Les protéines membranaires sont les éléments de la membrane qui lui apportent sa spécificité pour remplir un rôle donné. En fonction de leur localisation dans la membrane, les protéines seront dites transmembranaires, ancrées aux lipides ou périphériques. Les protéines transmembranaires possèdent trois domaines distincts, les domaines cytosoliques et exoplasmiques, respectivement orientés vers l'intérieur et l'extérieur de la cellule, qui possèdent une surface hydrophile pouvant interagir avec le milieu aqueux environnant et un domaine hydrophobe traversant la membrane. Ce type de protéines permet d'échanger de la matière entre les deux côtés de la membrane de manière active. Les protéines ancrées aux lipides sont liées de manière covalente à un ou plusieurs lipides de la membrane. La protéine en elle-même ne pénètre pas dans la membrane et peut servir de point d'accroche pour d'autres protéines hydrosolubles. Les protéines périphériques n'entrent pas en contact avec le cœur hydrophobe de la membrane mais sont liées de manière indirecte à la membrane par des interactions avec les têtes polaires des lipides, des protéines transmembranaires ou encore des protéines ancrées aux lipides. En interagissant avec les lipides de la membrane, toutes ces protéines vont permettre de structurer la membrane avec la formation de domaines, d'assurer la communication entre les deux faces de la membrane et elles pourront jouer le rôle de récepteur en interagissant préférentiellement avec certaines molécules.

c) Particularité des procaryotes

Les cellules procaryotes possèdent une particularité au niveau de la structure de leur membrane. En plus des lipides et protéines, la membrane des procaryotes est composée d'une couche de peptidoglycane, polymère formé d'une partie peptidique et d'une partie polysaccharide, plus ou moins épaisse en fonction du type d'organisme.

2. Effets de nanovecteurs à base de copolymère sur des cellules

Il existe diverses façons de procéder à l'étude des effets que peuvent avoir des nanovecteurs et leur contenu sur des membranes. De manière générale, elles se séparent en deux grandes catégories : les expériences sur le vivant et celles sur des modèles. Les expériences sur le vivant regroupent toutes les expériences *in vitro* et *in vivo*. Par la suite, nous nous intéresserons surtout aux expériences *in vitro* sur culture de cellules.

a) Cultures cellulaires

La culture cellulaire regroupe l'ensemble des techniques permettant de faire croître des cellules *in-vitro* dans un environnement contrôlé. En générale, elle est une des premières étapes de développement de composés ou de formulations à visée thérapeutique. La culture cellulaire a un rôle important car elle permet de mesurer les effets de ce que l'on souhaite développer sur un modèle de l'organisme cible avant de passer par des modèles animaux et enfin par des essais cliniques sur humain. Bien que plus simple que ces dernières, l'utilisation de cultures cellulaires peut se décliner de différentes façons en faisant varier le type de cellules utilisées ou encore la manière dont elles seront cultivées.

(1) Type de cellules

Il est possible de cultiver des cellules de différents types d'organismes. Il peut s'agir de micro-organismes, tels que des levures ou bactéries, qui peuvent être utilisés pour tester les effets de différentes substances ou pour produire des molécules d'intérêt. Il est possible d'utiliser des cellules prélevées sur un organisme et de les faire croître en culture. Dans ce cas, on parle de culture primaire. Ces cultures ne peuvent pas être utilisées indéfiniment car après un certain nombre de divisions successives, les cellules commencent à montrer des signes de sénescence. Pour pallier à ce problème, il est possible d'utiliser des lignées cellulaires qui sont des cellules pouvant se diviser à l'infini sans détérioration. Ces cellules sont obtenues soit à partir de cellules cancéreuses extraites de patients, soit de cellules immortalisées par l'utilisation d'un oncogène ou par manipulation génétique, soit à partir de cellules souches. Cette variété permet d'obtenir des modèles de nature proche de celles des organismes ciblés par la substance active.

(2) Méthode de culture

La plupart du temps, la technique utilisée pour cultiver les cellules est la culture en monocouche sur une surface plane. Cette technique est relativement facile d'accès, bien décrite dans la littérature et peu coûteuse mais la manière dont les cellules croissent les unes par rapport aux autres est très éloignée de la réalité au sein d'un organisme vivant. Différentes techniques existent pour obtenir des cultures de cellules avec une architecture en trois dimensions, appelé des sphéroïdes¹⁴¹. Elles sont basées sur la croissance des cellules sous forme d'agrégats sur ou dans une matrice, souvent un gel, ou en suspension dans une solution.

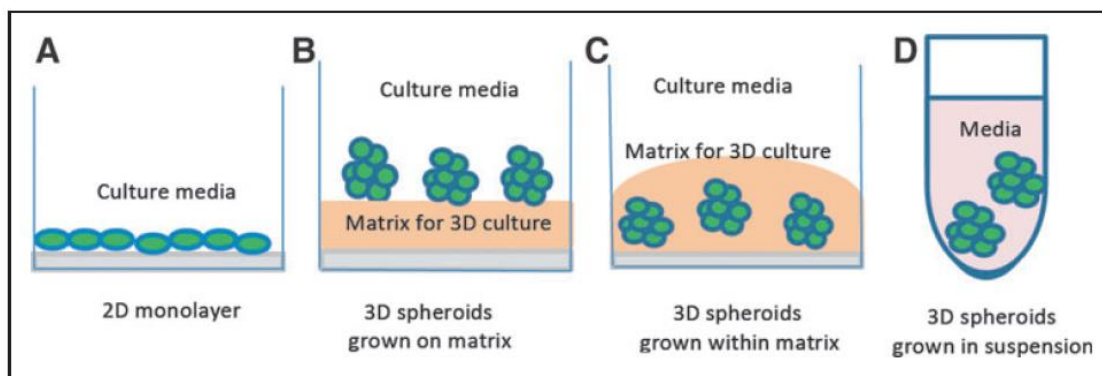


Fig. 1. Schematic diagrams of the traditional two-dimensional (2D) monolayer cell culture **(A)** and three typical three-dimensional (3D) cell culture systems: cell spheroids/aggregates grown on matrix **(B)**, cells embedded within matrix **(C)**, or scaffold-free cell spheroids in suspension **(D)**.

Figure 11 : Types de cultures cellulaires (extrait de ¹⁴¹)

Ces cultures 3D permettent d'observer des comportements et phénomènes absents des cultures 2D mais bel et bien présent dans les organismes vivants. Notamment elles présentent des gradients de nutriments ou de gaz dissous entre la surface et le cœur du sphéroïde ou encore l'apparition de zones nécrotiques au cœur du sphéroïde, en dormance autour du cœur et en prolifération en bordure¹⁴². Bien évidemment, ces modèles sont plus difficiles à manipuler, à entretenir et sont bien plus coûteux que les cultures 2D. Ces différents types de cultures sont illustrés sur la Figure 11.

b) Mesures sur des cellules

Les effets des nanovecteurs sont généralement mesurés en faisant des mesures de viabilité des cellules. Ce type de mesure est effectué en regardant l'incorporation d'un composé externe pouvant être métabolisé par les cellules saines ou le relargage de composés internes durant la nécrose des cellules, tels que la lactate déshydrogénase (LDH). De manière similaire, des mesures d'hémolyse peuvent être faites pour quantifier l'effet des nanovecteurs sur la perméabilité d'érythrocytes en mesurant la concentration en hémoglobine par absorbance^{143–}

¹⁴⁷.

Il est possible de vérifier par microscopie de fluorescence si des nanovecteurs peuvent franchir la membrane des cellules en les marquant à l'aide de sondes fluorescentes, et, le cas échéant, de voir leur localisation dans la cellule. Les outils classiques utilisés pour visualiser/quantifier l'absorption cellulaire sont la cytométrie en flux et la microscopie confocale. La microscopie confocale permet aussi de suivre des changements potentiels de forme des cellules et d'éventuels changements de leur membrane.

Ces mesures permettent de quantifier l'internalisation et les effets des nanovecteurs sur la survie des cellules mais n'apportent pas d'information sur la manière dont les nanovecteurs interagissent avec les cellules. Comprendre comment les nano-objets et les membranes cellulaires interagissent est crucial mais ce n'est clairement pas trivial compte tenu de la grande variété de propriétés des nanoparticules (taille, charge, forme, modification de la surface...) et de la complexité biologique. Il est intéressant de noter que les interactions des nanoparticules à base de carbone ou métalliques avec les membranes et leur absorption

cellulaire ont été largement décrites^{148,149} offrant des pistes de réflexion dans le cas de l'absorption cellulaire de nanovecteurs polymères qui a été peu étudiée jusqu'à présent.

Les stratégies classiques pour déchiffrer les mécanismes d'absorption cellulaire sont basées sur l'inhibition chimique sélective des différents processus endocytiques ou l'incubation à 4 °C au lieu de 37 °C pour ralentir les processus cellulaires. Dans le contexte de la PDT avec des nanoparticules polymères, nous avons identifié quelques études expérimentales qualitatives/quantitatives sur les interactions entre les nanoparticules et les membranes cellulaires, l'absorption cellulaire et la libération de médicaments.

Kerdous et al.¹⁵⁰ ont proposé un moyen original d'étudier les mécanismes de libération du phéophorbide encapsulé dans des nanoparticules de PEO-PCL lorsqu'il est exposé à des cellules de cancer du sein humain MCF-7. En utilisant un microscope confocal à fluorescence permettant d'effectuer des mesures spectroscopiques et de durée de vie de l'état excité du photosensibilisateur, ils ont démontré que la libération de phéophorbide-a impliquait très peu l'internalisation des nanoparticules. Les principaux mécanismes de délivrance de médicaments provenaient d'un transfert direct du médicament de la nanoparticule à la membrane cellulaire par collision. Dans le même ordre d'idées, en utilisant des micelles de PEO-PCL chargées en phéophorbide-a ou contenant des copolymères fluorescents, Till et al.¹⁵¹ ont démontré que le photosensibilisateur migrerait directement des micelles de PEO-PCL vers la membrane cellulaire sans perturbation de la nanoparticule ou délivrance partielle de médicament au voisinage de la cellule. Xue et al.¹³⁸ ont observé par des expériences de cytométrie en flux après 4h et 24h d'incubation l'absorption intracellulaire de micelles de copolymères tri-blocs à base de ZnTPPC6 à terminaison PEO (PEO-b-PTPPDS-b-PEO) dans des cellules tumorales A549. L'absorption intracellulaire de ces micelles semblait être un processus dépendant du temps et ils ont proposé qu'elle provenait de l'endocytose plutôt que d'une simple diffusion passive de la porphyrine libre.

Wan et al.¹⁵² ont réalisé une étude détaillée sur les mécanismes d'absorption de micelles de poly(acide aspartique)-g-(PEO-Vert indocyanine) chargées en paclitaxel. Des cellules de cancer ovarien humain SK-OV-3 ont été prétraitées pendant 30 minutes avec du tampon phosphate salin (PBS pour Phosphate Buffered Saline) à 4 °C pour ralentir tous les processus cellulaires, du 2-désoxy-d-glucose/NaN₃ pour épuiser les cellules en ATP pour limiter l'endocytose et du saccharose comme solution hypertonique pour inhiber l'endocytose clathrine-dépendante. Des cellules prétraitées avec du PBS à 37 °C ont servi de contrôle. Après ces prétraitements, les cellules ont été incubées avec des micelles pendant 2h à 37 °C avant d'être analysées par cytométrie en flux. Alors que le traitement d'épuisement en ATP et le traitement hypertonique n'ont pas réussi à inhiber l'absorption cellulaire des micelles chargées, l'incubation à 4 °C l'a réduite de 66%. Ces résultats indiquent que le mécanisme d'absorption cellulaire des micelles ne se faisait pas par endocytose, mais était en grande partie attribué au transport passif.

3. Les modèles de membranes

Dans certains cas, lorsque l'on cherche à comprendre le mécanisme d'action d'un nanovecteur encapsulant un principe actif, il est essentiel de regarder en détail l'aspect physico-chimique

des interactions entre la membrane et les nanoparticules. L'utilisation de cultures cellulaires amène une complexité et une variabilité intrinsèque aux cellules pouvant empêcher d'utiliser certaines techniques d'analyses. Il est possible de réduire considérablement cette complexité en ne regardant la cellule qu'au travers de sa barrière avec l'extérieur, la membrane. Comme décrit précédemment, la membrane des cellules est essentiellement constituée de lipides. De nombreuses techniques permettent de formuler des objets ou structures à base de lipides pouvant être assimilés à une membrane. Ces modèles de membranes peuvent varier de par leur géométrie, leur taille ou leur composition.

a) Types de modèles de membranes

Il existe de nombreux types de modèles de membranes. Nous avons choisi de les présenter en fonction de leur géométrie et de leur composition.

(1) Géométrie

(a) Modèles de membranes sphériques

Décrits pour la première fois dans les années 1960 par Bangham⁴⁵, les liposomes sont des vésicules sphériques composées d'une ou plusieurs bicouches de lipides. Ils sont un des modèles les plus proches structurellement de la cellule. Les techniques de production de liposomes ont évolué avec le temps et diffèrent en fonction du type d'objets que l'on cherche à formuler mais elles conservent toujours la même base. Les lipides sont dissous dans un solvant organique qui est ensuite évaporé pour former un film de lipides sec. Ce film est ensuite hydraté avec une phase aqueuse. L'hydratation du film va former spontanément des vésicules lipidiques multilamellaires (MLV pour MultiLamellar Vesicles) dont la taille peut varier d'un à plusieurs dizaines de microns. À partir de ces MLV, il est ensuite possible d'obtenir différents type d'objets. Les plus utilisés sont les vésicules unilamellaires dites larges (LUV pour Large Unilamellar Vesicles) ou petites (SUV pour Small Unilamellar Vesicles). Les LUV et SUV peuvent être obtenues de différentes façons à partir des MLV mais elles reposent toutes sur le même principe, l'utilisation de perturbations physiques pour réduire la taille et la lamellarité des MLV. De manière assez classique, les techniques utilisées sont l'emploi d'ultrasons ou de cycles de gel/dégel de la solution de MLV. Pour contrôler la taille des objets et assurer leur unilamellarité, la solution est extrudée à travers une membrane aux pores du diamètre désiré. Cette méthode permet d'obtenir des liposomes de taille contrôlée et homogène. Ces différents type de liposomes sont schématisés sur la Figure 12. Possédant à la fois un cœur aqueux et une zone hydrophobe au sein de la bicouche lipidique, les liposomes ont été étudiés et utilisés pour la délivrance de substances actives.

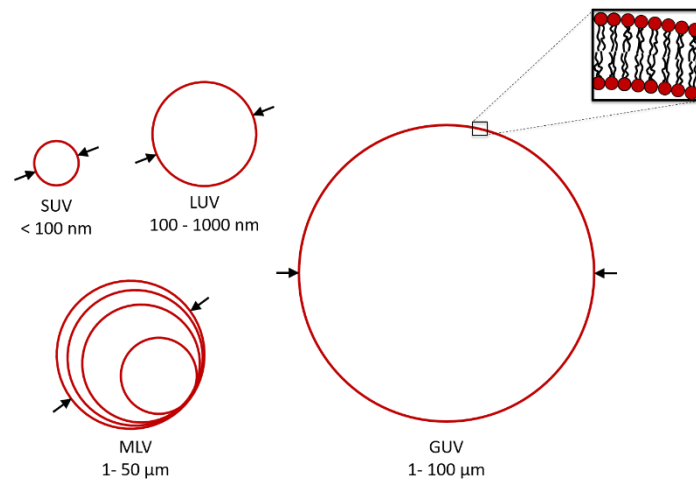


Figure 12 : Différents types de liposomes

Il est possible de produire des vésicules unilamellaires de plus grande taille (GUV pour Giant Unilamellar Vesicle) dont le diamètre peut aller d'un à la centaine de microns, l'ordre de grandeur des cellules. Pour former ces GUV, il existe plusieurs méthodes. L'une d'elles consiste à déposer un film de lipides sur une surface plane et de lui ajouter doucement une phase aqueuse. Cette hydratation lente va générer un gonflement du film et au bout de quelques heures, des GUV se seront formées (Figure 13-a). Cette méthode est très simple mais reste néanmoins lente et ne produit pas que des GUV mais aussi des MLV^{153,154}. Une autre méthode, l'électroformation, est plus rapide et produit essentiellement des GUV^{154,155}. Dans ce cas, le film de lipides est déposé sur une surface conductrice, classiquement une lame de verre recouverte d'oxyde d'indium-étain. Le film est ensuite mis en contact avec une phase aqueuse et une autre lame de verre conductrice est placée au-dessus en contact avec le liquide pour fermer le circuit. Un champ électrique de fréquence et de voltage précis est appliqué entre les deux électrodes et va entraîner l'apparition des GUV (Figure 13-b). Avec le progrès technologique apporté par les techniques de microfluidique, il est aussi possible d'obtenir des GUV de manière contrôlée par coécoulement à l'aide de puces microfluidiques¹⁵⁶ (Figure 13-c).

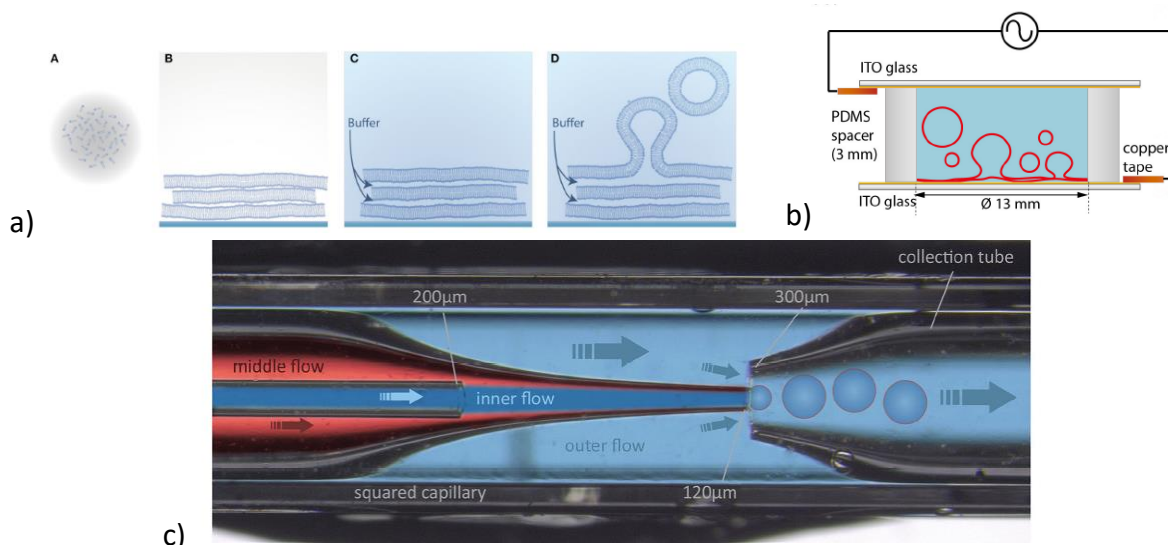


Figure 13 : Formation de GUV par a) gonflement, b) électroformation et c) microfluidique (extraits de ¹⁵⁷)

(b) Modèles de membranes planes

Développée au début du 20^{ème} siècle par Langmuir et Blodgett, la cuve de Langmuir reste un des outils de prédilection pour former et étudier des films de lipides. En déposant un solvant contenant les lipides dissous sur un volume d'eau, il se forme, après évaporation du solvant organique, une couche de lipides à l'interface air/eau (Figure 14-a). Cette couche, est constituée d'une seule épaisseur de lipide où les têtes polaires sont orientées vers le liquide et les chaînes grasses vers l'air, ce qui est appelée une monocouche. Une fois cette monocouche formée à la surface du liquide, il est possible de la déposer sur une surface solide. Pour ce faire, il suffit de venir plonger un solide ou de faire remonter un solide préalablement immergé dans l'eau à travers la monocouche (Figure 14-b). Dans le premier cas, la monocouche sera adsorbée sur le solide par les chaînes grasses et dans le second cas par les têtes polaires.

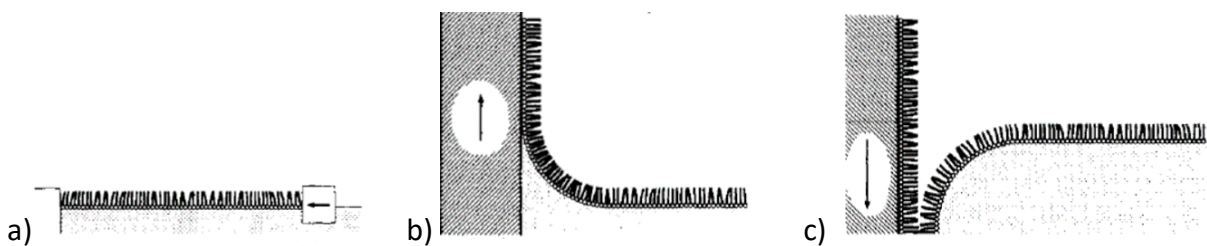


Figure 14 : a) monocouche lipidique à l'interface eau/air, b) préparation d'une monocouche supportée et c) préparation d'une bicouche supportée (extraits de ¹⁵⁸)

Il est possible d'obtenir des bicouches voire même des multicouches de différentes épaisseurs en plongeant de nouveau le solide recouvert à travers la même monocouche ou une autre de composition différente (Figure 14-c). De cette manière, on peut donc obtenir des bicouches lipidiques supportées. Une autre manière classique d'obtenir ce type de membranes sur un support solide est d'utiliser une solution de SUV de diamètre suffisamment faible, inférieur à 30 nm, et de la mettre en contact avec le solide à recouvrir à une température au-dessus de la température de transition de phase des lipides. Les SUV, très tendues de par leur petite taille, vont alors pouvoir s'adsorber sur la surface et fusionner pour former une ou plusieurs bicouches superposées¹⁵⁹. D'autres techniques peuvent être utilisées pour former une bicouche sur une surface telles que le spin-coating¹⁶⁰, l'échange de solvant¹⁶¹ ou encore la nanolithographie¹⁶². En fonction de la nature de la surface portant la bicouche, il est possible de différencier les cas où la bicouche épouse la topographie de la surface et les cas où des réservoirs de phase aqueuse se forment entre les aspérités de la surface et la bicouche. Ceci est dû à l'affinité du lipide pour le support solide, plus elle est grande, plus la bicouche suivra les formes de la surface¹⁶³. Cet effet peut générer des différences notables sur la mobilité des lipides au sein de la membrane. Pour circonvenir à ces problèmes, il est possible de placer un espaceur entre la bicouche et le support solide. Cet espaceur peut être une couche de polymères située entre le solide et la membrane^{164,165} ou une molécule pouvant se lier de manière covalente au support et s'insérer dans la membrane¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Il est possible d'aller encore plus loin en suspendant la membrane au-dessus d'un pore¹⁶⁹⁻¹⁷². De cette manière, la partie suspendue possède la même mobilité qu'une membrane naturelle et les deux côtés de la membrane sont accessibles pour des mesures.

(2) Composition

Il est possible de produire des modèles de membranes ayant des compositions de tous types. Les membranes les plus simples sont composées d'un ou plusieurs lipides, souvent commerciaux. Ces lipides peuvent être de synthèse ou des extraits naturels purifiés. Des techniques existent pour formuler des membranes de composition très proche de celles de membranes naturelles, incluant notamment des protéines membranaires. Il est possible d'extraire les composants de la membrane de cellules¹⁷³ pour les utiliser comme matière première pour la synthèse de vésicules^{174,175}. En appliquant un stress osmotique^{176,177} ou chimique^{178,179} à une cellule, il a été montré qu'elle pouvait produire des vésicules de composition proche de celle de sa membrane plasmique incluant des protéines dans leurs conformations natives. Il existe des techniques permettant de récupérer mécaniquement une partie de la membrane de cellules, par exemple à l'aide d'une pipette aspirante¹⁸⁰ ou en faisant adhérer la partie apicale des cellules à une plaque qui une fois enlevée gardera attachée à elle une partie de la membrane¹⁸¹.

4. Méthode de caractérisation des membranes modèles

Le type de mesures expérimentales possibles lors de l'étude de membranes modèles va dépendre de la taille et de la géométrie du modèle. Des techniques restent néanmoins communes à différents types de modèles.

a) Techniques de diffusion

La diffusion de la lumière et les mesures de potentiel Zéta sont parmi les techniques de caractérisation d'objets à l'échelle nanométrique les plus répandues. Elles permettent de mesurer la taille et le potentiel surfacique des objets présents dans un échantillon. Ces mesures sont adaptées à l'étude de LUV ou de SUV^{182,183}. D'autres techniques de diffusion existent et peuvent être utilisées pour analyser des membranes. La diffusion des neutrons¹⁶⁸ et la diffusion des rayons X^{161,182,184} sont fréquemment utilisées pour analyser la structure de membranes. Ayant une longueur d'onde plus petites que celle de la lumière, ces techniques peuvent sonder les échantillons à plus petite échelle. Elles permettent ainsi obtenir des informations sur les tailles caractéristiques des différents domaines de la membrane et sur sa possible organisation à longue distance.

b) Microscopie

La microscopie permet d'observer directement la structure de la membrane et la manière dont elle peut interagir avec des éléments extérieurs. En fonction de la taille caractéristique de la membrane à observer et de sa nature, différentes techniques peuvent être utilisées. La microscopie électronique, de par sa résolution, sera adaptée à l'observation d'objets à l'échelle nanométrique. En revanche, elle nécessite souvent de travailler sur des échantillons séchés, ce qui peut apporter un biais sur la structure d'objets formés dans l'eau. Dans ce cas, il existe des techniques dites de cryo-microscopie électronique qui permettent d'observer des échantillons dans l'eau en les vitrifiant¹⁸³. La microscopie à force atomique (AFM pour Atomic Force Microscopy) permet de venir sonder l'échantillon analysé à l'aide d'une pointe nanométrique. Cette méthode permet de mesurer la topologie de l'échantillon et est particulièrement adaptée à l'étude de membrane planes^{159,163,180,185,186}. Si les membranes sont de taille suffisamment grande, au minimum de l'ordre du micron, il est alors possible d'utiliser

la microscopie optique pour imager l'échantillon. Cette technique est particulièrement adaptée à l'étude de GUV^{187,188} (Figure 15-a).

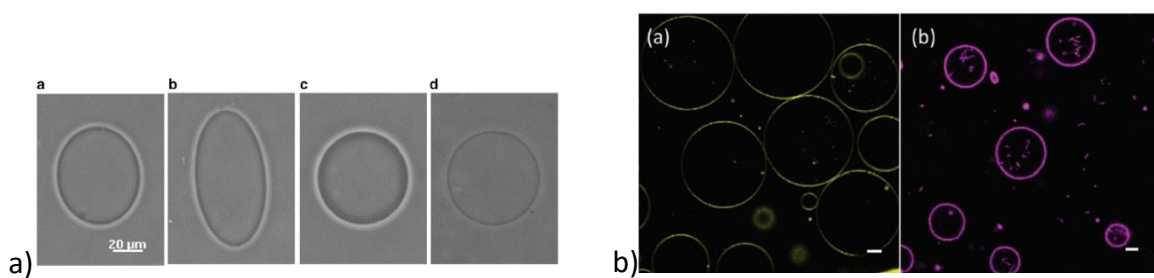


Figure 15 : a) Images de microscopie optique d'une GUV répondant à une perturbation (extrait de ¹⁸⁷) et b) images de microscopie confocale de fluorescence de GUV seules (gauches) et mélangées à des nanovecteurs (droite) (extrait de ⁴)

La microscopie confocale est une technique de microscopie optique permettant d'imager l'échantillon dans un plan de manière spécifique puis de combiner ces différentes images pour former une image 3D de l'échantillon. Cette technique peut être combinée avec des sondes fluorescentes (Figure 15-b), telles que des protéines ou des lipides, présentes dans la membrane ce qui permet d'avoir une idée de leur répartition spatiale dans la membrane^{4,172,175,179,181,189,190}. Une utilisation particulière de cette microscopie de fluorescence est la redistribution de fluorescence après photoblanchiment (FRAP pour Fluorescence Recovery After Photobleaching). Cette technique consiste à irradier intensément une zone de la membrane, ce qui va générer un photoblanchiment des molécules fluorescentes dans cette zone et donc une perte de fluorescence. En mesurant le retour progressif de molécules fluorescentes, il est possible d'avoir une mesure de la mobilité de ces molécules dans la membrane^{164,165,175,179,181}. En utilisant une molécule dont la fluorescence va dépendre de la manière dont une partie de la molécule va pouvoir pivoter sur elle-même, un rotor moléculaire fluorescent, il est possible de sonder de manière locale la viscosité de la membrane^{191–193}.

c) Calorimétrie

La calorimétrie permet de mesurer les effets de perturbations extérieures sur l'arrangement des composants de la membrane. Tout changement dans l'organisation des lipides entre eux pourra être mesuré par calorimétrie différentielle à balayage (DSC pour Differential Scanning Calorimetry)^{163,194,195}. Il est aussi possible de mesurer les interactions entre la membrane et des molécules ou objets qui lui sont présentés par titrage calorimétrique isotherme (ITC pour Isothermal Titration Calorimetry)¹⁹⁶.

d) Tension de surface

La tension de surface d'une membrane renseigne sur la manière dont ses composants sont arrangés entre eux et les effets potentiels de l'arrivée d'une molécule ou d'un objet extérieur sur la membrane. Il est possible de la mesurer facilement lorsque l'on travaille avec des monocouches de Langmuir à l'aide d'une balance de Langmuir, capteur présent à la surface de la cuve qui permet de mesurer la pression de surface de la monocouche^{184,194,197}. Si l'on travaille sur des GUV, il existe un système basé sur l'utilisation d'une pipette aspirante qui permet de venir piéger une GUV par l'aspiration puis, en maintenant une pression constante, d'observer les variations de la tension de surface de la GUV en fonction des stimuli externes^{198,199}.

e) Spectroscopie

Technique classique de la chimie analytique, la spectroscopie UV-Visible est principalement utilisée dans le cadre de l'étude de membrane pour suivre le devenir de sondes²⁰⁰ qui pourraient interagir avec la membrane ou des lipides qui la composent²⁰¹. Dans certains cas, elle permet d'observer des modifications chimiques des lipides. Par exemple, il est possible de suivre l'oxydation de lipides à chaînes polyinsaturées en suivant l'absorbance des diènes conjugués alors formés^{195,201}. La spectroscopie de fluorescence est aussi un outil très utile pour étudier les propriétés des membranes et ce de différentes façons. Il est ainsi possible de mesurer l'affinité de certaines molécules pour les membranes¹⁸⁸ ou le passage de molécules fluorescentes à travers la membrane, renseignant sur sa perméabilité^{183,202}. En utilisant le principe de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes, il est possible de montrer la proximité spatiale de deux fluorophores¹⁷⁷. La corrélation de fluorescence permet quant à elle de suivre les fluctuations de la fluorescence d'une espèce et d'en déduire son coefficient de diffusion, ce qui permet d'avoir une idée de son environnement^{4,190}.

La spectroscopie d'impédance est utilisée pour mesurer les propriétés électriques des membranes et notamment leur capacité à laisser passer les ions^{164,166,168}.

La spectroscopie infrarouge est principalement utilisée dans l'étude de membranes planes sur une surface solide. Elle permet de caractériser les fonctions chimiques présentes et surtout, en observant les différences entre les spectres avant et après ajout d'une substance tierce, de comprendre les interactions entre la membrane et cette substance^{161,184,197,203}.

f) Autres techniques de caractérisation

La spectrométrie de masse permet de remonter à la nature chimique des molécules constituant la membrane. Elle permet notamment d'identifier les lipides ou protéines pouvant être présents dans la membrane et de suivre leurs éventuelles modifications chimiques^{200,201}.

La microbalance à quartz est un outil permettant de mesurer des variations très fines de masse ou de rigidité d'une membrane déposée sur sa surface¹⁶³.

Un des outils de l'étude des membranes est l'utilisation de la dynamique moléculaire. Il s'agit de simulations qui permettent de modéliser le comportement des constituants de la membrane et de prédire leur comportement dans différentes situations^{183,204,205}. Ces modélisations permettent de mieux comprendre certains résultats expérimentaux qui eux même permettent d'améliorer les modèles.

La résonance magnétique nucléaire (RMN), outil de base de l'analyse de composés chimiques, peut aussi être utilisée dans le cadre de l'analyse de membranes. En effet, cette technique permet de voir des changements au niveau de l'organisation de la membrane en fonction des stimuli ou d'interactions avec des composés extérieurs^{203,206,207}.

La réflectivité des neutrons ou des rayons X est une technique qui permet de sonder des membranes planes pour connaître leur structure à l'échelle nanométrique et pour montrer les interactions entre les membranes et des composés tiers^{208–210}.

5. Interactions entre membranes et nanovecteurs à base de copolymères à blocs

En utilisant les méthodes décrites précédemment, il est possible de regarder l'effet de la présence de copolymères à blocs et d'auto-assemblages à base de copolymères à blocs sur des modèles de membranes.

a) Modélisation par dynamique moléculaire

En utilisant la dynamique moléculaire, il est possible de modéliser le comportement de membranes en présence de copolymères ou d'auto-assemblages. Zaki et Carbone²¹¹ ont pu de cette manière regarder les effets de copolymères à blocs de types poly(oxyde d'éthylène)-b-poly(oxyde de propylène)-b-poly(oxyde d'éthylène) (PEO-PPO-PEO) sur une bicouche de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) sous contraintes mécaniques. Ils ont montré que le polymère pouvait s'insérer dans la membrane, entraînant la formation d'une membrane hybride aux propriétés mécaniques accrues. Houang et al.²¹² ont comparé les résultats obtenus par dynamique moléculaire avec ceux obtenus par des études physiologiques. Ils ont utilisé des copolymères de PEO-poly(oxyde de propylène) (PPO) avec différents types de groupement terminal de la chaîne du PPO et les ont testés comme stabilisateurs de membranes à la fois *in silico* et *in vivo*. En utilisant des bicouches de palmitoyloléoylphosphatidylcholine (POPC) sous contrainte mécanique comme modèle de membrane lors de leurs simulations, ils ont montré que les polymères présentant les groupements terminaux les plus hydrophobes s'inséraient plus profondément dans la bicouche de la membrane là où ceux avec les groupements terminaux plus hydrophiles restaient proches de l'interface polaire. Ces résultats ont pu être mis en parallèle avec des résultats obtenus sur des modèles animaux où les copolymères avec les groupements terminaux les plus hydrophobes ont été ceux aidant le plus les cellules musculaires à résister à des contraintes mécaniques. Raman et al.²¹³ ont utilisé la dynamique moléculaire pour modéliser une bicouche de dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) et ont regardé comment des copolymères de PEO-PCL de différentes tailles et leurs micelles pouvaient se mélanger à la membrane. Ils ont pu montrer que les micelles les plus hydrophiles n'interagissaient pas avec la bicouche mais que les plus hydrophobes étaient internalisées sur la durée de leur simulation. Pendant cette internalisation, ils ont remarqué un changement dans la structure des micelles, passant d'une conformation cœur-couronne à une conformation de type Janus, avec les chaînes PEO localisées à l'interface près des têtes polaires et les chaînes PCL dans le cœur hydrophobe de la bicouche. Guan et al.²¹⁴ ont exploré les différentes façons dont des micelles de copolymères à blocs et des membranes pouvaient interagir en utilisant un modèle de bicouche lipidique contenant une proportion de lipides pouvant se lier aux micelles. En faisant varier l'intensité de cette force d'association, ils ont pu isoler quatre types d'interactions membrane/micelles : l'ancrage, la demi-endocytose, l'endocytose et la fusion (Figure 16). Ils ont montré que l'endocytose était l'interaction la plus efficace pour l'absorption des micelles et que la fusion pouvait entraîner une plus grande cytotoxicité. Ils ont regardé les effets du nombre d'agrégation des micelles, de la longueur du polymère et de la rigidité des chaînes hydrophobes sur l'internalisation des micelles. Leurs résultats montrent qu'un plus petit nombre d'agrégation et des polymères plus courts entraînaient une internalisation des micelles plus faibles mais qu'une augmentation de ces paramètres générerait une plus grande

cytotoxicité. Ils ont remarqué qu'une plus faible rigidité des chaînes hydrophobes pouvait entraîner une meilleure internalisation et une plus faible toxicité des micelles.

