

Université de Montréal

*Etude des propriétés physicochimiques des vecteurs nanoparticulaires*

par

Xavier Banquy

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté de pharmacie  
en vue de l'obtention du grade de  
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)  
en Sciences Pharmaceutiques

Juin 2009

© Banquy Xavier, 2009

Université de Montréal  
Faculté de Pharmacie

Cette thèse intitulée :

***Etude des propriétés physico-chimiques des vecteurs nanoparticulaires***

Présentée par  
Xavier Banquy

a été évaluée par le jury composé des personnes suivantes :

Président rapporteur : Fahima Nekka

Directrice de recherche : Suzanne Giasson

Co-directeur de recherche : Patrice Hildgen

Membre du Jury : Antonella Badia

Examineur externe : Jérôme Claverie

Représentant du doyen de la FES : Normand Mousseau

## RÉSUMÉ

Cette thèse rapporte l'étude des propriétés physicochimiques des nanoparticules polymériques et leur impact sur l'interaction avec les cellules vivantes. Nous nous sommes tout spécialement attachés à étudier l'effet des propriétés adhésives et mécaniques des nanoparticules sur leur capacité de pénétration de la membrane cellulaire. Pour ce faire, nous avons tout d'abord utilisé des nanoparticules d'acide polylactique (PLA) fonctionnalisées en surface avec un ligand des sélectines E et P. Le greffage du ligand sur la particule s'est fait par une nouvelle méthode expérimentale garantissant la présence du ligand à la surface de la particule durant toute sa durée de vie. Cette méthode consiste à mélanger un polymère fonctionnalisé avec le ligand avec un autre polymère non fonctionnalisé. La présence du ligand à la surface des nanoparticules formées à partir de ce mélange de polymères a été confirmée par analyse ToF SIMS. Nous avons pu prouver que les particules possédant le ligand greffé à leur surface démontraient une capacité adhésive supérieure à leurs homologues non fonctionnalisés sur des cellules endothéliales HUVEC activées par différentes drogues. De plus, le captage des particules par les cellules HUVEC est modulé par le niveau d'expression des récepteurs selectine E et P et aussi par la quantité de ligand libre. Ces résultats montrent clairement que le greffage du ligand confère aux particules des propriétés adhésives accrues et spécifiques ce qui permet leur usage postérieure comme vecteur pharmaceutique capable de cibler un récepteur particulier à la surface d'une cellule.

Nous avons aussi démontré que l'interaction entre les nanoparticules et la membrane cellulaire peut aussi être contrôlée aussi bien par les propriétés mécaniques de la cellule que de la nanoparticule. Dans une première étape, nous avons mesuré à l'aide de l'appareil de forces de surface l'élasticité de cellules macrophagiques déposées sur différents substrats. En contrôlant l'interaction entre la cellule et le substrat sur lequel elle repose nous avons montré qu'il était possible de modifier à

volonté les propriétés mécaniques cellulaire. Une augmentation de l'élasticité cellulaire s'accompagne d'une augmentation systématique de l'internalisation de nanoparticules de PLA non fonctionnalisées. Ceci suggère un rôle prépondérant des propriétés mécaniques du cortex cellulaire dans le captage des nanoparticules de PLA.

Dans une seconde étape, nous avons étudié l'effet des propriétés mécaniques des nanoparticules sur leur capacité de pénétration cellulaire. Pour ce faire, nous avons synthétisé des particules d'hydrogel dont l'élasticité était contrôlée par le degré d'agent réticulant inclus dans leur formulation. Le contrôle des propriétés mécaniques des nanoparticules a été confirmé par la mesure du module de Young des particules par microscopie de force atomique. L'impact des propriétés mécaniques de ces particules sur leur capacité de pénétration dans les cellules vivantes a été étudié sur des cellules macrophagiques de souris. Les résultats ont montré que la cinétique d'internalisation, la quantité de particules internalisées et le mécanisme d'internalisation dépendent tous du module de Young des nanoparticules. Aucune différence dans le trajet intracellulaire des particules n'a pu être observée malgré le fait que différentes voies d'internalisation aient été observées. Ce dernier résultat peut s'expliquer par le fait que les nanoparticules sont internalisées par plusieurs voie simultanément ce qui facilite leur accumulation dans les organelles digestives intracellulaires. Un modèle simple permettant d'expliquer ces résultats a été proposé et discuté.

