

Les nanoparticules d'or présentent également un intérêt au niveau de leur surface, qui peut être assez aisément modifiée de façon à y ajouter différentes fonctionnalités. Il est possible, par exemple, d'ajouter une couche de silice fluorescente autour des nanoparticules, ou encore de greffer à leur surface des anticorps, des protéines et même des brins d'ADN. Plusieurs groupements présentent d'ailleurs une bonne affinité pour les surfaces d'or, comme les amines et les thiols.¹² Ce projet a donc pour but d'exploiter les propriétés optiques et les propriétés de surface des nanoparticules d'or dans deux domaines connexes : le relargage contrôlé de médicaments et la détection d'ATP en milieu cellulaire.

1.1 Utilisation de nanoparticules d'or pour le relargage contrôlé de médicaments

La plupart des traitements médicaux envers un patient reposent sur l'administration d'un médicament composé d'une ou plusieurs molécules bioactives dans le corps humain. L'impact du traitement thérapeutique dépend alors de trois grands facteurs : l'efficacité du transport du médicament jusqu'au site biologique d'intérêt (une tumeur, un organe, un tissu, etc.), le contrôle de la dose administrée au site d'importance et le suivi thérapeutique permettant d'ajuster le traitement d'un patient à l'autre.¹³ Toutefois, la plupart des traitements disponibles sur le marché sont non-ciblés, ce qui diminue grandement leur efficacité. Il suffit de penser à la chimiothérapie, un traitement non-ciblé contre le cancer, qui utilise le système sanguin afin d'acheminer le médicament à travers pratiquement tout le corps. Puisque seule une fraction des molécules bioactives administrées se rend aux tumeurs cancéreuses visées, la chimiothérapie demande l'utilisation de doses élevées de médicaments. Ceci peut mener à l'apparition de nombreux effets secondaires indésirables, tels que la perte des cheveux, l'apparition de plaies buccales, la diminution de la fertilité et la dépression.¹⁴

Étant donné la complexité des barrières naturelles du système immunitaire et le manque de sélectivité des méthodes conventionnelles, le relargage contrôlé de molécules dans l'organisme représente un enjeu de taille pour l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques. De plus en plus, les recherches se tournent donc vers la médecine de précision, qui vise à personnaliser les traitements en utilisant entre autres la thérapie ciblée.¹⁵ Ce type de thérapie consiste à utiliser des nanomatériaux comme véhicules afin de transporter des médicaments vers un site spécifique grâce à un ciblage actif. En effet, les nanomatériaux peuvent être fonctionnalisés à l'aide de différents agents de ciblage qui ont une affinité pour certaines structures biologiques, comme des anticorps, des brins d'ADN ou des protéines.¹³

Dans un second temps, la thérapie ciblée utilise un stimulus externe afin de contrôler la libération du médicament. Il peut s'agir d'un stimulus physique, comme de la lumière, un changement de température ou encore des ultrasons. D'autres systèmes emploient plutôt des stimuli biologiques, comme une molécule sécrétée par un certain type de cellules, ou encore des stimuli chimiques, comme un changement de pH ou la présence d'un oxydant.¹ Le troisième aspect consiste plutôt à intégrer au nano-véhicule un système de suivi de l'effet thérapeutique. Ceci peut inclure par exemple des éléments luminescents qui seraient visible en microscopie de fluorescence,^{16,17} ou encore des nanoparticules magnétiques détectables par imagerie à résonance magnétique.¹⁸