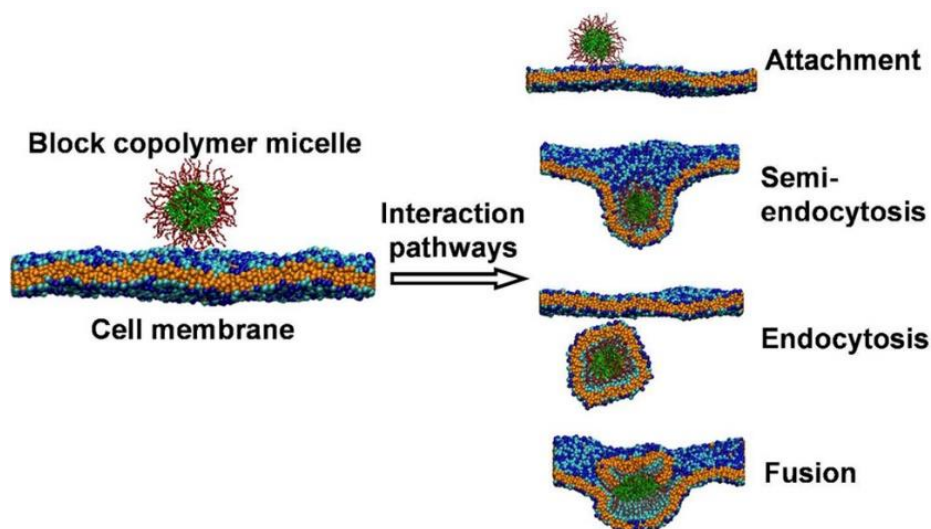


Figure 16 : Types d'interactions entre des micelles de copolymères à blocs et des membranes (extrait de Guan et al.²¹⁴)

b) Mesures sur des monocouches lipidiques

A l'aide de monocouches lipidiques faites de DPPC et de cholestérol, Sandez-Macho et al.¹⁴⁷ ont pu montrer comment des copolymères de PEO-PPO-PEO présentant différentes tailles de blocs PEO pouvaient interagir avec la membrane. Ils ont notamment montré que plus les blocs de PEO étaient courts, plus le polymère augmentait la surface spécifique par lipide et la perméabilité de la membrane. Ces effets ont été confirmés par des mesures d'hémolyse. Yaroslavof et al.¹⁹⁴ ont utilisé des monocouches de DPPC/dioleoylphosphoglycerol (DOPG⁻) pour caractériser les effets de plusieurs polybétaines sur une membrane lipidique. Ils ont montré qu'après complexation avec la monocouche anionique, les polybétaines génèrent une expansion de la monocouche dépendamment de la longueur de l'espaceur entre les charges positives et négatives de la bétaine. Celles générant la plus faible expansion de la monocouche étaient aussi celles générant le moins de cytotoxicité sur des cellules de cancers de sein MCF7. Schwiegger et al.²¹⁵ ont utilisé des monocouches de différents types de lipides, en faisant varier la nature des têtes polaires ou des chaînes grasses, pour étudier les interactions entre les lipides et deux copolymères à blocs contenant du poly(méthacrylate de glycidyle) (PGMA) de type (PGMA-PPO-PGMA), dont un présentant un groupement terminal fluoré. Ils ont montré que le polymère fluoré s'incorporait plus profondément dans la monocouche que le non-fluoré. Ils notèrent que l'intensité de l'interaction entre la chaîne PGMA hydrophile et la tête polaire du lipide dépend de la nature de cette dernière et qu'elle était notamment plus grande pour des têtes polaires PE que pour des PC. Cet effet était encore plus marqué pour le polymère fluoré. Ces expériences suggèrent aussi que le polymère serait partiellement miscible à la monocouche, formant alors des monocouches hybrides polymères/lipides.

c) Mesures sur des bicouches lipidiques supportées

Ramadurai et al.²¹⁶ ont utilisé des bicouches de DOPC déposées sur une surface en PDMS présentant des microcavités pour étudier les interactions entre la membrane et différents types de polymères amphiphiles réversibles, une classe de polymères pouvant former des

micelles dans des solvants polaires et des micelles inverses dans des solvants apolaires. En utilisant la spectroscopie de corrélation de temps de vie de fluorescence, ils ont montré que le polymère le plus hydrophobe qu'ils ont étudié entraînait une augmentation de la viscosité de la membrane, attribuée à l'adsorption des micelles sur la bicouche. Ils ont aussi utilisé de la spectroscopie d'impédance électrochimique et ont montré que ce même polymère entraînait une décroissance de la résistance de la membrane, liée à une augmentation de sa perméabilité. Ces effets ont aussi été observés avec les micelles plus hydrophiles mais à une intensité moindre.

d) Mesures sur des liposomes

A l'aide de liposomes de POPC chargés à la calcéine, Wilkosz et al.¹⁸³ ont étudié les effets de polymères et de copolymères cationiques sur la membrane. Ils ont montré que les polycations les plus densément substitués généraient une libération rapide de la calcéine. Ils ont estimé que cela était dû à la formation de pores dans la membrane. Cette théorie a été confirmée à l'aide de modélisation par dynamique moléculaire. Palominos et al.²¹⁷ ont étudié des mélanges de liposomes de DPPC chargés à la calcéine et deux types de copolymères de PCL-PEO-PCL de tailles de blocs différentes. Ils ont montré que, dans la gamme de concentration qu'ils étudiaient, les deux types de polymères diminuaient la perméabilité de la membrane, le polymère le plus long générant un effet plus grand. Ces résultats confirment des mesures qu'ils ont effectués en utilisant deux sondes de fluorescence, le Laurdan et le 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH). En mesurant la polarisation de fluorescence du Laurdan et l'anisotropie de fluorescence du DPH, il est possible de déterminer les propriétés physico-chimiques de la membrane. Le Laurdan et le DPH sont sensibles à leur environnement et s'insèrent respectivement à l'interface de la bicouche et au cœur des chaînes hydrophobes. De cette manière, ils ont pu montrer que le copolymère le plus court génère un effet sur l'intérieur de la bicouche, là où le plus long a un effet à la fois sur l'interface et l'intérieur de la bicouche. En mélangeant des LUV de POPC avec des copolymères de PEO-PPO de différentes tailles et en analysant ces mélanges par RMN à gradient de champs pulsés, Zhang et al.²¹⁸ ont quantifié la diffusion du polymère en absence et en présence de liposomes. De ces résultats, ils ont pu mesurer l'absorption du polymère sur les liposomes. Ils ont montré que plus la masse molaire du polymère et son hydrophobicité sont grandes, plus la surface du liposome sera recouverte de polymère. Ils ont aussi noté que le pourcentage de couverture des liposomes était indépendant du temps d'incubation du mélange, laissant penser que les interactions entre le polymère et la membrane ont lieu juste après le mélange et atteignent vite un état d'équilibre.

D. Objectifs de la thèse

Dans ce travail de thèse, nous allons chercher à mettre en place des protocoles d'expériences qui nous permettront d'évaluer les processus se déroulant lors d'un mélange entre ces micelles chargées d'un photosensibilisateur, le phéophorbide-a, et des modèles de membranes, des liposomes de DOPC.

Nous étudierons tout d'abord les propriétés spectrales du phéophorbide-a en fonction de son environnement et les utiliserons pour quantifier son affinité pour les micelles ainsi que pour les liposomes. Nous chercherons ensuite à mettre en évidence le transfert du phéophorbide-a des micelles vers les liposomes. Pour ce faire, nous utiliserons deux techniques différentes, une basée sur le transfert d'énergie par résonance de type Förster et une méthode de fractionnement flux-force.

Ensuite, nous chercherons à observer les phénomènes en jeu lors de l'irradiation du phéophorbide-a encapsulé dans les micelles en présence de modèles de membranes. Nous nous évaluerons à la production d'oxygène singulet par le phéophorbide-a encapsulé dans les différentes micelles à l'aide d'une sonde dérivée de l'anthracène. Nous regarderons ensuite les effets de cette production d'oxygène singulet et de la présence des micelles sur la fuite d'une sonde fluorescence à travers la membrane des liposomes. Nous nous intéresserons alors à l'oxydation des lipides de la membrane en suivant la production de lipides oxydés par spectrométrie de masse, ce qui nous permettra de remonter aux vitesses d'oxydation des lipides.

Pour finir, en utilisant les résultats de ces différentes expériences, nous comparerons les systèmes étudiés entre eux pour pouvoir faire le lien entre la nature du polymère utilisé dans la formulation des micelles et les effets de ces micelles encapsulant du phéophorbide-a *in fine* sur des modèles de membranes.

**Chapitre II : Etude des propriétés
physico-chimiques de nanovecteurs à base
de copolymères à blocs encapsulant un
photosensibilisateur**

Chapitre II : Etude des propriétés physico-chimiques de nanovecteurs à base de copolymères à blocs encapsulant un photosensibilisateur

Dans ce chapitre, nous allons comparer les propriétés d'un photosensibilisateur encapsulé dans des nanovecteurs à base de copolymère à blocs. Les nanovecteurs que nous avons choisi d'étudier sont des micelles formulées à partir de trois polymères différents. Il s'agit du PEO-PCL 5k-4k, du PEO-PLA 2,4k-2k et du PEO-PS 2,3k-3,1k. Ces polymères présentent tous le même type de chaîne hydrophile PEO mais différentes natures de chaînes hydrophobes (Figure 17-a, b et c). Le photosensibilisateur modèle que nous avons étudié est le phéophorbide-a (Figure 17-d). Dans nos expériences, nous utilisons un modèle de membrane pour simuler les effets de ces systèmes sur la membrane d'une cellule. Pour simplifier au maximum l'étude des mécanismes en jeu lors de l'interaction entre les nanovecteurs chargés en photosensibilisateur et la membrane, nous avons choisi d'utiliser comme modèle des liposomes de DOPC (Figure 17-e).

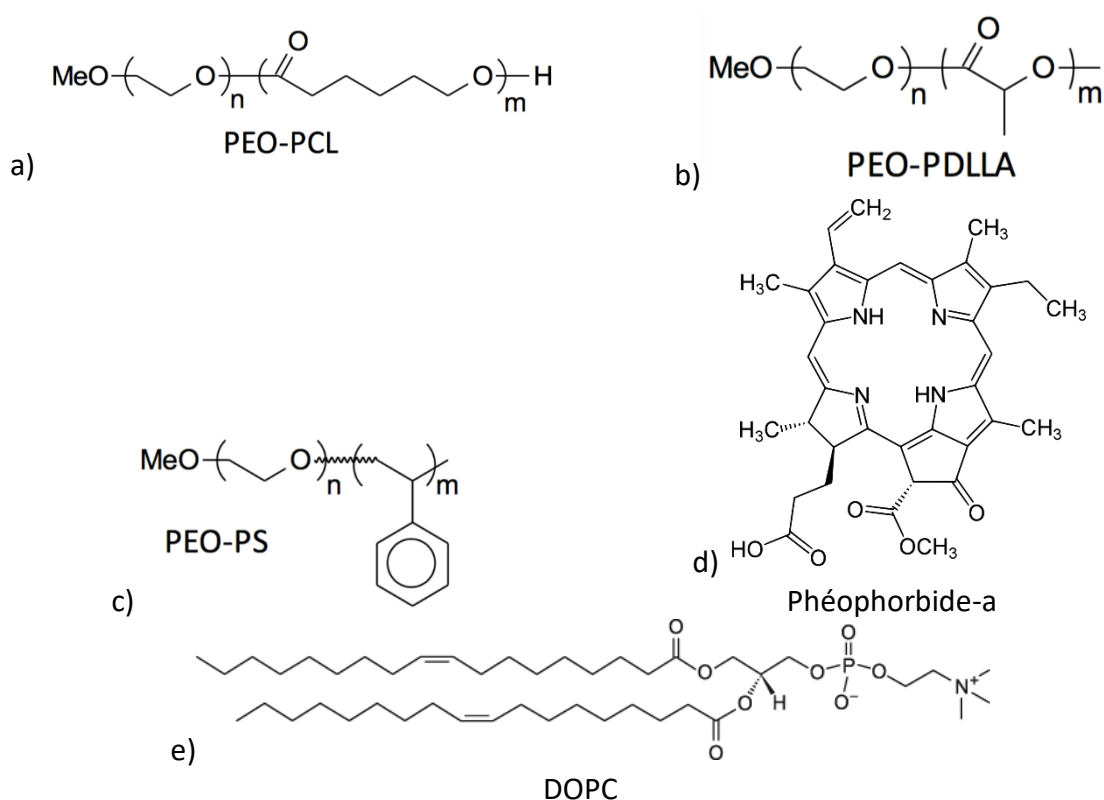


Figure 17 : Structures a-c) des polymères utilisés, d) du phéophorbide-a et e) du DOPC

A. Propriétés spectroscopiques

Les propriétés spectroscopiques du phéophorbide-a ont fait l'objet de nombreux travaux et sont bien documentées dans la littérature. Röder et al.²¹⁹ ont mesuré son absorbance et sa fluorescence dans l'éthanol, du PBS contenant 2% d'éthanol et dans des liposomes. Ils ont noté des changements de l'allure de son spectre d'absorbance entre ces différentes conditions. Les pics du phéophorbide-a dans l'éthanol étaient plus intenses que dans le PBS ou les SUV et ils ont noté un décalage d'un des pics présents à 667 nm dans l'éthanol et dans les SUV mais à 683 nm dans le PBS. Ils ont aussi montré que son rendement quantique et son

temps de vie de fluorescence dans le PBS étaient beaucoup plus faibles que dans l'éthanol ou dans des liposomes. Ces différences ont été imputées à l'agrégation du phéophorbide-a en milieu aqueux, où il forme des dimères qui ne fluorescent pas²²⁰. Nous avons mesuré l'absorbance du phéophorbide-a dans l'éthanol, le PBS et encapsulé dans les différents types d'objets (Figure 18). On remarque que les spectres du phéophorbide-a dans les différents objets sont similaires entre eux et ont la même allure que celui dans l'éthanol. Pour le phéophorbide-a dans le PBS, on observe que son coefficient d'extinction molaire est très inférieur à celui dans les autres cas, ce qui est en accord avec la littérature.

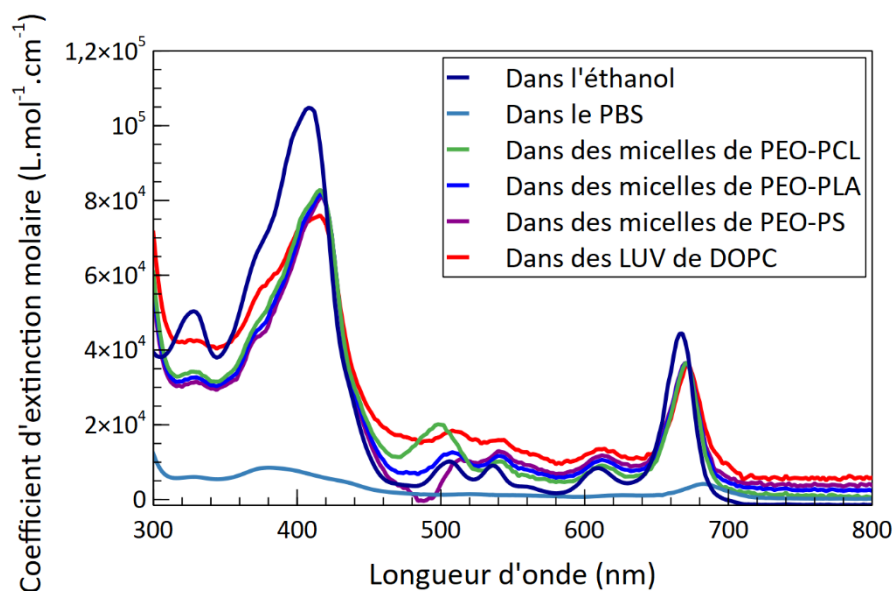


Figure 18 : Coefficient d'extinction molaire du phéophorbide-a dans différents milieux

Nous nous sommes ensuite intéressés aux propriétés de fluorescence du phéophorbide dans différentes conditions. Nous avons mesuré le temps de vie de fluorescence du phéophorbide-a dans l'éthanol, le PBS et encapsulé dans les différents types de micelles (Figure 19-a). Les échantillons ont été irradiés à l'aide d'une LED pulsée à 371 nm et la fluorescence mesurée à 675 nm. Dans toutes ces conditions, la concentration en phéophorbide-a était de 1 μ M. Les solutions utilisées étaient toutes placées sous un bullage d'argon avant la mesure et conservées sous argon pendant la mesure afin d'éviter la présence d'oxygène dissous dans le milieu. En effet, la présence d'oxygène dissous dans le milieu diminue artificiellement le temps de vie de fluorescence du phéophorbide-a. Les décroissances ont été modélisées en les considérant comme des monoexponentielles, sauf pour celle du phéophorbide-a dans le PBS qui a été traitée comme une biexponentielle pour minimiser les résidus (Figure 19-b).

La valeur obtenue pour le temps de vie de fluorescence du phéophorbide-a dans l'éthanol de 4,9 ns est comparable à celle de 5,9 ns donnée dans la littérature²¹⁹ en considérant l'erreur expérimentale. Lorsque le phéophorbide-a est encapsulé dans les micelles, on obtient des temps de vie de 5,9 ns pour celles de PEO-PCL, 5,8 ns pour celles de PEO-PLA et 5,2 ns pour celles de PEO-PS, soit du même ordre de grandeur que dans l'éthanol. On remarque ensuite que pour la solution de phéophorbide-a dans le PBS, nous obtenons deux temps de vie différents, un de 0,2 ns et l'autre de 4,2 ns. Ces valeurs sont en accord avec la littérature²¹⁹ et

s'expliquent par la présence de phéophorbide-a sous forme monomérique, au temps de vie plus long, et sous forme d'agrégats, aux temps de vie plus court.

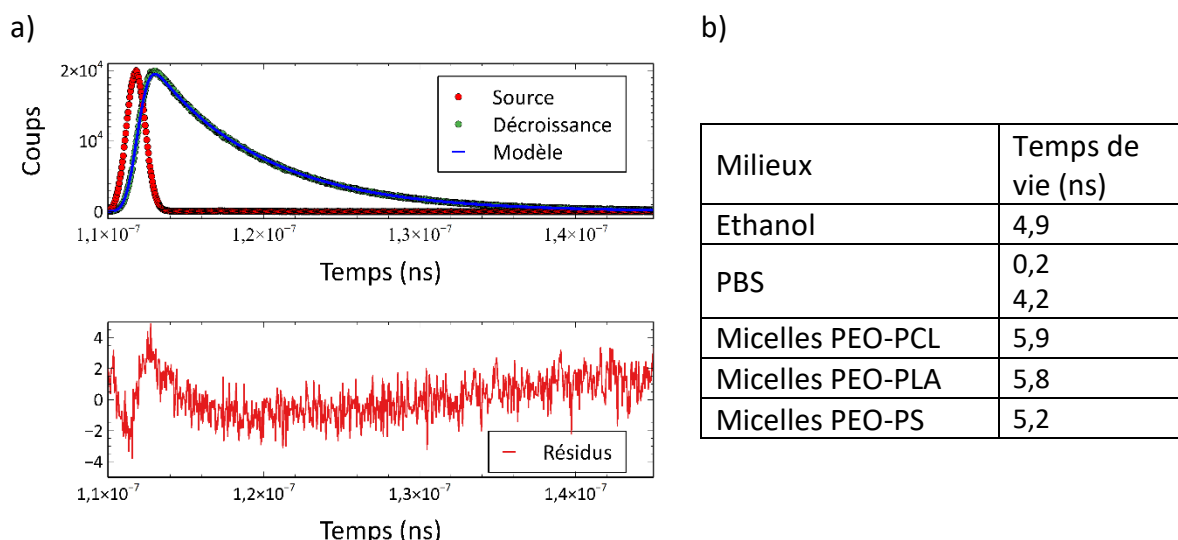


Figure 19 : a) Mesure de temps de vie de fluorescence du phéophorbide-a dans l'éthanol et b) temps de vie dans différents milieux

Nous avons ensuite mesuré le spectre de fluorescence du phéophorbide-a en solution dans du PBS et dans les différents objets (Figure 20). On remarque que, à concentration identique, le phéophorbide-a fluoresce dix fois moins dans le PBS que dans les différentes micelles ou que dans les liposomes de DOPC. Cette différence est liée à l'absorbance plus faible du phéophorbide-a dans le PBS. Dans la littérature, il est aussi rapporté que la présence de dimères de phéophorbide-a dans le PBS désactive la fluorescence de la forme monomère²²⁰. Il existe une très légère différence d'intensité de fluorescence entre le phéophorbide-a encapsulé dans les différentes micelles et dans les liposomes de DOPC.

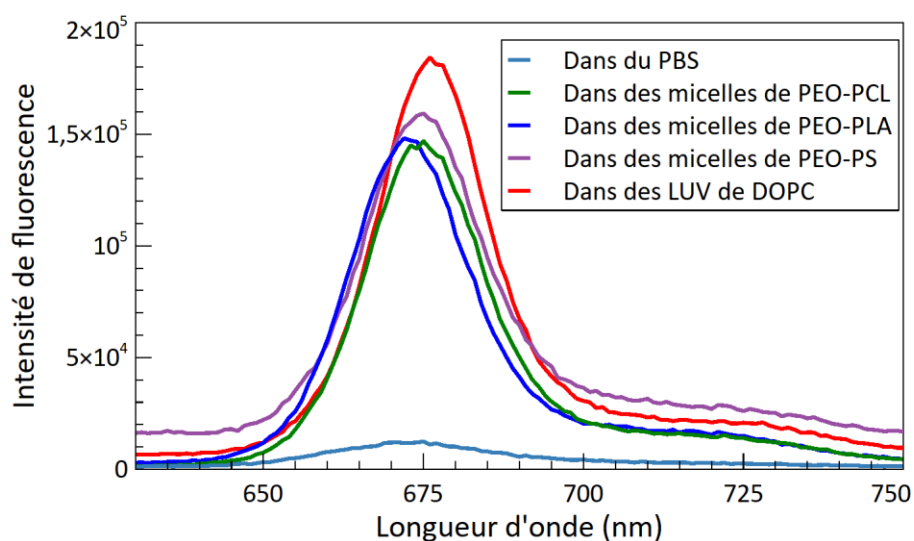


Figure 20 : Spectre de fluorescence du phéophorbide-a à 10^{-8} M dans du PBS et différents objets

Tous ces résultats nous indiquent que lorsque le phéophorbide-a est encapsulé dans les micelles, il se trouve sous sa forme monomérique. De cette manière, le phéophorbide-a pourra absorber la lumière, fluorescer et produire de l'oxygène singulet de manière efficace en milieu aqueux.

B. Affinité du phéophorbide-a pour les différents types d'objets

L'affinité d'une molécule pour un vecteur est liée à ses interactions avec les constituants du vecteur. Elle régit son partitionnement entre le vecteur et le milieu. Si les propriétés d'absorbance ou de fluorescence de la molécule varient selon qu'elle se trouve en solution ou dans les objets, il est possible d'utiliser cet effet pour remonter à sa localisation. Kuzelova et Brault²²¹ ont utilisé les propriétés de fluorescence d'une porphyrine de structure proche du phéophorbide-a pour mesurer son affinité pour des liposomes de dimyristoylphosphocholine (DMPC). Pour ce faire, ils ont mélangé différentes quantités de liposomes à une solution de fluorophore et mesuré leur fluorescence. Ils ont pu remonter à la constante d'affinité du fluorophore pour le lipide à l'aide du modèle suivant :

$$I = I_0 + (I_{DMPC} - I_0) \frac{K_L [DMPC]}{1 + K_L [DMPC]}$$

Avec :

I : l'intensité de fluorescence à une concentration de lipide donnée

I_0 : l'intensité de fluorescence en absence de lipides

I_{DMPC} : l'intensité de fluorescence lorsque tout le fluorophore est incorporé dans les vésicules

K_L : la constante d'affinité du fluorophore pour le lipide

Ce système étant très proche du nôtre, nous pouvons utiliser cette méthode pour déterminer l'affinité du phéophorbide-a pour les différents types d'objets. Nous avons analysé la fluorescence de solutions contenant diverses quantités d'objets et du phéophorbide à une concentration fixe dans du PBS. Plusieurs précautions ont été prises afin d'obtenir les résultats les plus reproductibles possibles. La concentration en phéophorbide-a a été fixée à 1.10^{-8} M de manière à minimiser la concentration en dimère de phéophorbide-a en solution. De même, tous les échantillons ont été préalablement placés sous un bullage d'argon pour chasser l'oxygène dissous et éviter la désactivation de la fluorescence du phéophorbide-a.

On observe une augmentation de l'intensité de fluorescence du phéophorbide à mesure que la concentration en objets augmente, jusqu'à atteindre un plateau. Cette évolution s'explique par le fait que lorsque l'on augmente la concentration en objets, l'équilibre entre le phéophorbide-a libre dans le PBS, peu fluorescent, et celui encapsulé dans les objets, très fluorescent, se déplace. On passe alors d'une concentration en objets assez faible pour laisser du phéophorbide libre à une concentration où la quasi-totalité du phéophorbide est contenue dans les objets. Au-delà de cette concentration, la fluorescence n'augmente plus (Figure 21-a).

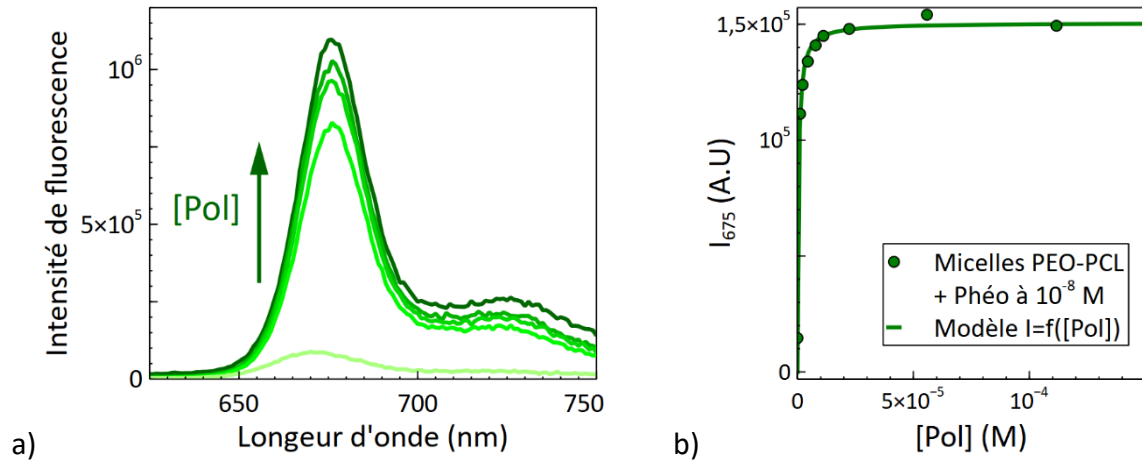


Figure 21 : a) Spectres de fluorescence d'une solution de phéophorbide-a dans du PBS à 1.10^{-8} M contenant différentes quantités de micelles PEO-PCL, b) Intensité de fluorescence à 675 nm en fonction de la concentration en polymères

Nous avons modélisé l'évolution du maximum de fluorescence en fonction de la concentration en polymères ou en lipides (Figure 21-b), dépendamment de la nature de l'auto-assemblage utilisé, à l'aide de SA, un logiciel de modélisation issu du laboratoire. Le modèle que nous avons utilisé considère l'équilibre entre le phéophorbide-a en solution et encapsulé dans les objets.



$$K_{aff} = \frac{[NP(Phéo)]}{[Phéo][NP]}$$

Pour remonter à la concentration de chaque espèce, nous avons considéré que l'intensité de fluorescence à une longueur d'onde donnée contient une part due au phéophorbide-a libre et une part due au phéophorbide-a encapsulé. Nous avons aussi fait l'hypothèse que dans la gamme de concentration de phéophorbide utilisé, son intensité de fluorescence évolue de manière linéaire avec sa concentration :

$$I_{Phéo} = I_{Phéo_{libre}} + I_{Phéo_{encaps}} = [Phéo_{libre}]F_{Phéo_{libre}} + [Phéo_{encaps}]F_{Phéo_{encaps}}$$

Avec :

$I_{Phéo}$: l'intensité de fluorescence totale

$I_{Phéo libre}$: l'intensité de fluorescence due au phéophorbide-a libre

$I_{Phéo encapsulé}$: l'intensité de fluorescence due au phéophorbide-a encapsulé dans les objets

$[Phéo_{libre}]$: la concentration en phéophorbide-a libre en solution

$[Phéo_{encapsulé}]$: la concentration en phéophorbide-a libre encapsulé dans les objets

$F_{Phéo libre}$: le coefficient reliant l'intensité de fluorescence du phéophorbide-a libre et sa concentration

$F_{Phéo encapsulé}$: le coefficient reliant l'intensité de fluorescence du phéophorbide-a encapsulé dans les objets et sa concentration

Nous fixons dans le modèle la valeur de $F_{\text{Phéo, libre}}$ à partir de l'intensité de fluorescence et de la concentration de la solution de phéophorbide-a sans objet et laissons la valeur de $F_{\text{Phéo encapsulé}}$ ajustable par le logiciel SA (Tableau 2).

Types d'objets	$F_{\text{Phéo encapsulé}} \text{ (M}^{-1}\text{)}$
Micelles de PEO-PCL	$1,53 \pm 0,06 \cdot 10^{13}$
Micelles de PEO-PLA	$1,39 \pm 0,01 \cdot 10^{13}$
Micelles de PEO-PS	$1,62 \pm 0,01 \cdot 10^{13}$
Liposomes de DOPC	$1,94 \pm 0,02 \cdot 10^{13}$

Tableau 2 : Valeurs de $F_{\text{Phéo encapsulé}}$ Obtenues pour les différents types d'objets

On remarque que les valeurs de $F_{\text{Phéo encapsulé}}$ sont du même ordre de grandeur pour tous les types d'objets.

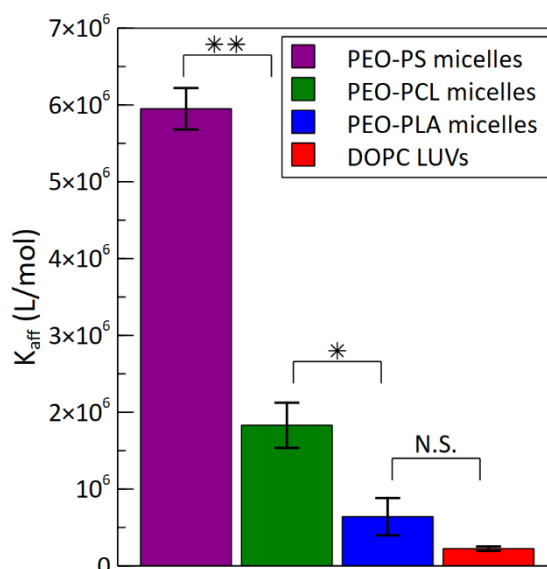


Figure 22 : Constantes d'affinité du phéophorbide-a pour différents types d'objets (N.S. : non significatif, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$)

A l'aide de ce modèle, nous avons pu évaluer la constante d'affinité du phéophorbide-a pour les différentes micelles étudiées, ainsi que pour les liposomes de DOPC (Figure 22). On observe une plus grande affinité du phéophorbide-a pour les micelles de PEO-PS, puis pour celles de PEO-PCL, de PEO-PLA et pour les liposomes de DOPC. En effectuant un test de Student, nous avons vu que les résultats obtenus pour les différents types de micelles sont bien significativement différents. En revanche, il n'y a pas de différence significative entre les résultats obtenus pour les micelles de PEO-PLA et les liposomes de DOPC. Cet ordre est en accord avec l'hydrophobicité relative des différents objets. Plus le cœur des micelles ou la membrane des liposomes est hydrophobe, plus le phéophorbide-a aura de facilité à pénétrer au sein des objets. Ceci est sûrement accentué dans le cas des micelles PEO-PS où la présence des cycles aromatiques sur la chaîne hydrophobe du copolymère peut augmenter la rétention du phéophorbide-a par interaction π - π . Nous avons testé le modèle de Kuzelova et Brault²²¹ sur nos résultats et obtenons les mêmes constantes d'affinité, ce qui est normal, les deux modèles étant deux manières différentes de considérer le même équilibre.

C. Transfert du phéophorbide-a des micelles vers les modèles de membranes

1. Mesures par fluorescence

Une des techniques permettant d'observer le transfert du phéophorbide-a des micelles de copolymères à blocs aux modèles de membranes repose sur le phénomène de transfert d'énergie par résonance de type Förster (ou FRET pour Förster Resonance Energy Transfer). Ce transfert d'énergie non-radiatif a lieu lorsque deux fluorophores sont proches spatialement l'un de l'autre, et que le spectre d'émission de l'un, le donneur, recouvre le spectre d'absorption de l'autre, l'accepteur. On nomme distance de Förster la distance à laquelle le donneur a la même probabilité de transférer son énergie à l'accepteur que d'émettre lui-même, c'est-à-dire la distance à laquelle l'efficacité de transfert est à la moitié de son maximum. Cette distance peut être calculée à partir de cette équation⁸³ :

$$R_0 = 0,2108 \left[\kappa^2 \Phi_D n^{-4} \int_0^{+\infty} I_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) d\lambda \right]^{-\frac{1}{6}}$$

Avec :

R_0 : la distance de Förster en Å

κ^2 : le facteur d'orientation des fluorophores, considéré égal à 2/3 pour des molécules libres

Φ_D : le rendement quantique de fluorescence du donneur en l'absence de transfert

n : l'indice de réfraction du milieu dans la gamme de longueurs d'onde considérée

I_D : l'intensité de fluorescence du donneur normalisée de manière à ce que $\int_0^{+\infty} I_D(\lambda) d\lambda = 1$

ε_A : le coefficient d'absorption molaire de l'accepteur en $M^{-1}cm^{-1}$

Pour observer le transfert du phéophorbide-a sur nos modèles de membranes, nous avons adapté un protocole utilisé par Kerdous et al.¹⁵⁰. Nous avons intégré dans la formulation de liposomes de DOPC 1% molaire de lipides marqués, un dioleoylphosphoethanolamine (DOPE) marqué à la lissamine rhodamine B. Ce fluorophore présente un spectre d'émission qui recouvre le spectre d'absorption du phéophorbide (Figure 23-a) et ne devrait pas changer les propriétés physico-chimiques de nos liposomes puisqu'il possède les mêmes chaînes grasses que le DOPC. En utilisant la formule énoncée précédemment, nous avons calculé que la distance de Förster pour le couple rhodamine/phéophorbide-a est d'environ 4,3 nm. Cette distance, de l'ordre de l'épaisseur de la bicouche des liposomes²²², nous permet de dire que pour observer ce phénomène, il faut que les deux sondes fluorescentes soient au sein du même objet ou que les micelles et les liposomes soient en contact direct.

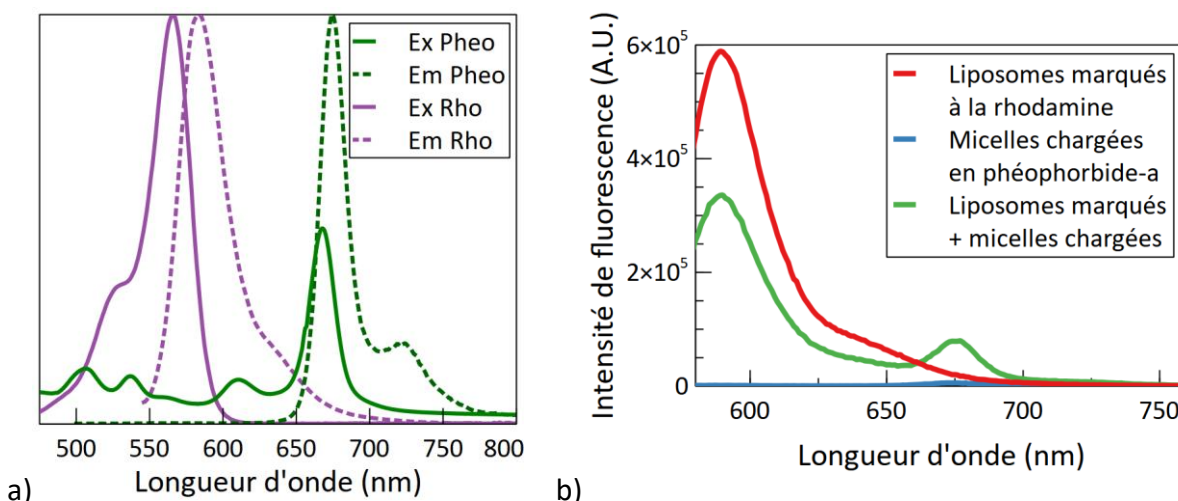


Figure 23 : a) Spectres d'absorption et d'émission de la rhodamine et du phéophorbide-a et b) mise en évidence du FRET

Le transfert d'énergie a pu être mis en évidence de manière simple (Figure 23-b). Nous avons mesuré la fluorescence sous irradiation à 569 nm, maximum du spectre d'absorption de la rhodamine, d'une solution de liposomes marqués, de micelles chargées en phéophorbide-a et d'un mélange des deux, aux mêmes concentrations que pour les solutions précédentes. On observe alors un spectre classique de fluorescence de la rhodamine pour les liposomes marqués, avec un pic à 591 nm. Pour la solution de micelles chargées en phéophorbide-a, ce dernier absorbant un peu à la longueur d'onde d'excitation choisie, on note un pic de fluorescence d'intensité relativement faible à 676 nm. En ce qui concerne le mélange des deux types d'objets, on remarque la présence de ces deux pics mais à des intensités différentes que pour les objets seuls, plus faible pour celui associé à la rhodamine et plus élevé pour celui associé au phéophorbide. Ce changement est dû au FRET et montre que le phéophorbide-a et la rhodamine sont bien proches spatialement. En revanche, ce résultat ne permet pas d'expliquer s'il s'agit juste d'un rapprochement entre les micelles et les liposomes ou s'il s'agit d'un transfert du phéophorbide-a dans les liposomes, du lipide marqué dans les micelles ou des deux.

Le principe de transfert d'énergie mis en évidence, nous avons aussi regardé l'aspect cinétique de ce transfert. En suivant l'évolution de l'intensité de fluorescence à 591 nm juste après le mélange entre des micelles de PEO-PCL chargées en phéophorbide-a et des LUV marquées à la rhodamine (Figure 24), nous avons pu estimer le temps nécessaire pour atteindre un équilibre. La valeur de l'intensité semble atteindre un plateau après 20 min. Par précaution, nous attendrons toujours un minimum d'une heure après le mélange pour faire nos mesures de fluorescence pour laisser le temps aux échantillons de s'équilibrer.