MOTS CLES : nanoparticules, PLA, hydrogel, élasticité, selectine, SFA, AFM, interactions, internalisation.

## ABSTRACT

This thesis reports the study of physical chemical properties of polymeric nanoparticles and their impact on the interaction with living cells. In particular we endeavoured to study the effect of the adhesive and mechanical properties of the vector on its capacity of penetration of the cellular membrane. With this intention, we firstly used nanoparticles of polylactic acid (PLA) functionalized on their surfaces with a ligand of the selectines E and P receptor. The grafting of the ligand on the particle's surface was carried out thanks to a new experimental method guaranteeing the presence of the active molecule on the surface of the particle during its whole life cycle. This method consists in mixing a polymer functionalized with the ligand with another polymer not functionalized. The presence of the ligand on the surface of the nanoparticles formed starting from this mixture of polymers was confirmed by ToF SIMS analysis. We could show that the particles having the ligand grafted on their surface exhibit a higher adhesive capacity than their non-functionalized counterpart on endothelial cells HUVEC activated by various drugs. Nanoparticles adhesion on cells membrane was modulated by the level of expression of the receptors selectine E and P and also by the quantity of free ligand. These results show clearly that the functionalized particles possess all the characteristics of a pharmaceutical vector capable of targeting a particular receptor on a cell surface.

The interaction between nanoparticles and cellular membrane can also be controlled by the mechanical properties of the cell as well as of the nanoparticle. To demonstrate it we have measured the elasticity of macrophagic cells deposited on various substrates using the SFA. We have thus showed that it was possible to control the cell mechanical properties at will by controlling the interaction between the cell and the substrate on which it rests. An increase of the cell elasticity is accompanied by an increase of the internalization of non-functionalized PLA nanoparticles. This suggests a major role of cytoskeletal mechanical properties in the capture of hard PLA particles.

Lastly, we studied the effect of the mechanical properties of the nanoparticles on their cellular penetration capacity. With this intention, we synthesized hydrogel particles whose elasticity was controlled by the degree of crosslinking agent included in their formulation. The control of the mechanical properties of the nanoparticles was confirmed by the measurement of the Young modulus of the particles by AFM. The interaction of these particles with macrophages showed that the mechanical properties of the particles affect various aspects related to the internalization of the nanoparticles. The internalization kinetics, the quantity of internalized particles and the mechanism of internalization depend all on the Young modulus of the nanoparticles. No differences in the intracellular pathway could be observed in spite of the fact that various pathways of internalization were observed for these nanoparticles. This last result can be explained by the fact that the nanoparticles are internalized by several mechanisms of simultaneously which facilitates their accumulation in intracellular digestive organelles. A simple model explaining these results is proposed and discussed.

**KEY WORDS:** nanoparticles, PLA, hydrogel, elasticity, selectine, SFA, AFM, interactions, internalization.

## REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Suzanne Giasson, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je voudrais lui exprimer toute ma reconnaissance pour la confiance qu'elle a su m'accorder en me laissant mener mon projet avec une totale liberté.

Je voudrais également remercier toutes les personnes qui font ou faisaient partie de son groupe de recherche : Frank pour m'avoir transmis ses connaissances techniques, Benoît pour m'avoir aidé dans mon travail de recherche, Béatrice Lego pour ses aides matérielles et techniques ainsi que Mohan pour ses leçons d'anglais.

J'aimerais également exprimer toute ma gratitude aux professeurs Robert Prud'homme et Julian Zhu pour m'avoir permis d'utiliser les instruments scientifiques de leur laboratoire. Je remercie aussi leurs groupes de recherche respectifs pour leurs disponibilités et la formation sur les appareils scientifiques. Je remercie également tous les techniciens de l'atelier mécanique pour les nombreuses heures passées à la construction et aux réglages des appareils nécessaires au bon déroulement de ce projet.