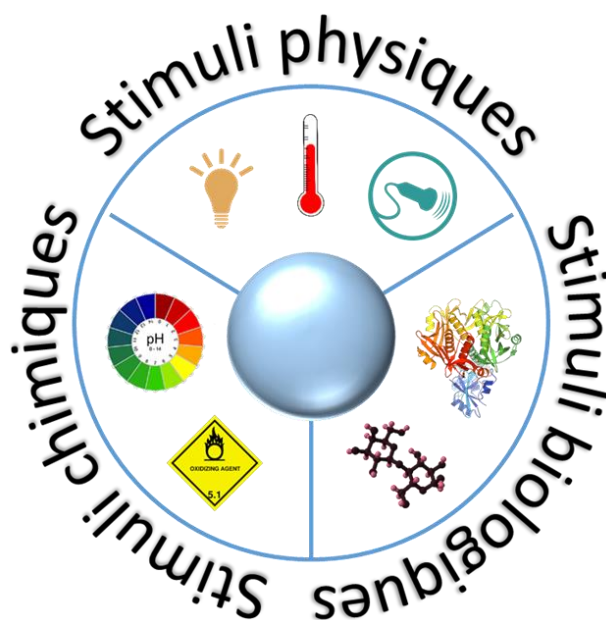


Figure 1.4 – Différents types de stimuli utilisés afin de contrôler le relargage d'un médicament.¹

Les nanoparticules d'or s'avèrent être de bons candidats afin de développer des nano-véhicules sensibles à la lumière. Les nanosphères d'or possèdent une résonance plasmonique typiquement autour de 530 nm, c'est-à-dire qu'elles peuvent absorber et diffuser la lumière dans la région du visible. Par contre, il n'est pas idéal de travailler avec le domaine du visible en milieu biologique, puisque plusieurs composantes des tissus (comme les protéines, l'eau et l'hémoglobine) possèdent un grand coefficient d'absorption à ces longueurs d'onde.¹⁹ De plus, certaines structures biologiques, telles que les acides aminés, les flavines, les porphyrines et la mélanine peuvent causer l'autofluorescence des tissus dans cette région spectrale.²⁰

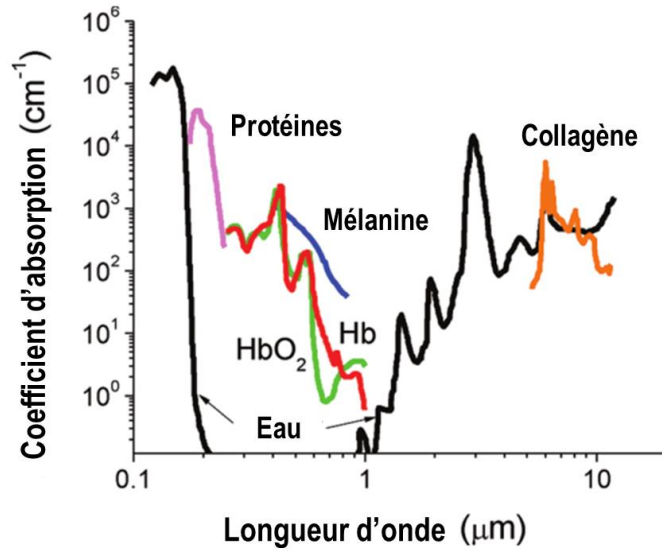


Figure 1.5 – Absorption de différents composants des tissus.¹⁹

Il est par conséquent préférable de se déplacer vers le proche infrarouge, plus spécifiquement entre 650 nm et 1450 nm, une région reconnue comme la fenêtre de transparence biologique et dans laquelle la pénétration des tissus est maximale et les dommages causés aux cellules sont limités.²¹ Certaines nanoarchitectures d'or possèdent d'ailleurs un plasmon dans cette région spectrale. Les nanobâtonnets²² de même que les nanoparticules hybrides possédant un cœur de silice et une coquille d'or¹⁸ représentent des structures intéressantes à cet égard, particulièrement pour des dimensions inférieures à 100 nm, soit une taille optimale pour l'accumulation dans les tissus biologiques.²³