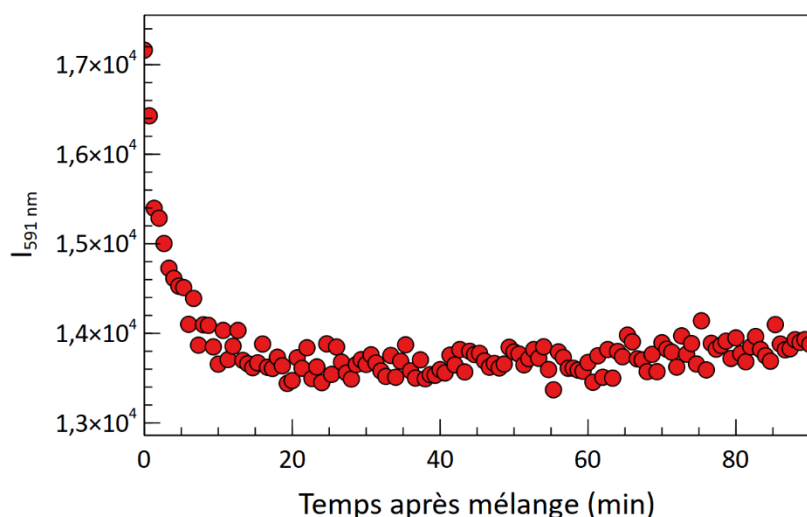


Figure 24 : Suivi au cours du temps de l'intensité de fluorescence à 591 nm d'un mélange de micelles PEO-PCL chargées en phéophorbide-a et des LUV marquées à la rhodamine

Nous pouvons alors utiliser les mesures de FRET pour comparer la manière dont le phéophorbide-a se transfère des micelles vers les liposomes. Pour ce faire, nous avons décidé de mélanger une quantité fixe de liposomes marqués à la rhodamine avec des quantités variables de micelles chargées en phéophorbide. Les micelles étudiées sont formulées à partir des mêmes polymères que précédemment, à savoir du PEO-PCL 5k-4k, du PEO-PLA 2,4k-2k et du PEO-PS 2,3k-3,1k. Pour cette expérience, nous avons aussi fait varier la quantité de phéophorbide-a dans les micelles. Trois ratios molaires de phéophorbide-a vis-à-vis du polymère ont été étudiés, 1/30, 1/50 et 1/100

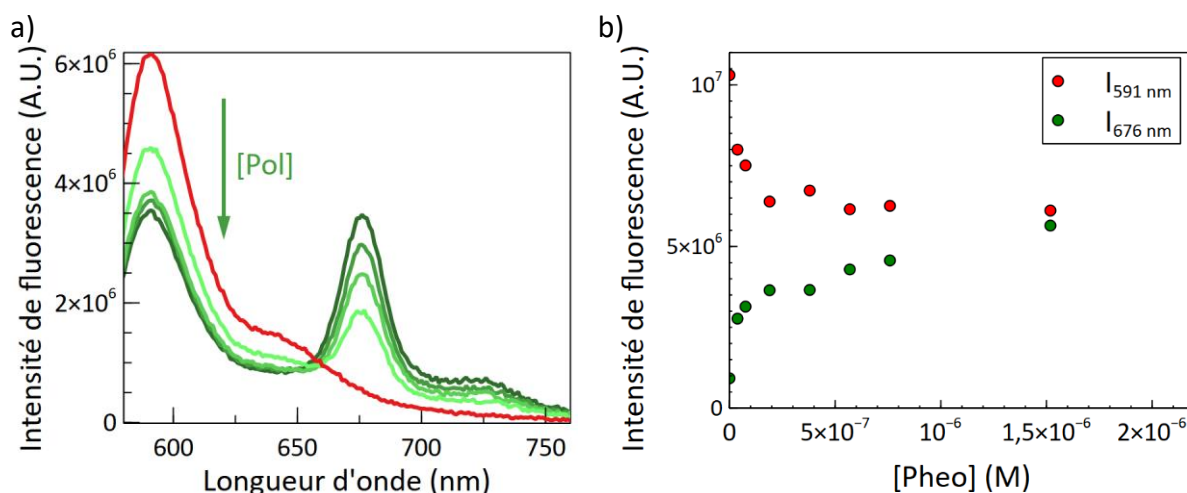


Figure 25 : a) Spectres de fluorescence de mélanges de liposomes marqués à la rhodamine et de différentes quantités de micelles PEO-PS chargées en phéophorbide-a et b) Intensité de fluorescence à 591 et 676 nm en fonction de la concentration en phéophorbide-a

On observe sur les spectres de fluorescence des différents mélanges (Figure 25-a) qu'à mesure que la concentration en phéophorbide-a dans les échantillons augmente, le pic centré à 591 nm diminue jusqu'à atteindre une valeur stable et le pic à 676 nm augmente sans sembler se stabiliser (Figure 25-b). Il ne faut pas oublier qu'à la longueur d'onde d'excitation choisie, le phéophorbide-a émet lui aussi. Nous avons donc préparé des échantillons de micelles chargées en phéophorbide-a aux mêmes concentrations que celles des mélanges et enlevé

l'intensité de fluorescence à 676 nm mesurée à celle des mélanges. Une fois corrigée, l'intensité de fluorescence à 676 nm présente bien un plateau (Figure 26-a).

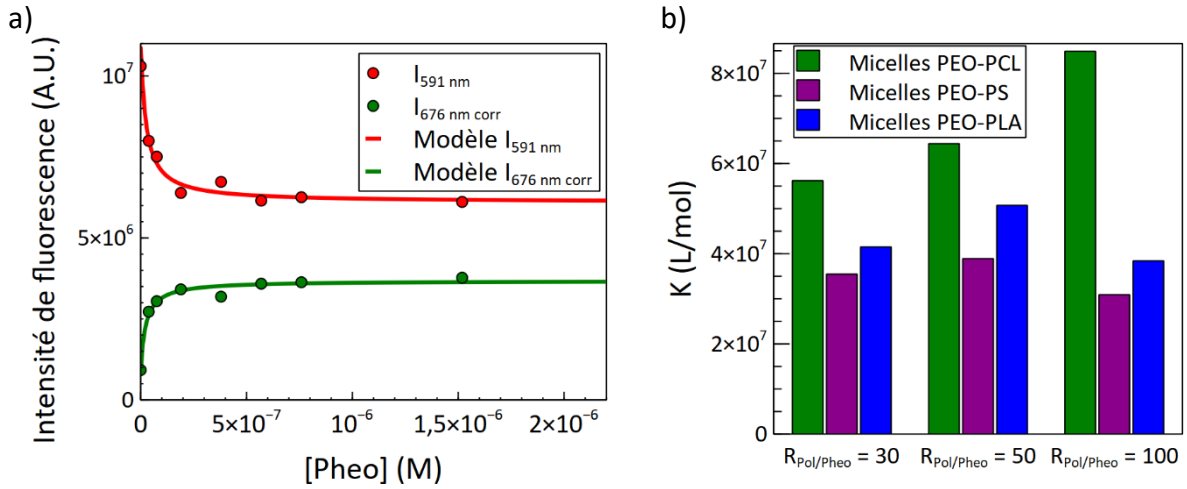
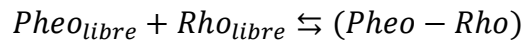


Figure 26 : a) Intensité de fluorescence à 591 nm et intensité de fluorescence corrigée à 676 nm en fonction de la concentration en phéophorbide-a et b) Histogrammes des valeurs de K_{trans} pour chaque type de micelles et de ratio de chargement en phéophorbide-a

Pour modéliser ces résultats, nous avons émis différentes hypothèses. Puisque l'observation du phénomène de FRET ne nous permet pas de savoir exactement si on est en présence d'un rapprochement entre les micelles et les liposomes ou d'un transfert du phéophorbide-a dans les liposomes, du lipide marqué dans les micelles, voire des deux, nous avons choisi de considérer une approche généralisée. Elle consiste en un équilibre entre le phéophorbide-a et la rhodamine « libres » (notés Pheo_{libre}, Rho_{libre}), c'est-à-dire à assez grande distance l'un de l'autre pour ne pas avoir de FRET, et un couple phéophorbide-a/rhodamine (noté Pheo-Rho) subissant le FRET, peu importe leur localisation.



$$K_{trans} = \frac{[(Pheo-Rho)]}{[Pheo][Rho]}$$

Nous avons considéré que pour chaque longueur d'onde étudiée, une part de l'intensité de fluorescence était due à la rhodamine « libre » et une autre au couple phéophorbide-a/rhodamine. Enfin, nous avons fait l'hypothèse que la gamme de concentration en rhodamine et en phéophorbide-a dans laquelle nous avons fait les mesures permet de considérer une proportionnalité entre l'intensité de fluorescence et la concentration en fluorophores.

$$I_{\lambda} = I_{Rho libre \lambda} + I_{(Pheo-Rho) \lambda} = [Rho_{libre}]F_{Rho_{libre} \lambda} + [(Pheo-Rho)]F_{(Pheo-Rho) \lambda}$$

Avec :

I_{λ} : l'intensité de fluorescence à une longueur d'onde donnée

$I_{Rho libre \lambda}$: l'intensité de fluorescence due à la rhodamine libre à une longueur d'onde donnée

$I_{(\text{Phéo-Rho}) \lambda}$: l'intensité de fluorescence due au couple (phéophorbide-a/rhodamine) à une longueur d'onde donnée

$[\text{Rho}_{\text{libre}}]$: la concentration en rhodamine libre

$[(\text{Phéo-Rho})]$: la concentration du couple (phéophorbide-a/rhodamine)

$F_{\text{Rho libre } \lambda}$: le coefficient reliant l'intensité de fluorescence à une longueur d'onde donnée de la rhodamine libre et sa concentration

$F_{(\text{Phéo-Rho}) \lambda}$: le coefficient reliant l'intensité de fluorescence à une longueur d'onde donnée du couple (phéophorbide-a/rhodamine) et sa concentration

De cette manière, nous avons pu modéliser pour chaque concentration l'équilibre entre les différentes espèces et remonter à une constante de transfert. Nous avons fixé les paramètres $F_{\text{Rho libre } \lambda}$ pour les deux longueurs d'onde étudiées obtenus à partir de la concentration en lipide et du spectre de fluorescence des liposomes seuls. Nous avons laissé les paramètres $F_{(\text{Phéo-Rho}) \lambda}$ ajustables par le logiciel. Ce que l'on peut remarquer, c'est que la formation de l'espèce phéophorbide-a/rhodamine est moins importante lorsque le phéophorbide est encapsulé dans des micelles de PEO-PS, un peu plus marquée pour les micelles PEO-PLA et encore plus marquée pour les micelles PEO-PCL (Figure 26-b). Nous n'avons pas effectué de répliques de chaque échantillon mais le fait d'observer le même comportement et le même classement entre les micelles à des taux de chargement en phéophorbide-a différents nous permet de considérer ces résultats comme justes.

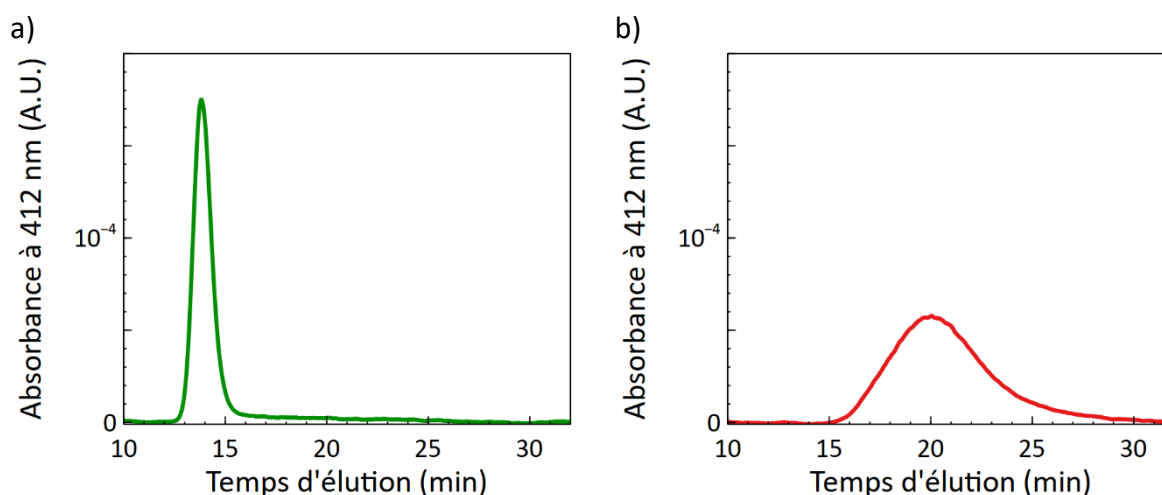
2. Etude d'un mélange de micelles et de liposomes par AF4

Pour pouvoir mieux comprendre le passage du phéophorbide-a des micelles vers les membranes, nous avons utilisé une autre méthode d'analyse, le fractionnement flux-force. La méthode de fractionnement flux-force que nous avons utilisée est le fractionnement flux-force flux asymétrique (AF4 pour Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation). Cette méthode permet la séparation des composés en fonction de leur taille. Elle se caractérise par l'utilisation d'un canal dont la face inférieure est poreuse et recouverte d'une membrane d'ultrafiltration. De cette manière, il est possible de créer un contre d'éluant perpendiculaire au canal, appelé flux croisé, en le soutirant à travers la membrane. Ce flux croisé permet de créer la force qui génèrera la séparation. Dans notre cas, cette méthode nous permet de séparer un mélange de micelles et de liposomes, leurs diamètres respectivement autour des 30 nm et des 100 nm, étant assez différents. Pour la partie analytique, nous avons travaillé avec, en ligne, un détecteur d'absorbance UV-Visible, un détecteur de fluorescence, un détecteur de diffusion de la lumière dynamique et statique et un réfractomètre. Tout ceci nous permet d'obtenir des informations sur la taille et la morphologie des objets ainsi que sur la présence de phéophorbide-a dans les différents types d'objets.

Dans la littérature, nous avons trouvé une autre étude de suivi de transfert de molécules hydrophobes par AF4²²³. Bien que relativement similaire, pour certains aspects leur approche se différencie de celle que nous avons mise en place. Dans leur cas, le vecteur contenant la molécule hydrophobe et la cible sont tous deux des liposomes. Ils arrivent à les différencier en les produisant de taille ou de lamellarité différentes. Une autre différence majeure est la

méthode utilisée pour quantifier le transfert. Dans leur cas, ils ont récolté les fractions correspondant aux liposomes « donneurs » et « accepteurs » et ont analysé leur contenu par chromatographie liquide. Dans notre expérience, nous utiliserons l'absorbance du phéophorbide-a pour évaluer son transfert.

Dans un premier temps, nous avons mis au point la méthode de séparation de micelles PEO-PCL chargées en phéophorbide-a et de liposomes de DOPC. Nous nous sommes basé sur une méthode de séparation de micelles et de polymersomes de PEO-PCL mise au point lors de travaux précédents²²⁴, les polymersomes étant de taille comparable à celle des liposomes. En partant de cette méthode, nous avons analysé séparément les micelles et liposomes. Nous avons ensuite ajusté le profil de variation du flux croisé pour s'assurer que les objets sortent du canal à des temps suffisamment différents. Le profil choisi démarre par un plateau à un flux croisé à 3 mL/min puis diminue jusqu'à atteindre 0,3 mL/min. De cette manière, durant le plateau initial, les liposomes, de diamètre plus grand, sont plus retenus que les micelles. Ensuite, après la diminution du flux croisé, les liposomes seront alors moins retenus et élueront à une vitesse normale. Il en résulte que les micelles sortiront en premières du canal et que les liposomes ne sortiront que plus tard. Ceci a été vérifié en suivant l'absorbance à 412 nm en sortie du canal. Dans le cas des micelles seules (Figure 27-a), on remarque qu'elles sortent après 12 minutes d'élution. Les liposomes quant à eux sortent à partir de 15 minutes d'élution (Figure 27-b). La différence de temps d'élution des deux types d'objets permet alors de distinguer clairement les deux pics qui leur sont associés lorsqu'ils sont mélangés (Figure 27-c). Il est important de noter que l'absorbance mesurée pour les deux types d'objets provient de phénomènes différents. En effet, pour les micelles chargées, il s'agit de l'absorbance du phéophorbide-a mais pour les liposomes, le signal observé provient de la diffusion des liposomes, leur taille avoisinant les 100 nm de diamètre.



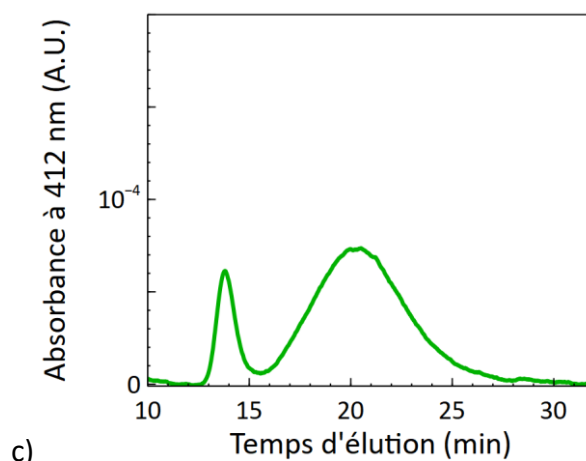


Figure 27 : Fractogrammes a) de micelles PEO-PCL chargées en phéophorbide-a, b) de liposomes de DOPC et c) d'un mélange de micelles chargées et de liposomes

En s'intéressant de plus près au fractogramme du mélange des micelles chargées et des liposomes et en le comparant aux fractogrammes obtenus pour les objets seuls aux mêmes concentrations (Figure 28), on remarque que le pic associé aux micelles est plus faible pour le mélange alors que celui associé aux liposomes est plus élevé. Ce phénomène est dû au transfert d'une partie du phéophorbide-a dans les micelles vers les liposomes. De cette manière, nous avons pu expliciter la dynamique du transfert observée dans la partie précédente. Il serait alors envisageable d'adapter l'expérience de suivi de transfert à une étude par AF4. Malheureusement, nous n'avons pas eu le temps de mener une expérience complète.

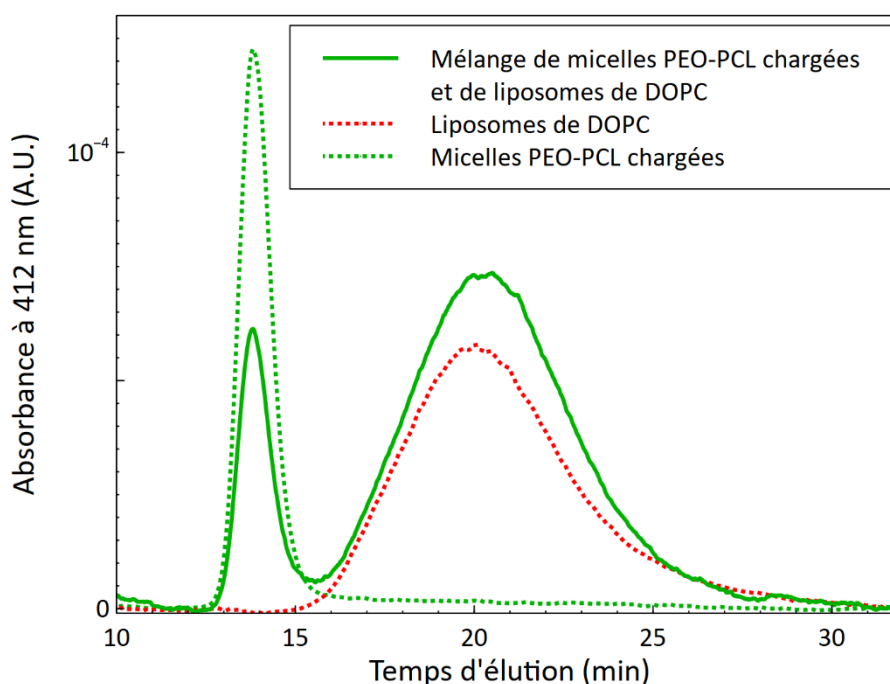


Figure 28 : Comparaison du fractogramme d'un mélange de micelles PEO-PCL chargées en phéophorbide-a et de liposomes de DOPC (trait plein) et des fractogrammes des objets seuls aux mêmes concentrations (pointillés)

D. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons comparé les propriétés d'absorbance et de fluorescence du phéophorbide-a en solution dans l'éthanol ou dans le PBS, encapsulé dans des micelles de

trois polymères différents, le PEO-PCL 5k-4k, le PEO-PLA 2,4k-2k et le PEO-PS 2,3k-3,1k. Ces résultats nous ont permis de mettre en évidence que le phéophorbide-a est encapsulé dans les micelles sous sa forme monomérique.

Nous avons évalué les constantes d'affinité du phéophorbide-a pour les différents types de micelles et pour les modèles de membranes étudiés, des liposomes de DOPC. Nous avons ainsi pu montrer que le phéophorbide-a possède une plus grande affinité pour les micelles de PEO-PS, suivies des micelles de PEO-PCL et PEO-PLA, pour lesquelles le phéophorbide-a montre une affinité similaire à celle pour les liposomes de DOPC. Cet ordre d'affinité du phéophorbide-a pour les différents objets peut être corrélé à l'hydrophobicité relative du cœur des micelles ou de la bicouche. Plus elle est élevée, plus le photosensibilisateur présentera une grande affinité pour l'objet.

Ensuite, nous avons cherché à observer et à rationaliser le transfert du phéophorbide-a encapsulé dans les micelles vers les liposomes de DOPC. Dans un premier temps, nous avons utilisé des liposomes marqués à la rhodamine, fluorophore pouvant former un couple FRET avec le phéophorbide-a. Après avoir mélangé des micelles chargées en phéophorbide-a et des liposomes marqués, nous avons pu mettre en évidence le transfert d'énergie associé à la proximité spatiale du phéophorbide-a et de la rhodamine. Nous avons alors évalué une constante caractéristique du rapprochement spatial du phéophorbide-a encapsulé dans les différents types de micelles étudiées et de la rhodamine, sans pour autant pouvoir expliciter le transfert en jeu.

Pour pouvoir comprendre en détail ce phénomène, nous avons cherché à reproduire cette expérience et à la suivre par fractionnement flux-force, technique permettant de séparer les micelles et les liposomes avant de les analyser. En n'utilisant qu'un seul type de micelles, celles de PEO-PCL, nous avons réussi à observer le transfert du phéophorbide-a vers les liposomes. En revanche, nous ne sommes pas encore parvenus à remonter à une constante de transfert du phéophorbide-a des micelles vers les liposomes à partir de ces expériences.

Bien que nous n'ayons pas pu expliciter la manière dont le phéophorbide-a passe des micelles aux membranes à l'aide de ces expériences, il est possible d'envisager différents scénarios pouvant expliquer les résultats observés. Sur la Figure 29, nous avons représenté quelques-uns de ces scénarios. Nous avons considéré le cas où le phéophorbide-a n'est pas transféré à la membrane mais toujours encapsulé dans des micelles au contact de la membrane (Figure 29-a). Ce cas peut expliquer des mesures obtenues par FRET mais pas par AF4. Nous avons aussi envisagé le cas où les micelles chargées sont au contact de la membrane qu'une partie du phéophorbide-a a été transféré à la membrane de manière collisionnelle ((Figure 29-b). Ce scénario pourrait expliquer à la fois ce que l'on observe par FRET et par AF4. Enfin, il est aussi possible d'envisager le cas où la micelle interagit de manière plus intime avec la membrane. On peut alors imaginer des cas où le polymère pénètre partiellement la membrane (Figure 29-c) ou complètement (Figure 29-d). Dans ces deux cas, le phéophorbide-a serait transféré à la membrane en même temps que le polymère. Ces deux scénarios sont compatibles avec les résultats que nous avons obtenus avec nos expériences mais des mesures complémentaires serait nécessaire pour les confirmer. Par exemple, en

utilisant un polymère marqué d'un fluorophore dans la formulation des micelles, il serait possible par AF4 d'observer son transfert potentiel aux liposomes.

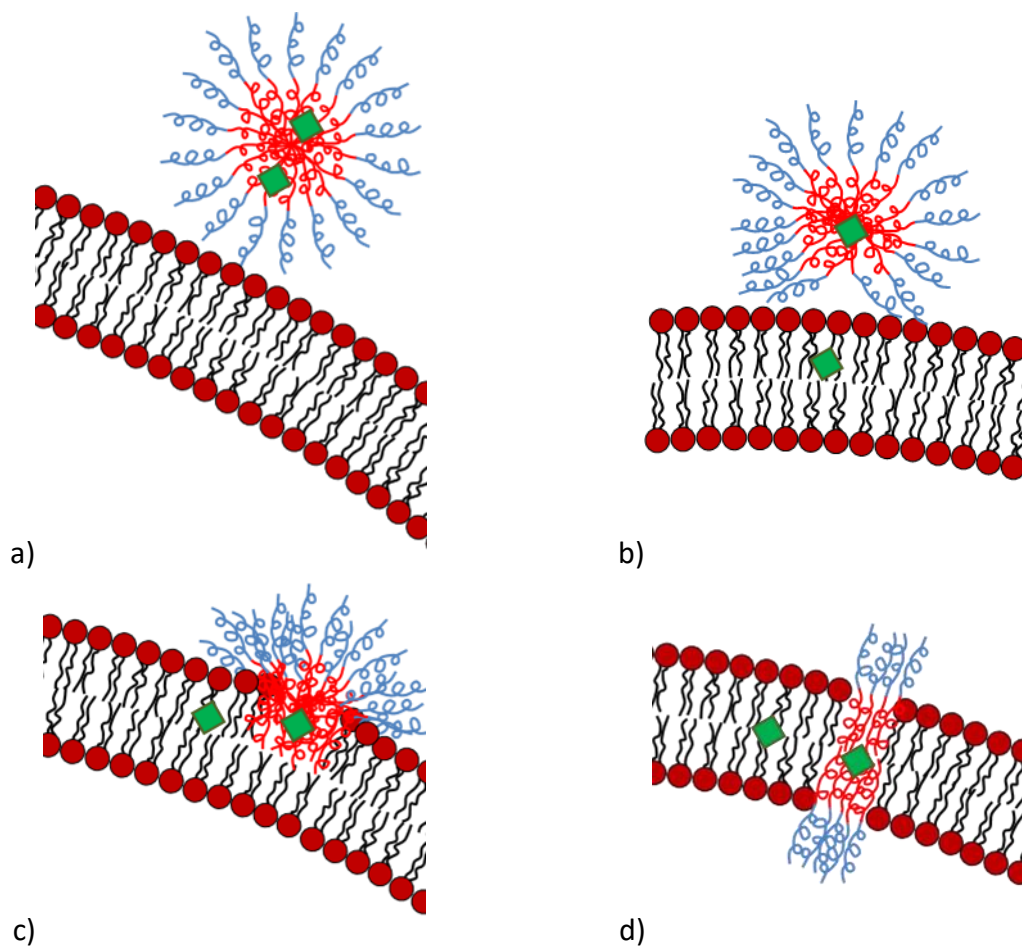


Figure 29 : Représentation schématique de quelques-uns des mécanismes possibles de transfert du phéophorbide-a (losange vert) d'une micelles de copolymère à blocs à une membrane lipidiques.

**Chapitre III : Etude des effets sur des
modèles de membranes de nanovecteurs à
base de copolymères à blocs encapsulant un
photosensibilisateur sous irradiation
lumineuse**

Chapitre III : Etude des effets sur des modèles de membranes de nanovecteurs à base de copolymères à blocs encapsulant un photosensibilisateur sous irradiation lumineuse

Nous avons vu dans le chapitre précédent les propriétés spectrales du phéophorbide-a dans différents types d'objets, des micelles de PEO-PCL 5k-4k, de PEO-PLA 2,4k-2k et de PEO-PS 2,3k-3,1k ou des liposomes de DOPC. Nous avons ensuite observé et quantifié le transfert du phéophorbide-a des micelles vers les liposomes. Dans ce chapitre, nous allons décrire les phénomènes ayant lieu lorsque des mélanges de micelles chargées en phéophorbide-a et de liposomes se retrouvent soumis à une irradiation lumineuse. La source lumineuse que nous avons choisie est une LED dont le spectre est un seul pic centré autour de 656 nm. Cette LED permet d'irradier préférentiellement le phéophorbide-a dans sa bande centrée à 670 nm (Figure 30).

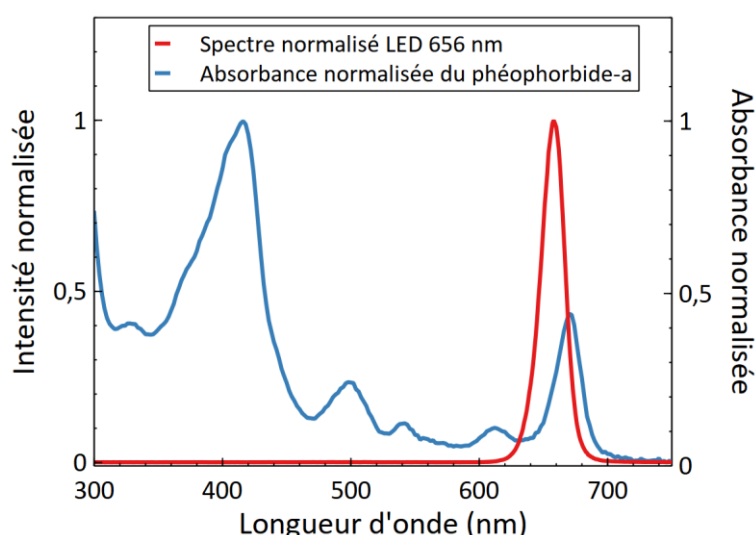


Figure 30 : Spectre normalisé de la LED utilisée pour les irradiations et spectre d'absorbance normalisée du phéophorbide-a encapsulé dans des micelles de PEO-PCL

A. Suivi des modifications de perméabilité des modèles de membranes à la suite d'une irradiation lumineuse

1. Recherche des conditions expérimentales

Pour mesurer les effets des nanovecteurs chargés en phéophorbide-a sur la membrane des liposomes, nous avons utilisé une méthode de suivi de la fuite d'une sonde fluorescente chargée dans les liposomes. Nous avons utilisé la 5(6)-carboxyfluorescéine (CBF) comme sonde. Elle est utilisée pour observer des modifications de liposomes grâce à sa propriété d'auto-extinction²²⁵. A haute concentration la CBF est faiblement fluorescente à cause d'interactions entre fluorophores. En diffusant à travers la membrane des liposomes, elle se dilue dans le milieu extérieur, ce qui génère une augmentation de sa fluorescence (Figure 31-a). La diffusion de la CBF à travers la membrane des liposomes dépend de la perméabilité de ces derniers. En suivant l'évolution de la fluorescence de la CBF en fonction du temps, il est possible de remonter à la perméabilité des liposomes. De cette manière, nous pourrions voir comment l'utilisation des micelles chargées en phéophorbide-a modifie cette perméabilité

après l'irradiation lumineuse du photosensibilisateur. Il est important de noter que la fluorescence de la CBF est fortement dépendante du pH de la solution^{225,226}. Pour cette raison, nous avons choisi de préparer toutes nos formulations et de faire toutes nos expériences dans du PBS à un pH de 7,4. De cette manière, nous sommes certains que les variations de fluorescence observées ne sont pas dues à des variations potentielles du pH lors de nos expériences.

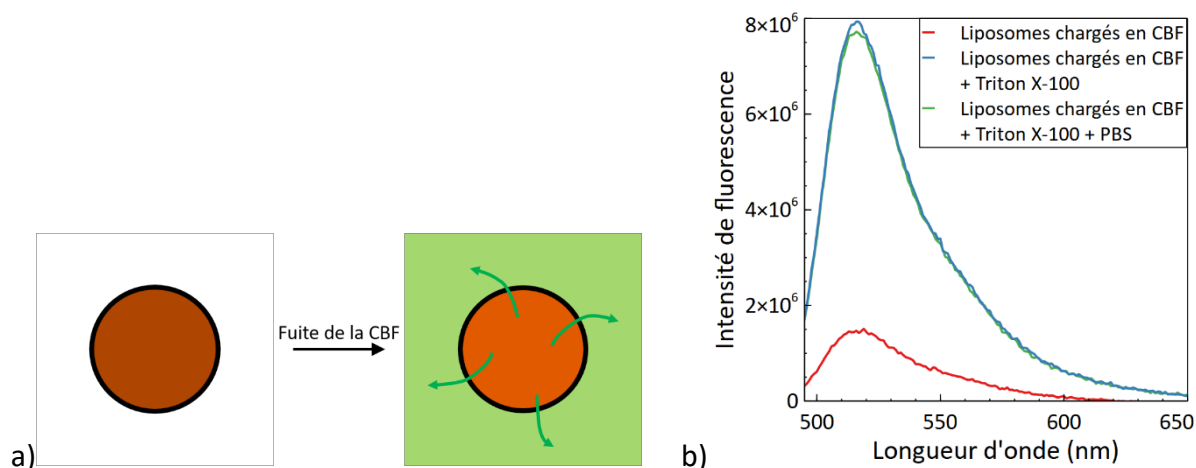


Figure 31 : a) Schéma de principe de la fuite de liposomes chargés à la CBF à concentration d'auto-extinction et b) exemple de la fluorescence de liposomes chargés en CBF avant et après ajout de Triton X-100 puis après ajout de PBS

Pour nos mesures, nous avons décidé de toujours conserver les concentrations en phéophorbide-a ainsi qu'en lipide constantes. La concentration en phéophorbide-a a été fixée à 1 μM de manière à ce que son absorbance soit mesurable sans être trop élevée. Celle en lipide a été fixée de manière à ce que la concentration totale en CBF soit inférieure à sa concentration d'auto-extinction. Ceci a pu être vérifié en préparant des solutions de liposomes chargés en CBF à 60 mM dans du PBS et en mesurant leur fluorescence après ajout de Triton X-100 (Figure 31-b). Le Triton X-100 est un tensioactif non-ionique qui va détruire les liposomes pour libérer toute la CBF encapsulée. Après cette mesure, la solution est légèrement diluée par un ajout de PBS et sa fluorescence est de nouveau mesurée. Nous avons déterminé qu'une concentration en lipide de 120 μM permettait de préparer des échantillons avec le comportement attendu : l'intensité de fluorescence diminue de façon proportionnelle à la concentration, ce qui indique que la CBF est bien en dessous de sa concentration d'auto-extinction.

Un autre paramètre de notre expérience que nous avons fixé était le temps après le mélange des micelles et des liposomes à attendre avant de commencer l'irradiation. Dans le chapitre II, nous avons mesuré la cinétique de transfert du phéophorbide-a des micelles vers les liposomes. Nous avons remarqué qu'après 20 minutes, le système semblait avoir atteint un équilibre. Par précaution, nous avons choisi de fixer ce temps d'incubation à 30 minutes.

Le dernier paramètre restant à fixer est le temps d'irradiation de notre mélange. Pour ce faire, nous avons regardé le comportement du phéophorbide-a sous irradiation. Comme décrit dans le diagramme de Jablonski d'un photosensibilisateur au chapitre I (Figure 7), sous irradiation le phéophorbide-a va tout d'abord passer à un état singulet excité, puis à un état triplet par conversion intersystème pour ensuite transférer son énergie à l'oxygène triplet et produire de

l'oxygène singulet. Différentes techniques pour détecter l'oxygène singulet existent. Il est possible de visualiser sa production en utilisant la fluorescence de l'oxygène singulet à 1270 nm²²⁷. L'oxygène singulet peut réagir avec des piègeurs de radicaux tels que la 2,2,6,6-tetramethylpiperidine (TEMP), les produits de ce piégeage pouvant ensuite être quantifiés par résonnance paramagnétique électronique (RPE)²²⁸. Il est aussi possible d'utiliser des sondes qui réagiront avec l'oxygène singulet, ce qui changera leurs propriétés d'absorbance ou de fluorescence²²⁹. C'est cette technique que nous avons utilisée pour détecter la production d'oxygène singulet par le phéophorbide-a. Nous avons ajouté de l'acide dipropionique d'anthracène (ADPA) dans le milieu.

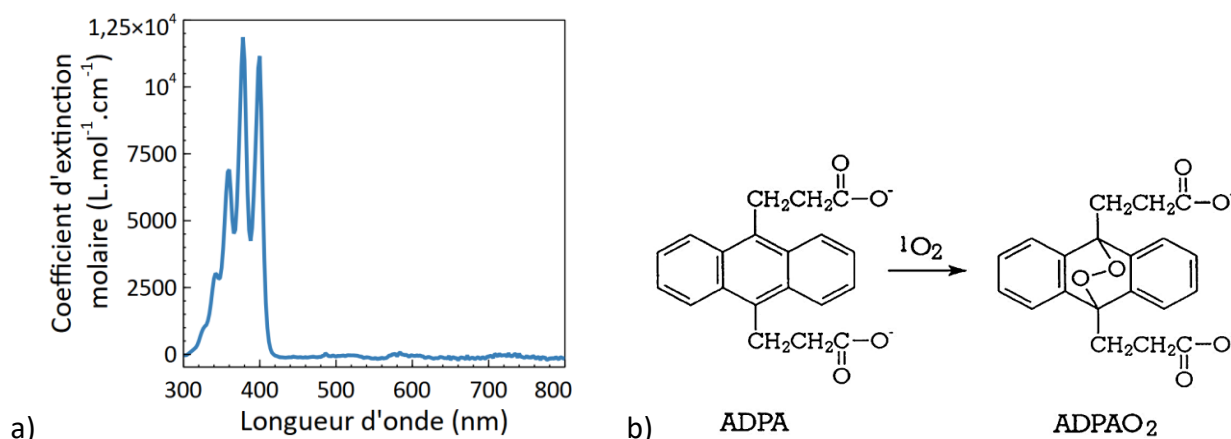


Figure 32 : a) évolution du coefficient d'extinction molaire de l'ADPA dans le PBS avec la longueur d'onde et b) réaction de l'ADPA avec l'oxygène singulet pour former un endopéroxyde

Cet anthracène soluble dans l'eau possède un spectre d'absorbance présentant des pics caractéristiques entre 300 et 420 nm (Figure 32-a). Dans la littérature, l'ADPA a été utilisé pour quantifier la production d'oxygène singulet par des photosensibilisateurs²³⁰. En présence d'oxygène singulet, l'ADPA est oxydé pour former un endopéroxyde qui n'absorbe plus entre 300 et 420 nm (Figure 32-b). En suivant alors la décroissance de l'absorbance de l'ADPA, il est possible de remonter à la production en oxygène singulet dans le milieu. Cette méthode peut être adaptée à notre système, à la seule différence que dans notre cas, l'ADPA n'est pas la seule molécule pouvant réagir avec l'oxygène singulet. En effet, dans notre mélange, nous avons à la fois l'ADPA, la CBF, le phéophorbide-a et les lipides constituant les liposomes qui peuvent être oxydés par l'oxygène singulet.