Merci à ma famille pour avoir été présente à mes côtés durant tout ce parcours. En particulier à mon père pour m'avoir transmis son goût pour les sciences et à ma femme pour son soutien et son amour.

A vous tous, merci.

# TABLE DES MATIERES

<b>RESUME</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	v
<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	vi
<b>GLOSSAIRE</b> .....	xi
<b>LISTE DES ILLUSTRATIONS</b> .....	xiii
<b>LISTE DES SCHEMAS</b> .....	xvii
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	xviii

## CHAPITRE 1 : Introduction

1.1 La vectorisation par les nanoparticules.....	1
1.1.1 Utilisation des nanoparticules pour le ciblage de la voie endothéliale .....	1
1.1.2 Les nanoparticules polymériques solides de PLA/PLGA.....	4
1.1.3 Les nanoparticules d'hydrogel .....	8
1.1.4 Paramètres physico-chimiques déterminant l'interaction particule – cellule.....	10
1.2 Mécanique et fonction cellulaire.....	15
1.2.1 Les composants mécaniques de la cellule.....	15
1.2.2 Approches expérimentales pour mesurer les propriétés mécaniques d'une cellule.....	20
1.2.3 Modélisations des propriétés mécaniques des cellules vivantes.....	23
1.2.4 Implications du cytosquelette dans l'adhésion cellulaire et l'endocytose	26



1.3 Hypothèses et objectifs .....	33
1.5 Structure de la thèse .....	35
1.3 Références.....	36

## **CHAPITRE 2 : Techniques expérimentales**

2.1 La mesure des forces d'interaction entre surfaces .....	55
2.1.1 Principe de la mesure .....	55
2.1.2 Effet de la géométrie du système et approximation de Derjaguin .....	56
2.2 L'appareil de force de surface .....	57
2.3 La microscopie à force atomique (AFM).....	60
2.3.1 Principe de la mesure .....	60
2.3.2 Le microscope à force atomique .....	61
2.3.3 La nano-indentation .....	62
2.4 Les microscopies à fluorescence.....	65
2.4.1 Origines de la fluorescence .....	65
2.4.2 La microscopie à fluorescence.....	65
2.5 Références.....	67

## **CHAPITRE 3 : Selectins Ligand Decorated Drug Carriers for Activated Endothelial Cell Targeting**

3.1 Introduction.....	70
3.2 Experimental Procedures .....	72
3.2.1 Materials.....	72
3.2.2 Ligand docking simulations .....	72
3.2.3 Ligand synthesis.....	73
3.2.4 Polymer synthesis and subsequent ligand conjugation and deprotection ..	77
3.2.5 NPs preparation.....	78
3.2.6 NPs characterization .....	78

3.2.7 In vitro binding assays .....	80
3.2.8 Statistical analysis .....	81
3.3 Results.....	81
3.3.1 Ligand docking Simulations .....	81
3.3.2 Ligand and Polymer Synthesis.....	83
3.3.3 Preparation and Characterization of NPs .....	84
3.3.4 Binding capacity of the NPs in vitro .....	87
3.4 Discussion .....	91
3.5 References.....	93

## **CHAPITRE 4 : Direct measurement of Mechanical and Adhesive Properties of Living Cells using the Surface Forces Apparatus**

4.1 Introduction.....	97
4.2 Experimental Procedures .....	99
4.2.1 Materials.....	99
4.2.2 Chemical grafting of APTES and glutaraldehyde onto mica surfaces.....	100
4.2.3 Chemical grafting of FN and PLL onto glutaraldehyde-functionalized mica surfaces.....	101
4.2.4 Cell culture and cell monolayer formation on functionalized mica surfaces.....	101
4.2.5 Optical microscopy .....	101
4.2.6 SFA measurements .....	102
4.2.7 AFM measurements .....	103
4.3 Results and discussion .....	103
4.4 Conclusion .....	116
4.5 Internalisation de NPs de PLA par des macrophages déposés sur différents substrats fonctionnalisés .....	116
4.5.1 Protocole expérimental .....	117
4.5.1.1 Fonctionnalisation du mica .....	117

4.5.1.2 Culture cellulaire et internalisation des particules de PLA..	117
4.5.2 Résultats.....	118
4.6 Références.....	119