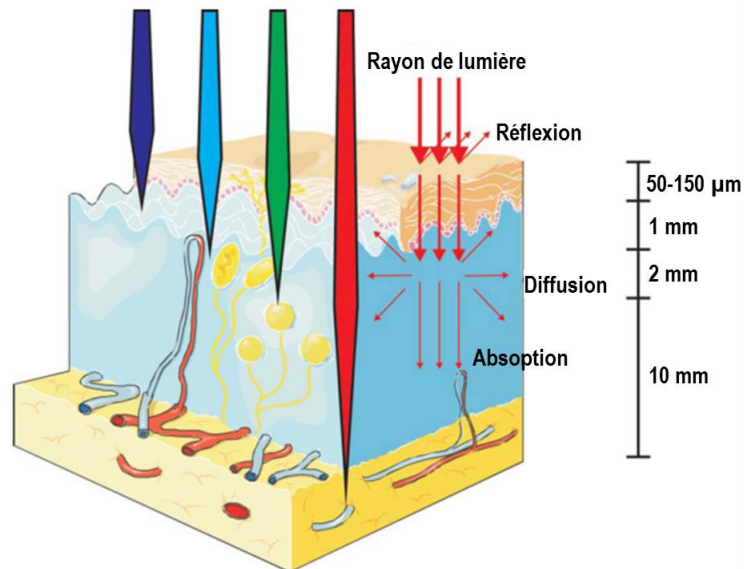


Figure 1.6 – Schéma illustrant la meilleure pénétration des tissus dans la fenêtre de transparence biologique.²¹

L'objectif du projet est donc de développer une plateforme plasmonique multifonctionnelle qui permettra à la fois d'encapsuler des molécules bioactives, de cibler la région biologique d'intérêt et d'effectuer le suivi du traitement médical en temps réel. Pour ce faire, nous avons imaginé une nanostructure basée sur un nanobâtonnet d'or entouré d'une couche de silice fluorescente et d'une couche de polymère thermosensible dans laquelle un médicament peut être encapsulé. Ce véhicule peut également être décoré d'agents de ciblage afin d'assurer le transport actif du cargo.

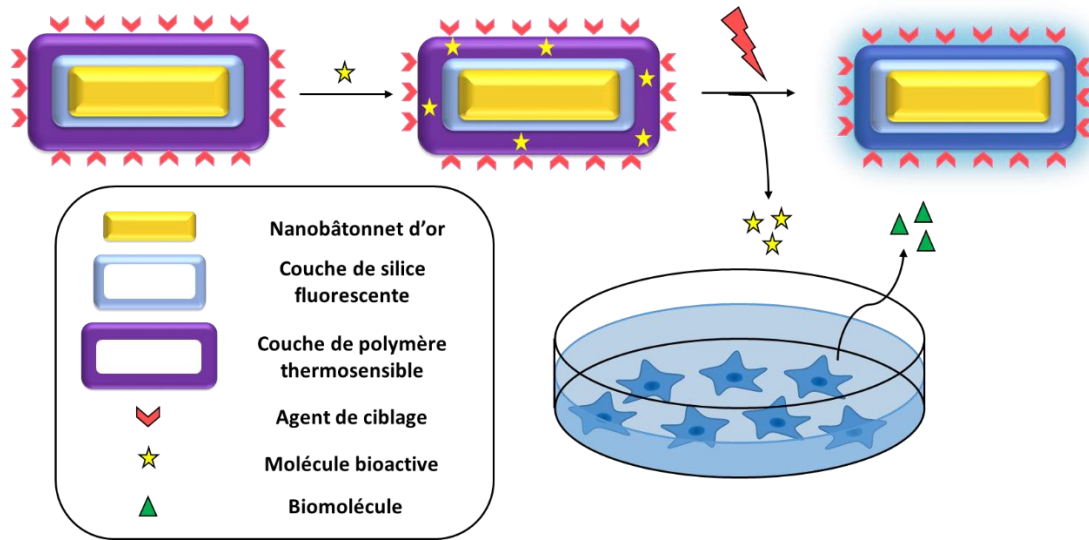


Figure 1.7 – Schéma du nano-transporteur plasmonique imaginé afin de répondre aux objectifs du projet.

Selon ce concept, en réponse à un stimulus lumineux dans le proche infrarouge, le nanobâtonnet absorbe une partie de l'énergie incidente et la transmet sous forme de chaleur à son environnement. Ceci entraîne l'affaissement de la couche de polymère, qui possède une température critique minimale de solubilité supérieure à la température du corps humain, libérant ainsi son contenu dans le milieu biologique. En réponse au traitement, les cellules génèrent alors une molécule ou un ion et, si le fluorophore incorporé dans la couche de silice y est sensible, il est alors possible de suivre le traitement en temps réel par microscopie de fluorescence.