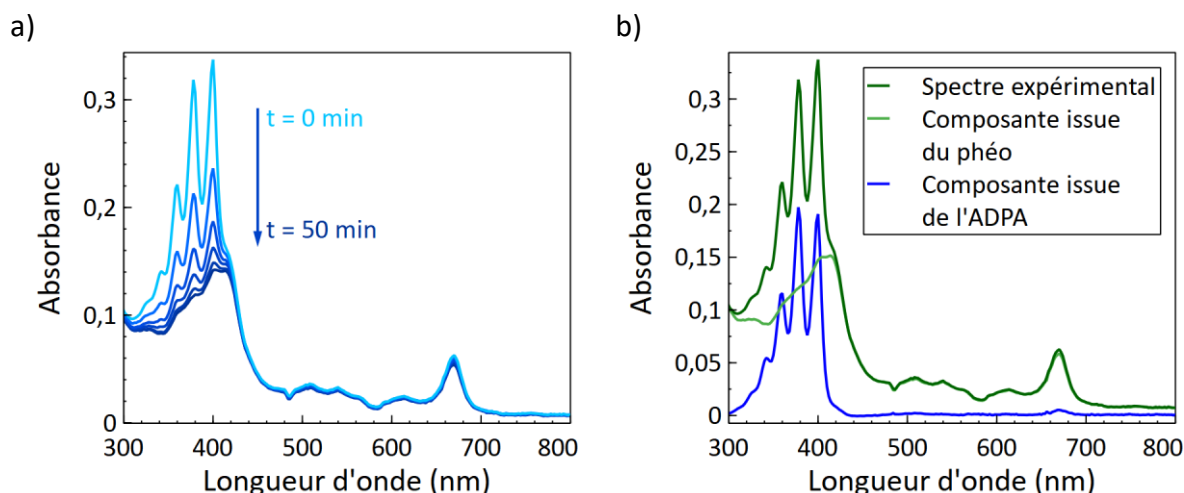


Figure 33 : a) évolution de l'absorbance d'un mélange d'ADPA et de micelles de PEO-PCL chargées en phéophorbide-a sous irradiation à 656 nm et b) résultats de la SVD du spectre du mélange avant irradiation

Pour optimiser le temps d'irradiation, nous avons décidé de partir d'un mélange plus simple. Nous avons regardé l'évolution de l'absorbance d'un mélange de micelles PEO-PCL chargées en phéophorbide-a et d'ADPA dans du PBS sous irradiation d'une LED à 656 nm (Figure 33-a). On remarque que durant l'irradiation, les pics caractéristiques de l'ADPA entre 300 et 420 nm baissent de manière significative et que celui du phéophorbide-a à 670 nm baisse légèrement. Ces diminutions sont respectivement dues à la formation de l'endoperoxyde d'ADPA et du photoblanchiment du phéophorbide-a. Nous avons analysé ces données à l'aide d'un outil de décomposition en valeurs singulières (SVD pour singular value decomposition) présent dans le logiciel pilotant notre spectromètre UV-visible. Cet outil nous permet de séparer du spectre d'absorption du mélange les composantes dues au phéophorbide-a et à l'ADPA (Figure 33-b). Une fois ces composantes isolées, nous pouvons alors modéliser l'évolution de l'absorbance de chaque espèce, et donc de sa concentration (Figure 34). En première approximation, nous avons considéré que les deux réactions d'oxydation ayant lieu durant l'irradiation suivaient une cinétique d'ordre 1. De cette modélisation, nous avons obtenu les temps caractéristiques de l'oxydation de l'ADPA et du phéophorbide-a respectivement de 14 et 806 minutes. À partir de ces résultats, nous avons choisi d'utiliser un temps d'irradiation de 30 minutes pour notre expérience de suivi de modification de l'intégrité de liposomes. Ce temps permet d'observer la production d'oxygène singulet via la baisse de l'absorbance de l'ADPA sans non plus consommer tout l'ADPA dans le milieu. De plus, sur cette échelle de temps, la dégradation du phéophorbide-a reste très faible et pourra alors être négligée.

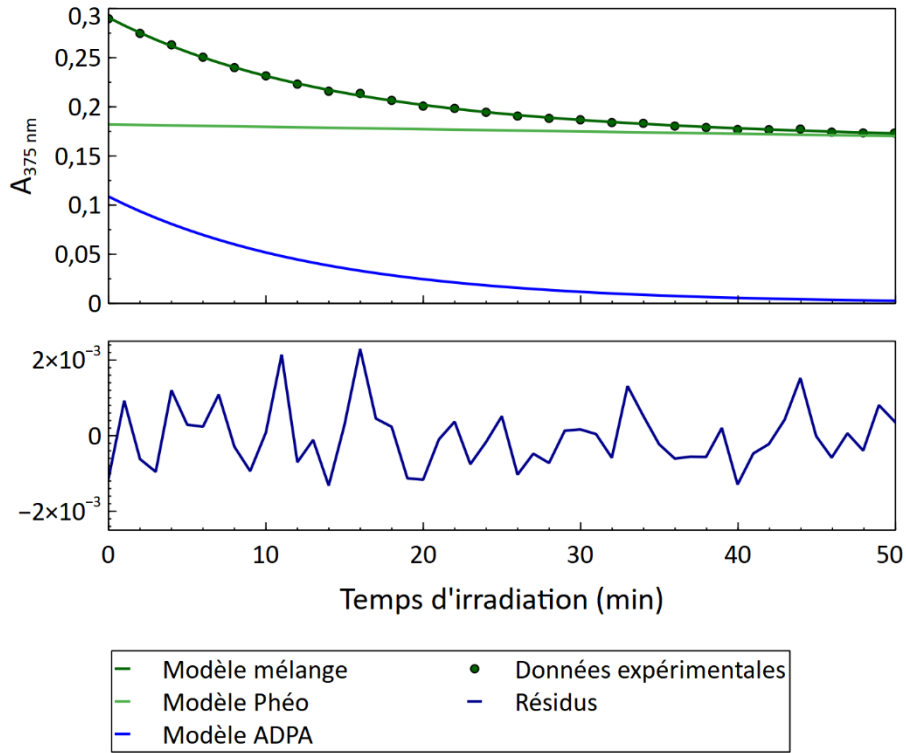


Figure 34 : Modélisation de l'absorbance d'un mélange d'ADPA et de micelles PEO-PCL chargées en phéophorbide-a obtenue par SVD

2. Mesure de la production d'oxygène singulet

Une fois tous les paramètres expérimentaux fixés, nous avons pu mettre en place l'expérience sur le système complet. Dans ce cas, il ne sera pas possible de mesurer la quantité d'oxygène singulet produite mais il sera tout de même possible de la comparer dans les différents types de mélanges. En suivant l'absorbance d'un mélange de liposomes, de micelles chargées en phéophorbide-a et d'ADPA durant l'irradiation, on remarque une diminution nette des pics associés à l'ADPA et à la CBF, alors que le pic du phéophorbide-a à 670 nm ne diminue que très peu (Figure 35-a). Pour avoir une idée plus précise, nous avons suivi l'absorbance en fonction du temps d'irradiation de certains pics d'intérêts, celui à 400 nm associé à l'ADPA, celui à 492 nm associé à la CBF et celui à 670 nm associé au phéophorbide-a (Figure 35-b). Comme vu précédemment, le photoblanchiment du phéophorbide-a est assez lent sur le temps d'irradiation effectué et nous pouvons considérer la concentration en phéophorbide-a quasi constante durant toute l'irradiation. La puissance lumineuse de la LED ne variant pas non plus durant l'irradiation, la concentration en oxygène singulet peut alors être considérée constante durant ce laps de temps. L'oxydation de l'ADPA et de la CBF peuvent être assimilées à des réactions d'ordre 1. Les décroissances d'absorbance à 400 et 492 nm sont alors modélisées en utilisant une exponentielle décroissante de type :

$$A_{\lambda} = A_{\lambda,\infty} + (A_{\lambda,0} - A_{\lambda,\infty})e^{-\frac{t}{\tau_{\lambda}}}$$

Avec :

A_{λ} : l'absorbance à la longueur d'onde donnée

$A_{\lambda,\infty}$: l'absorbance à la longueur d'onde donnée après un temps d'irradiation infini

$A_{\lambda,0}$: l'absorbance à la longueur d'onde donnée avant irradiation

τ_{λ} : le temps caractéristique de l'oxydation de l'espèce concernée

Cette formule diffère des formules classiques de type $A = A_0 e^{-\frac{t}{\tau}}$ car à 400 et 492 nm, le phéophorbide-a absorbe aussi. Pour compenser cela nous avons dû introduire le terme $A_{\lambda,\infty}$.

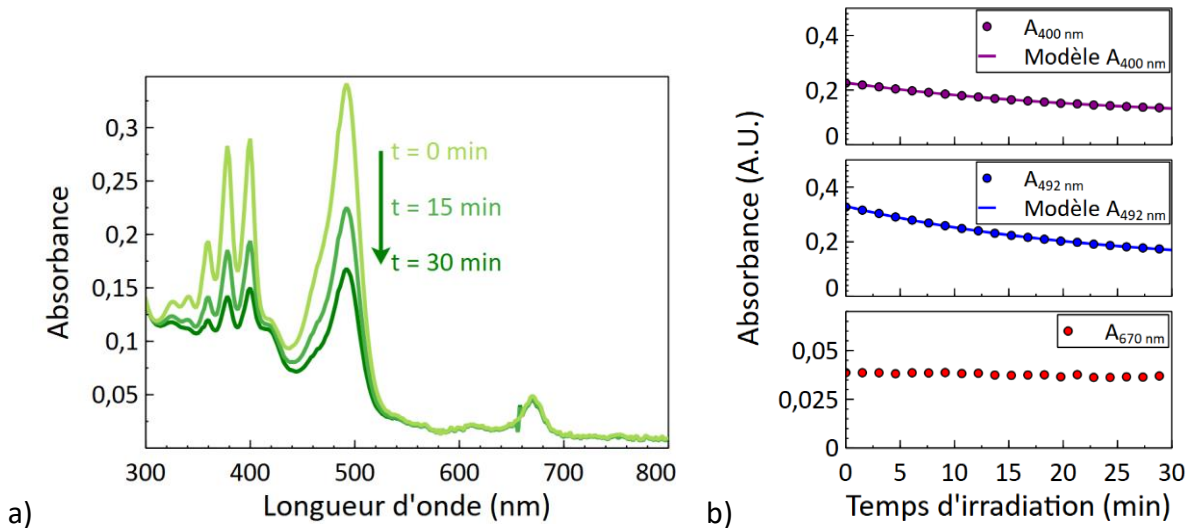


Figure 35 : a) Spectres d'absorbance d'un mélange de LUV chargées en CBF, de micelles chargées en phéophorbide-a et d'ADPA dans du PBS à différents temps d'irradiation sous LED 656 nm et b) suivi de l'absorbance à 400, 492 et 670 nm en fonction du temps d'irradiation

Ces temps caractéristiques vont nous permettre de comparer la production en oxygène singlet en fonction des vecteurs utilisés. Plus la concentration en oxygène singlet produit sera élevée, plus ils seront faibles.

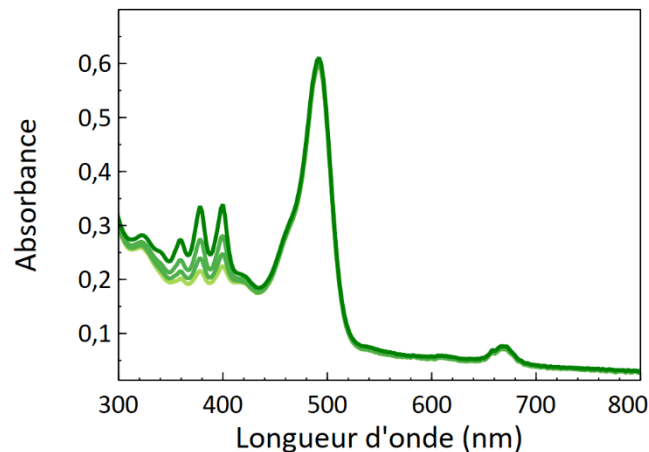


Figure 36 : Spectres d'absorbance d'un mélange de CBF en solution dans le PBS, de micelles chargées en phéophorbide-a et d'ADPA dans du PBS à différents temps d'irradiation

Pour nous permettre de mieux comprendre ce qu'il se passe durant l'irradiation, nous avons aussi fait une cinétique d'irradiation d'un mélange contenant de l'ADPA, des micelles de PEO-PCL chargées en phéophorbide-a et de la CBF en solution dans le PBS (Figure 37). Nous nous sommes placés à une concentration en CBF de 6 μM , soit 10 000 fois moins que dans les liposomes mais du même ordre de grandeur que la concentration totale en CBF dans un échantillon. Nous voyons toujours la diminution de l'absorbance de l'ADPA liée à son

oxydation mais nous n'observons pas de baisse de l'absorbance de la CBF. Ceci nous permet de confirmer que l'oxydation de la CBF observée précédemment est bien celle de la sonde lorsqu'elle est encapsulée dans les liposomes. La surconcentration en CBF dans les liposomes explique très certainement pourquoi elle s'oxyde autant.

Nous supposons que l'ADPA est réparti de manière homogène en solution et qu'il ne présente pas d'affinité particulière pour les liposomes ou les micelles. Sa cinétique d'oxydation nous donne alors des informations sur la production d'oxygène singulet dans l'ensemble de la solution. La CBF étant majoritairement à l'intérieur des LUV durant l'irradiation, sa cinétique d'oxydation va quant à elle nous apporter des informations sur la quantité d'oxygène singulet produite proche des LUV. Redmond et al.²³¹ ont estimé la distance moyenne parcourue par une molécule d'oxygène singulet dans l'eau à environ 125 nm pendant la durée d'un temps de vie, de l'ordre de 3 μ s dans l'eau²³², et à 220 nm pendant la durée de trois temps de vie, temps auquel 95 % de l'oxygène singulet se sera désactivé de lui-même. De plus, ces distances sont calculées en considérant que l'oxygène singulet ne rencontre pas d'autres molécules durant son trajet et peuvent être considérées comme des distances maximales théoriques. Aux concentrations en micelles et liposomes auxquelles nous travaillons, nous pouvons calculer que si les objets sont répartis de manière homogène dans la solution, chaque micelle d'environ 30 nm de diamètre est contenue dans un volume équivalent à un cube d'environ 280 nm de côté et chaque liposome d'environ 100 nm de diamètre dans un cube de 1,2 μ m de côté. Ces distances confirment que pour oxyder la CBF, l'oxygène singulet doit être produit par du phéophorbide-a soit encapsulé dans des micelles à proximité de liposomes, moins de 100 nm, soit directement au sein de liposomes après transfert.

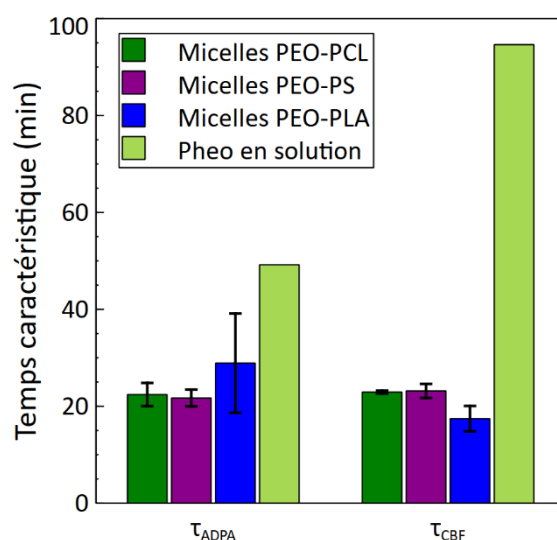


Figure 37 : Temps caractéristiques de l'oxydation de l'ADPA et de la CBF pour différentes conditions

La modélisation de l'oxydation de l'ADPA et de la CBF dans les différentes conditions étudiées (Figure 37) montre que, pour tous les types de micelles utilisés, les temps caractéristiques d'oxydation de l'ADPA et de la CBF sont similaires mais sont plus élevés lorsque le phéophorbide-a n'est pas encapsulé. Ceci s'explique par le fait que le phéophorbide-a est dans ce cas présent sous forme agrégée et que cette dernière présente un rendement de production d'oxygène singulet bien plus faible que lorsqu'il est encapsulé²¹⁹. On ne note pas

de différences majeures sur la production d'oxygène singulet entre tous les types de micelles utilisés.

3. Suivi des modifications de perméabilité des membranes

Pour suivre les effets sur nos modèles de membrane du mélange avec les différents types de micelles et de l'irradiation du phéophorbide-a, nous avons mesuré la fluorescence de la CBF. Ce suivi a été fait avant le mélange des LUV avec les micelles ou la solution de phéophorbide-a, pendant la période d'incubation du mélange et après irradiation pendant au minimum 15 heures. Après cette période de mesure, du Triton X-100 est ajouté au mélange, donnant ainsi accès à la fluorescence maximale théorique du mélange. De ces différentes mesures, nous avons pu calculer un taux de fuite de la CBF en fonction du temps, en suivant l'évolution de l'intensité de fluorescence à 518 nm, le maximum de fluorescence de la CBF, et en la normalisant de la manière suivante :

$$Fuite(t) = \frac{I(t) - I_0}{I_{Triton} - I_0}$$

Avec :

$I(t)$: l'intensité de fluorescence à 518 nm du mélange à un temps donné

I_0 : l'intensité de fluorescence à 518 nm avant ajout des micelles ou de la solution de phéophorbide-a

I_{Triton} : l'intensité de fluorescence à 518 nm après ajout de 100 μ L de Triton X-100 à 10%_m

Il y a plusieurs précautions à prendre lors de ce calcul. Les intensités de fluorescence I_0 et I_{Triton} étant mesurées sur des volumes de solutions différents des autres, il est nécessaire de les corriger en prenant en compte ces différences. Ensuite, comme observé précédemment, durant l'irradiation, la CBF peut être oxydée. Cette oxydation génère une perte de la fluorescence du milieu. Pour compenser cette perte, nous avons choisi de corriger toutes les valeurs d'intensité de fluorescence avant irradiation. Pour ce faire, nous avons utilisé le suivi de l'absorbance du mélange durant l'irradiation et calculé le rapport de l'absorbance de la CBF à 492 nm avant et après irradiation. Nous avons alors multiplié toutes les valeurs d'intensité de fluorescence avant irradiation par ce rapport afin de les corriger. Ceci équivaut à considérer que le produit d'oxydation de la CBF diffuse de la même manière que la CBF à travers la membrane des liposomes.

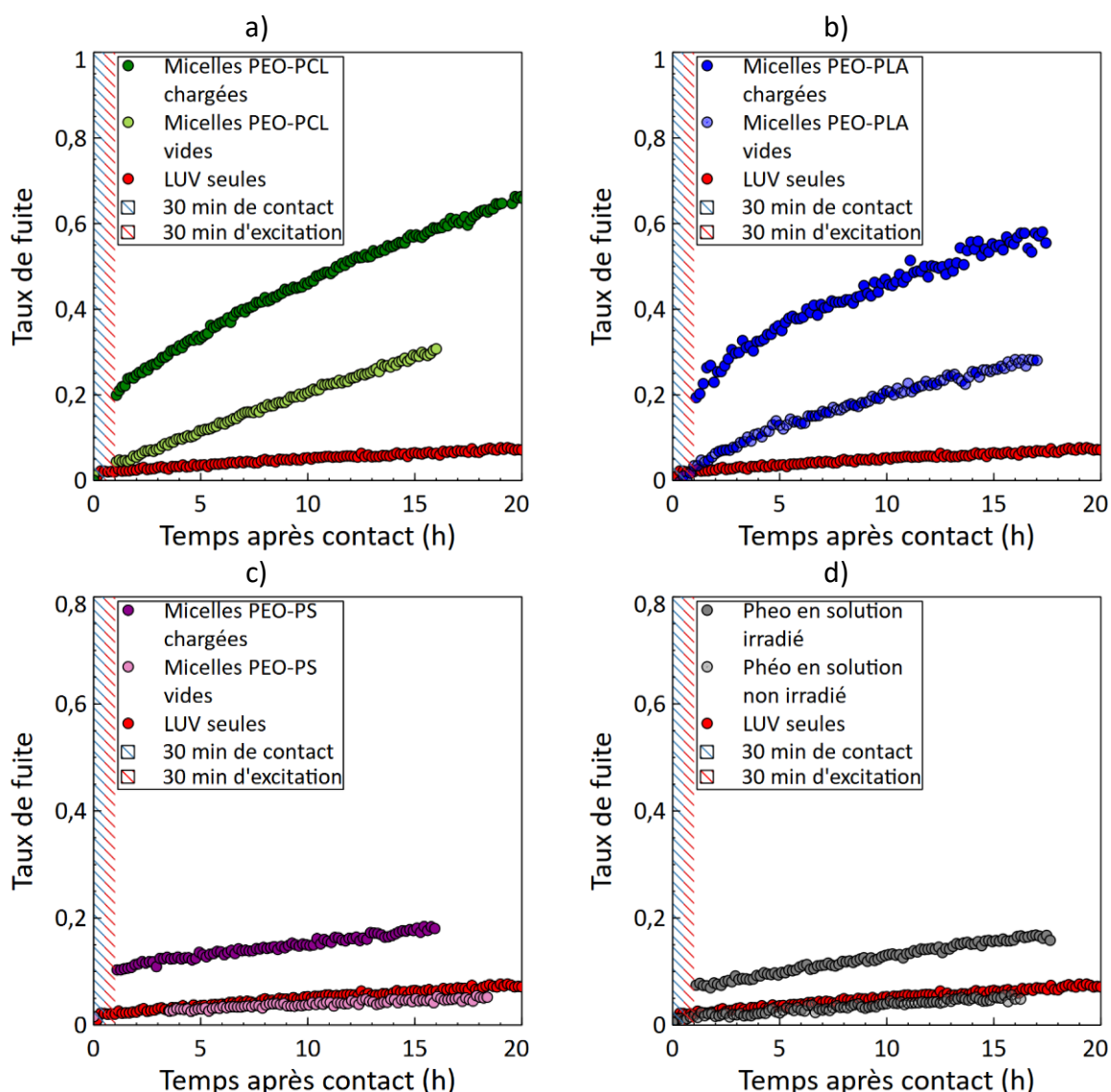


Figure 38 : Suivi de la fuite de CBF à travers la membrane de liposomes de DOPC en contact avec des micelles de a) PEO-PCL, b) PEO-PLA, c) PEO-PS et d) une solution de phéophorbide-a sous différentes conditions

Nous avons suivi la fuite de la CBF à travers la membrane des liposomes et comparé les effets du phéophorbide-a encapsulé dans les différents types de micelles ou en solution dans du PBS. Pour discerner les effets dus à la production d'oxygène singulet et ceux dus à la présence de micelles, des échantillons ne contenant pas de phéophorbide-a ont aussi été testés. Pour la solution de phéophorbide-a, le contrôle a été effectué en laissant la solution dans l'obscurité durant toute la durée de la mesure. De l'observation des mesures en présence de phéophorbide-a, deux phénomènes se détachent. On note tout d'abord une augmentation rapide de la fuite durant l'irradiation. Lorsque l'irradiation est terminée, le régime de fuite se fait alors à un rythme plus lent. Lors de l'utilisation de micelles PEO-PCL encapsulant du phéophorbide-a (Figure 38-a), on remarque une fuite d'environ 20% du contenu total des liposomes durant la période d'irradiation, ce que l'on n'observe pas lorsque les micelles ne contiennent pas de phéophorbide-a. En ce qui concerne la vitesse de fuite après irradiation, on peut voir qu'elle est légèrement plus élevée dans le cas où les micelles de PEO-PCL contiennent du phéophorbide-a que lorsqu'elles sont vides. Néanmoins, dans ces deux cas, la vitesse de fuite est tout de même beaucoup plus importante que dans le cas des liposomes

natifs. On note un comportement similaire lors de l'utilisation de micelles de PEO-PLA (Figure 38-b). En revanche, lors de l'utilisation de micelles de PEO-PS (Figure 38-c), on remarque que l'augmentation de la fuite durant d'irradiation des échantillons contenant le phéophorbide-a est plus faible que pour les autres types de micelles, de l'ordre de 10% du contenu total des liposomes. Quant à la vitesse de fuite après irradiation, elle est bien plus faible, du même ordre de grandeur que celle des liposomes seuls, que l'échantillon contienne du phéophorbide-a ou non. En ce qui concerne l'utilisation d'une solution de phéophorbide-a (Figure 38-d), lors de l'irradiation la fuite générée est assez faible, de l'ordre de 8% et la vitesse de fuite est identique à celle des liposomes seuls lorsque l'échantillon n'est pas irradié et légèrement plus rapide lorsqu'il est irradié.

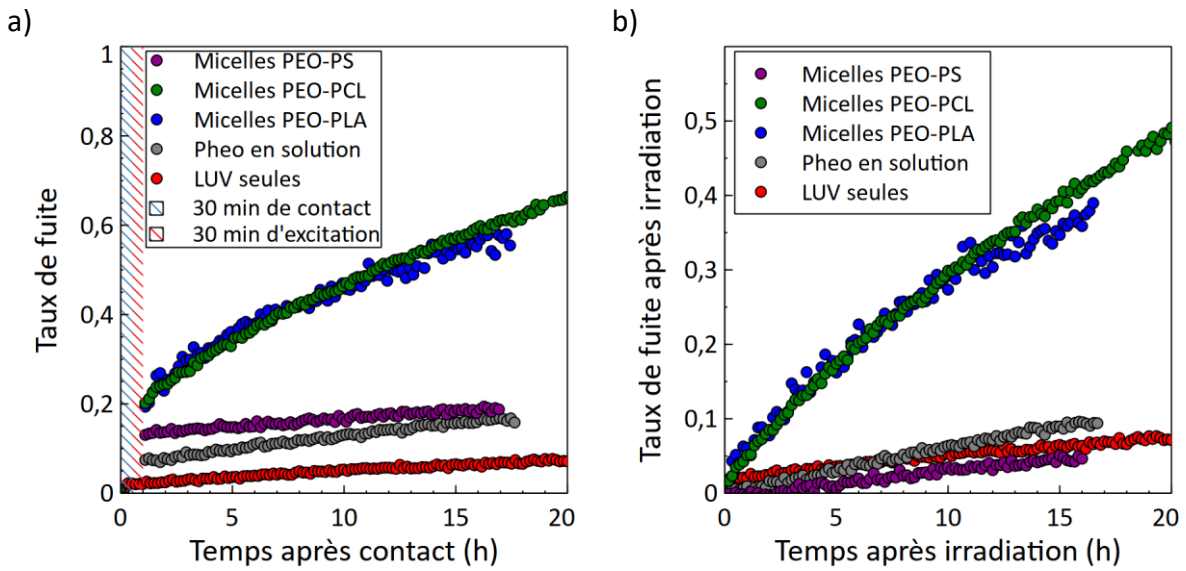


Figure 39 : Cinétiques de fuite de liposomes chargées en CBF dans différentes conditions a) globale et b) seulement après irradiation

En comparant les cinétiques de fuite des liposomes en fonction des différentes conditions (Figure 39-a), on retrouve le classement de vitesse de fuite émit précédemment : les micelles PEO-PCL et PEO-PLA chargées génèrent une fuite plus rapide que les micelles PEO-PS chargées et que la solution de phéophorbide-a, qui sont du même ordre de grandeur que la vitesse de fuite des liposomes seuls. Pour pouvoir expliciter ce classement, il est nécessaire de retravailler les données pour pouvoir les analyser. Pour ce faire, nous allons nous intéresser à la fuite seulement après l'irradiation (Figure 39-b). Maherani et al.²³³ ont utilisé une expérience similaire pour sonder la perméabilité de liposomes de différentes compositions via la fuite de calcéine encapsulée. Pour modéliser la fuite des liposomes et exprimer le coefficient de perméabilité des liposomes, ils ont utilisé les expressions suivantes :

$$Fuite(t) = Fuite_{max} \left(1 - e^{\frac{-t}{\tau_{Fuite}}} \right)$$

$$P = \frac{r}{3\tau_{Fuite}}$$

Avec :

$Fuite_{max}$: le taux de fuite à l'équilibre du système

τ_{Fuite} : le temps caractéristique de fuite

P : le coefficient de perméabilité des liposomes

r : le rayon des liposomes (environ 50 nm)

Nous avons utilisé ce modèle pour obtenir le coefficient de perméabilité des liposomes dans nos expériences. Lorsque le temps caractéristique de la fuite est plus grand que le temps de notre expérience, une quinzaine d'heures, nous avons utilisé l'équation suivante :

$$Fuite(t) = Fuite_{\max} \frac{t}{\tau_{\text{Fuite}}}$$

En effet si on utilise un développement limité de la fonction exponentielle, quand le temps caractéristique de la fuite est au moins trois fois plus grand que la durée de l'expérience les termes d'ordre deux et plus peuvent être considérés négligeables. Ceci permet d'extraire de la pente initiale de la courbe de fuite des liposomes le rapport $Fuite_{\max}/\tau_{\text{Fuite}}$ et en considérant $Fuite_{\max}$ comme étant égale à 1 pour ces systèmes fuyant très lentement, on obtient alors une approximation du temps caractéristique de la fuite permettant de calculer le coefficient de perméabilité des liposomes (Figure 40).

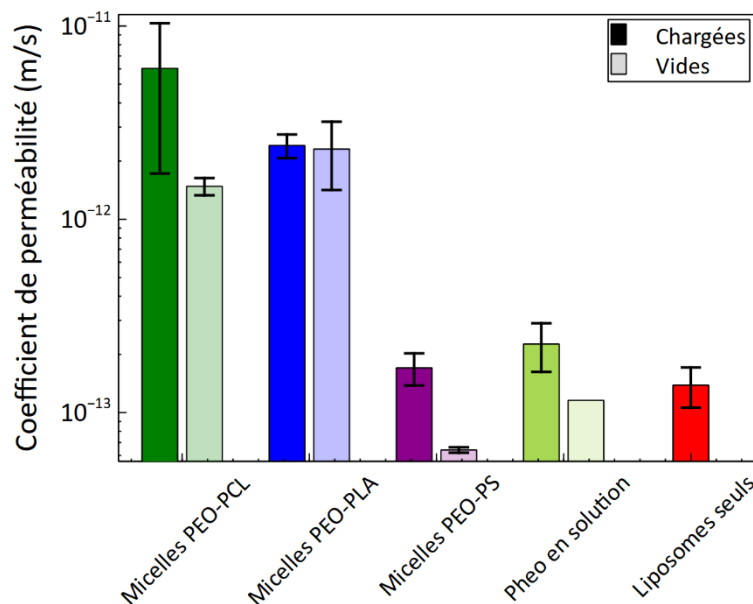


Figure 40 : Coefficients de perméabilité de liposomes de DOPC dans différentes conditions après irradiation

Pour vérifier la pertinence de notre modèle, nous avons comparé la valeur de coefficient de perméabilité des liposomes de DOPC que nous avons obtenu, $1,4 \pm 0,3 \cdot 10^{-13}$ m/s, avec celle trouvée dans la littérature²³³, $2,64 \pm 0,3 \cdot 10^{-13}$ m/s. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur et assez proches pour confirmer le modèle que nous avons utilisé. Nous avons alors testé les effets des différentes conditions utilisées sur la perméabilité des liposomes de DOPC à l'aide d'un test statistique de type ANOVA. On remarque que les micelles PEO-PCL et PEO-PLA chargées en phéophorbide-a génèrent une augmentation significative de la perméabilité des liposomes après 30 minutes d'irradiation alors qu'elle reste similaire à celle des LUV seules dans le cas de l'utilisation de micelles PEO-PS chargées et de phéophorbide-a en solution. Il est important de noter aussi que même en absence de phéophorbide-a, la

présence de micelles PEO-PCL et PEO-PLA augmente la perméabilité des liposomes de manière significative. L'effet inverse est remarqué lors de l'utilisation de micelles PEO-PS. Ce phénomène pourrait s'expliquer par une modification de la composition de la membrane des liposomes lors de la rencontre avec les micelles. Une partie du polymère pourrait venir se loger dans la membrane et en changer les propriétés.

B. Suivi de l'oxydation des modèles de membranes

Pour mieux comprendre ce qu'il se passe durant l'irradiation de mélanges de liposomes et micelles contenant du phéophorbide-a, nous avons décidé de regarder le devenir des lipides constituant la membrane des liposomes. Le DOPC présente une insaturation sur chacune de ses deux chaînes qui peuvent être oxydées en présence d'oxygène singulet (Figure 41).

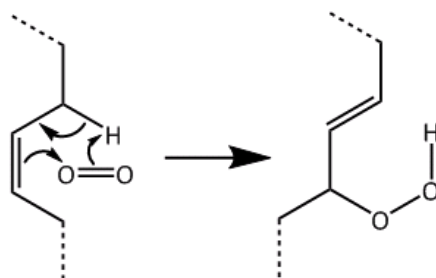


Figure 41 : Mécanisme de l'oxydation d'une insaturation par l'oxygène singulet

Nous avons choisi d'utiliser la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse pour détecter et quantifier le DOPC et ses formes oxydées dans le mélange. Avant l'analyse des échantillons, il est nécessaire d'effectuer une étape d'extraction des lipides du mélange. En effet, la séparation par chromatographie liquide utilisée nécessite que l'échantillon soit en solution dans du méthanol. Le procédé choisi est une version modifiée du protocole de Bligh et Dyer²³⁴. Il s'agit d'une extraction liquide-liquide où un mélange chloroforme/méthanol est ajouté à l'échantillon à extraire. Après agitation et mise au repos pour laisser le mélange démixer, la phase organique est retirée et séchée. L'extrait sec est ensuite dissous dans du méthanol pour être injecté dans la colonne de chromatographie. Avant de pouvoir mener ces expériences à proprement parlé, nous avons effectué des tests pour définir la manière de préparer les échantillons ainsi que la concentration à laquelle ils doivent être analysés. Nous avons d'abord effectué un premier test durant lequel des liposomes de DOPC ont été mélangés à des micelles de PEO-PCL chargées en phéophorbide-a dans les mêmes concentrations que lors des expériences de suivi de fuite des liposomes. Ce mélange a été irradié pendant 30 minutes à l'aide de la LED à 656 nm à la puissance de 31 mW/cm². Après irradiation, le mélange a été extrait comme indiqué précédemment et l'extrait sec repris dans un volume de 50 µL de méthanol, correspondant à une concentration en lipides de 13 mM. En plus de cette solution, nous avons préparé une solution de DOPC directement solubilisé dans le méthanol à la même concentration.