## **CHAPITRE 5 : Effect of Mechanical Properties of Hydrogel Nanoparticles on Macrophage Cell Uptake**

5.1 Introduction.....	124
5.2 Materials and Methods.....	125
5.2.1 Materials.....	125
5.2.2 Nanoparticles synthesis.....	126
5.2.3 Nanoparticles characterization.....	126
5.2.4 Immobilization of the nanoparticles NPs on mica surfaces.....	127
5.2.5 Mechanical characterization of the nanoparticles.....	128
5.2.6 Cell Culture.....	129
5.2.7 NPs Cytotoxicity.....	130
5.2.8 Uptake study.....	130
5.2.9 Intracellular trafficking.....	130
5.2.10 Statistical Analysis.....	130
5.3 Results.....	131
5.3.1 Particle Size, zeta potential and morphology.....	131
5.3.2 Mechanical Properties of the NPs.....	133
5.3.3 Cytotoxicity of the NPs.....	134
5.3.4 Uptake Mechanism.....	135
5.3.5 Effect of NP concentration on cellular uptake.....	138
5.3.6 Uptake Kinetics.....	139
5.3.7 Intracellular trafficking.....	140
5.4 Discussion.....	143
5.5 Conclusions.....	145

5.6 Références.....	145
---------------------	-----

## **CHAPITRE 6 : Discussion Générale**

6.1 Le ciblage de la voie endothéliale.....	148
6.2 Effet de l'élasticité cellulaire sur la capacité d'internalisation des nanoparticules	152
6.3 Effet des propriétés élastiques des nanoparticules sur leur capacité de pénétration cellulaire.....	155
6.4 Références.....	159

<b>CHAPITRE 7 : Conclusions et perspectives.....</b>	<b>161</b>
--	------------

## GLOSSAIRE

### *Symboles scientifiques :*

$\delta$	Déformation relative
$\mu$	Indice de réfraction
$\nu$	ratio de Poisson
$\nu_s$	vitesse de séparation
$a$	Rayon de l'aire de contact entre deux surfaces
$A_{int}$	Aire de contact effective
$D$	Distance de séparation
$E$	Module de Young
$F(D)$	Loi de force
$k_B$	Constante de Boltzmann
$K$	Module de flexion
$Mn$	Masse molaire en nombre d'un polymère
$Mw$	Masse molaire en poids d'un polymère
$N_D$	Densité surfacique cellulaire
$pH$	Potentiel hydrogène
$P$	Pression
$P_{atm}$	Pression atmosphérique
$R$	Rayon de courbure
$R_0$	Rayon cellulaire
$T$	Température
$W$	Energie d'interaction entre deux plans infinis

***Techniques expérimentales :***

<i>AFM</i>	Microscopie à force atomique
<i>SFA</i>	Appareil de mesure de forces de surface
ToF SIMS	Time of Flight Secondary Ionization Mass Spectroscopy

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

<b>Figure 1.1</b> : Micrographies obtenues par microscopie électronique à transmission représentant les filaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules ....	15
<b>Figure 1.2</b> : Représentation schématique d'un filament d'actine .....	16
<b>Figure 1.3</b> : Représentation schématique d'un microtubule .....	18
<b>Figure 1.4</b> : Diagramme en ruban montrant la structure enroulée des deux hélices $\alpha$ constituant l'unité structurelle des filaments intermédiaires .....	19
<b>Figure 1.5</b> : Représentation schématiques des différentes technique utilisées pour mesurer les propriétés mécaniques cellulaires.....	21
<b>Figure 1.6</b> : Représentation générale des modèles mécaniques des cellules vivantes ...	24
<b>Figure 1.7</b> : Représentation schématique des possibles fonctions de l'actine dans les différentes voies d'endocytose.....	31
<b>Figure 2.1</b> : Géométrie générale utilisée pour la mesure des forces d'interaction entre deux surfaces ainsi que les paramètres importants qui doivent être contrôlés et/ou mesurés .....	47
<b>Figure 2.2</b> : Représentation schématique de l'appareil de mesure de forces de surface	49
<b>Figure 2.3</b> : Principe de la mesure de distance en <i>SFA</i> .....	50