À plus long terme, l'application visée pour ces transporteurs à nanocargos est le traitement de maladies dermatologiques orphelines, puisque la peau peut être facilement traversée par un laser dans l'infrarouge. Par contre, pour faire une preuve de concept, ces nano-véhicules seront d'abord étudiés pour effectuer la décalcification des valves aortiques dans des cultures cellulaires cardiaques. Nos collaborateurs, le Dr. Patrick Mathieu et son équipe à l'Institut universitaire de cardiologie et de

pneumologie de Québec, ont en effet développé un médicament pour traiter cette maladie, soit la 2-thiouridine-5'-triphosphate.²⁴ Puisqu'une conséquence du traitement est la libération d'ions calcium dans le milieu cellulaire, l'incorporation d'un fluorophore sensible au calcium à la couche de silice permet de faire le suivi du traitement.

1.2 Utilisation de nanoparticules d'or comme biocapteurs pour la mesure d'ATP dans des cultures cellulaires

Une des molécules les plus étudiées dans le domaine des biocapteurs est l'adénosine 5'-triphosphate (ATP). Découverte par Karl Lohmann en 1929,²⁵ sa structure consiste en un sucre, le ribose, auquel sont liées une chaîne de trois groupements phosphates ainsi qu'une base azotée portant le nom d'adénine (voir figure 1.8). L'intérêt de l'ATP provient de son rôle central en tant que source d'énergie dans le métabolisme des cellules. En effet, l'hydrolyse de l'ATP est une réaction exothermique qui alimente une grande variété de processus biologiques, tels que le transport actif transmembranaire, la division cellulaire et la synthèse de biomolécules essentielles à la survie cellulaire. Au cours de cette réaction, les sous-produits générés sont l'adénosine 5'-diphosphate (ADP) ainsi qu'un groupement phosphate libre, mais l'ADP peut être hydrolysée à son tour pour former de l'adénosine 5'-monophosphate (AMP), ce qui libère davantage d'énergie.²⁶

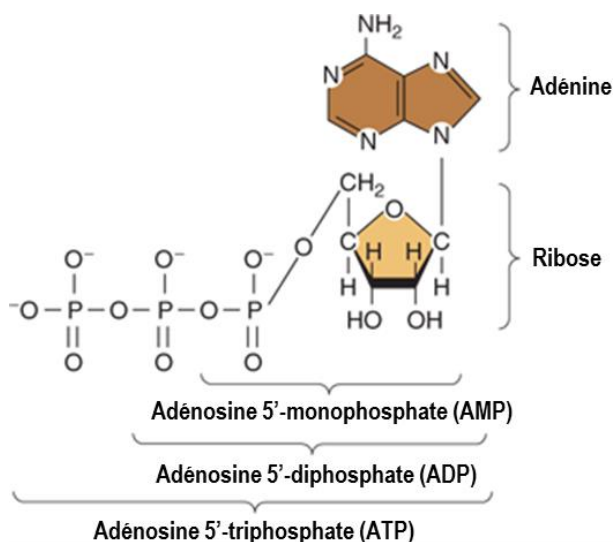


Figure 1.8 – Structure chimique de l'adénosine 5'-triphosphate et de ses sous-produits d'hydrolyse, l'adénosine 5'-diphosphate et l'adénosine 5'-monophosphate.²⁶

Étant donné le rôle vital de l'ATP pour le métabolisme, il n'est pas étonnant d'apprendre que sa concentration en milieu intracellulaire est relativement élevée; plusieurs études l'estiment dans le

domaine du faible millimolaire (1-10 mM) tout dépendant du type de cellule étudié.^{27,28} Toutefois, les chercheurs ont longtemps cru que la concentration d'ATP dans le milieu extracellulaire était nulle. À l'époque, il était illogique de penser que les cellules puissent se débarrasser d'une partie – même infime – de leur ATP, car le seul rôle qu'on lui octroyait était celui de carburant. Cette croyance était appuyée par le fait qu'aucun mécanisme de transport membranaire n'était alors connu pour l'ATP.²⁹