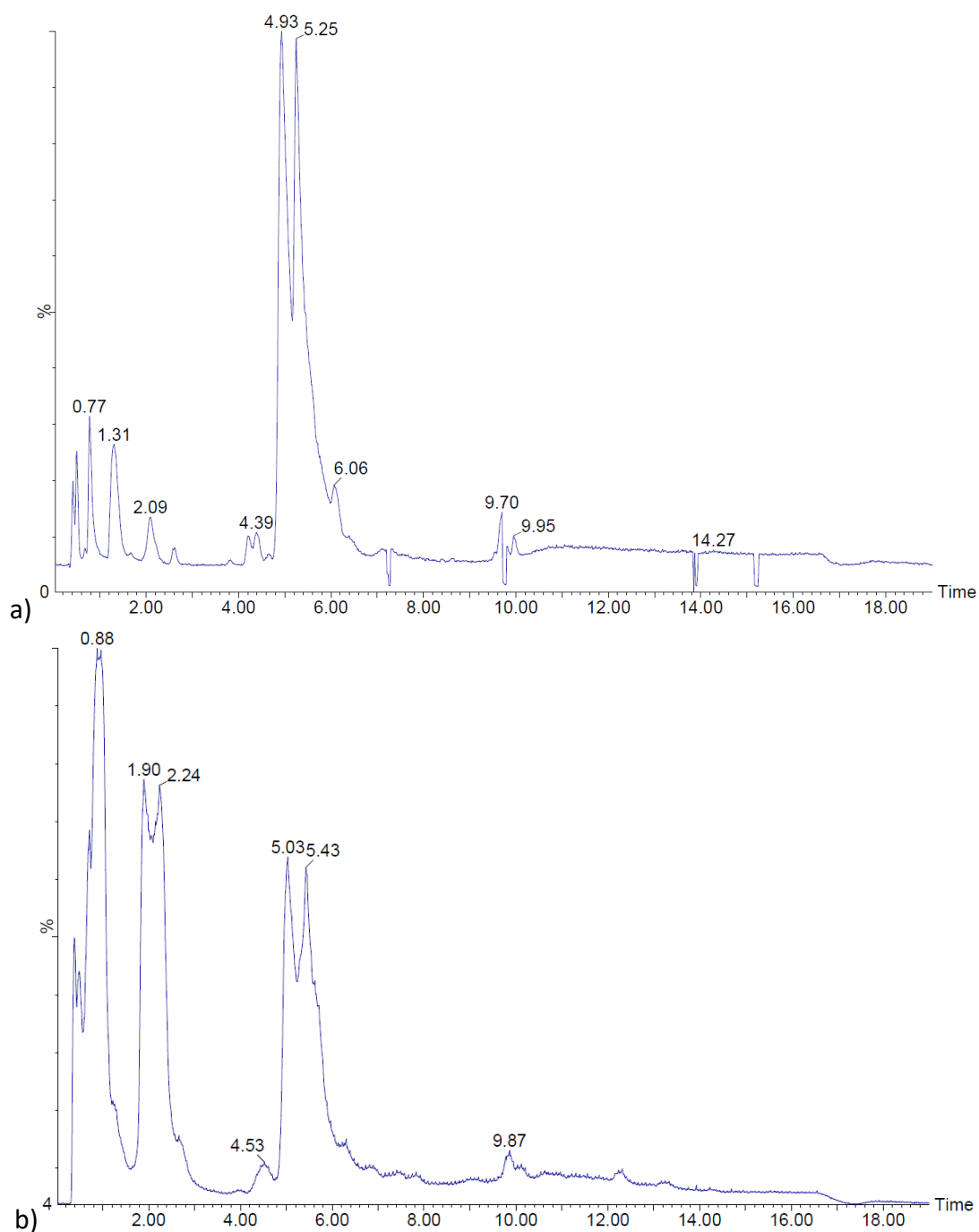
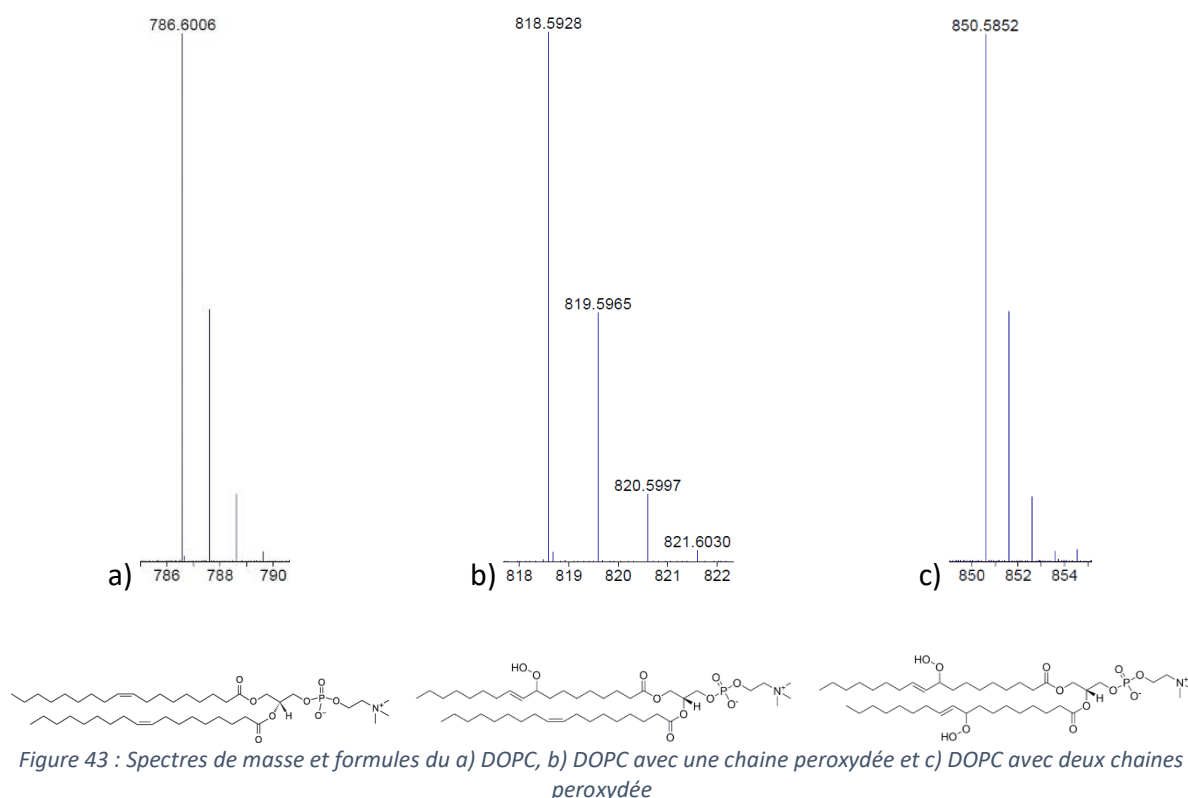


Figure 42 : Chromatogrammes a) du DOPC seul et b) d'un mélange de liposomes de DOPC et de micelles PEO-PCL chargées en phéophorbide-a irradié

Sur le chromatogramme obtenu pour l'échantillon de DOPC seul (Figure 42-a), le pic principal à environ 5 minutes correspond à un ion d'une masse de 786,6 g/mol (Figure 43-a), la masse du DOPC additionné d'un proton. D'autres masses ont pu être isolées mais avec une intensité plus faible. En ce qui concerne le mélange (Figure 42-b), on retrouve le pic à 5 minutes correspondant à la masse 786,6 g/mol du DOPC mais aussi deux pics à 2 et 1 minutes correspondant respectivement à une masse de 818,6 g/mol (Figure 43-b), la masse du DOPC additionné d'un proton et de deux oxygènes, et à une masse de 850,6 g/mol (Figure 43-c), masse du DOPC additionné d'un proton et quatre oxygènes. Ces deux masses concordent avec les masses théoriques du DOPC présentant une peroxydation sur une de ses chaînes et sur ses

deux chaînes. On retrouve encore les autres masses déjà isolées mais toujours à de faibles intensités.



Ce que l'on peut aussi observer sur ces chromatogrammes, c'est qu'à cette concentration, le DOPC met plusieurs minutes à sortir. Ce phénomène est très certainement dû à une saturation de la colonne. Pour éviter cette saturation, il est nécessaire de diminuer la concentration en lipides dans l'échantillon mais il faut néanmoins faire attention à ne pas trop diluer l'échantillon sous peine de perdre le signal des formes oxydées du lipide. Après plusieurs essais, nous avons choisi de préparer des échantillons correspondant à une concentration de 0,26 mM de lipide dans le méthanol qui nous permet d'obtenir un signal non saturé du DOPC mais aussi d'avoir les pics des formes oxydées détachés du bruit de fond. Pour analyser nos résultats, nous intégrons les pics des masses d'intérêt plus ou moins 0,1 g/mol, par exemple de 786,5 à 786,7 pour le DOPC, et utilisons ces aires pour suivre la cinétique d'oxydation du lipide (Figure 44).

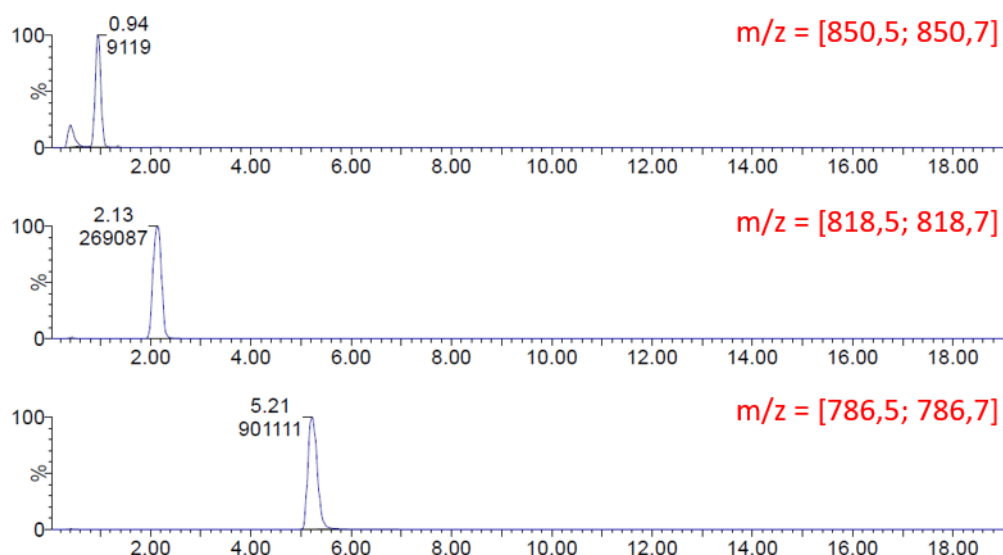


Figure 44 : Exemple d'intégration des pics des masses d'intérêt extraits dans les conditions de concentration optimale ([lipides] = 0.26 mM)

Durant ces essais, nous avons aussi testé s'il était possible d'irradier un mélange de liposomes et de micelles et de prélever régulièrement une partie de ce mélange pour faire un suivi de l'oxydation au cours du temps. Il s'est avéré que de cette manière, les échantillons injectés étaient trop peu concentrés et que si l'on souhaitait procéder à des prélèvements plus importants pour augmenter la concentration des échantillons, cela générerait une trop grande variation de volume du mélange. Pour effectuer cette cinétique, il faut donc préparer un mélange frais pour chaque temps d'irradiation mesuré.

Un autre paramètre important à contrôler est la concentration en oxygène dans le milieu. Durant l'irradiation de l'échantillon, le phéophorbide-a va transformer l'oxygène triplet en oxygène singulet qui va être consommé en réagissant avec les lipides. Pour simplifier le système et l'analyse des résultats, il est important que la concentration en oxygène reste constante durant la durée de l'irradiation pouvant aller jusqu'à quatre heures. Pour renouveler l'oxygène dissous, nous avons opté pour un bullage de gaz dans l'échantillon. Ce bullage a aussi pour avantage de brasser l'échantillon et de l'homogénéiser. Nous avons testé deux types de sources d'oxygène, l'air comprimé de pailasse et un bouteille d'oxygène. Dans les deux cas, le gaz est mis à buller dans un volume d'eau en amont de notre échantillon pour le saturer en eau et ainsi limiter l'évaporation de l'échantillon par le bullage. Après avoir effectué une cinétique d'oxydation des lipides par du phéophorbide-a encapsulé dans des micelles de PEO-PCL avec les deux types de bullage, nous avons comparé les résultats sur quatre heures d'irradiation (Figure 45). Globalement, on n'observe pas de différence majeure entre ces deux conditions. Pour la suite des expériences, le bullage est effectué avec l'oxygène par simple souci de praticité, le débit sortant de la bouteille étant plus facile à contrôler et la composition du gaz maîtrisée.

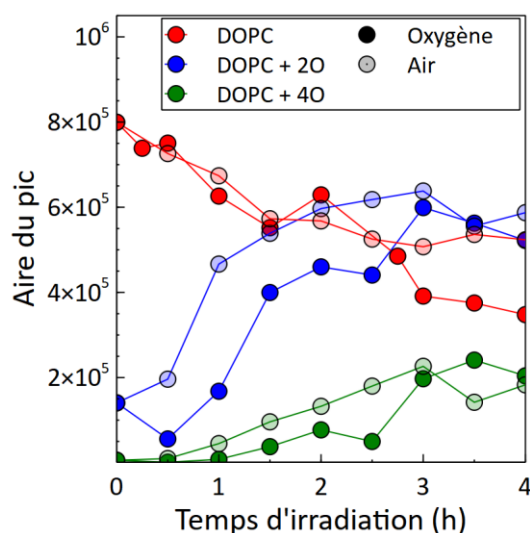


Figure 45 : Cinétiques d'oxydation des lipides en présence de micelles PEO-PCL chargées en phéophorbide-a sous bullage d'air ou d'oxygène

Afin de suivre la cinétique d'oxydation de la manière la plus complète, nous avons décidé de faire les mesures jusqu'à un temps d'irradiation de quatre heures. Durant cette période, il existe un risque que le photoblanchiment du phéophorbide-a, pouvant être lui-même oxydé par l'oxygène singulet, devienne non-négligeable. Nous avons vérifié cela en suivant l'absorbance des mélanges étudiés (Figure 46-a). Initialement, on note la présence des pics caractéristiques du phéophorbide-a autour de 400 nm et 670 nm ainsi que la diffusion liée à la présence des liposomes. Au cours de l'irradiation, on note une diminution de l'absorbance des pics du phéophorbide-a et de la diffusion. Ceci est dû à une disparition du phéophorbide-a et à une modification des liposomes (Figure 46-a).

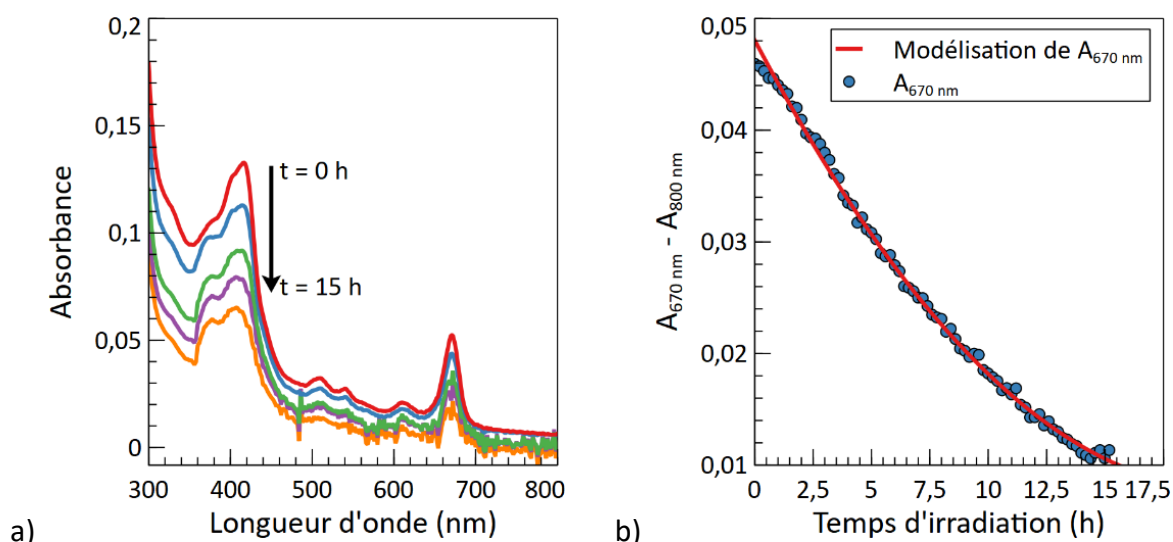
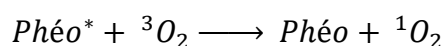
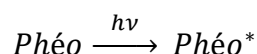
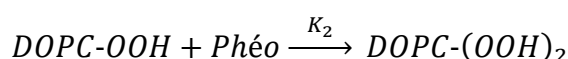
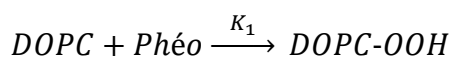
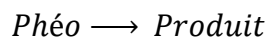


Figure 46 : a) Suivi de l'absorbance d'un mélange de liposome et de micelles chargées en phéophorbide-a pendant une irradiation de 15 h et b) évolution de l'absorbance à 670 nm durant l'irradiation

Pour pouvoir modéliser la cinétique d'oxydation du DOPC, nous avons émis plusieurs hypothèses. L'intensité d'irradiation de la lampe et la concentration en oxygène dissous étant constantes durant toute la durée de l'expérience, nous avons aussi considéré que la concentration en oxygène singulet était proportionnelle à la concentration en phéophorbide-a. Ceci permet de simplifier



en



Avec K_1 et K_2 les constantes de vitesse respectivement de la première oxydation et de la seconde oxydation du DOPC. Nous avons modélisé la disparition du phéophorbide-a durant l'irradiation par un polynôme d'ordre 2 (Figure 46-b). Nous avons aussi considéré que l'aire des pics des masses d'intérêt sur les chromatogrammes est proportionnelle à la concentration de l'espèce concernée. Toujours en utilisant le logiciel SA, nous pouvons ainsi modéliser les oxydations successives du DOPC (Figure 47-a) et obtenir les constantes de vitesse d'oxydation (Figure 47-b).

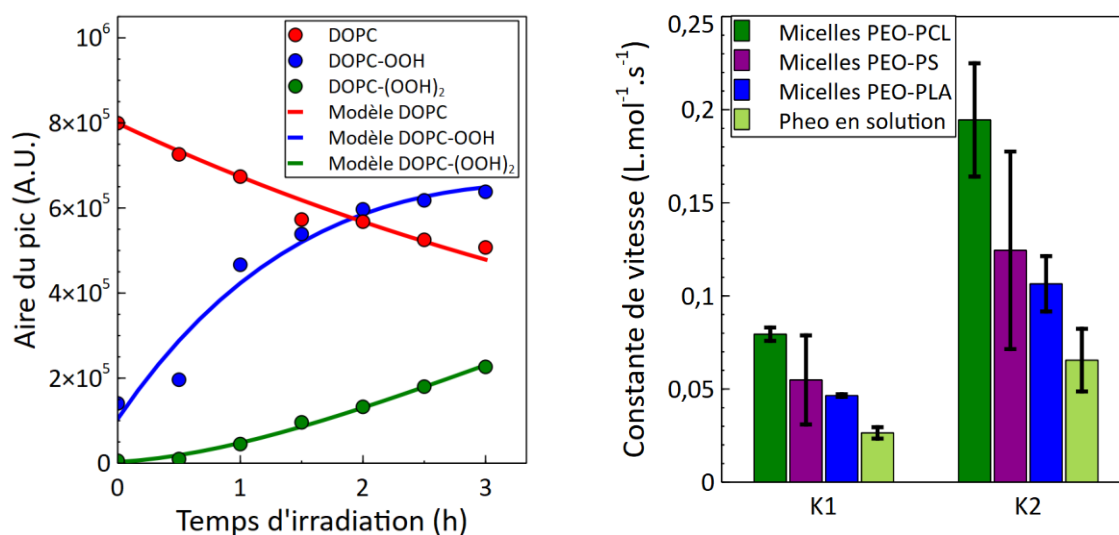


Figure 47 : a) Cinétique et modélisation des oxydations successives du DOPC et b) constantes de vitesse d'oxydation pour différentes sources de phéophorbide-a

Nous avons testé l'effet de la nature du polymère utilisé les vitesses d'oxydations successives et l'effet de la vitesse de la première oxydation sur celle de la seconde à l'aide d'un test statistique de type ANOVA. Ce que nous observons en premier est que, quel que soit les conditions, l'oxydation de la seconde chaîne lipidique se produit à une vitesse significativement plus grande que celle de la première. En revanche, même si de premier abord nous remarquons des différences sur les constantes de vitesse d'oxydation entre les différentes conditions, les seules différences significatives sont celles entre les vitesses obtenues pour les micelles PEO-PCL et les micelles PEO-PLA ainsi que celles obtenues pour les micelles PEO-PCL et le phéophorbide-a en solution. Cette observation va dans le sens des mesures de transfert du phéophorbide-a, plus efficace dans le cas des micelles PEO-PCL.

On note tout de même une grande incertitude sur les mesures relatives au PEO-PS. Elle est due à la variabilité de l'expérience en elle-même. Le fait d'avoir à passer par une étape d'extraction liquide/liquide augmente le risque d'erreur et d'avoir des écarts de concentration entre les échantillons. Pour diminuer cette incertitude, il faudrait soit augmenter le nombre de répliques par condition, soit changer de méthode d'analyse pour pouvoir injecter les échantillons sans passer par l'étape d'extraction. Une nouvelle méthode pourrait aussi permettre un échantillonnage différent permettant de faire une cinétique complète avec un seul mélange, diminuant encore les variations dues à la préparation des différents échantillons.

C. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié les phénomènes liés à l'irradiation par une LED à 656 nm de mélanges de micelles chargées en phéophorbide-a et de liposomes.

Dans un premier temps, nous avons recherché les conditions expérimentales optimales pour pouvoir suivre la fuite d'une sonde fluorescente à travers la membrane des liposomes et ainsi remonter à leur perméabilité. Nous avons notamment cherché le temps d'irradiation nécessaire pour pouvoir observer une modification de notre système et nous sommes arrêté sur un temps de 30 minutes avec une LED à 656 nm à une puissance de 35 mW.

A l'aide d'une sonde permettant de suivre la production d'oxygène singulet, nous avons vu que dans les mêmes conditions d'irradiation, le phéophorbide-a produit une quantité similaire d'oxygène singulet indifféremment du type de micelles l'encapsulant mais qu'il en produit moins lorsqu'il n'est pas encapsulé.

Nous avons pu constater une augmentation brusque de la fluorescence des solutions lors de l'irradiation des échantillons contenant du phéophorbide-a. Cette augmentation est à attribuer à une forte fuite de la CBF encapsulée dans les liposomes pendant l'irradiation. Cette augmentation était plus marquée dans les cas où le phéophorbide-a était encapsulé dans des micelles de PEO-PCL et de PEO-PLA. Une fois l'irradiation finie, la vitesse de fuite diminue et devient régulière. En modélisant cette fuite, il a alors été possible de remonter au coefficient de perméabilité des liposomes en fonction des conditions. En comparant les valeurs obtenues à celles de liposomes seuls, nous avons remarqué que les micelles de PEO-PCL et de PEO-PLA génèrent une augmentation du coefficient de perméabilité, même en absence de phéophorbide-a. Cet effet n'est pas retrouvé lors de l'utilisation de micelles de PEO-PS ou de phéophorbide-a en solution.

Dans la littérature la perméabilisation des bicouches lipidiques suite à l'irradiation en présence de photosensibilisateurs est généralement attribuée à l'oxydation des lipides^{187,235}. En effet la présence de lipides oxydés (peroxydes ou aldéhydes) influence la perméabilité des bicouches lipidiques via la formation de défauts et de pores²³⁶⁻²³⁸. Pour mieux comprendre le mécanisme impliquant cette augmentation de la perméabilité dans notre cas, nous avons cherché à voir l'effet de la production d'oxygène singulet sur le lipide d'un point de vue moléculaire. Nous n'avons pas observé de différences entre les espèces oxydées avec et sans micelles, et entre les différentes micelles. Dans tous les cas les espèces oxydées présentent une ou deux peroxydations, mais nous n'avons pas observé la présence d'aldéhydes. Pour aller

plus loin dans la caractérisation du phénomène d'oxydation, nous avons effectué un suivi cinétique de l'irradiation de mélange de liposomes de DOPC et de phéophorbide-a encapsulé dans les différents types de micelles ou en solution. Par spectrométrie de masse, nous avons pu remonter à la quantité de lipides et de deux de ses formes oxydées en fonction du temps d'irradiation. Que le phéophorbide-a soit encapsulé ou en solution, nous avons remarqué que la seconde oxydation se faisait avec une vitesse plus élevée que la première et qu'elle commence seulement après une demie heure d'irradiation quand la concentration de lipide avec une peroxydation est suffisamment importante. Nous avons pu voir que lorsque le phéophorbide-a est encapsulé dans des micelles de PEO-PCL, les vitesses d'oxydations du lipide sont plus élevées que lorsqu'il est encapsulé dans des micelles de PEO-PLA ou en solution. Une trop grande variabilité des expériences a empêché de donner un classement plus précis des vitesses d'oxydation associées au phéophorbide-a dans les micelles de PEO-PS.

En reliant les résultats de ces deux expériences, nous avons pu voir que l'augmentation de la fuite observée lors de l'irradiation de mélange de liposomes et de micelles encapsulant du phéophorbide-a est très certainement due à l'oxydation des lipides de la membrane. En revanche, le fait qu'après l'arrêt de l'irradiation, la fuite des liposomes ralentisse laisse penser qu'une partie des perturbations dues à l'oxydation est transitoire. Ceci pourrait s'expliquer par la présence de domaines à la surface du liposome présentant une concentration en espèces oxydées plus importante que sur le reste de la surface. La formation de ce type de domaine a été observée par Tsubone et al.²³⁹ sur des GUV contenant des lipides présentant une peroxydation. Cette surconcentration locale en lipides présentant une peroxydation peut expliquer la plus grande vitesse de réaction pour la seconde oxydation. En revanche, ils n'ont pas observé d'augmentation de la perméabilité liée à la présence de ces lipides oxydés. Su et al.²⁴⁰ ont montré par simulation d'une membrane contenant des lipides présentant une ou deux peroxydation qu'il était possible d'observer une augmentation de la perméabilité sans avoir la formation de pores. Ils ont attribué cette augmentation au changement du profil d'énergie libre de la bicouche suite à la peroxydation. Dans notre cas, l'augmentation de la perméabilité pourrait aussi venir du fait que nous travaillons sur des liposomes de plus petite taille. Il est admis dans la littérature²⁴¹, que la présence d'une peroxydation sur une des chaînes d'un lipide augmente la surface occupée par lipide et donc la tension de la membrane. A l'échelle d'une GUV, cette augmentation peut ne pas générer de perturbation importante mais à l'échelle d'une LUV elle pourrait avoir un impact marqué. Après l'irradiation, la fluidité de la membrane permet aux lipides de diffuser librement sur sa surface, homogénéisant alors la concentration en lipides oxydés et permettant à la membrane de se restructurer.

Il est aussi important de se pencher de plus près sur l'évolution du coefficient de perméabilité des liposomes en fonction des conditions. Dans le cas de l'utilisation de micelles de PEO-PCL pour encapsuler le phéophorbide-a, la part de l'augmentation du coefficient étant due à l'irradiation du phéophorbide-a est relativement faible comparée à l'augmentation générée par la seule présence des micelles. Cet effet est encore plus marqué pour les micelles de PEO-PLA où le coefficient de perméabilité avec et sans phéophorbide-a est du même ordre de grandeur. En revanche, lors de l'utilisation de PEO-PS sans phéophorbide-a, le coefficient de perméabilité des liposomes n'est pas augmenté. Ces observations laissent penser que le polymère en lui-même génère la perturbation des liposomes dépendamment de sa nature

chimique. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour pouvoir vérifier cette hypothèse.

Conclusions générales de la thèse

Conclusions générales de la thèse

Au cours de ce projet de thèse, nous avons cherché à identifier les étapes clés gouvernant le mécanisme de l'action d'un nanovecteur à base de copolymères à blocs encapsulant un photosensibilisateur et l'effet sur l'intégrité d'une membrane modèle.

Nous nous sommes concentrés sur l'utilisation de micelles de PEO-PCL, PEO-PLA et PEO-PS encapsulant du phéophorbide-a car ces systèmes ont précédemment fait l'objet d'un projet de thèse ayant été de la caractérisation fine des auto-assemblages jusqu'à leur utilisation sur des cultures de cellules 2D et 3D en condition de thérapie photodynamique. Ces résultats nous ont servi de point de départ pour nos propres expériences.

Nous avons choisi d'utiliser des liposomes de DOPC comme modèle de membrane. Ce système a pour avantage d'être simple à formuler et est adapté à plusieurs sortes de techniques d'analyse. Une fois des méthodes analytiques testées sur ce système, il servira de point de départ pour la mise au point de modèles de membranes plus complexes, de composition ou de taille plus proches de celles de cellules vivantes.

Nous avons alors cherché à caractériser les propriétés d'absorbance et de fluorescence du phéophorbide-a lorsqu'il est en solution et au sein des différents types d'objets. Ces mesures nous ont permis de confirmer que lorsqu'il est encapsulé dans les micelles, le phéophorbide-a se trouve sous sa forme monomérique. Cette forme est celle possédant l'absorbance et le rendement quantique de production d'oxygène singulet assez élevés pour pouvoir avoir un effet thérapeutique.

En utilisant les différences entre les propriétés de fluorescence du phéophorbide-a en solution et dans les nano-objets, nous avons pu évaluer les coefficients d'affinité du phéophorbide-a pour les copolymères. Il en est ressorti que le phéophorbide-a présente une plus grande affinité pour les micelles de PEO-PS, suivies de celles de PEO-PCL puis, de façon similaire, par celles de PEO-PLA et par les liposomes. Ce classement est en accord avec l'ordre d'hydrophobicité du cœur des micelles ou de la bicouche lipidique. La présence de cycle aromatique au sein du bloc hydrophobe du PEO-PS doit très certainement renforcer cet effet. Ce type d'effet a été utilisé par Buwalda et al.²⁴² pour augmenter le taux de chargement de curcumine dans des micelles à base de PEO-PCL en étoile en incorporant des groupement aromatique sur les chaînes PCL.

Par la suite, nous avons voulu mettre en évidence et quantifier le transfert du phéophorbide-a des micelles vers les liposomes. Nous avons ajouté un lipide marqué à la rhodamine dans la formulation des liposomes. Ce système nous a permis de mettre en évidence le rapprochement spatial du phéophorbide-a et de la rhodamine grâce à un transfert d'énergie par résonance de type Förster se caractérisant par une extinction de la fluorescence de la rhodamine au profit de celle du phéophorbide-a. Nous avons pu modéliser et évaluer ce rapprochement en fonction du type de micelles utilisé. Il s'est avéré que dans le cas où le phéophorbide-a était encapsulé dans les micelles de PEO-PS, son rapprochement avec le lipide marqué était moins efficace que lorsqu'il était encapsulé dans les autres micelles. Ce résultat

reste cohérent avec les mesures de constantes d'affinité. Plus le phéophorbide-a a d'affinité pour les micelles, moins il est accessible.

Cette expérience en elle-même ne nous permettait pas de discriminer la nature exacte du transfert, à savoir si le phéophorbide-a passe dans les liposomes, le lipide marqué dans les micelles ou une situation intermédiaire. Pour tenter d'expliquer ce mécanisme, nous avons utilisé le fractionnement flux-force flux asymétrique qui permet de séparer en fonction de leur taille des populations de nanoparticules dans un mélange. De cette manière, nous avons réussi à observer le transfert du phéophorbide-a de micelles de PEO-PCL vers des liposomes de DOPC. En revanche, nous n'avons pas encore pu reproduire l'expérience précédente au complet pour en évaluer des constantes de transferts.

Une fois l'aspect transfert du photosensibilisateur exploré, nous nous sommes intéressés aux phénomènes ayant lieu lors de l'irradiation du phéophorbide-a. Nous avons alors pu estimer la production relative d'oxygène singulet du phéophorbide-a encapsulé dans les différents types de micelles ou en solution. Nous n'avons pas observé de différence de production par le phéophorbide-a encapsulé dans les différentes micelles mais lorsqu'il n'était pas encapsulé, la production mesurée était bien plus faible. En suivant la fuite d'une sonde fluorescente chargée dans le cœur aqueux des liposomes, nous avons été capables de suivre les perturbations de la membrane après avoir été mise en contact avec des micelles, certaines contenant du phéophorbide-a et d'autres non, ou une solution de phéophorbide-a puis irradiés. Nous avons observé que durant l'irradiation, les liposomes en présence de phéophorbide-a fuyaient plus rapidement. Cette fuite était plus rapide dans le cas où le phéophorbide-a était encapsulé dans des micelles de PEO-PCL et de PEO-PLA que dans celle de PEO-PS ou lorsqu'il est en solution. Après irradiation, les liposomes en contact avec des micelles de PEO-PCL et de PEO-PLA chargées en phéophorbide-a présentaient un coefficient de perméabilité bien plus élevé que ceux mis en contact avec les micelles de PEO-PS chargées ou la solution de phéophorbide-a. Ce comportement a aussi été remarqué lorsque les micelles n'étaient pas chargées.

Enfin, nous avons réussi par spectrométrie de masse à effectuer une cinétique de l'oxydation du DOPC composant des liposomes mélangés avec le phéophorbide-a en solution ou encapsulé dans les micelles sous irradiation lumineuse. Nous avons pu isoler le signal caractéristique du DOPC natif et de ses formes oxydées présentant une et deux chaînes peroxydées. Nous sommes parvenus à évaluer les constantes de vitesse des deux réactions d'oxydation en fonction des conditions utilisées. Nous avons vu que la seconde oxydation se produit à une vitesse supérieure à la première et que lorsque le phéophorbide-a est encapsulé dans des micelles de PEO-PCL, les vitesses d'oxydations du lipide sont plus élevées que lorsqu'il est encapsulé dans des micelles de PEO-PLA ou en solution. Une trop grande variabilité des expériences a empêché de donner un classement plus précis des vitesses d'oxydation associées au phéophorbide-a dans les micelles de PEO-PS.

Tous ces résultats nous ont permis de dégager quelques points clés permettant de mettre en évidence des parties du mécanisme en jeu lors de l'interaction entre une membrane et des nanovecteurs encapsulant un photosensibilisateur.

Tout d'abord, nous avons remarqué que le vecteur générant *in fine* le moins de perturbation de la membrane après irradiation du phéophorbide-a, les micelles de PEO-PS, était celui pour lequel le phéophorbide-a présente la plus grande affinité et celui pour lequel le transfert à la membrane semble se faire avec une moins bonne efficacité. En ce qui concerne les micelles PEO-PCL et PEO-PLA, nous avons remarqué que le phéophorbide-a présente une affinité plus élevée pour les micelles de PEO-PCL que pour celles de PEO-PLA alors que le transfert du phéophorbide-a des micelles aux liposomes est plus efficace lors de l'utilisation de micelles de PEO-PCL que pour celles de PEO-PLA. Il semble que le transfert ne soit pas uniquement lié à l'affinité du phéophorbide-a pour son vecteur. D'autres interactions rentrent sûrement en jeu. Nous notons que les micelles permettant le transfert le plus efficace, celles de PEO-PCL, sont aussi celles générant le plus de perturbations des liposomes durant l'irradiation du phéophorbide-a. Durant le chapitre III, nous avons, à partir des cinétiques d'oxydation de l'ADPA et de la CBF, émis l'hypothèse que l'oxygène singulet produit devait l'être proche des membranes pour avoir le temps de migrer avant de se désactiver. Tout ceci confirme que si le phéophorbide-a est plus transféré aux membranes, les dégâts qu'il peut y faire n'en serait que plus importants.

Nous avons aussi remarqué une dépendance très marquée de la nature du polymère constituant les micelles sur les modifications apportées au coefficient de perméabilité des liposomes, et ce même sans phéophorbide-a. Tout laisse à penser qu'une part non négligeable de l'augmentation du coefficient de perméabilité des liposomes lors de leur mise en contact avec des micelles de PEO-PCL et de PEO-PLA provient d'une interaction directe entre la membrane et les polymères. De leur côté, les micelles de PEO-PS sembleraient faire diminuer la perméabilité de la membrane. Ce genre d'effet a déjà été relevé dans la littérature. À l'aide de simulations de dynamique moléculaire, Raman et al.²¹³ ont montré que des micelles de PEO-PCL pouvaient pénétrer au sein d'une bicouche lipidique. Le copolymère simulé était de masse molaire bien inférieure à celui que nous utilisons. Palominos et al.²¹⁷ ont quant à eux produit des micelles à base d'un triblocs PCL-PEO-PCL et ont montré que ces micelles, une fois mises en contact avec des liposomes de DPPC, font baisser leur coefficient de perméabilité. Encore une fois, le copolymère ainsi que le lipide sont différents de ceux que nous avons étudié mais l'idée reste la même. La présence du polymère induit des changements sur les propriétés physico-chimiques de la membrane. Ces changements semblent être extrêmement dépendants de la nature du copolymère. Dans le cas de nanoparticules à base de polymères hydrophobes, il a été montré par des simulations moléculaires que les effets sur les propriétés physico-chimiques de membranes modèles (i.e. structurales, mécaniques et dynamiques) sont différents selon la nature du polymère²⁴³. La compréhension des paramètres qui affectent les interactions entre nanomatériaux et biomembranes est très importantes pour leur application dans la délivrance de médicaments²⁴⁴. Le choix du copolymère ne semble pas être anodin.

Par la suite, plusieurs pistes de recherche sont à envisager pour ce projet. Dans un premier temps, il faudrait pouvoir tirer au clair le mécanisme de transfert du phéophorbide-a encapsulé dans les nanovecteurs vers les membranes. L'utilisation de la technique de fractionnement flux-force permettrait de distinguer et quantifier le transfert du phéophorbide-a.

En effet le fractionnement flux-force pourrait permettre d'évaluer s'il y a transfert de polymères à la membrane ou de lipides aux micelles. Des expériences ont été menées dans ce sens en utilisant des polymères et des lipides marqués permettant alors d'explicitier la présence au sein des différents types d'objets. Ces expériences n'ont pour l'instant pas donné de résultats mais cette porte reste ouverte.

Nous cherchons aussi à améliorer la précision et la reproductibilité de nos analyses. Dans cette optique, nous avons récemment adapté le protocole de suivi de fuite des liposomes à un lecteur de fluorescence en plaque. De cette manière, il est possible de suivre la cinétique de fuite de plusieurs échantillons en même temps, permettant alors de passer les répliques et les blancs associés à plusieurs types d'échantillons dans exactement les mêmes conditions et surtout pour un temps expérimental fortement réduit.

Nous sommes toujours en train de chercher à optimiser les expériences de suivi d'oxydation des lipides par spectrométrie de masse. Le protocole actuel est relativement long et nécessite des étapes d'extractions augmentant la variabilité intrinsèque de l'expérience. Une caractérisation des échantillons sans avoir à passer par cette étape d'extraction permettrait de gagner en précision et, encore une fois, en temps d'expérience.