<b>Figure 2.4</b> : Représentation schématique du microscope à force atomique.....	52
<b>Figure 2.5</b> : Schéma de principe des trois types de microscopies : (a) microscopie optique ; (b) microscopie à épifluorescence et (c) microscopie confocale.....	57
<b>Figure 3.1</b> : Conformation of the ligand in the bonded state obtained from docking experiments.....	73
<b>Figure 3.2</b> : Partial TOF-SIMS spectrum (40-46 amu). (A) NPs made of PLA; (B) NPs made of PLA and PLA-SEL <sub>5%</sub> (50:50) and (C) NPs made of PLA-SEL <sub>5%</sub> alone.....	75
<b>Figure 3.3</b> : Cytotoxicity assays of NPs on endothelial cells and rat macrophages.....	76
<b>Figure 3.4</b> : Normalized E and P-selectin expression quantification from fluorescence microscopy in response to LPS and L-NAME activation.....	77
<b>Figure 3.5</b> : Fluorescent micrographs of HUVECs activated with LPS (B and C) and with L-NAME (E and F).....	78
<b>Figure 3.6</b> : Fluorescence spectrophotometry demonstrates that binding of the NPs is regulated by receptor expression .....	79
<b>Figure 3.7</b> : Fluorescent microscopy was used to assess localization of the NPs on LPS activated cell surface.....	80
<b>Figure 3.8</b> : Fluorescence spectrophotometry demonstrated that free ligand can inhibit binding of NPs bearing ligand molecules .....	81
<b>Figure 4.1</b> : AFM images of PLL and FN coatings on freshly cleaved mica and glutaraldehyde-coated substrates .....	94



<b>Figure 4.2</b> : Schematic representation of a cell monolayer deposited on a functionalized mica surface. ....	95
<b>Figure 4.3</b> : (a) Microscopy imaging of a cell monolayer under different compression forces, and (b) the corresponding FECO fringes. (c) FECO fringes corresponding to the mica–mica contact in air, (d) microscopy imaging of the cell monolayer after decompression. Scale bars represent 50µm .....	97
<b>Figure 4.4</b> : Compression force profiles of a cell monolayer plated on a FN-coated substrate and on a PLL-coated substrate .....	98
<b>Figure 4.5</b> : Variation of the rupture force between the cells and the substrate.....	103
<b>Figure 4.6</b> : Internalisation de particules de PLA fluorescentes par des macrophages murins déposés sur différents substrats.....	108
<b>Figure 5.1</b> : Surface imaging of the hydrogel nanoparticles (A) deposited from PBS solution at 37 °C on mica surfaces and analyzed using AFM in air at 25 °C in tapping mode (see methodology for details) (B) NPs deposited on glass slides by self-adsorption from PBS solution at 37 °C and analyzed using fluorescence microscopy. ....	122
<b>Figure 5.2</b> : Characteristic force curves measured using AFM between a cantilever tip and one nanoparticle grafted on mica surface for the 4 NP batches.....	123
<b>Figure 5.3</b> : Cytotoxicity of hydrogel NPs (100 µg/mL) on macrophage RAW 264.7 cell line evaluated using (A) MTT and (B) LDH assays .....	125
<b>Figure 5.4</b> : Cellular uptake mechanisms of the NPs assessed by treating the cells with different inhibitors of endocytic entry routes .....	126

<b>Figure 5.5</b> : Fluorescence micrographs of macrophage cells incubated simultaneously for 1 h with DX-FITC and NPs from batch A to D. ....	128
<b>Figure 5.6</b> : Effect of the NPs concentration of the uptake concentration by macrophage cells.....	129
<b>Figure 5.7</b> : Uptake kinetics of NPs by macrophage cells .....	130
<b>Figure 5.8</b> : (A) Percentage of colocalization of DX-FITC to rhodamine B labeled NPs (B) Fluorescence microscopy of rhodamine B labeled NPs in RAW 264.7 cells at different times after internalization.....	131
<b>Figure 5.9</b> : Fluorescence micrograph showing colocalization of NPs with early endosome marker EEA-1.....	132
<b>Figure 6.1</b> : Représentation schématique du changement de mécanisme d'entrée des NPs d'hydrogel en fonction de leur élasticité.....	146
<b>Figure 6.2</b> : Représentation schématique des différents modèles de déformation possibles induites lors du contact entre une particule d'hydrogel et une membrane cellulaire.....	147