Cependant, des études menées à partir des années 1950 ont permis de démontrer que l'ATP est bien présente en milieu extracellulaire, bien que ce soit en faible concentration (typiquement de 20 nM à 10 µM). Il s'avère que l'ATP traverse la membrane cellulaire par exocytose et joue alors un rôle important dans la régulation de plusieurs phénomènes biologiques, comme la contraction musculaire, l'agrégation des plaquettes sanguines, la neurotransmission et la vasoconstriction.²⁹ Cette molécule est également excrétée par les cellules en réponse à un stress externe, puisqu'elle promeut la réparation tissulaire et l'activation du système immunitaire.³⁰

Afin de mieux comprendre les différents rôles de l'ATP, il est important de connaître avec précision sa concentration dans les cellules ainsi que dans leur environnement en fonction du temps. L'une des techniques les plus utilisées pour la mesure d'ATP dans le milieu extracellulaire repose sur la bioluminescence générée par une interaction entre une enzyme oxydative, une luciférase, et une molécule pouvant générer de la lumière lorsqu'elle subit une oxydation, une luciférine. De manière générale, une luciférase est utilisée pour catalyser la réaction à multiples étapes entre la D-luciférine, l'oxygène ainsi que l'ATP avec son cofacteur métallique (Mg^{2+}). L'oxyluciférine est alors formée à l'état excité et émet de la lumière à une longueur d'onde de 560 nm en retournant au niveau fondamental. Cette méthode, bien qu'elle possède une sensibilité et une sélectivité très élevées, repose cependant sur des mesures d'ensemble qui ne permettent pas le suivi en temps réel.^{31,32}

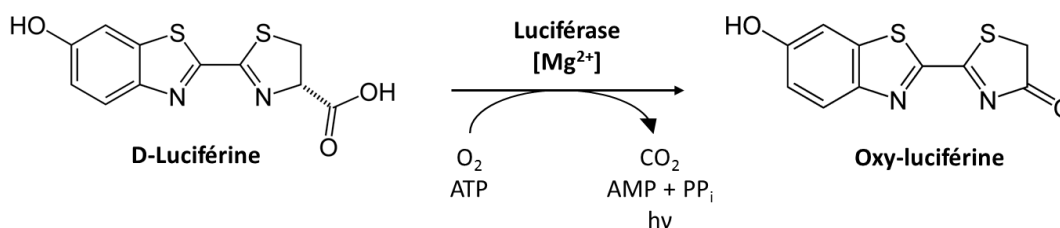


Figure 1.9 – Méthode de détection d'ATP par bioluminescence entre une luciférase et la D-luciférine.³²

Il y a une dizaine d'années, un groupe de recherche a toutefois exploité ce couple luciférase/luciférine dans le but d'effectuer le suivi de la concentration d'ATP à la surface de cellules.³³ Pour ce faire, une protéine membranaire comportant un segment luciférase a été incorporée à une lignée cellulaire. Cette enzyme oxydative est située à l'interface en contact avec le milieu extracellulaire, comme le montre la figure 1.10, ce qui permet de sonder l'ATP tout près des récepteurs membranaires. Dans le cadre de cette étude, la concentration d'ATP tout près de la membrane s'est révélée plus élevée que dans le reste du milieu extracellulaire, soit de l'ordre de 100 à 200 μM pour les deux types de cellules étudiés.