Nous avons prévu de formuler des liposomes de compositions différentes pour se rapprocher de plus en plus de celle de la membrane des cellules. Des formulations de membranes biomimétiques ont déjà été mises au point pour tester les effets de photosensibilisateurs. Citons notamment les travaux d'Essaid et al. qui, après avoir établi le profil lipidomique de rétinoblastomes, ont pu formuler des modèles de membranes sous forme de monocouche²⁴⁵ qu'ils ont ensuite utilisé pour tester l'efficacité d'un photosensibilisateur²⁴⁶. A l'heure actuelle, nous avons plusieurs formulations en tête dont la composition se rapproche de la membrane spécifique telle que celle des érythrocytes humains ou de la myéline humaine. Il serait même envisageable de formuler des liposomes de composition proche de celle de la membrane de bactéries pour pouvoir tester nos formulations dans un autre contexte que celui de la PDT. Par exemple, Michel et al.²¹⁰ ont formulé des bicouches lipidiques asymétriques de composition similaire à celle de bactéries Gram-négatives qu'ils ont utilisé pour tester l'efficacité de peptides antimicrobiens. Une autre piste pour la formulation de membranes biomimétiques serait d'utiliser des lipides directement extraits de cellules.

Enfin, après avoir fini de mettre au point ce regroupement de technique d'analyse, il sera alors possible de l'utiliser pour tester l'efficacité d'autres types de photosensibilisateurs voire même d'autres types de substances actives. Cette étude a été axée autour d'une application PDT mais les concepts que nous utilisons et les résultats que nous en tirons peuvent être adaptés à d'autres applications mettant en jeu le transport d'une substance active via un nanovecteur.

Annexes

Annexe 1: Matériels et méthodes

A. Produits

Le poly(oxyde d'éthylène)-b-poly(caprolactone) (PEO-PCL) 5k-4k, le poly(oxyde d'éthylène)-b-poly(styrène) (PEO-PS) 2,3k-3,1k et le poly(oxyde d'éthylène)-b-poly(D,L acide lactique) (PEO-PLA) 2,4k-2k ont été achetés chez Polymer Sources (Polymer Source. Inc., Canada). Le 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) et le 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl)(sel d'ammonium) (Liss-Rhod-PE) proviennent de chez Avanti Polar Lipids (Avanti Polar Lipids, Inc., USA). Le phéophorbide-a a été acheté à Wako (Japon). Le chloroforme, le méthanol, l'acétone, le tampon phosphate (PBS, P4417) et la carboxyfluoresceine (CBF, 21877) ont été achetés chez Sigma Aldrich (Merk, Allemagne). L'eau utilisée pour préparer toutes les solutions de PBS était une eau ultrapure à une résistivité de 18 MΩ issue d'un système ELGA Purelab Flex (ELGA LabWater, UK).

B. Préparation des micelles de copolymères à blocs

La formulation des micelles à base de copolymères à blocs se fait en utilisant une méthode dite d'addition normale acétone. Dans un premier temps, environ 20 mg de polymère sont dissous dans 400 µL d'acétone. Le polymère dissous est ensuite ajouté au goutte à goutte lent, avec une aiguille de 0,5 mm de diamètre, sur 5 mL de PBS, préalablement filtré à travers une membrane en cellulose régénérée à pores de 220 nm, en agitation douce. Une fois toute la solution de polymère dans l'acétone ajoutée, la solution de PBS est laissée sous agitation pendant 30 minutes. L'échantillon est laissé à l'air libre pendant 48 h pour laisser l'acétone s'évaporer.

Dans le cas où les micelles sont chargées en phéophorbide-a, ce dernier est préalablement dissous dans l'acétone à 0,5 mg/mL et est ajouté au goutte à goutte lent sur les micelles déjà formées. L'acétone résiduel est évaporé en laissant l'échantillon à l'air libre environ 5 h.

Typiquement, la quantité de phéophorbide-a est calculée pour obtenir un ratio molaire final polymère/phéophorbide-a de 30.

C. Préparation des liposomes

Les liposomes sont préparés selon une méthode d'hydratation d'un film sec de lipides suivi d'une extrusion. Tout d'abord, le lipide est solubilisé dans du chloroforme dans un tube à hémolyse (20 mg/mL). Ce tube est ensuite placé dans un évaporateur rotatif à l'aide d'un adaptateur et le chloroforme est évaporé jusqu'à formation d'un film de lipides au fond du tube. Ce film est mis sous vide dynamique un minimum de 4 h pour finir d'évaporer le chloroforme résiduel. Une fois le film sec, du PBS filtré est ajouté dans le tube de manière à obtenir une suspension de lipides à une concentration de 10 mg/mL. Après un éventuel passage au vortex pour finir de décoller le film du fond du tube, la suspension de lipides est mise 30 minutes dans un bain à 60 °C puis 1 h dans un bain à ultrasons à 60 °C. La suspension de lipides est alors extrudée 19 fois à travers une membrane à pores de 100 nm (Nucleopore Track-Etch Membrane, Whatman, UK) à l'aide d'un extrudeur manuel (Avanti Mini Extruder, Avanti Polar Lipids, USA) pour obtenir une distribution de liposomes unilamellaire homogène.

La taille des liposomes est vérifiée par DLS, leur taille étant typiquement autour des 100 nm de diamètre.

D. Mesures d'absorbance UV-Visible

Toutes les mesures d'absorbance UV-Visible ont été faites à 25 °C à l'aide d'un spectromètre à barrette de diodes (HP 8452A, Hewlett-Packard, USA) piloté à l'aide du logiciel SpectralWork (Olis, USA).

E. Mesures de fluorescence

Toutes de mesures de fluorescence ont été faites à 25°C à l'aide d'un spectromètre de fluorescence (Fluorolog 3-2 iHR 320, Horiba, Japon).

1. Mesures de temps de vie de fluorescence

Les temps de vie de fluorescence du phéophorbide-a dans différentes conditions ont été mesurées en utilisant une LED pulsée à 371 nm (NanoLED-370, Horiba, Japon) comme source d'excitation. La réponse de la source lumineuse a tout d'abord été mesurée à l'aide d'une solution de nanosphères de silice de 80 nm à 0,5 mg/mL (NanoXact Silica Nanospheres, nanoComposix, US) puis en mesurant la réponse de l'échantillon à 675 nm. L'ouverture des fentes est réglée de manière à conserver à 2 % le rapport entre le taux de photon reçu par le capteur et le taux de photons émis par la source d'excitation. Pour toutes les mesures, le signal est collecté jusqu'à ce qu'un point atteigne les 4000 coups. L'acquisition est effectuée à l'aide du logiciel DAS6 (Horiba, Japon) et le traitement des données à l'aide du logiciel DataStation (Horiba, Japon).

2. Mesures de fluorescence pour obtenir des constantes d'affinité

Pour chaque série de mesure, une solution mère de phéophorbide-a à $2 \cdot 10^{-8}$ M dans du PBS est préparée en ajoutant 30 μ L d'une solution de phéophorbide-a dans l'acétone à 0,01 mg/mL à 25 mL de PBS. Après agitation, la solution est placée sous un bullage d'argon pendant 10 minutes pour chasser l'acétone résiduel et l'oxygène dissous. Les échantillons sont ensuite préparés en ajoutant différentes quantités d'objets, micelles ou liposomes (volumes entre 0,5 et 250 μ L), à 1 mL de cette solution mère puis en complétant chaque échantillon par du PBS jusqu'à un volume total de 2 mL. Les concentrations en objets ont été variées entre 10^{-7} et 10^{-4} M pour les micelles et 10^{-6} et 10^{-3} M pour les liposomes. Tous les échantillons ont été mis sous bullage d'argon pendant 1-2 minutes pour chasser l'oxygène dissous puis fermés et laissés dans l'obscurité à incuber pendant au minimum 3 h. Après incubation, la fluorescence des échantillons est mesurée en les excitant à 400 nm et en mesurant leur émission de 600 à 780 nm. L'analyse de ces résultats est obtenue en reportant la valeur de l'intensité de fluorescence à 675 nm en fonction de la concentration en polymères ou en lipides dans l'échantillon. Ces données ont ensuite été modélisées en considérant l'équilibre :



$$K_{aff} = \frac{[NP(Phéo)]}{[Phéo][NP]}$$

et la relation :

$$I_{Phéo} = I_{Phéo_{libre}} + I_{Phéo_{encaps}} = [Phéo_{libre}]F_{Phéo_{libre}} + [Phéo_{encaps}]F_{Phéo_{encaps}}$$

Avec :

$I_{Phéo}$: l'intensité de fluorescence totale

$I_{Phéo \text{ libre}}$: l'intensité de fluorescence due au phéophorbide-a libre

$I_{Phéo \text{ encapsulé}}$: l'intensité de fluorescence due au phéophorbide-a encapsulé dans les objets

$[Phéo_{libre}]$: la concentration en phéophorbide-a libre en solution

$[Phéo_{encapsulé}]$: la concentration en phéophorbide-a libre encapsulé dans les objets

$F_{Phéo \text{ libre}}$: le coefficient reliant l'intensité de fluorescence du phéophorbide-a libre et sa concentration

$F_{Phéo \text{ encapsulé}}$: le coefficient reliant l'intensité de fluorescence du phéophorbide-a encapsulé dans les objets et sa concentration

La modélisation de cet équilibre a été faite en utilisant le logiciel SA développé au laboratoire. Le modèle utilise les équations des cinétiques correspondantes et les intègre jusqu'à atteindre l'équilibre en chaque point. Ces données obtenues à l'équilibre pour un jeu de paramètres sont comparées aux résultats expérimentaux. Les équations différentielles sont intégrées numériquement en utilisant une méthode Runge-Kutta semi-implicite. Les paramètres inconnus sont modélisés automatiquement en utilisant un algorithme itératif de type Powell, fait pour minimiser l'erreur quadratique $E = \frac{\sum_j \sum_i [c_{ij} - e_{ij}]^2}{(n-N)}$ où c_{ij} et e_{ij} sont respectivement les valeurs calculées et expérimentales des concentrations, n le nombre de points par mesures et N le nombre de mesures.

Dans notre cas, nous fixons le $F_{Phéo \text{ libre}}$ calculé à partir de l'intensité de fluorescence et de la concentration de la solution de phéophorbide-a sans objet et laissons ajustable par le logiciel le $F_{Phéo \text{ encapsulé}}$.

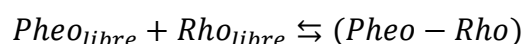
Types d'objets	$F_{Phéo \text{ encapsulé}} (M^{-1})$
Micelles de PEO-PCL	$1,53 \pm 0.06 \cdot 10^{13}$
Micelles de PEO-PLA	$1,39 \pm 0.01 \cdot 10^{13}$
Micelles de PEO-PS	$1,62 \pm 0.01 \cdot 10^{13}$
Liposomes de DOPC	$1,94 \pm 0.02 \cdot 10^{13}$

3. Mesures de fluorescence pour obtenir des constantes de transfert

Pour cette expérience, la composition des liposomes a été changée pour qu'ils contiennent 1% molaire d'un lipide marqué, le 18:1 Liss Rhod PE, et 99% de DOPC. Le lipide marqué est préalablement dissous dans le chloroforme à 1 mg/mL. Une fois le DOPC pesé, typiquement 10 mg, le volume nécessaire de la solution de lipide marqué pour obtenir le rapport voulu, environ 300 μ L, lui est ajouté et le tout est complété par 700 μ L de chloroforme. La suite de la préparation des liposomes est la même que celle décrite précédemment.

Des échantillons contenant une quantité fixe de liposomes (100 µL d'une dilution par 20 de la solution mère) et des quantités variables de micelles chargées en phéophorbide-a (entre 5 et 200 µL qui correspond à un rapport molaire entre polymère et lipide de 0,1 à 3,5) ou d'une solution de phéophorbide-a dans du PBS ont été préparés et laissés à incuber pendant au minimum 2 h. Dans ces échantillons, la concentration en rhodamine était de 0,12 µM. Pour chaque système étudié, des échantillons aux mêmes concentrations, mais sans liposomes ont été mesurés comme blancs. Après incubation, la fluorescence des échantillons est mesurée en les excitant à 569 nm et en mesurant leur émission de 590 à 800 nm. Sur ces spectres d'émission, deux pics d'intérêt apparaissent, un à 591 nm et l'autre à 676 nm. La valeur de l'intensité de fluorescence à ces longueurs d'onde des échantillons ne contenant pas de liposomes est soustraite à celles obtenues pour les mélanges.

La modélisation de ces résultats a été obtenue en considérant un équilibre généralisé entre le phéophorbide-a et la rhodamine « libres », c'est-à-dire à distance assez grande l'un de l'autre pour ne pas observer de transfert d'énergie, et un couple phéophorbide-a/rhodamine subissant un transfert d'énergie.



$$K_{trans} = \frac{[(Pheo-Rho)]}{[Pheo][Rho]}$$

Pour chaque longueur d'onde étudiée, une part de l'intensité de fluorescence est considérée due à la rhodamine « libre » et une autre au couple phéophorbide-a/rhodamine. Nous avons fait l'hypothèse que la gamme de concentration en rhodamine et en phéophorbide-a utilisée pour ces mesures assure une linéarité entre l'intensité de fluorescence d'une espèce et sa concentration. Ces hypothèses se traduisent par :

$$I_{\lambda} = I_{Rho\ libre\lambda} + I_{(Pheo-Rho)\lambda} = [Rho_{libre}]F_{Rho_{libre}\lambda} + [(Phéo-Rho)]F_{(Phéo-Rho)\lambda}$$

Avec :

I_{λ} : l'intensité de fluorescence à une longueur d'onde donnée

$I_{Rho\ libre\lambda}$: l'intensité de fluorescence due à la rhodamine libre à une longueur d'onde donnée

$I_{(Phéo-Rho)\lambda}$: l'intensité de fluorescence due au couple (phéophorbide-a/rhodamine) à une longueur d'onde donnée

$[Rho_{libre}]$: la concentration en rhodamine libre

$[(Phéo-Rho)]$: la concentration du couple (phéophorbide-a/rhodamine)

$F_{Rho\ libre\lambda}$: le coefficient reliant l'intensité de fluorescence à une longueur d'onde donnée de la rhodamine libre et sa concentration

$F_{(Phéo-Rho)\lambda}$: le coefficient reliant l'intensité de fluorescence à une longueur d'onde donnée du couple (phéophorbide-a/rhodamine) et sa concentration

A partir de ces équations, les valeurs de constantes de transferts ont été évaluées en utilisant le logiciel SA. Nous avons fixé les $F_{\text{Rho libre } \lambda}$ pour les deux longueurs d'onde étudiées à l'aide des concentrations initiales et laissé les $F_{(\text{Phéo-Rho}) \lambda}$ ajustables par le logiciel.

F. Expériences d'AF4

Les expériences de fractionnement flux-force flux asymétrique ont été effectuées à l'aide d'un système Eclipse Dualtech (Wyatt Technology Corporation, USA). Le canal utilisé est un canal trapézoïdal de 17,3 cm de long avec une largeur initiale de 1,1 cm et d'une largeur finale de 0,27 cm. Un espaceur de 350 μm est placé entre la membrane d'ultrafiltration en cellulose régénérée de 10 kD et la plaque de verre supérieure.

L'éluant utilisé est du PBS contenant 0,02% d'azoture de sodium filtré à 0,2 μm . L'injection des échantillons et le contrôle du flux d'éluant sont gérés par une chaîne HPLC Agilent 1000 (Agilent Technology, Allemagne).

Les échantillons injectés sont des mélanges de micelles de PEO-PCL et de liposomes de DOPC à diverses concentrations. Une méthode a été développée pour assurer la séparation des micelles et des liposomes. Durant toute la méthode, le flux d'élution est maintenu à 1 mL/min. Elle consiste en une première étape d'une minute sans flux croisé suivie d'une minute avec un flux croisé à 1 mL/min. Il s'en suit ensuite une étape d'une minute de focus suivie de cinq minutes de focus+injection. Après injection, le flux croisé est fixé à 3 mL/min pendant cinq minutes puis il est progressivement abaissé à 0,3 mL/min sur cinq minutes et est maintenu à ce débit pendant 25 minutes. Le flux croisé est ensuite arrêté pour éliminer tout ce qui pourrait avoir été retenu précédemment.

En sortie du canal AF4 sont placés un détecteur UV-visible Agilent 1100, un détecteur de diffusion de la lumière 18 angles DAWN Heleos II (Wyatt Technology Corporation, USA) équipé d'un QELS (DLS) à 99° et un réfractomètre OptilabRex (Wyatt Technology Corporation, USA). Les détecteurs du MALS ont été normalisés avec de l'albumine de sérum bovin (BSA). L'étalonnage de l'intensité de diffusion a été réalisé avec du toluène.

G. Irradiation de mélange liposomes et de sources de phéophorbide-a

La source lumineuse utilisée dans toutes les expériences impliquant une irradiation est une LED dont le spectre est centré à 656 nm (WLS-LED-0656-03, Mightex Systems, Canada). Cette LED est intégrée à un barillet à LED (WheeLED, Mightex Systems, Canada) auquel est relié une fibre optique.

1. Suivi de fuite de liposomes par fluorescence

Pour cette expérience, les liposomes sont chargés à la CBF. Le film sec de lipides est hydraté avec une solution de CBF à 60 mM dans du PBS. Le reste de la procédure est identique jusqu'à l'extrusion. Les liposomes sont ensuite séparés de la CBF libre par exclusion stérique en passant à travers une colonne remplie de Séphadex G-50 (GE Healthcare - Life Sciences, USA). Toutes les fractions sont contrôlées en DLS et toutes celles contenant des liposomes sont regroupées. La dilution due au passage par la colonne est calculée en faisant le rapport du volume total récupéré et du volume de suspension initialement injecté dans la colonne. Pour

être sûr d'avoir éliminé toute la CBF libre, le mélange des fractions récupérées est passé une seconde fois dans la colonne.

Pour cette série d'expérience, les échantillons préparés étaient des mélanges de liposomes de DOPC chargés en CBF, d'ADPA et de phéophorbide-a chargé ou pas dans les différentes micelles (PEO-PCL, PEO-PDLLA, PEO-PS). Le volume total était de 2 mL de PBS, [DOPC] = 120 µM, [ADPA] = 20 µM et [Phéophorbide-a] = 1 µM. Après mélange, les solutions sont laissées à incuber pendant 30 minutes dans l'obscurité. Après l'incubation, le mélange mis sous agitation et irradié pendant 30 minutes à l'aide d'une LED à 656 nm à une puissance de 35 mW. Durant cette irradiation, l'absorbance du mélange est mesurée entre 300 et 800 nm à l'aide d'un spectromètre à barrette de diodes (HP 8452A, Hewlett Packard, USA) piloté à l'aide du logiciel SpectralWork (Olis, USA). La fluorescence des échantillons est mesurée en excitant la CBF à 492 nm et en regardant l'émission de 500 à 800 nm. La fluorescence est mesurée initialement lorsque le mélange ne contient que les liposomes et l'ADPA dans le PBS, après l'ajout des micelles chargées en phéophorbide-a ou de la solution de phéophorbide-a, puis pendant les 15 h suivant l'irradiation. Une fois ce temps passé, 100 µL de Triton X-100 à 10%_m dans du PBS sont ajoutés au mélange pour déstabiliser les liposomes et libérer toute la CBF encapsulée. La fluorescence est une nouvelle fois mesurée.

La fuite est calculée en utilisant la formule :

$$Fuite(t) = \frac{I(t) - I_0}{I_{Triton} - I_0}$$

Avec :

$I(t)$: l'intensité de fluorescence à 518 nm, le maximum de fluorescence de la CBF, du mélange à un temps donné

I_0 : l'intensité de fluorescence à 518 nm avant ajout des micelles ou de la solution de phéophorbide-a corrigée pour prendre en compte le volume plus faible de l'échantillon

I_{Triton} : l'intensité de fluorescence à 518 nm après ajout de 100 µL de Triton X-100 à 10%_m corrigée pour prendre en compte le volume plus élevé de l'échantillon

Le suivi de la fuite après irradiation est modélisé pour ensuite calculer le coefficient de perméabilité des liposomes en utilisant les formules :

$$Fuite(t) = Fuite_{max} \left(1 - e^{\frac{-t}{\tau_{Fuite}}} \right)$$

$$P = \frac{r}{3\tau_{Fuite}}$$

Avec :

$Fuite_{max}$: le taux de fuite à l'équilibre du système

τ_{Fuite} : le temps caractéristique de fuite

P : le coefficient de perméabilité des liposomes

r : le rayon des liposomes

2. Suivi de l'oxydation de lipides par spectrométrie de masse

Pour cette expérience, les échantillons ont été préparés en mélangeant des liposomes de DOPC avec des micelles chargées en phéophorbide-a à 1/30 ou du phéophorbide-a en solution de telle manière à ce que la concentration en DOPC soit d'environ 300 μM et que la concentration en phéophorbide-a soit de 1 μM dans un volume total de 2 mL de PBS. La cinétique d'oxydation a été faite en irradiant pendant 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 et 240 min. Pour chaque point de la cinétique, un nouvel échantillon a été préparé. Tous les échantillons ont été placés sous une bullage d'air comprimé ou d'oxygène pur pendant au moins une minute avant l'irradiation et ensuite pendant toute la durée de l'irradiation. La fibre optique servant à l'irradiation a été placée de manière à ce que la totalité du faisceau lumineux passe par la solution et la puissance de la LED a été fixée à 35 mJ/cm^2 . Après irradiation, les échantillons ont été mis sous un bullage d'argon pour chasser l'oxygène dissous puis laissés dans l'obscurité à 4 °C en attendant d'être extraits.

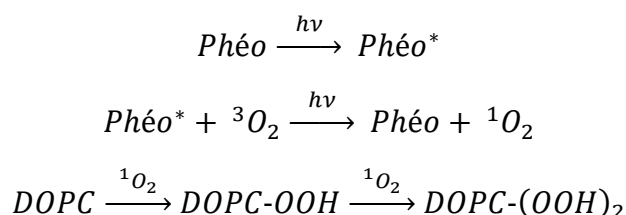
Une fois que tous les échantillons d'une même cinétique ont été préparés, les composés organiques ont été extraits en utilisant une méthode adaptée de celle de Bilgh et Dyer²³⁴. 1 mL de méthanol est ajouté à chaque échantillon, puis après un mélange, 2 mL de chloroforme sont de nouveau ajoutés. Les échantillons sont alors mélangés vigoureusement et après séparation des deux phases, la phase organique est recueillie puis le chloroforme est évaporé sous vide. Une fois séchés, les échantillons sont repris dans 1 mL de méthanol et sont dilués ensuite 2,5 fois pour obtenir une concentration finale théorique en lipide de 0,24 mM.

3 μL de ces extraits ont ensuite directement été injectés dans l'appareil de LC-MS. La séparation chromatographique a été faite en utilisant un système AQUITY-UPLC (Waters, UK) équipé d'une colonne BEH-C8, 2,1 x 50 mm, 1,7 μm . Un gradient binaire d'éluant composé d'acétate d'ammonium et de méthanol a été utilisé. L'élution commençait à 14 %_v d'acétate d'ammonium pendant 3 minutes puis une baisse linéaire de 14 à 3 %_v sur 7 minutes. Cette composition est ensuite maintenue pendant 6 minutes. Après cela, la composition est de nouveau ramenée à 14 %_v en acétate d'ammonium sur 1 minute et laissée telle quelle pendant 2 minutes pour une durée expérimentale totale de 19 minutes durant lesquelles le four contenant la colonne est placé à 40 °C.

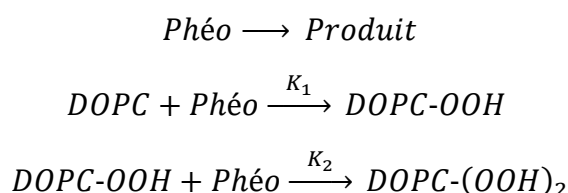
Pour l'analyse, nous avons utilisé un spectromètre Xevo G2 QTOF (Waters, UK) équipé d'un électronébuliseur comme source des ions. Les paramètres de la source étaient une température de capillaire de 130 °C, une tension de 3 kV, une température de désolvatation de 450 °C et de l'azote en tant que gaz de nébulisation.

De la leucine-enkephaline ($[\text{M} + \text{H}]^+$: m/z 556.2771) a été utilisée comme référence et injectée à 7 $\mu\text{L}/\text{min}$ à la concentration de 400 $\text{pg}/\mu\text{L}$. Sa masse a été mesurée toutes les 5 secondes indépendamment des autres signaux, ce qui permet une correction des masses en continu. L'erreur sur la masse était toujours inférieure à 5 ppm. L'acquisition et le traitement des données ont été faits à l'aide du logiciel MassLynx 4.1 (Waters, UK). Le traitement des données a été fait en extrayant et intégrant les chromatogrammes pour les masses d'intérêt.

Pour expliquer l'oxydation du lipide, nous avons considéré le mécanisme suivant :



Pour simplifier ce mécanisme, nous avons considéré la production d'oxygène singulet proportionnelle à la concentration en phéophorbide-a. Cette dernière a été modélisée par un polynôme d'ordre 2 à partir de données d'absorbance obtenues durant un suivi de l'irradiation par spectrométrie UV-Visible. Le mécanisme précédent a pu être transformé en :



Nous avons aussi considéré que la valeur de l'aire des pics des masses d'intérêt sur les chromatogrammes était proportionnelle à la concentration de l'espèce concernée. En prenant en compte toutes ces hypothèses, la cinétique d'oxydation a pu être modélisée en utilisant le logiciel SA pour évaluer les constantes de vitesse de réaction. Nous avons fixé à partir de la concentration initiale en DOPC la valeur de la constante reliant l'aire du pic du DOPC à sa concentration et laissé ajustables celles relatives aux deux formes oxydées.

H. Tests statistiques

Les analyses statistiques de type ANOVA ont été effectuées à l'aide du logiciel RStudio.

Pour le suivi de fuite des liposomes, nous avons testé les effets de la nature du polymère utilisé et de la présence de phéophorbide-a (ou de son irradiation dans le cas où il n'était pas encapsulé) sur l'évolution du coefficient de perméabilité des liposomes.

Le modèle utilisé était le suivant :

```
#####Script stats R studio#####

perm=read.table("Perm.txt", sep='\t', h=T, dec = ',')

res=lm(log(P)~Cond+Type, data=perm)
anova(res)
summary(res)
qqnorm(residuals(res))
qqline(residuals(res))

shapiro.test(residuals(res))

t<-TukeyHSD(aov(res))

t$Type
```

Ce qui nous a donné les résultats suivant :

```
##### Resultats#####
res=lm(log(P)~Cond+Type, data=perm)
> anova(res)
Analysis of Variance Table

Response: log(P)
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)    
Cond     1  7.668   7.6675   36.602 1.686e-05 ***
Type     4 47.526  11.8816   56.718 3.006e-09 ***
Residuals 16  3.352   0.2095
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> summary(res)
```

```
Call:
lm(formula = log(P) ~ Cond + Type, data = perm)
```

```
Residuals:
      Min       1Q   Median       3Q      Max
-0.75760 -0.22977 -0.07748  0.15674  1.08079
```

```
Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept) -28.8631     0.3890  -74.192 < 2e-16 ***
CondV        -0.7576     0.2159   -3.509  0.0029 **
TypeMicPLA    2.3784     0.4042    5.883 2.31e-05 ***
TypeMicPCL    2.6997     0.3981    6.782 4.40e-06 ***
TypeMicPS    -0.6334     0.4042   -1.567  0.1367
TypePheo     -0.2387     0.4419   -0.540  0.5966
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
Residual standard error: 0.4577 on 16 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.9427, Adjusted R-squared:  0.9249
F-statistic: 52.69 on 5 and 16 DF, p-value: 2.256e-09
```

```
> qqnorm(residuals(res))
> qqline(residuals(res))
> shapiro.test(residuals(res))
```

Shapiro-wilk normality test

```
data: residuals(res)
W = 0.92984, p-value = 0.1218
```

```
> t<-TukeyHSD(aov(res))
> t$type
```

	diff	lwr	upr	p adj
MicPLA-LUV	2.1124720	0.9392810	3.2856629	3.918202e-04
MicPCL-LUV	2.3831986	1.2589123	3.5074849	6.357424e-05
MicPS-LUV	-0.8992468	-2.0724378	0.2739441	1.804847e-01
Pheo-LUV	-0.5341007	-1.8141570	0.7459556	7.074690e-01
MicPCL-MicPLA	0.2707266	-0.5503360	1.0917893	8.469937e-01
MicPS-MicPLA	-3.0117188	-3.8985678	-2.1248698	1.415716e-07
Pheo-MicPLA	-2.6465727	-3.6706177	-1.6225277	5.575347e-06
MicPS-MicPCL	-3.2824454	-4.1035081	-2.4613828	1.385666e-08
Pheo-MicPCL	-2.9172993	-3.8849310	-1.9496677	7.300393e-07
Pheo-MicPS	0.3651461	-0.6588989	1.3891911	8.078593e-01

Pour le suivi de la cinétique d'oxydation des lipides, nous avons testé l'effet de la nature du polymère utilisé sur les vitesses d'oxydations successives et l'effet de la vitesse de la première oxydation sur celle de la seconde.

Le modèle utilisé était le suivant :

```
#####Script stats R studio#####
CinOX=read.table("CinOX.txt", sep='\t', h=T, dec = ',')

res=lm(vitesse~K+Type, data=CinOX)
anova(res)
summary(res)
qqnorm(residuals(res))
qqline(residuals(res))

shapiro.test(residuals(res))

TukeyHSD(aov(res))
```

Ce qui nous a donné les résultats suivant :

```
##### Resultats#####
> res=lm(vitesse~K+Type, data=CinOX)
> anova(res)
Analysis of Variance Table

Response: vitesse
      Df    Sum Sq   Mean Sq F value    Pr(>F)
K       1 0.0201214 0.0201214  27.951 0.0002576 ***
Type    3 0.0171910 0.0057303   7.960 0.0042314 **
Residuals 11 0.0079188 0.0007199
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> summary(res)
```

```
Call:
lm(formula = vitesse ~ K + Type, data = CinOX)
```

```
Residuals:
      Min       1Q   Median       3Q      Max
-0.038163 -0.017056  0.002763  0.014731  0.043563
```

```
Coefficients:
      Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)  0.10151    0.01500   6.768 3.08e-05 ***
Kk2          0.07092    0.01342   5.287 0.000258 ***
TypePheo     -0.09100    0.01897  -4.796 0.000556 ***
TypePLA      -0.06047    0.01897  -3.188 0.008644 **
TypePS       -0.04727    0.01897  -2.492 0.029940 *
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
Residual standard error: 0.02683 on 11 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.8249, Adjusted R-squared:  0.7613
F-statistic: 12.96 on 4 and 11 DF, p-value: 0.0003811
```

```
> qqnorm(residuals(res))
> qqline(residuals(res))
> shapiro.test(residuals(res))
```

Shapiro-wilk normality test

```
data: residuals(res)
W = 0.972, p-value = 0.8698
```

```
> TukeyHSD(aov(res))
  Tukey multiple comparisons of means
    95% family-wise confidence level
```

```
Fit: aov(formula = res)
```

```
$K
      diff      lwr      upr      p adj
k2-k1 0.070925 0.04139786 0.1004521 0.0002576
```

```
$Type
      diff      lwr      upr      p adj
Pheo-PCL -0.091000 -0.14809795 -0.033902054 0.0026578
PLA-PCL  -0.060475 -0.11757295 -0.003377054 0.0371577
PS-PCL   -0.047275 -0.10437295  0.009822946 0.1164017
PLA-Pheo  0.030525 -0.02657295  0.087622946 0.4129157
PS-Pheo   0.043725 -0.01337295  0.100822946 0.1560122
PS-PLA    0.013200 -0.04389795  0.070297946 0.8965917
```


Annexe 2 : Références

- (1) Dionzou, M.; Morère, A.; Roux, C.; Lonetti, B.; Marty, J.-D.; Mingotaud, C.; Joseph, P.; Goudounèche, D.; Payré, B.; Léonetti, M.; et al. Comparison of Methods for the Fabrication and the Characterization of Polymer Self-Assemblies: What Are the Important Parameters? *Soft Matter* **2016**, *12* (7), 2166–2176. <https://doi.org/10.1039/C5SM01863C>.
- (2) Gibot, L.; Lemelle, A.; Till, U.; Moukarzel, B.; Mingotaud, A.-F.; Pimienta, V.; Saint-Aguet, P.; Rols, M.-P.; Gaucher, M.; Violleau, F.; et al. Polymeric Micelles Encapsulating Photosensitizer: Structure/Photodynamic Therapy Efficiency Relation. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (4), 1443–1455. <https://doi.org/10.1021/bm5000407>.
- (3) Till, U. OncoPol Vers le developpement critique de vecteurs polymeres pour l'oncologie, Université de Toulouse, Toulouse, 2016.
- (4) Montis, C.; Till, U.; Vicendo, P.; Roux, C.; Mingotaud, A.-F.; Violleau, F.; Demazeau, M.; Berti, D.; Lonetti, B. Extended Photo-Induced Endosome-like Structures in Giant Vesicles Promoted by Block-Copolymer Nanocarriers. *Nanoscale* **2018**, *10* (33), 15442–15446. <https://doi.org/10.1039/C8NR04355H>.
- (5) Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2018**, *68* (6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- (6) Biela, A.; Nasief, N. N.; Betz, M.; Heine, A.; Hangauer, D.; Klebe, G. Dissecting the Hydrophobic Effect on the Molecular Level: The Role of Water, Enthalpy, and Entropy in Ligand Binding to Thermolysin. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52* (6), 1822–1828. <https://doi.org/10.1002/anie.201208561>.
- (7) Wright, J. S.; Lyon, G. J.; George, E. A.; Muir, T. W.; Novick, R. P. Hydrophobic Interactions Drive Ligand-Receptor Recognition for Activation and Inhibition of Staphylococcal Quorum Sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2004**, *101* (46), 16168–16173. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404039101>.
- (8) Loftsson, T.; Brewster, M. E. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins: Basic Science and Product Development: Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2010**, *62* (11), 1607–1621. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2010.01030.x>.
- (9) Manallack, D. T. The PK(a) Distribution of Drugs: Application to Drug Discovery. *Perspect Medicin Chem* **2007**, *1*, 25–38. <https://doi.org/10.1177/1177391X0700100003>.
- (10) Williams, H. D.; Trevaskis, N. L.; Charman, S. A.; Shanker, R. M.; Charman, W. N.; Pouton, C. W.; Porter, C. J. H. Strategies to Address Low Drug Solubility in Discovery and Development. *Pharmacological Reviews* **2013**, *65* (1), 315–499. <https://doi.org/10.1124/pr.112.005660>.
- (11) Taniguchi, C.; Kawabata, Y.; Wada, K.; Yamada, S.; Onoue, S. Microenvironmental PH-Modification to Improve Dissolution Behavior and Oral Absorption for Drugs with PH-Dependent Solubility. *Expert Opinion on Drug Delivery* **2014**, *11* (4), 505–516. <https://doi.org/10.1517/17425247.2014.881798>.
- (12) Rayaprolu, B. M.; Strawser, J. J.; Anyarambhatla, G. Excipients in Parenteral Formulations: Selection Considerations and Effective Utilization with Small Molecules

- and Biologics. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2018**, *44* (10), 1565–1571. <https://doi.org/10.1080/03639045.2018.1483392>.
- (13) Censi, R.; Di Martino, P. Polymorph Impact on the Bioavailability and Stability of Poorly Soluble Drugs. *Molecules* **2015**, *20* (10), 18759–18776. <https://doi.org/10.3390/molecules201018759>.
 - (14) Friščić, T.; Jones, W. Benefits of Cocrystallisation in Pharmaceutical Materials Science: An Update: Cocrystallisation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2010**, *62* (11), 1547–1559. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2010.01133.x>.
 - (15) Lawrence, M. J. Surfactant Systems: Their Use in Drug Delivery. *Chemical Society Reviews* **1994**, *23* (6), 417. <https://doi.org/10.1039/cs9942300417>.
 - (16) Paclitaxel Tablets (paclitaxel): Side Effects, Interactions, Warning, Dosage & Uses <https://www.rxlist.com/taxol-drug.htm> (accessed Mar 4, 2019).
 - (17) Taxotere (Docetaxel for Injection): Side Effects, Interactions, Warning, Dosage & Uses <https://www.rxlist.com/taxotere-drug.htm> (accessed Mar 4, 2019).
 - (18) Sudimack, J.; Lee, R. J. Targeted Drug Delivery via the Folate Receptor. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2000**, *41* (2), 147–162. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(99\)00062-9](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(99)00062-9).
 - (19) Maeda, H. Vascular Permeability in Cancer and Infection as Related to Macromolecular Drug Delivery, with Emphasis on the EPR Effect for Tumor-Selective Drug Targeting. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* **2012**, *88* (3), 53–71. <https://doi.org/10.2183/pjab.88.53>.
 - (20) Matsumura, Y.; Maeda, H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res.* **1986**, *46* (12 Pt 1), 6387–6392.
 - (21) Torchilin, V. Tumor Delivery of Macromolecular Drugs Based on the EPR Effect. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2011**, *63* (3), 131–135. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.03.011>.
 - (22) Li, S.-D.; Huang, L. Pharmacokinetics and Biodistribution of Nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics* **2008**, *5* (4), 496–504. <https://doi.org/10.1021/mp800049w>.
 - (23) Kresge, C. T.; Leonowicz, M. E.; Roth, W. J.; Vartuli, J. C.; Beck, J. S. Ordered Mesoporous Molecular Sieves Synthesized by a Liquid-Crystal Template Mechanism. *Nature* **1992**, *359* (6397), 710–712. <https://doi.org/10.1038/359710a0>.
 - (24) Meseguer-Olmo, L.; Ros-Nicolás, M.; Vicente-Ortega, V.; Alcaraz-Baños, M.; Clavel-Sainz, M.; Arcos, D.; Ragel, C. V.; Vallet-Regí, M.; Meseguer-Ortiz, C. A Bioactive Sol-Gel Glass Implant for in Vivo Gentamicin Release. Experimental Model in Rabbit. *Journal of Orthopaedic Research* **2006**, *24* (3), 454–460. <https://doi.org/10.1002/jor.20064>.
 - (25) Areva, S.; Ääritalo, V.; Tuusa, S.; Jokinen, M.; Lindén, M.; Peltola, T. Sol-Gel-Derived TiO₂–SiO₂ Implant Coatings for Direct Tissue Attachment. Part II: Evaluation of Cell Response. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2007**, *18* (8), 1633–1642. <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3064-z>.
 - (26) Vallet-Regí, M.; Rámila, A.; del Real, R. P.; Pérez-Pariente, J. A New Property of MCM-41: Drug Delivery System. *Chemistry of Materials* **2001**, *13* (2), 308–311. <https://doi.org/10.1021/cm0011559>.
 - (27) Roy, I.; Ohulchanskyy, T. Y.; Pudavar, H. E.; Bergey, E. J.; Oseroff, A. R.; Morgan, J.; Dougherty, T. J.; Prasad, P. N. Ceramic-Based Nanoparticles Entrapping Water-Insoluble Photosensitizing Anticancer Drugs: A Novel Drug–Carrier System for