## LISTE DES SCHEMAS

<b>Schéma 3.1:</b> Chemical structure of the synthetic ligand of E and P-selectin.....	63
<b>Schéma 3.2:</b> General synthesis of the selectin ligand Chemical structure of the synthetic ligand of E and P-selectin.....	63
<b>Schéma 3.3:</b> Grafting reaction of the synthetic ligand on a PLA chain and deprotection .....	74

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Table 1.1:</b> Module de Young de l'actine et des filaments d'actine.....	17
<b>Table 1.2:</b> Module de Young des microtubules de différents organismes.....	18
<b>Table 1.3:</b> Module de Young de différents matériaux contenant de la kératine .....	20
<b>Table 3.1:</b> Particle size and Zeta potential measurements of the different NPs used in this study .....	74
<b>Table 4.1:</b> Mechanical parameters of cells obtained by fitting the capsule model (CM), Hertz theory (HT) and the extended Hertz theory (Tatara model, EHT) to the experimental force profiles .....	100
<b>Table 5.1:</b> Properties of the hydrogel nanoparticles used in the present study. All measurements were done in PBS at 37 °C.....	124

# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION GENERALE

### *1.1 La vectorisation par les nanoparticules*

#### *1.1.1 Utilisation des nanoparticules pour le ciblage de la voie endothéliale*

L'utilisation des nanoparticules polymériques dans la préparation de nouvelles formes pharmaceutiques a fait l'objet de nombreuses études depuis plus de 30 ans.<sup>1-3</sup> Leur usage s'est étendu au fil des années en commençant par des formes de dosage oral<sup>4</sup> à la libération contrôlée de principes actifs<sup>5</sup> et plus récemment au ciblage passif et actif.<sup>6, 7</sup> Les avantages des vecteurs nanoparticulaires sont nombreux. Par exemple les NPs permettent de maintenir la concentration thérapeutique de médicament libéré sur des périodes de temps très longues et variables selon les applications, il apporte une amélioration de l'indice thérapeutique du médicament délivré, permettent de diminuer potentiellement les quantités de médicament ainsi que le nombre d'injections nécessaires ce qui améliore la qualité de vie du patient et enfin elles procurent une augmentation de la stabilité des médicaments à faible temps de vie *in vivo* telles que les protéines et les peptides.

Les principaux mécanismes par lesquels le médicament encapsulé est relargué par les nanoparticules sont :

- Diffusion du principe actif au travers de la matrice polymérique
- Dégradation enzymatique ou chimique de la matrice polymérique
- Transition de phase, c'est-à-dire un gonflement ou un effondrement de la matrice polymérique déclenché par un stimuli physique ou chimique<sup>8</sup>

Plusieurs moyens peuvent être employés pour contrôler la biodistribution des particules administrées. La première méthode consiste à contrôler la taille des particules à injecter afin qu'elles ne circulent que dans des capillaires de diamètre supérieure ou égal au diamètre des particules. Ainsi les particules de diamètres supérieures à quelques micromètres seront automatiquement filtrées dans les capillaires pulmonaires ou seront éliminées lors du premier passage épithélial. Les particules de diamètre inférieur à 200 nm s'accumulent dans les tissus dont la vascularisation est poreuse, comme c'est le cas des sites d'inflammation et des zones tumorales. Ces deux effets sont dits passifs car ils n'impliquent pas de phénomènes de reconnaissance spécifique entre la particule et le tissu cible. Pour qu'un ciblage soit actif il est nécessaire de greffer sur la particule une molécule de reconnaissance d'un récepteur présent sur les cellules ciblées. Plus le récepteur sera présent sur le site ciblé plus le ciblage du site sera spécifique. Parmi les ligands les plus utilisés nous citerons les anticorps, les peptides et les facteurs de croissance.