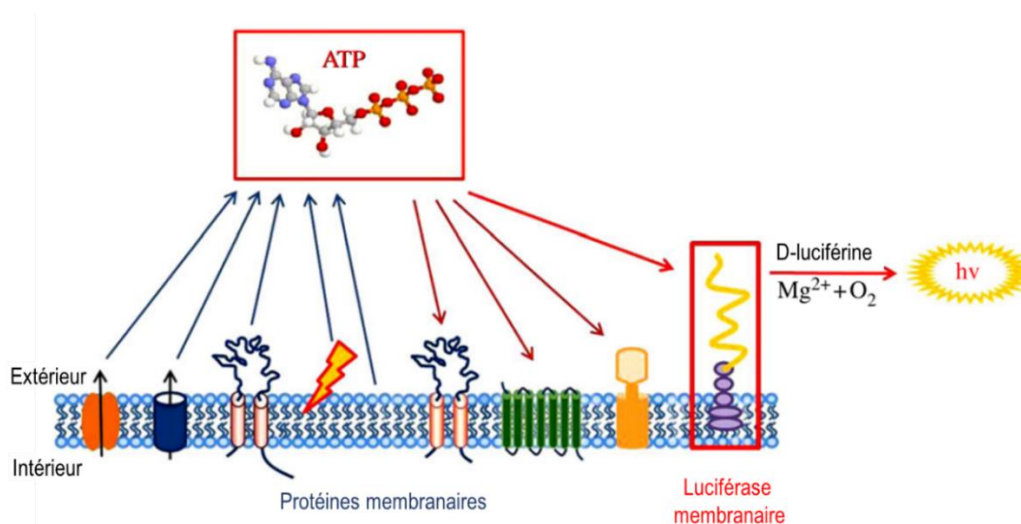


Figure 1.10 – Schéma présentant la technique de détection d'ATP à la surface des cellules par l'incorporation d'une luciférase membranaire à l'aide d'une mutation génétique.³¹

Cependant, cette technique est peu applicable à d'autres systèmes, puisqu'elle requiert l'incorporation d'une nouvelle protéine à la membrane cellulaire par mutation génétique. En plus d'être complexe, cette manipulation génétique pourrait également avoir un impact sur le métabolisme des cellules et, par conséquent, modifier la concentration d'ATP par rapport aux cellules préexistantes. Cette méthode se limite également à la mesure d'ATP à l'interface entre la membrane et le milieu extracellulaire.

Afin de s'adresser à ces problématiques, d'autres outils de mesure plus localisés ont également été imaginés. Le groupe de Nicholas Dale, par exemple, a développé une microélectrode de platine recouverte de glycérol kinase et de glycérol-3-phosphate oxydase. Ces enzymes, en présence d'ATP et d'oxygène, permettent de métaboliser le glycérol pour former du peroxyde d'hydrogène. L'oxydation de ce dernier composé, catalysée sur une surface de platine, peut alors être détectée par une simple mesure d'électrochimie, ce qui permet de quantifier la concentration d'ATP en milieu extracellulaire dans une gamme de 200 nM à 50 μM (voir figure 1.11).

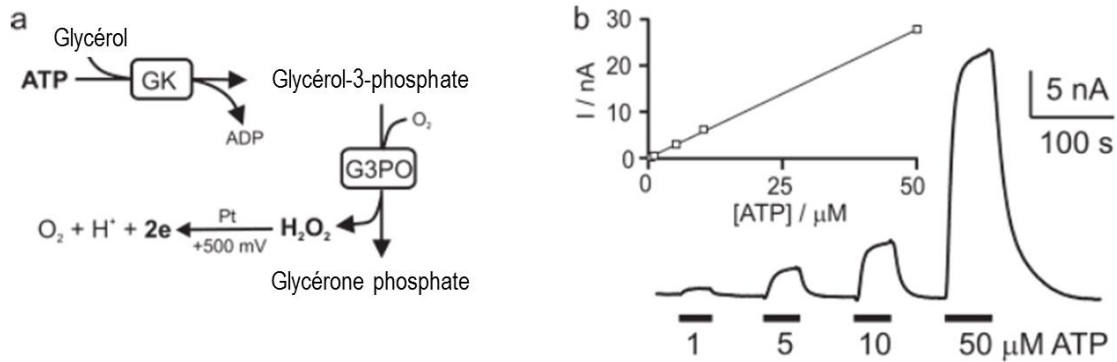


Figure 1.11 – a) Métabolisme enzymatique du glycérol en présence d'ATP et d'oxygène, suivi de l'oxydation du peroxyde d'hydrogène la surface de l'électrode de platine. b) Droite d'étalonnage du biocapteur par électrochimie.³⁴

Encore une fois, cette technique de mesure possède certains inconvénients. Tout d'abord, le diamètre de la microélectrode (25-100 μm) est du même ordre de grandeur que le diamètre des cellules, ce qui rend cet outil très invasif en plus de limiter sa précision spatiale. De plus, la mesure dépend à la fois de la concentration d'ATP et de glycérol dans l'environnement cellulaire, deux paramètres qui varient aussi bien dans le temps que dans l'espace sondé.