- Photodynamic Therapy. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (26), 7860–7865. <https://doi.org/10.1021/ja0343095>.
- (28) Slowing, I.; Viveroescoto, J.; Wu, C.; Lin, V. Mesoporous Silica Nanoparticles as Controlled Release Drug Delivery and Gene Transfection Carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60* (11), 1278–1288. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.012>.
- (29) Vallet-Regí, M.; Colilla, M.; Izquierdo-Barba, I.; Manzano, M. Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery: Current Insights. *Molecules* **2017**, *23* (1), 47. <https://doi.org/10.3390/molecules23010047>.
- (30) Bardhan, M.; Majumdar, A.; Jana, S.; Ghosh, T.; Pal, U.; Swarnakar, S.; Senapati, D. Mesoporous Silica for Drug Delivery: Interactions with Model Fluorescent Lipid Vesicles and Live Cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2018**, *178*, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.10.023>.
- (31) Freestone, I.; Meeks, N.; Sax, M.; Higgitt, C. The Lycurgus Cup — A Roman Nanotechnology. *Gold Bulletin* **2007**, *40* (4), 270–277. <https://doi.org/10.1007/BF03215599>.
- (32) Faraday, M. The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1857**, *147*, 145–181.
- (33) Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discussions of the Faraday Society* **1951**, *11*, 55. <https://doi.org/10.1039/df9511100055>.
- (34) Frens, G. Particle Size and Sol Stability in Metal Colloids. *Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polymere* **1972**, *250* (7), 736–741. <https://doi.org/10.1007/BF01498565>.
- (35) Ghosh, P.; Han, G.; De, M.; Kim, C.; Rotello, V. Gold Nanoparticles in Delivery Applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60* (11), 1307–1315. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.016>.
- (36) García Calavia, P.; Bruce, G.; Pérez-García, L.; Russell, D. A. Photosensitiser-Gold Nanoparticle Conjugates for Photodynamic Therapy of Cancer. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2018**, *17* (11), 1534–1552. <https://doi.org/10.1039/C8PP00271A>.
- (37) Sztandera, K.; Gorzkiewicz, M.; Klajnert-Maculewicz, B. Gold Nanoparticles in Cancer Treatment. *Molecular Pharmaceutics* **2019**, *16* (1), 1–23. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00810>.
- (38) Bañobre-López, M.; Teijeiro, A.; Rivas, J. Magnetic Nanoparticle-Based Hyperthermia for Cancer Treatment. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy* **2013**, *18* (6), 397–400. <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2013.09.011>.
- (39) Yang, Y.; Guo, Q.; Peng, J.; Su, J.; Lu, X.; Zhao, Y.; Qian, Z. Doxorubicin-Conjugated Heparin-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Combined Anticancer Drug Delivery and Magnetic Resonance Imaging. *Journal of Biomedical Nanotechnology* **2016**, *12* (11), 1963–1974. <https://doi.org/10.1166/jbn.2016.2298>.
- (40) Huang, Y.; Mao, K.; Zhang, B.; Zhao, Y. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Conjugated with Folic Acid for Dual Target-Specific Drug Delivery and MRI in Cancer Theranostics. *Materials Science and Engineering: C* **2017**, *70*, 763–771. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.052>.
- (41) Wagstaff, A. J.; Brown, S. D.; Holden, M. R.; Craig, G. E.; Plumb, J. A.; Brown, R. E.; Schreiter, N.; Chrzanowski, W.; Wheate, N. J. Cisplatin Drug Delivery Using Gold-Coated Iron Oxide Nanoparticles for Enhanced Tumour Targeting with External

- Magnetic Fields. *Inorganica Chimica Acta* **2012**, 393, 328–333. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2012.05.012>.
- (42) Kroto, H. W.; Heath, J. R.; O'Brien, S. C.; Curl, R. F.; Smalley, R. E. C60: Buckminsterfullerene. *Nature* **1985**, 318 (6042), 162–163. <https://doi.org/10.1038/318162a0>.
- (43) Mohajeri, M.; Behnam, B.; Sahebkar, A. Biomedical Applications of Carbon Nanomaterials: Drug and Gene Delivery Potentials. *Journal of Cellular Physiology* **2019**, 234 (1), 298–319. <https://doi.org/10.1002/jcp.26899>.
- (44) Chaudhuri, P.; Paraskar, A.; Soni, S.; Mashelkar, R. A.; Sengupta, S. Fullerenol–Cytotoxic Conjugates for Cancer Chemotherapy. *ACS Nano* **2009**, 3 (9), 2505–2514. <https://doi.org/10.1021/nn900318y>.
- (45) Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C. Diffusion of Univalent Ions across the Lamellae of Swollen Phospholipids. *Journal of Molecular Biology* **1965**, 13 (1), 238–252. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6).
- (46) Bernkop-Schnürch, A.; Dünnhaupt, S. Chitosan-Based Drug Delivery Systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2012**, 81 (3), 463–469. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.04.007>.
- (47) Varshosaz, J. Dextran Conjugates in Drug Delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* **2012**, 9 (5), 509–523. <https://doi.org/10.1517/17425247.2012.673580>.
- (48) Abeer, M. M.; Mohd Amin, M. C. I.; Martin, C. A Review of Bacterial Cellulose-Based Drug Delivery Systems: Their Biochemistry, Current Approaches and Future Prospects: Review of BC-Based Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2014**, 1047–1061. <https://doi.org/10.1111/jphp.12234>.
- (49) Lomis, N.; Westfall, S.; Farahdel, L.; Malhotra, M.; Shum-Tim, D.; Prakash, S. Human Serum Albumin Nanoparticles for Use in Cancer Drug Delivery: Process Optimization and In Vitro Characterization. *Nanomaterials* **2016**, 6 (6), 116. <https://doi.org/10.3390/nano6060116>.
- (50) Tang, W.; Xu, H.; Park, E. J.; Philbert, M. A.; Kopelman, R. Encapsulation of Methylene Blue in Polyacrylamide Nanoparticle Platforms Protects Its Photodynamic Effectiveness. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2008**, 369 (2), 579–583. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.02.066>.
- (51) Devissaguet, J.-P.; Puisieux, F. Process for the Preparation of Dispersible Colloidal Systems of a Substance in the Form of Nanoparticles. US5118528A.
- (52) Rancan, F.; Papakostas, D.; Hadam, S.; Hackbarth, S.; Delair, T.; Primard, C.; Verrier, B.; Sterry, W.; Blume-Peytavi, U.; Vogt, A. Investigation of Polylactic Acid (PLA) Nanoparticles as Drug Delivery Systems for Local Dermatotherapy. *Pharmaceutical Research* **2009**, 26 (8), 2027–2036. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-9919-x>.
- (53) Boas, U.; Heegaard, P. M. H. Dendrimers in Drug Research. *Chemical Society Reviews* **2004**, 33 (1), 43. <https://doi.org/10.1039/b309043b>.
- (54) Israelachvili, J. N. *Intermolecular and Surface Forces*, Third edition.; Elsevier, Academic Press: Amsterdam, 2011.
- (55) Blanazs, A.; Armes, S. P.; Ryan, A. J. Self-Assembled Block Copolymer Aggregates: From Micelles to Vesicles and Their Biological Applications. *Macromolecular Rapid Communications* **2009**, 30 (4–5), 267–277. <https://doi.org/10.1002/marc.200800713>.
- (56) Cameron, N. S.; Corbierre, M. K.; Eisenberg, A. 1998 E.W.R. Steacie Award Lecture Asymmetric Amphiphilic Block Copolymers in Solution: A Morphological Wonderland. **1999**, 77, 16. <https://doi.org/10.1139/v99-141>.

- (57) Ianiro, A.; Patterson, J.; González García, Á.; van Rijt, M. M. J.; Hendrix, M. M. R. M.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Voets, I. K.; Esteves, A. C. C.; Tuinier, R. A Roadmap for Poly(Ethylene Oxide)-Block-Poly- ϵ -Caprolactone Self-Assembly in Water: Prediction, Synthesis, and Characterization. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **2018**, *56* (4), 330–339. <https://doi.org/10.1002/polb.24545>.
- (58) Hayward, R. C.; Pochan, D. J. Tailored Assemblies of Block Copolymers in Solution: It Is All about the Process. *Macromolecules* **2010**, *43* (8), 3577–3584. <https://doi.org/10.1021/ma9026806>.
- (59) Wurtz, A. Mémoire Sur l'oxyde d'éthylène et Les Alcools Polyéthyléniques. *Annales de chimie et de physique* **1863**, *69* (3), 317–355.
- (60) Abuchowski, A.; McCoy, J. R.; Palczuk, N. C.; van Es, T.; Davis, F. F. Effect of Covalent Attachment of Polyethylene Glycol on Immunogenicity and Circulating Life of Bovine Liver Catalase. *Journal of Biological Chemistry* **1977**, *252* (11), 3582–3586.
- (61) Green, A. E.; Rose, P. G. Pegylated Liposomal Doxorubicin in Ovarian Cancer. *Int J Nanomedicine* **2006**, *1* (3), 229–239.
- (62) Frazza, E. J.; Schmitt, E. E. A New Absorbable Suture. *Journal of Biomedical Materials Research* **1971**, *5* (2), 43–58. <https://doi.org/10.1002/jbm.820050207>.
- (63) Kulkarni, R. K.; Moore, E. G.; Hegyeli, A. F.; Leonard, F. Biodegradable Poly(Lactic Acid) Polymers. *Journal of Biomedical Materials Research* **1971**, *5* (3), 169–181. <https://doi.org/10.1002/jbm.820050305>.
- (64) Reed, A. M.; Gilding, D. K. Biodegradable Polymers for Use in Surgery - Poly(Glycolic)/Poly(Lactic Acid) Homo and Copolymers: 2. In Vitro Degradation. *Polymer* **1981**, *22*, 494–498.
- (65) Mir, M.; Ahmed, N.; Rehman, A. ur. Recent Applications of PLGA Based Nanostructures in Drug Delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2017**, *159*, 217–231. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.07.038>.
- (66) Zeng, Z. Recent Advances in PEG-PLA Block Copolymer Nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine* **2010**, 1057. <https://doi.org/10.2147/IJN.S14912>.
- (67) Wauters, A. C.; Pijpers, I. A. B.; Mason, A. F.; Williams, D. S.; Tel, J.; Abdelmohsen, L. K. E. A.; van Hest, J. C. M. Development of Morphologically Discrete PEG–PDLLA Nanotubes for Precision Nanomedicine. *Biomacromolecules* **2019**, *20* (1), 177–183. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b01245>.
- (68) Sim, T.; Kim, J. E.; Hoang, N. H.; Kang, J. K.; Lim, C.; Kim, D. S.; Lee, E. S.; Youn, Y. S.; Choi, H.-G.; Han, H.-K.; et al. Development of a Docetaxel Micellar Formulation Using Poly(Ethylene Glycol)–Polylactide–Poly(Ethylene Glycol) (PEG–PLA–PEG) with Successful Reconstitution for Tumor Targeted Drug Delivery. *Drug Delivery* **2018**, *25* (1), 1362–1371. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1477865>.
- (69) Grossen, P.; Witzigmann, D.; Sieber, S.; Huwyler, J. PEG-PCL-Based Nanomedicines: A Biodegradable Drug Delivery System and Its Application. *Journal of Controlled Release* **2017**, *260*, 46–60. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.05.028>.
- (70) Wilson, P.; Ke, P. C.; Davis, T. P.; Kempe, K. Poly(2-Oxazoline)-Based Micro- and Nanoparticles: A Review. *European Polymer Journal* **2017**, *88*, 486–515. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.09.011>.
- (71) Su, F.; Yun, P.; Li, C.; Li, R.; Xi, L.; Wang, Y.; Chen, Y.; Li, S. Novel Self-Assembled Micelles of Amphiphilic Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline) -Poly(L-Lactide) Diblock Copolymers for Sustained Drug Delivery. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2019**, *566*, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.01.015>.

- (72) Zheng, D.; Ye, H.; Luo, C.; Xu, H.; Meng, L. The Efficient Apoptotic Induction of Paclitaxel-Loaded Poly(N-Vinylpyrrolidone)-Block-Poly(ϵ -Caprolactone) Nanoparticles in the In Vitro Study of Lung Cancer Cell Lines. *Journal of Nanomaterials* **2015**, *2015*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/791063>.
- (73) Mitra, K.; Hira, S. K.; Singh, S.; Vishwakarma, N. K.; Vishwakarma, S.; Gupta, U.; Manna, P. P.; Ray, B. In Vitro Anticancer Drug Delivery Using Amphiphilic Poly(N-Vinylpyrrolidone)-b-Polyketal-b-Poly(N-Vinylpyrrolidone) Block Copolymer as Micellar Nanocarrier. *ChemistrySelect* **2018**, *3* (31), 8833–8843. <https://doi.org/10.1002/slct.201801399>.
- (74) Ramesh, K.; Singh, S.; Mitra, K.; Chattopadhyay, D.; Misra, N.; Ray, B. Self-Assembly of Novel Poly(d,l-Lactide-Co-Glycolide)-b-Poly(N-Vinylpyrrolidone) (PLGA-b-PNVVP) Amphiphilic Diblock Copolymers. *Colloid and Polymer Science* **2016**, *294* (2), 399–407. <https://doi.org/10.1007/s00396-015-3795-1>.
- (75) Patterson, J. P.; Robin, M. P.; Chassenieux, C.; Colombani, O.; O'Reilly, R. K. The Analysis of Solution Self-Assembled Polymeric Nanomaterials. *Chemical Society Reviews* **2014**, *43* (8), 2412. <https://doi.org/10.1039/c3cs60454c>.
- (76) Giddings, J.; Yang, F.; Myers, M. Flow-Field-Flow Fractionation: A Versatile New Separation Method. *Science* **1976**, *193* (4259), 1244–1245. <https://doi.org/10.1126/science.959835>.
- (77) *Field-Flow Fractionation in Biopolymer Analysis*; Williams, S. K. R., Caldwell, K., Eds.; Springer: Vienna ; London, 2012.
- (78) Cauvin, J. F. Des bienfaits de l'insolation, Faculté de Médecine de Paris, Paris, 1815.
- (79) Grzybowski, A.; Pietrzak, K. From Patient to Discoverer—Niels Ryberg Finsen (1860–1904)—the Founder of Phototherapy in Dermatology. *Clinics in Dermatology* **2012**, *30* (4), 451–455. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2011.11.019>.
- (80) Cremer, R. J.; Perryman, P. W.; Richards, D. H. INFLUENCE OF LIGHT ON THE HYPERBILIRUBINÆMIA OF INFANTS. *The Lancet* **1958**, *271* (7030), 1094–1097. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(58\)91849-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(58)91849-X).
- (81) Fitzpatrick, T. B.; Pathak, M. A. Part IV: Basic Considerations of the Psoralens: Historical Aspects of Methoxsalen and Other Furocoumarins¹¹ From the Division of Dermatology, University of Oregon Medical School, Portland, Oregon. *Journal of Investigative Dermatology* **1959**, *32* (2), 229–231. <https://doi.org/10.1038/jid.1959.40>.
- (82) Daniell, M. D.; Hill, J. S. A HISTORY OF PHOTODYNAMIC THERAPY. *ANZ Journal of Surgery* **1991**, *61* (5), 340–348. <https://doi.org/10.1111/j.1445-2197.1991.tb00230.x>.
- (83) Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2012. <https://doi.org/10.1002/9783527650002>.
- (84) Debele, T.; Peng, S.; Tsai, H.-C. Drug Carrier for Photodynamic Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* **2015**, *16* (9), 22094–22136. <https://doi.org/10.3390/ijms160922094>.
- (85) Davies, M. J. Singlet Oxygen-Mediated Damage to Proteins and Its Consequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2003**, *305* (3), 761–770. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00817-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00817-9).
- (86) Agnez-Lima, L. F.; Melo, J. T. A.; Silva, A. E.; Oliveira, A. H. S.; Timoteo, A. R. S.; Lima-Bessa, K. M.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P.; Galhardo, R. S.; et al. DNA Damage by Singlet Oxygen and Cellular Protective Mechanisms. *Mutation*

- Research/Reviews in Mutation Research* **2012**, 751 (1), 15–28. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.12.005>.
- (87) Mfouo-Tynga, I.; Abrahamse, H. Cell Death Pathways and Phthalocyanine as an Efficient Agent for Photodynamic Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* **2015**, 16 (12), 10228–10241. <https://doi.org/10.3390/ijms160510228>.
- (88) Sharman, W. M.; Allen, C. M.; van Lier, J. E. Photodynamic Therapeutics: Basic Principles and Clinical Applications. *Drug Discovery Today* **1999**, 4 (11), 507–517. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(99\)01412-9](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(99)01412-9).
- (89) Dolmans, D. E. J. G. J.; Fukumura, D.; Jain, R. K. Photodynamic Therapy for Cancer. *Nature Reviews Cancer* **2003**, 3, 380.
- (90) Gaullier, J. M.; Berg, K.; Peng, Q.; Anholt, H.; Selbo, P. K.; Ma, L. W.; Moan, J. Use of 5-Aminolevulinic Acid Esters to Improve Photodynamic Therapy on Cells in Culture. *Cancer Res.* **1997**, 57 (8), 1481–1486.
- (91) Battah, S.; Balaratnam, S.; Casas, A.; O'Neill, S.; Edwards, C.; Batlle, A.; Dobbin, P.; MacRobert, A. J. Macromolecular Delivery of 5-Aminolaevulinic Acid for Photodynamic Therapy Using Dendrimer Conjugates. *Molecular Cancer Therapeutics* **2007**, 6 (3), 876–885. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0359>.
- (92) Stilts, C. E.; Nelen, M. I.; Hilmey, D. G.; Davies, S. R.; Gollnick, S. O.; Oseroff, A. R.; Gibson, S. L.; Hilf, R.; Detty, M. R. Water-Soluble, Core-Modified Porphyrins as Novel, Longer-Wavelength-Absorbing Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, 43 (12), 2403–2410. <https://doi.org/10.1021/jm000044i>.
- (93) Copper, M. P.; Tan, I. B.; Oppelaar, H.; Ruevekamp, M. C.; Stewart, F. A. Meta-Tetra(Hydroxyphenyl)Chlorin Photodynamic Therapy in Early-Stage Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery* **2003**, 129 (7), 709. <https://doi.org/10.1001/archotol.129.7.709>.
- (94) Kashef, N.; Huang, Y.-Y.; Hamblin, M. R. Advances in Antimicrobial Photodynamic Inactivation at the Nanoscale. *Nanophotonics* **2017**, 6 (5), 853–879. <https://doi.org/10.1515/nanoph-2016-0189>.
- (95) Brasseur, N.; Ali, H.; Langlois, R.; Wagner, J. R.; Rousseau, J.; Lier, J. E. van. Biological Activities Of Phthalocyanines—V. Photodynamic Therapy Of Emt-6 Mammary Tumors In Mice With Sulfonated Phthalocyanines. *Photochemistry and Photobiology* **1987**, 45 (5), 581–586. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1987.tb07383.x>.
- (96) Allen, C. M.; Langlois, R.; Sharman, W. M.; La Madeleine, C.; Lier, J. E. Photodynamic Properties of Amphiphilic Derivatives of Aluminum Tetrasulfophthalocyanine. *Photochemistry and Photobiology* **2002**, 76 (2), 208–216. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)0760208PPOADO2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0760208PPOADO2.0.CO2).
- (97) Tardivo, J. P.; Del Giglio, A.; de Oliveira, C. S.; Gabrielli, D. S.; Junqueira, H. C.; Tada, D. B.; Severino, D.; de Fátima Turchiello, R.; Baptista, M. S. Methylene Blue in Photodynamic Therapy: From Basic Mechanisms to Clinical Applications. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2005**, 2 (3), 175–191. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00097-9](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00097-9).
- (98) Samy, N. A.; Salah, M. M.; Ali, M. F.; Sadek, A. M. Effect of Methylene Blue-Mediated Photodynamic Therapy for Treatment of Basal Cell Carcinoma. *Lasers in Medical Science* **2015**, 30 (1), 109–115. <https://doi.org/10.1007/s10103-014-1609-1>.
- (99) Alexander, W. American Society of Clinical Oncology, 2010 Annual Meeting and Rose Bengal: From a Wool Dye to a Cancer Therapy. *P T* **2010**, 35 (8), 469–478.

- (100) Sharma, K. V.; Davids, L. M. Hypericin-PDT-Induced Rapid Necrotic Death in Human Squamous Cell Carcinoma Cultures after Multiple Treatment. *Cell Biology International* **2012**, *36* (12), 1261–1266. <https://doi.org/10.1042/CBI20120108>.
- (101) Mroz, P.; Pawlak, A.; Satti, M.; Lee, H.; Wharton, T.; Gali, H.; Sarna, T.; Hamblin, M. R. Functionalized Fullerenes Mediate Photodynamic Killing of Cancer Cells: Type I versus Type II Photochemical Mechanism. *Free Radical Biology and Medicine* **2007**, *43* (5), 711–719. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.005>.
- (102) Bourré, L.; Giuntini, F.; Eggleston, I. M.; Wilson, M.; MacRobert, A. J. 5-Aminolaevulinic Acid Peptide Prodrugs Enhance Photosensitization for Photodynamic Therapy. *Molecular Cancer Therapeutics* **2008**, *7* (6), 1720–1729. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0092>.
- (103) Sol, V.; Chaleix, V.; Champavier, Y.; Granet, R.; Huang, Y.-M.; Krausz, P. Glycosyl Bis-Porphyrin Conjugates: Synthesis and Potential Application in PDT. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006**, *14* (23), 7745–7760. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.08.004>.
- (104) Michael Luciano; Christian Brückner. Modifications of Porphyrins and Hydroporphyrins for Their Solubilization in Aqueous Media. *Molecules* **2017**, *22* (6), 980. <https://doi.org/10.3390/molecules22060980>.
- (105) Zhang, J.; Jiang, C.; Figueiró Longo, J. P.; Azevedo, R. B.; Zhang, H.; Muehlmann, L. A. An Updated Overview on the Development of New Photosensitizers for Anticancer Photodynamic Therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **2018**, *8* (2), 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.09.003>.
- (106) Bovis, M. J.; Woodhams, J. H.; Loizidou, M.; Scheglmann, D.; Bown, S. G.; MacRobert, A. J. Improved in Vivo Delivery of M-THPC via Pegylated Liposomes for Use in Photodynamic Therapy. *Journal of Controlled Release* **2012**, *157* (2), 196–205. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.085>.
- (107) Skupin-Mrugalska, P.; Piskorz, J.; Goslinski, T.; Mielcarek, J.; Konopka, K.; Düzgüneş, N. Current Status of Liposomal Porphyrinoid Photosensitizers. *Drug Discovery Today* **2013**, *18* (15–16), 776–784. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.04.003>.
- (108) Reshetov, V.; Lassalle, H.-P.; François, A.; Dumas, D.; Hupont, S.; Gräfe, S.; Filipe, V.; Jiskoot, W.; Guillemain, F.; Zorin, V.; et al. Photodynamic Therapy with Conventional and PEGylated Liposomal Formulations of MTHPC (Temoporfin): Comparison of Treatment Efficacy and Distribution Characteristics in Vivo. *International Journal of Nanomedicine* **2013**, 3817. <https://doi.org/10.2147/IJN.S51002>.
- (109) Düzgüneş, N.; Piskorz, J.; Skupin-Mrugalska, P.; Goslinski, T.; Mielcarek, J.; Konopka, K. Photodynamic Therapy of Cancer with Liposomal Photosensitizers. *Therapeutic Delivery* **2018**, *9* (11), 823–832. <https://doi.org/10.4155/tde-2018-0050>.
- (110) Tu, H.-L.; Lin, Y.-S.; Lin, H.-Y.; Hung, Y.; Lo, L.-W.; Chen, Y.-F.; Mou, C.-Y. In Vitro Studies of Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles for Photodynamic Therapy. *Advanced Materials* **2009**, *21* (2), 172–177. <https://doi.org/10.1002/adma.200800548>.
- (111) Couleaud, P.; Morosini, V.; Durand, J.-O. Silica-Based Nanoparticles for Photodynamic Therapy Applications. **2010**, 15.
- (112) Rizzi, M.; Tonello, S.; Estevão, B. M.; Gianotti, E.; Marchese, L.; Renò, F. Verteporfin Based Silica Nanoparticle for in Vitro Selective Inhibition of Human Highly Invasive Melanoma Cell Proliferation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2017**, *167*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.12.021>.

- (113) Yuan, F.; Li, J.-L.; Cheng, H.; Zeng, X.; Zhang, X.-Z. A Redox-Responsive Mesoporous Silica Based Nanoplatfrom for *in Vitro* Tumor-Specific Fluorescence Imaging and Enhanced Photodynamic Therapy. *Biomaterials Science* **2018**, *6* (1), 96–100. <https://doi.org/10.1039/C7BM00793K>.
- (114) Berwin Singh, S. V.; Kim, J.; Park, H.; Khang, G.; Lee, D. Novel Chemi-Dynamic Nanoparticles as a Light-Free Photodynamic Therapeutic System for Cancer Treatment. *Macromol. Res.* **2017**, *25* (7), 749–755. <https://doi.org/10.1007/s13233-017-5078-9>.
- (115) Chu, M.; Li, H.; Wu, Q.; Wo, F.; Shi, D. Pluronic-Encapsulated Natural Chlorophyll Nanocomposites for *in Vivo* Cancer Imaging and Photothermal/Photodynamic Therapies. *Biomaterials* **2014**, *35* (29), 8357–8373. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.05.049>.
- (116) Gjuroski, I.; Furrer, J.; Vermathen, M. How Does the Encapsulation of Porphyrinic Photosensitizers into Polymer Matrices Affect Their Self-Association and Dynamic Properties? *ChemPhysChem* **2018**, *19* (9), 1089–1102. <https://doi.org/10.1002/cphc.201701318>.
- (117) Montanha, M. C.; Silva, L. L.; Pangoni, F. B. B.; Cesar, G. B.; Gonçalves, R. S.; Caetano, W.; Hioka, N.; Tominaga, T. T.; Consolaro, M. E. L.; Diniz, A.; et al. Response Surface Method Optimization of a Novel Hypericin Formulation in P123 Micelles for Colorectal Cancer and Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2017**, *170*, 247–255. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.04.008>.
- (118) Vilsinski, B. H.; Gerola, A. P.; Enumo, J. A.; Campanholi, K. da S. S.; Pereira, P. C. de S.; Braga, G.; Hioka, N.; Kimura, E.; Tessaro, A. L.; Caetano, W. Formulation of Aluminum Chloride Phthalocyanine in Pluronic™ P-123 and F-127 Block Copolymer Micelles: Photophysical Properties and Photodynamic Inactivation of Microorganisms. *Photochemistry and Photobiology* **2015**, *91* (3), 518–525. <https://doi.org/10.1111/php.12421>.
- (119) Zhiyentayev, T. M.; Boltaev, U. T.; Solov'eva, A. B.; Aksenova, N. A.; Glagolev, N. N.; Chernjak, A. V.; Melik-Nubarov, N. S. Complexes of Chlorin E6 with Pluronics and Polyvinylpyrrolidone: Structure and Photodynamic Activity in Cell Culture. *Photochemistry and Photobiology* **2014**, *90* (1), 171–182. <https://doi.org/10.1111/php.12181>.
- (120) Han, Y.; Chen, Z.; Zhao, H.; Zha, Z.; Ke, W.; Wang, Y.; Ge, Z. Oxygen-Independent Combined Photothermal/Photodynamic Therapy Delivered by Tumor Acidity-Responsive Polymeric Micelles. *Journal of Controlled Release* **2018**, *284*, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.06.012>.
- (121) Jing, C.; Wang, R.; Ou, H.; Li, A.; An, Y.; Guo, S.; Shi, L. Axial Modification Inhibited H-Aggregation of Phthalocyanines in Polymeric Micelles for Enhanced PDT Efficacy. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (32), 3985–3988. <https://doi.org/10.1039/C7CC09954A>.
- (122) Lamch, Ł.; Tylus, W.; Jewgiński, M.; Latajka, R.; Wilk, K. A. Location of Varying Hydrophobicity Zinc(II) Phthalocyanine-Type Photosensitizers in Methoxy Poly(Ethylene Oxide) and Poly(L-Lactide) Block Copolymer Micelles Using ¹H NMR and XPS Techniques. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120* (49), 12768–12780. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b10267>.
- (123) Li, J.; Yao, S.; Wang, K.; Lu, Z.; Su, X.; Li, L.; Yuan, C.; Feng, J.; Yan, S.; Kong, B.; et al. Hypocrellin B-Loaded, Folate-Conjugated Polymeric Micelle for Intraperitoneal

- Targeting of Ovarian Cancer in Vitro and in Vivo. *Cancer Science* **2018**, *109* (6), 1958–1969. <https://doi.org/10.1111/cas.13605>.
- (124) Wennink, J. W. H.; Liu, Y.; Mäkinen, P. I.; Setaro, F.; de la Escosura, A.; Bourajaj, M.; Lappalainen, J. P.; Holappa, L. P.; van den Dikkenberg, J. B.; al Fartousi, M.; et al. Macrophage Selective Photodynamic Therapy by Meta-Tetra(Hydroxyphenyl)Chlorin Loaded Polymeric Micelles: A Possible Treatment for Cardiovascular Diseases. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2017**, *107*, 112–125. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.06.038>.
- (125) Yang, T.; Liu, L.; Deng, Y.; Guo, Z.; Zhang, G.; Ge, Z.; Ke, H.; Chen, H. Ultrastable Near-Infrared Conjugated-Polymer Nanoparticles for Dually Photoactive Tumor Inhibition. *Advanced Materials* **2017**, *29* (31), 1700487. <https://doi.org/10.1002/adma.201700487>.
- (126) Grossen, P.; Witzigmann, D.; Sieber, S.; Huwyler, J. PEG-PCL-Based Nanomedicines: A Biodegradable Drug Delivery System and Its Application. *Journal of Controlled Release* **2017**, *260*, 46–60. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.05.028>.
- (127) Yu, W.; Ye, M.; Zhu, J.; Wang, Y.; Liang, C.; Tang, J.; Tao, H.; Shen, Y. Zinc Phthalocyanine Encapsulated in Polymer Micelles as a Potent Photosensitizer for the Photodynamic Therapy of Osteosarcoma. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2018**, *14* (4), 1099–1110. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.02.005>.
- (128) Huang, Y.; Ma, D.; Pan, S.; Lin, P.; Lin, Y.; Yang, H.; Peng, Y. Comparative Study of Aluminum Phthalocyanine Incorporating into Two Types of Block Copolymer: Photo-Physical Property, Size, and in Vitro Photodynamic Therapy Efficacy. *J Nanopart Res* **2015**, *17* (1), 41. <https://doi.org/10.1007/s11051-014-2819-y>.
- (129) Jang, W.-D.; Nishiyama, N.; Zhang, G.-D.; Harada, A.; Jiang, D.-L.; Kawauchi, S.; Morimoto, Y.; Kikuchi, M.; Koyama, H.; Aida, T.; et al. Supramolecular Nanocarrier of Anionic Dendrimer Porphyrins with Cationic Block Copolymers Modified with Polyethylene Glycol to Enhance Intracellular Photodynamic Efficacy. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44* (3), 419–423. <https://doi.org/10.1002/anie.200461603>.
- (130) Chen, H.; Xiao, L.; Anraku, Y.; Mi, P.; Liu, X.; Cabral, H.; Inoue, A.; Nomoto, T.; Kishimura, A.; Nishiyama, N.; et al. Polyion Complex Vesicles for Photoinduced Intracellular Delivery of Amphiphilic Photosensitizer. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (1), 157–163. <https://doi.org/10.1021/ja406992w>.
- (131) Zhang, G.-D.; Harada, A.; Nishiyama, N.; Jiang, D.-L.; Koyama, H.; Aida, T.; Kataoka, K. Polyion Complex Micelles Entrapping Cationic Dendrimer Porphyrin: Effective Photosensitizer for Photodynamic Therapy of Cancer. *Journal of Controlled Release* **2003**, *93* (2), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2003.05.002>.
- (132) Zhao, L.; Ma, R.; Li, J.; Li, Y.; An, Y.; Shi, L. J- and H-Aggregates of 5,10,15,20-Tetrakis-(4-Sulfonatophenyl)-Porphyrin and Interconversion in PEG-b-P4VP Micelles. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (10), 2601–2608. <https://doi.org/10.1021/bm8004808>.
- (133) Zheng, R.; Wu, Z.; Yan, Y.; Wang, J.; Huang, J. Suppressing Singlet Oxygen Formation from 5,10,15,20-Tetrakis(4-Sulfonatophenyl)Porphyrin Using Polyion Complex Micelles. *RSC Adv.* **2015**, *5* (22), 17253–17256. <https://doi.org/10.1039/C4RA16259E>.
- (134) Castriciano, M. A.; Zagami, R.; Casaletto, M. P.; Martel, B.; Trapani, M.; Romeo, A.; Villari, V.; Sciortino, M. T.; Grasso, L.; Guglielmino, S.; et al. Poly(Carboxylic Acid)-Cyclodextrin/Anionic Porphyrin Finished Fabrics as Photosensitizer Releasers for

- Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (4), 1134–1144. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01752>.
- (135) Conte, C.; Scala, A.; Siracusano, G.; Sortino, G.; Pennisi, R.; Piperno, A.; Miro, A.; Ungaro, F.; Sciortino, M. T.; Quaglia, F.; et al. Nanoassemblies Based on Non-Ionic Amphiphilic Cyclodextrin Hosting Zn(II)-Phthalocyanine and Docetaxel: Design, Physicochemical Properties and Intracellular Effects. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2016**, *146*, 590–597. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.06.047>.
- (136) Xiong, H.; Zhou, D.; Zheng, X.; Qi, Y.; Wang, Y.; Jing, X.; Huang, Y. Stable Amphiphilic Supramolecular Self-Assembly Based on Cyclodextrin and Carborane for the Efficient Photodynamic Therapy. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (24), 3422–3425. <https://doi.org/10.1039/C6CC10059G>.
- (137) Shen, L.; Huang, Y.; Chen, D.; Qiu, F.; Ma, C.; Jin, X.; Zhu, X.; Zhou, G.; Zhang, Z. PH-Responsive Aerobic Nanoparticles for Effective Photodynamic Therapy. *Theranostics* **2017**, *7* (18), 4537–4550. <https://doi.org/10.7150/thno.19546>.
- (138) Xue, Y.; Tian, J.; Xu, L.; Liu, Z.; Shen, Y.; Zhang, W. Ultrasensitive Redox-Responsive Porphyrin-Based Polymeric Nanoparticles for Enhanced Photodynamic Therapy. *European Polymer Journal* **2019**, *110*, 344–354. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.11.033>.
- (139) Tian, J.; Xu, L.; Xue, Y.; Jiang, X.; Zhang, W. Enhancing Photochemical Internalization of DOX through a Porphyrin-Based Amphiphilic Block Copolymer. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (12), 3992–4001. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01037>.
- (140) Lodish, H. F. *Molecular Cell Biology*, Eighth edition.; W.H. Freeman-Macmillan Learning: New York, 2016.
- (141) Edmondson, R.; Broglie, J. J.; Adcock, A. F.; Yang, L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *ASSAY and Drug Development Technologies* **2014**, *12* (4), 207–218. <https://doi.org/10.1089/ad.2014.573>.
- (142) Lin, R.-Z.; Chang, H.-Y. Recent Advances in Three-Dimensional Multicellular Spheroid Culture for Biomedical Research. *Biotechnology Journal* **2008**, *3* (9–10), 1172–1184. <https://doi.org/10.1002/biot.200700228>.
- (143) Barthel, M. J.; Rinkenauer, A. C.; Wagner, M.; Mansfeld, U.; Hoepfner, S.; Czaplewski, J. A.; Gottschaldt, M.; Träger, A.; Schacher, F. H.; Schubert, U. S. Small but Powerful: Co-Assembly of Polyether-Based Triblock Terpolymers into Sub-30 Nm Micelles and Synergistic Effects on Cellular Interactions. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (7), 2426–2439. <https://doi.org/10.1021/bm5002894>.
- (144) Malcolm, D. W.; Freeberg, M. A. T.; Wang, Y.; Sims, K. R.; Awad, H. A.; Benoit, D. S. W. Diblock Copolymer Hydrophobicity Facilitates Efficient Gene Silencing and Cytocompatible Nanoparticle-Mediated siRNA Delivery to Musculoskeletal Cell Types. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (11), 3753–3765. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01349>.
- (145) Nawaz, S.; Redhead, M.; Mantovani, G.; Alexander, C.; Bosquillon, C.; Carbone, P. Interactions of PEO–PPO–PEO Block Copolymers with Lipid Membranes: A Computational and Experimental Study Linking Membrane Lysis with Polymer Structure. *Soft Matter* **2012**, *8* (25), 6744. <https://doi.org/10.1039/c2sm25327e>.
- (146) Mebarek, N.; Aubert-Pouessel, A.; Gérardin, C.; Vicente, R.; Devoisselle, J.-M.; Bégu, S. Polymeric Micelles Based on Poly(Methacrylic Acid) Block-Containing Copolymers with Different Membrane Destabilizing Properties for Cellular Drug Delivery. *International*

- Journal of Pharmaceutics* **2013**, 454 (2), 611–620. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.06.014>.
- (147) Sandez-Macho, I.; Casas, M.; Lage, E. V.; Rial-Hermida, M. I.; Concheiro, A.; Alvarez-Lorenzo, C. Interaction of Poloxamine Block Copolymers with Lipid Membranes: Role of Copolymer Structure and Membrane Cholesterol Content. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2015**, 133, 270–277. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.06.019>.
- (148) Zhao, F.; Zhao, Y.; Liu, Y.; Chang, X.; Chen, C.; Zhao, Y. Cellular Uptake, Intracellular Trafficking, and Cytotoxicity of Nanomaterials. *Small* **2011**, 7 (10), 1322–1337. <https://doi.org/10.1002/sml.201100001>.
- (149) Cheng, L.-C.; Jiang, X.; Wang, J.; Chen, C.; Liu, R.-S. Nano–Bio Effects: Interaction of Nanomaterials with Cells. *Nanoscale* **2013**, 5 (9), 3547–3569. <https://doi.org/10.1039/C3NR34276J>.
- (150) Kerdous, R.; Sureau, F.; Bour, A.; Bonneau, S. Release Kinetics of an Amphiphilic Photosensitizer by Block-Polymer Nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* **2015**, 495 (2), 750–760. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.09.032>.
- (151) Till, U.; Gibot, L.; Mingotaud, A.-F.; Ehrhart, J.; Wasungu, L.; Mingotaud, C.; Souchard, J.-P.; Poinso, A.; Rols, M.-P.; Violleau, F.; et al. Drug Release by Direct Jump from Poly(Ethylene-Glycol-b-ε-Caprolactone) Nano-Vector to Cell Membrane. *Molecules* **2016**, 21 (12). <https://doi.org/10.3390/molecules21121643>.
- (152) Wan, J.; Sun, L.; Wu, P.; Wang, F.; Guo, J.; Cheng, J.; Wang, C. Synthesis of Indocyanine Green Functionalized Comblike Poly(Aspartic Acid) Derivatives for Enhanced Cancer Cell Ablation by Targeting the Endoplasmic Reticulum. *Polym. Chem.* **2018**, 9 (10), 1206–1215. <https://doi.org/10.1039/C7PY01994G>.
- (153) Reeves, J. P.; Dowben, R. M. Formation and Properties of Thin-Walled Phospholipid Vesicles. *Journal of Cellular Physiology* **1969**, 73 (1), 49–60. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040730108>.
- (154) Rodriguez, N.; Pincet, F.; Cribier, S. Giant Vesicles Formed by Gentle Hydration and Electroformation: A Comparison by Fluorescence Microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2005**, 42 (2), 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.01.010>.
- (155) Angelova, M. I.; Dimitrov, D. S. Liposome Electroformation. *Faraday Discussions of the Chemical Society* **1986**, 81, 303. <https://doi.org/10.1039/dc9868100303>.
- (156) Arriaga, L. R.; Datta, S. S.; Kim, S.-H.; Amstad, E.; Kodger, T. E.; Monroy, F.; Weitz, D. A. Ultrathin Shell Double Emulsion Templated Giant Unilamellar Lipid Vesicles with Controlled Microdomain Formation. *Small* **2014**, 10 (5), 950–956. <https://doi.org/10.1002/sml.201301904>.
- (157) Stein, H.; Spindler, S.; Bonakdar, N.; Wang, C.; Sandoghdar, V. Production of Isolated Giant Unilamellar Vesicles under High Salt Concentrations. *Frontiers in Physiology* **2017**, 8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00063>.
- (158) Peterson, I. R. Langmuir-Blodgett Films. *Journal of Physics D: Applied Physics* **1990**, 23 (4), 379–395. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/23/4/001>.
- (159) Mingeot-Leclercq, M.-P.; Deleu, M.; Brasseur, R.; Dufrêne, Y. F. Atomic Force Microscopy of Supported Lipid Bilayers. *Nature Protocols* **2008**, 3 (10), 1654–1659. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.149>.
- (160) Dols-Perez, A.; Fumagalli, L.; Simonsen, A. C.; Gomila, G. Ultrathin Spin-Coated Dioleoylphosphatidylcholine Lipid Layers in Dry Conditions: A Combined Atomic Force

- Microscopy and Nanomechanical Study. *Langmuir* **2011**, *27* (21), 13165–13172. <https://doi.org/10.1021/la202942j>.
- (161) Hohner, A. O.; David, M. P. C.; Rädler, J. O. Controlled Solvent-Exchange Deposition of Phospholipid Membranes onto Solid Surfaces. *Biointerphases* **2010**, *5* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1116/1.3319326>.
- (162) Sekula-Neuner, S.; Maier, J.; Oppong, E.; Cato, A. C. B.; Hirtz, M.; Fuchs, H. Allergen Arrays for Antibody Screening and Immune Cell Activation Profiling Generated by Parallel Lipid Dip-Pen Nanolithography. *Small* **2012**, *8* (4), 585–591. <https://doi.org/10.1002/sml.201101694>.
- (163) Hasan, I. Y.; Mechler, A. Viscoelastic Changes Measured in Partially Suspended Single Bilayer Membranes. *Soft Matter* **2015**, *11* (27), 5571–5579. <https://doi.org/10.1039/C5SM00278H>.
- (164) Kügler, R.; Knoll, W. Polyelectrolyte-Supported Lipid Membranes. *Bioelectrochemistry* **2002**, *56* (1–2), 175–178. [https://doi.org/10.1016/S1567-5394\(02\)00031-2](https://doi.org/10.1016/S1567-5394(02)00031-2).
- (165) Naumann, C. A.; Prucker, O.; Lehmann, T.; Rühle, J.; Knoll, W.; Frank, C. W. The Polymer-Supported Phospholipid Bilayer: Tethering as a New Approach to Substrate–Membrane Stabilization. *Biomacromolecules* **2002**, *3* (1), 27–35. <https://doi.org/10.1021/bm0100211>.
- (166) Becucci, L.; Faragher, R. J.; Schwan, A. The Effect of the Hydrophilic Spacer Length on the Functionality of a Mercury-Supported Tethered Bilayer Lipid Membrane. *Bioelectrochemistry* **2015**, *101*, 92–96. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.08.012>.
- (167) Chadli, M.; Rebaud, S.; Maniti, O.; Tillier, B.; Cortès, S.; Girard-Egrot, A. New Tethered Phospholipid Bilayers Integrating Functional G-Protein-Coupled Receptor Membrane Proteins. *Langmuir* **2017**, *33* (39), 10385–10401. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b01636>.
- (168) Andersson, J.; Fuller, M. A.; Wood, K.; Holt, S. A.; Köper, I. A Tethered Bilayer Lipid Membrane That Mimics Microbial Membranes. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2018**, *20* (18), 12958–12969. <https://doi.org/10.1039/C8CP01346B>.
- (169) Winterhalter, M. Black Lipid Membranes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2000**, *5* (3–4), 250–255. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(00\)00063-7](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(00)00063-7).
- (170) Rajapaksha, S. P.; Wang, X.; Lu, H. P. Suspended Lipid Bilayer for Optical and Electrical Measurements of Single Ion Channel Proteins. *Analytical Chemistry* **2013**, *85* (19), 8951–8955. <https://doi.org/10.1021/ac401342u>.
- (171) Tadaki, D.; Yamaura, D.; Araki, S.; Yoshida, M.; Arata, K.; Ohori, T.; Ishibashi, K.; Kato, M.; Ma, T.; Miyata, R.; et al. Mechanically Stable Solvent-Free Lipid Bilayers in Nano- and Micro-Tapered Apertures for Reconstitution of Cell-Free Synthesized HERG Channels. *Scientific Reports* **2017**, *7* (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17905-x>.
- (172) Dugger, M. E.; Baker, C. A. Automated Formation of Black Lipid Membranes within a Microfluidic Device via Confocal Fluorescence Feedback-Controlled Hydrostatic Pressure Manipulations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2019**, *411* (19), 4605–4614. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1550-4>.
- (173) Okuno, T.; Yokomizo, T. Basic Techniques for Lipid Extraction from Tissues and Cells. In *Bioactive Lipid Mediators*; Yokomizo, T., Murakami, M., Eds.; Springer Japan: Tokyo, 2015; pp 331–336. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55669-5_23.
- (174) Bittame, A.; Lopez, J.; Effantin, G.; Blanchard, N.; Cesbron-Delauw, M.-F.; Gagnon, J.; Mercier, C. Lipid Extraction from HeLa Cells, Quantification of Lipids, Formation of

- Large Unilamellar Vesicles (LUVs) by Extrusion and in Vitro Protein-Lipid Binding Assays, Analysis of the Incubation Product by Transmission Electron Microscopy (TEM) and by Flotation across a Discontinuous Sucrose Gradient. *BIO-PROTOCOL* **2016**, 6 (20). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1963>.
- (175) Goennenwein, S.; Tanaka, M.; Hu, B.; Moroder, L.; Sackmann, E. Functional Incorporation of Integrins into Solid Supported Membranes on Ultrathin Films of Cellulose: Impact on Adhesion. *Biophysical Journal* **2003**, 85 (1), 646–655. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74508-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74508-1).
- (176) Cohen, S.; Ushiro, H.; Stoscheck, C.; Chinkers, M. A Native 170,000 Epidermal Growth Factor Receptor-Kinase Complex from Shed Plasma Membrane Vesicles. *J. Biol. Chem.* **1982**, 257 (3), 1523–1531.
- (177) Del Piccolo, N.; Placone, J.; He, L.; Agudelo, S. C.; Hristova, K. Production of Plasma Membrane Vesicles with Chloride Salts and Their Utility as a Cell Membrane Mimetic for Biophysical Characterization of Membrane Protein Interactions. *Analytical Chemistry* **2012**, 84 (20), 8650–8655. <https://doi.org/10.1021/ac301776j>.
- (178) Chiang, P.-C.; Tanady, K.; Huang, L.-T.; Chao, L. Rupturing Giant Plasma Membrane Vesicles to Form Micron-Sized Supported Cell Plasma Membranes with Native Transmembrane Proteins. *Scientific Reports* **2017**, 7 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15103-3>.
- (179) Lyu, S.-W.; Wang, J.-F.; Chao, L. Constructing Supported Cell Membranes with Controllable Orientation. *Scientific Reports* **2019**, 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39075-8>.
- (180) Lärmer, J.; Schneider, S. W.; Danker, T.; Schwab, A.; Oberleithner, H. Imaging Excised Apical Plasma Membrane Patches of MDCK Cells in Physiological Conditions with Atomic Force Microscopy. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* **1997**, 434 (3), 254–260.
- (181) Perez, J.-B.; Martinez, K. L.; Segura, J.-M.; Vogel, H. Supported Cell-Membrane Sheets for Functional Fluorescence Imaging of Membrane Proteins. *Advanced Functional Materials* **2006**, 16 (2), 306–312. <https://doi.org/10.1002/adfm.200500236>.
- (182) Lombardo, D.; Calandra, P.; Magazù, S.; Wanderlingh, U.; Barreca, D.; Pasqua, L.; Kiselev, M. A. Soft Nanoparticles Charge Expression within Lipid Membranes: The Case of Amino Terminated Dendrimers in Bilayers Vesicles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2018**, 170, 609–616. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.06.031>.
- (183) Wilkosz, N.; Jamróz, D.; Kopeć, W.; Nakai, K.; Yusa, S.; Wytrwal-Sarna, M.; Bednar, J.; Nowakowska, M.; Kepczynski, M. Effect of Polycation Structure on Interaction with Lipid Membranes. *The Journal of Physical Chemistry B* **2017**, 121 (30), 7318–7326. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b05248>.
- (184) Pereira, L. S. A.; Camacho, S. A.; Malfatti-Gasperini, A. A.; Jochelavicius, K.; Nobre, T. M.; Oliveira, O. N.; Aoki, P. H. B. Evidence of Photoinduced Lipid Hydroperoxidation in Langmuir Monolayers Containing Eosin Y. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2018**, 171, 682–689. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.002>.
- (185) Novikova, N. N.; Yakunin, S. N.; Morozov, V. N.; Shlyapnikova, E. A.; Kanev, I. L.; Shlyapnikov, Yu. M.; Stepina, N. D.; Rogachev, A. V.; Koval'chuk, M. V. Studying the Molecular Mechanisms of Interaction of Nanoaerosol Particles with a Model Membrane. *Crystallography Reports* **2018**, 63 (2), 228–233. <https://doi.org/10.1134/S1063774518020165>.

- (186) Henry, S.; Bercu, N. B.; Bobo, C.; Cullin, C.; Molinari, M.; Lecomte, S. Interaction of A β 1–42 Peptide or Their Variant with Model Membrane of Different Composition Probed by Infrared Nanospectroscopy. *Nanoscale* **2018**, *10* (3), 936–940. <https://doi.org/10.1039/C7NR07489A>.
- (187) Mertins, O.; Bacellar, I. O. L.; Thalmann, F.; Marques, C. M.; Baptista, M. S.; Itri, R. Physical Damage on Giant Vesicles Membrane as a Result of Methylene Blue Photoirradiation. *Biophysical Journal* **2014**, *106* (1), 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.11.4457>.
- (188) Kerdous, R.; Heuvingh, J.; Bonneau, S. Photo-Dynamic Induction of Oxidative Stress within Cholesterol-Containing Membranes: Shape Transitions and Permeabilization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2011**, *1808* (12), 2965–2972. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.08.002>.
- (189) Jamasbi, E.; Hossain, M. A.; Tan, M.; Separovic, F.; Ciccotosto, G. D. Fluorescence Imaging of the Interaction of Amyloid Beta 40 Peptides with Live Cells and Model Membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2018**, *1860* (9), 1609–1615. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.01.024>.
- (190) Chelladurai, R.; Debnath, K.; Jana, N. R.; Basu, J. K. Nanoscale Heterogeneities Drive Enhanced Binding and Anomalous Diffusion of Nanoparticles in Model Biomembranes. *Langmuir* **2018**, *34* (4), 1691–1699. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b04003>.
- (191) Vyšniauskas, A.; Qurashi, M.; Kuimova, M. K. A Molecular Rotor That Measures Dynamic Changes of Lipid Bilayer Viscosity Caused by Oxidative Stress. *Chemistry - A European Journal* **2016**, *22* (37), 13210–13217. <https://doi.org/10.1002/chem.201601925>.
- (192) Lee, S.-C.; Heo, J.; Woo, H. C.; Lee, J.-A.; Seo, Y. H.; Lee, C.-L.; Kim, S.; Kwon, O.-P. Fluorescent Molecular Rotors for Viscosity Sensors. *Chemistry - A European Journal* **2018**, *24* (52), 13706–13718. <https://doi.org/10.1002/chem.201801389>.
- (193) Haluska, C. K.; Schröder, A. P.; Didier, P.; Heissler, D.; Duportail, G.; Mély, Y.; Marques, C. M. Combining Fluorescence Lifetime and Polarization Microscopy to Discriminate Phase Separated Domains in Giant Unilamellar Vesicles. *Biophysical Journal* **2008**, *95* (12), 5737–5747. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.131490>.
- (194) Yaroslavov, A. A.; Sitnikova, T. A.; Rakhnyanskaya, A. A.; Yaroslavova, E. G.; Sybachin, A. V.; Melik-Nubarov, N. S.; Khomutov, G. B. Variable and Low-Toxic Polyampholytes: Complexation with Biological Membranes. *Colloid and Polymer Science* **2017**, *295* (8), 1405–1417. <https://doi.org/10.1007/s00396-017-4054-4>.
- (195) Massiot, J.; Makky, A.; Di Meo, F.; Chapron, D.; Trouillas, P.; Rosilio, V. Impact of Lipid Composition and Photosensitizer Hydrophobicity on the Efficiency of Light-Triggered Liposomal Release. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2017**, *19* (18), 11460–11473. <https://doi.org/10.1039/C7CP00983F>.
- (196) Kettiger, H.; Québatte, G.; Perrone, B.; Huwyler, J. Interactions between Silica Nanoparticles and Phospholipid Membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2016**, *1858* (9), 2163–2170. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.06.023>.
- (197) Cruz Gomes da Silva, R. L.; Oliveira da Silva, H. F.; da Silva Gasparotto, L. H.; Caseli, L. How the Interaction of PVP-Stabilized Ag Nanoparticles with Models of Cellular Membranes at the Air-Water Interface Is Modulated by the Monolayer Composition. *Journal of Colloid and Interface Science* **2018**, *512*, 792–800. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.10.091>.

- (198) Heuvingh, J.; Bonneau, S. Asymmetric Oxidation of Giant Vesicles Triggers Curvature-Associated Shape Transition and Permeabilization. *Biophysical Journal* **2009**, *97* (11), 2904–2912. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.08.056>.
- (199) Weber, G.; Charitat, T.; Baptista, M. S.; Uchoa, A. F.; Pavani, C.; Junqueira, H. C.; Guo, Y.; Baulin, V. A.; Itri, R.; Marques, C. M.; et al. Lipid Oxidation Induces Structural Changes in Biomimetic Membranes. *Soft Matter* **2014**, *10* (24), 4241. <https://doi.org/10.1039/c3sm52740a>.
- (200) Bacellar, I. O. L.; Oliveira, M. C.; Dantas, L. S.; Costa, E. B.; Junqueira, H. C.; Martins, W. K.; Durantini, A. M.; Cosa, G.; Di Mascio, P.; Wainwright, M.; et al. Photosensitized Membrane Permeabilization Requires Contact-Dependent Reactions between Photosensitizer and Lipids. *Journal of the American Chemical Society* **2018**, *140* (30), 9606–9615. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b05014>.
- (201) Thomas, A. H.; Catalá, Á.; Vignoni, M. Soybean Phosphatidylcholine Liposomes as Model Membranes to Study Lipid Peroxidation Photoinduced by Pterin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2016**, *1858* (1), 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.11.002>.
- (202) Mebarek, N.; Aubert-Pouëssel, A.; Gérardin, C.; Vicente, R.; Devoisselle, J.-M.; Bégu, S. Polymeric Micelles Based on Poly(Methacrylic Acid) Block-Containing Copolymers with Different Membrane Destabilizing Properties for Cellular Drug Delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **2013**, *454* (2), 611–620. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.06.014>.
- (203) Brisebois, P. P.; Arnold, A. A.; Chabre, Y. M.; Roy, R.; Marcotte, I. Comparative Study of the Interaction of Fullerenol Nanoparticles with Eukaryotic and Bacterial Model Membranes Using Solid-State NMR and FTIR Spectroscopy. *European Biophysics Journal* **2012**, *41* (6), 535–544. <https://doi.org/10.1007/s00249-012-0809-5>.
- (204) Nawaz, S.; Redhead, M.; Mantovani, G.; Alexander, C.; Bosquillon, C.; Carbone, P. Interactions of PEO–PPO–PEO Block Copolymers with Lipid Membranes: A Computational and Experimental Study Linking Membrane Lysis with Polymer Structure. *Soft Matter* **2012**, *8* (25), 6744. <https://doi.org/10.1039/c2sm25327e>.
- (205) Su, C.-F.; Merlitz, H.; Rabbel, H.; Sommer, J.-U. Nanoparticles of Various Degrees of Hydrophobicity Interacting with Lipid Membranes. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2017**, *8* (17), 4069–4076. <https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.7b01888>.
- (206) Smith, P. E. S.; Brender, J. R.; Dürr, U. H. N.; Xu, J.; Mullen, D. G.; Banaszak Holl, M. M.; Ramamoorthy, A. Solid-State NMR Reveals the Hydrophobic-Core Location of Poly(Amidoamine) Dendrimers in Biomembranes. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (23), 8087–8097. <https://doi.org/10.1021/ja101524z>.
- (207) Warschawski, D. E.; Arnold, A. A.; Beaugrand, M.; Gravel, A.; Chartrand, É.; Marcotte, I. Choosing Membrane Mimetics for NMR Structural Studies of Transmembrane Proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2011**, *1808* (8), 1957–1974. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.03.016>.
- (208) Vandoolaeghe, P.; Rennie, A. R.; Campbell, R. A.; Nylander, T. Neutron Reflectivity Studies of the Interaction of Cubic-Phase Nanoparticles with Phospholipid Bilayers of Different Coverage [†]. *Langmuir* **2009**, *25* (7), 4009–4020. <https://doi.org/10.1021/la802766n>.
- (209) Choi, D.; Moon, J. H.; Kim, H.; Sung, B. J.; Kim, M. W.; Tae, G. Y.; Satija, S. K.; Akgun, B.; Yu, C.-J.; Lee, H. W.; et al. Insertion Mechanism of Cell-Penetrating Peptides into

- Supported Phospholipid Membranes Revealed by X-Ray and Neutron Reflection. *Soft Matter* **2012**, 8 (32), 8294. <https://doi.org/10.1039/c2sm25913c>.
- (210) Michel, J. P.; Wang, Y. X.; Kiesel, I.; Gerelli, Y.; Rosilio, V. Disruption of Asymmetric Lipid Bilayer Models Mimicking the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria by an Active Plasticin. *Langmuir* **2017**, 33 (41), 11028–11039. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b02864>.
- (211) Zaki, A. M.; Carbone, P. How the Incorporation of Pluronic Block Copolymers Modulates the Response of Lipid Membranes to Mechanical Stress. *Langmuir* **2017**, 33 (46), 13284–13294. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b02244>.
- (212) Houang, E. M.; Haman, K. J.; Kim, M.; Zhang, W.; Lowe, D. A.; Sham, Y. Y.; Lodge, T. P.; Hackel, B. J.; Bates, F. S.; Metzger, J. M. Chemical End Group Modified Diblock Copolymers Elucidate Anchor and Chain Mechanism of Membrane Stabilization. *Molecular Pharmaceutics* **2017**, 14 (7), 2333–2339. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00197>.
- (213) Raman, A. S.; Pajak, J.; Chiew, Y. C. Interaction of PCL Based Self-Assembled Nano-Polymeric Micelles with Model Lipid Bilayers Using Coarse-Grained Molecular Dynamics Simulations. *Chemical Physics Letters* **2018**, 712, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2018.09.049>.
- (214) Guan, Z.; Wang, L.; Lin, J. Interaction Pathways between Plasma Membrane and Block Copolymer Micelles. *Biomacromolecules* **2017**, 18 (3), 797–807. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01674>.
- (215) Schwieger, C.; Blaffert, J.; Li, Z.; Kressler, J.; Blume, A. Perfluorinated Moieties Increase the Interaction of Amphiphilic Block Copolymers with Lipid Monolayers. *Langmuir* **2016**, 32 (32), 8102–8115. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b01574>.
- (216) Ramadurai, S.; Kohut, A.; Sarangi, N. K.; Zholobko, O.; Baulin, V. A.; Voronov, A.; Keyes, T. E. Macromolecular Inversion-Driven Polymer Insertion into Model Lipid Bilayer Membranes. *Journal of Colloid and Interface Science* **2019**, 542, 483–494. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.01.093>.
- (217) Palominos, M. A.; Vilches, D.; Bossel, E.; Soto-Arriaza, M. A. Interaction between Amphipathic Triblock Copolymers and L- α -Dipalmitoyl Phosphatidylcholine Large Unilamellar Vesicles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2016**, 148, 30–40. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.08.038>.
- (218) Zhang, W.; Haman, K. J.; Metzger, J. M.; Hackel, B. J.; Bates, F. S.; Lodge, T. P. Quantifying Binding of Ethylene Oxide–Propylene Oxide Block Copolymers with Lipid Bilayers. *Langmuir* **2017**, 33 (44), 12624–12634. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b02279>.
- (219) Roeder, B.; Hackbarth, St.; Korth, O.; Herter, R.; Hanke, T.; Hoehne, W. Photophysical Properties of Pheophorbide-a in Different Carrier-Systems. **1996**, 179–186. <https://doi.org/10.1117/12.230959>.
- (220) Eichwurz, I.; Stiel, H.; Röder, B. Photophysical Studies of the Pheophorbide a Dimer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2000**, 54 (2–3), 194–200. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(00\)00016-6](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(00)00016-6).
- (221) Kuzelova, K.; Brault, D. Kinetic and Equilibrium Studies of Porphyrin Interactions with Unilamellar Lipidic Vesicles. *Biochemistry* **1994**, 33 (32), 9447–9459. <https://doi.org/10.1021/bi00198a010>.

- (222) Tristram-Nagle, S.; Petrache, H. I.; Nagle, J. F. Structure and Interactions of Fully Hydrated Dioleoylphosphatidylcholine Bilayers. *Biophysical Journal* **1998**, *75* (2), 917–925. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77580-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77580-0).
- (223) Hinna, A. H.; Hupfeld, S.; Kuntsche, J.; Bauer-Brandl, A.; Brandl, M. Mechanism and Kinetics of the Loss of Poorly Soluble Drugs from Liposomal Carriers Studied by a Novel Flow Field-Flow Fractionation-Based Drug Release –/Transfer-Assay. *Journal of Controlled Release* **2016**, *232*, 228–237. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.04.031>.
- (224) Till, U.; Gibot, L.; Mingotaud, C.; Vicendo, P.; Rols, M.-P.; Gaucher, M.; Violleau, F.; Mingotaud, A.-F. Self-Assembled Polymeric Vectors Mixtures: Characterization of the Polymorphism and Existence of Synergistic Effects in Photodynamic Therapy. *Nanotechnology* **2016**, *27* (31), 315102. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/27/31/315102>.
- (225) Weinstein, J. N.; Blumenthal, R.; Klausner, R. D. [38] Carboxyfluorescein Leakage Assay for Lipoprotein-Liposome Interaction. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 1986; Vol. 128, pp 657–668. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(86\)28098-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(86)28098-2).
- (226) Massou, S.; Albilot, R.; Prats, M. Carboxyfluorescein Fluorescence Experiments. *Biochemical Education* **2000**, *28* (3), 171–173. <https://doi.org/10.1111/j.1539-3429.2000.tb00059.x>.
- (227) Kuimova, M. K.; Yahioglu, G.; Ogilby, P. R. Singlet Oxygen in a Cell: Spatially Dependent Lifetimes and Quenching Rate Constants. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131* (1), 332–340. <https://doi.org/10.1021/ja807484b>.
- (228) Nardi, G.; Manet, I.; Monti, S.; Miranda, M. A.; Lhiaubet-Vallet, V. Scope and Limitations of the TEMPO/EPR Method for Singlet Oxygen Detection: The Misleading Role of Electron Transfer. *Free Radical Biology and Medicine* **2014**, *77*, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.020>.
- (229) You, Y. Chemical Tools for the Generation and Detection of Singlet Oxygen. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2018**, *16* (22), 4044–4060. <https://doi.org/10.1039/C8OB00504D>.
- (230) Lindig, B. A.; Rodgers, M. A. J.; Schaap, A. P. Determination of the Lifetime of Singlet Oxygen in Water-D₂ Using 9,10-Anthracenedipropionic Acid, a Water-Soluble Probe. *Journal of the American Chemical Society* **1980**, *102* (17), 5590–5593. <https://doi.org/10.1021/ja00537a030>.
- (231) Redmond, R. W.; Kochevar, I. E. Spatially Resolved Cellular Responses to Singlet Oxygen. *Photochemistry and Photobiology* **2006**, *82* (5), 1178. <https://doi.org/10.1562/2006-04-14-IR-874>.
- (232) Egorov, S. Yu.; Kamalov, V. F.; Koroteev, N. I.; Krasnovsky, A. A.; Toleutaev, B. N.; Zinukov, S. V. Rise and Decay Kinetics of Photosensitized Singlet Oxygen Luminescence in Water. Measurements with Nanosecond Time-Correlated Single Photon Counting Technique. *Chemical Physics Letters* **1989**, *163* (4–5), 421–424. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(89\)85161-9](https://doi.org/10.1016/0009-2614(89)85161-9).
- (233) Maherani, B.; Arab-Tehrany, E.; Kheirilomoom, A.; Geny, D.; Linder, M. Calcein Release Behavior from Liposomal Bilayer; Influence of Physicochemical/Mechanical/Structural Properties of Lipids. *Biochimie* **2013**, *95* (11), 2018–2033. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.07.006>.

- (234) Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **1959**, *37* (8), 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>.
- (235) Bacellar, I. O. L.; Baptista, M. S.; Junqueira, H. C.; Wainwright, M.; Thalmann, F.; Marques, C. M.; Schroder, A. P. Permeability of DOPC Bilayers under Photoinduced Oxidation: Sensitivity to Photosensitizer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2018**, *1860* (11), 2366–2373. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.06.001>.
- (236) Runas, K. A.; Malmstadt, N. Low Levels of Lipid Oxidation Radically Increase the Passive Permeability of Lipid Bilayers. *Soft Matter* **2015**, *11* (3), 499–505. <https://doi.org/10.1039/C4SM01478B>.
- (237) Boonnoy, P.; Jarerattanachai, V.; Karttunen, M.; Wong-ekkabut, J. Bilayer Deformation, Pores, and Micellation Induced by Oxidized Lipids. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2015**, *6* (24), 4884–4888. <https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.5b02405>.
- (238) Lis, M.; Wizert, A.; Przybylo, M.; Langner, M.; Swiatek, J.; Jungwirth, P.; Cwiklik, L. The Effect of Lipid Oxidation on the Water Permeability of Phospholipids Bilayers. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2011**, *13* (39), 17555. <https://doi.org/10.1039/c1cp21009b>.
- (239) Tsubone, T. M.; Junqueira, H. C.; Baptista, M. S.; Itri, R. Contrasting Roles of Oxidized Lipids in Modulating Membrane Microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2019**, *1861* (3), 660–669. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.12.017>.
- (240) Su, C.-F.; Merlitz, H.; Thalmann, F.; Marques, C.; Sommer, J.-U. Coarse-Grained Model of Oxidized Membranes and Their Interactions with Nanoparticles of Various Degrees of Hydrophobicity. *The Journal of Physical Chemistry C* **2019**, *123* (11), 6839–6848. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b11909>.
- (241) Itri, R.; Junqueira, H. C.; Mertins, O.; Baptista, M. S. Membrane Changes under Oxidative Stress: The Impact of Oxidized Lipids. *Biophysical Reviews* **2014**, *6* (1), 47–61. <https://doi.org/10.1007/s12551-013-0128-9>.
- (242) Buwalda, S.; Al Samad, A.; El Jundi, A.; Bethry, A.; Bakkour, Y.; Coudane, J.; Nottelet, B. Stabilization of Poly(Ethylene Glycol)-Poly(ϵ -Caprolactone) Star Block Copolymer Micelles via Aromatic Groups for Improved Drug Delivery Properties. *Journal of Colloid and Interface Science* **2018**, *514*, 468–478. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.12.057>.
- (243) Bochicchio, D.; Panizon, E.; Monticelli, L.; Rossi, G. Interaction of Hydrophobic Polymers with Model Lipid Bilayers. *Scientific Reports* **2017**, *7* (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06668-0>.
- (244) Werner, M.; Auth, T.; Beales, P. A.; Fleury, J. B.; Höök, F.; Kress, H.; Van Lehn, R. C.; Müller, M.; Petrov, E. P.; Sarkisov, L.; et al. Nanomaterial Interactions with Biomembranes: Bridging the Gap between Soft Matter Models and Biological Context. *Biointerphases* **2018**, *13* (2), 028501. <https://doi.org/10.1116/1.5022145>.
- (245) Essaid, D.; Rosilio, V.; Daghighian, K.; Solgadi, A.; Vergnaud, J.; Kasselouri, A.; Chaminade, P. Artificial Plasma Membrane Models Based on Lipidomic Profiling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2016**, *1858* (11), 2725–2736. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.07.010>.
- (246) Essaid, D.; Tfayli, A.; Maillard, P.; Sandt, C.; Rosilio, V.; Baillet-Guffroy, A.; Kasselouri, A. Retinoblastoma Membrane Models and Their Interactions with Porphyrin

Photosensitisers: An Infrared Microspectroscopy Study. *Chemistry and Physics of Lipids* **2018**, 215, 34–45. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2018.07.003>.

La thérapie photodynamique (PDT), une thérapie basée sur l'irradiation de molécules photosensibilisatrices pour générer un stress oxydant, est déjà utilisée comme traitement de certaines pathologies. Très souvent, les photosensibilisateurs utilisés sont des molécules fortement hydrophobes qui s'agrègent en milieux aqueux. De ce fait, utilisées seules, elles nécessitent d'être injectées à des concentrations élevées, entraînant un risque de photosensibilisation générale. Pour diminuer cet effet secondaire et rendre le traitement plus efficace, il est possible d'encapsuler ces molécules. Des travaux précédant au sein du laboratoire des IRMCP ont permis le développement de vecteurs à base de copolymères à blocs pour l'encapsulation d'un photosensibilisateur, le phéophorbide-a. Ces travaux ont montré une efficacité de certains de ces vecteurs en conditions PDT sur des cultures cellulaires et ont ouvert des questions sur les processus de réponse cellulaire.

L'objectif de ce doctorat était de développer des outils permettant de mieux comprendre les mécanismes ayant lieu lors de l'utilisation de nanovecteurs à base de copolymères à blocs encapsulant du phéophorbide-a et lors de l'irradiation lumineuse du photosensibilisateur. Les nanovecteurs étudiés étaient des micelles formulées à base de trois copolymères différents, le PEO-PCL, le PEO-PLA et le PEO-PS. Pour simplifier le système étudié, nous avons choisi d'utiliser des modèles de membranes pour simuler la cible biologique, des liposomes (ou vésicules lipidiques). En utilisant les propriétés de fluorescence du phéophorbide-a, nous avons pu obtenir les constantes d'affinité du photosensibilisateur pour les micelles et pour les vésicules lipidiques, puis évaluer le passage du phéophorbide-a des micelles vers les vésicules. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux phénomènes en jeu lors de l'irradiation du photosensibilisateur. Nous avons pu estimer la production relative d'oxygène singulet en fonction du type de micelles utilisé. En suivant la fuite d'une sonde fluorescente contenue dans les liposomes, permettant ainsi de remonter à leur perméabilité, il a été possible de mesurer les effets de la production d'oxygène singulet sur l'intégrité de la membrane des liposomes. De manière complémentaire, nous avons suivi l'oxydation des lipides constituant les liposomes durant l'irradiation du phéophorbide-a par spectrométrie de masse.

Ces résultats combinés nous ont permis de voir quels étaient les paramètres influençant l'efficacité des micelles encapsulant un photosensibilisateur après irradiation et d'établir un classement de ceux ayant le plus d'effets sur l'intégrité de membranes modèles parmi ceux étudiés.

--

Photodynamic therapy (PDT), a therapy based on the irradiation of photosensitizing molecules to generate an oxidative stress, is already used as a treatment of some pathologies. The photosensitizers used are often highly hydrophobic molecules that aggregate in aqueous medium. Therefore, used by themselves, they require to be injected at high concentrations, leading to a risk of global photosensitization. To reduce this secondary effect and increase the effectiveness of the treatment, it is possible to encapsulate those molecules. Previous work in the IMRCP laboratory has led to the development of block copolymer-based carriers to encapsulate a photosensitizer, pheophorbide-a. This work has showed superior efficiency of some type of carriers compared to others under PDT conditions on cell culture.

The aim of this project was to develop tools to better understand the mechanisms occurring when using block copolymers-based nanocarriers encapsulating pheophorbide-a and during the irradiation of the photosensitizer. The nanocarriers studied were block copolymer-based micelles made of PEO-PCL, PEO-PLA and PEO-PS. To simplify the system studied, we chose to use liposomes as membrane models to simulate the biological target. Using the fluorescence properties of pheophorbide-a, we were able to obtain the affinity constants of the photosensitizer for the micelles and the lipid vesicles, and then evaluate the transfer of pheophorbide-a from the micelles to the vesicles. Following that, we investigated the phenomena occurring during the irradiation of the photosensitizer. We were able to estimate the relative production of singlet oxygen depending on the type of micelles used. By monitoring the leakage of a fluorescent probe contained in the liposomes, allowing us to evaluate their permeability, it was possible to measure the effects of singlet oxygen production on the integrity of the liposome membrane. Complementarily, we followed the oxidation of the lipids of the liposomes during the irradiation of pheophorbide-a by mass spectrometry.

These results combined together allowed us to see what were the parameters influencing the PDT efficiency of micelles encapsulating a photosensitizer. We managed to classify those with the greatest effect on the integrity of model membranes among those studied.