Le présent projet vise donc à développer un outil micrométrique non-invasif pour effectuer la détection localisée d'adénosine 5'-triphosphate dans les milieux intra et extracellulaire, et ce, en fonction du temps. Cette méthode de détection doit être à la fois non-invasive et présenter une grande sélectivité pour l'analyte d'intérêt. De plus, le biocapteur doit posséder une bonne sensibilité dans le domaine de concentration de l'analyte retrouvé dans les échantillons biologiques. Idéalement, cet outil doit également être polyvalent afin de détecter éventuellement d'autres biomolécules intéressantes.

Pour y arriver, nous nous sommes tournés vers les nanoparticules d'or afin de tirer profit de leurs propriétés plasmoniques et de leur biocompatibilité. Afin de trouver un support micrométrique pour ces nanoparticules d'or, nous nous sommes inspirés de travaux effectués par nos collaborateurs, le groupe de Jean-François Masson à l'Université de Montréal, qui se spécialisent dans le développement de biocapteurs. Récemment, cette équipe a développé un outil composé d'une micropipette de verre recouverte de nanoparticules d'or pour la détection de biomolécules par microscopie Raman (voir figure 1.12).³⁵

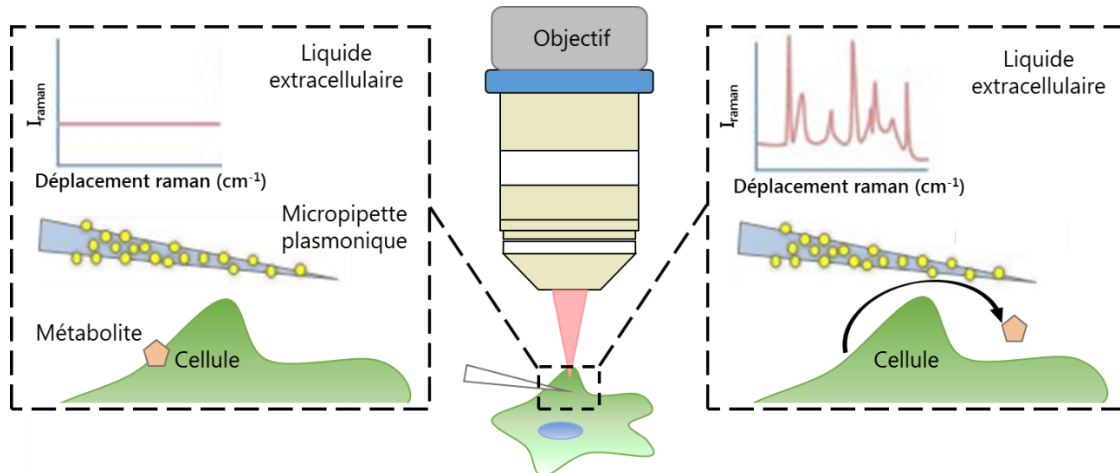


Figure 1.12 – Schéma de concept de l’outil développé par le groupe de Jean-François Masson pour la détection de bioanalytes dans l’environnement des cellules par diffusion Raman exaltée par une surface plasmonique.³⁵

En effet, ce concept tire profit des propriétés plasmoniques des nanoparticules d’or afin d’exalter la diffusion Raman d’un métabolite se trouvant à proximité. Nos collaborateurs ont testé ces biocapteurs en milieu biologique et sont parvenus à détecter différentes biomolécules d’intérêt, notamment l’ATP, le glucose, le pyruvate, le lactate ainsi que l’urée. Cependant, cette technique est présentement limitée à de la détection semi-quantitative, puisque l’intensité des bandes Raman varie grandement en fonction de l’orientation du métabolite et de la distance qui le sépare de la surface plasmonique.

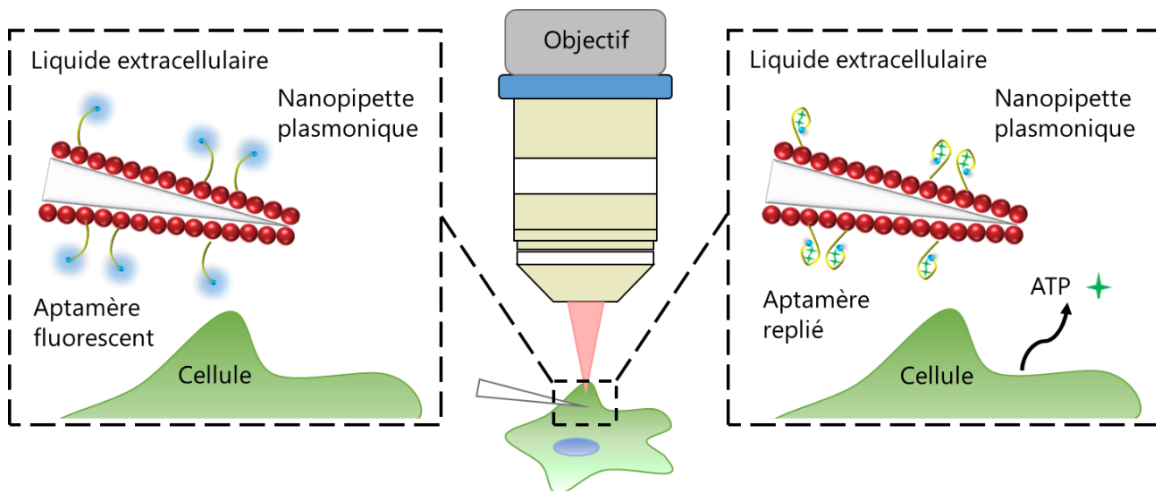


Figure 1.13 – Schéma de concept de l’outil micrométrique développé afin de répondre aux différents objectifs du projet.

Le but est donc de nous baser sur ce prototype afin de développer un outil de détection quantitatif pour l’ATP. Pour ce faire, nous avons imaginé un substrat composé d’une micropipette de verre recouverte

de nanoparticules d'or de 50 nm de diamètre. La surface du capteur est fonctionnalisée avec un aptamère fluorescent, soit un court simple brin d'ADN modifié avec un fluorophore, qui possède une grande affinité pour l'ATP. Lorsque l'aptamère se lie à sa molécule cible, il se replie sur lui-même, rapprochant ainsi le fluorophore de la surface des nanoparticules d'or. Grâce à un montage de microscopie de fluorescence, il est alors possible de mesurer l'extinction de fluorescence résultant de ce changement de conformation et, par conséquent, de quantifier la concentration d'ATP localement.

1.3 Liste des objectifs des deux projets

Pour résumer, les objectifs du premier projet sont de :

- Développer une nanoarchitecture plasmonique biocompatible dans le domaine de l'infrarouge;
- Permettre l'encapsulation de molécules bioactives à proximité de la nanoparticule;
- Inclure un agent de ciblage pour assurer le transport actif du cargo;
- Assurer un suivi du traitement en incorporant un fluorophore sensible au calcium.

Dans un second temps, les objectifs du projet de détection d'ATP sont de :

- Développer un outil de détection micrométrique pour quantifier la concentration d'ATP dans l'environnement de cellules;
 - Synthétiser des nanoparticules d'or sphérique avec un contrôle adéquat de la morphologie et de la taille;
 - Greffer ces nanoparticules à la surface de micropipettes de verre;
 - Ajouter un aptamère spécifique à l'ATP en surface.
- Développer une plateforme de détection en microscopie de fluorescence;
- Tester les performances de l'outil de détection avec des solutions d'ATP aqueuses;
- Tester les performances de l'outil de détection dans des conditions biologiques.