Le ciblage de l'endothélium représente une cible de choix pour le traitement d'un grand nombre de pathologies comme les maladies cardiovasculaires, pulmonaires, génétiques et cancéreuses. Aujourd'hui la plupart des médicaments utilisés pour le traitement de ces maladies ont très peu d'affinité pour l'endothélium. Le ciblage représente donc une stratégie très intéressante qui devrait permettre de libérer le principe actif au site même de la maladie. Pour cela il est nécessaire de sélectionner un récepteur qui puisse être utilisé comme cible pour l'ancrage du cargo. Plusieurs cibles potentielles de l'endothélium ont été identifiées telles les ecto peptidases,<sup>9, 10</sup> les protéines cavéolaires,<sup>11</sup> les molécules d'adhésion cellulaire,<sup>12-14</sup> les récepteurs des facteurs de croissance et les protéines de transport.<sup>15, 16</sup> Le récepteur doit présenter certaines caractéristiques pour pouvoir être considéré comme une cible potentiellement intéressante. En particulier, il doit être présent sur les cellules endothéliales et absent du flux sanguin ou de la surface des cellules autre qu'endothéliales sans quoi il y aurait compétition entre plusieurs sites actifs et donc une diminution de l'efficacité du ciblage. De plus la densité des récepteurs sur la membrane cellulaire doit être élevée pour permettre l'adhésion efficace du cargo. Par exemple, certaines protéines de l'adhésion cellulaire comme PECAM-1 présentent des millions de copies par cellule<sup>12</sup> et l'enzyme

de conversion de l'angiotensine (ACE) est exprimée constitutivement à plusieurs centaines de milliers de copies par cellule.<sup>17</sup>

De plus des facteurs pathologiques peuvent affecter l'expression de certains récepteurs membranaires. Par exemple la molécule d'adhésion intercellulaire ICAM-1 et d'autres molécules comme les sélectines sont fortement exprimées dans les sites d'inflammation, de thrombose et d'ischémie.<sup>18-20</sup> Dans ces conditions il est nécessaire que l'adhésion du cargo sur le site cible puisse se faire durant l'intervalle de temps d'expression de ces récepteurs.

Le ciblage de la voie endothéliale est une stratégie très prometteuse pour le traitement de maladie ayant une composante inflammatoire importante comme le cancer ou l'arthrose rhumatoïde. Les capillaires enflammés sont connus pour exprimer un certain nombre de récepteurs tels que les sélectines E et P et ICAM-1. Ces mêmes récepteurs peuvent être utilisés pour l'adressage de nanoparticules fonctionnalisées afin de libérer le principe actif de manière prolongée au site enflammé. Zang *et al.*<sup>21</sup> ont utilisé des nanoparticules de PLGA fonctionnalisées en surface avec un ligand peptidique ciblant le récepteur ICAM-1 connu pour être surexprimé sur les cellules endothéliales activées. Leur étude a montré que la quantité de nanoparticules fonctionnalisées internalisées par les cellules endothéliales de cordon ombilical humain (HUVEC) était deux fois plus importante que celle de leurs homologues non fonctionnalisés. Ces résultats montrent que le ciblage des cellules endothéliales activées est possible et ouvrent de nouveaux axes de recherches pour tester d'autres récepteurs eux aussi exprimés par les tissus enflammés, notamment les sélectines E et P. Il est à noter que la fonctionnalisation en surface des nanoparticules pose le problème de la stabilité du ligand à la surface des nanoparticules. En effet, la fonctionnalisation des nanoparticules nécessite des étapes de synthèse et de purification supplémentaires. Le lien chimique permettant de coupler le ligand à la particule est généralement peu stable dans un milieu de culture cellulaire où la présence d'enzymes et le pH accélèrent son hydrolyse. La disparition du ligand de la surface de la nanoparticule diminue fortement l'efficacité du ciblage et l'internalisation du vecteur. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles techniques de formulation de nanoparticules permettant de maintenir des concentrations de ligand en surface suffisantes pour conserver la fonction de ciblage du vecteur.

### ***1.1.2 Les nanoparticules polymériques solides de PLA/PLGA***

De nombreux types de nanoparticules polymériques ont été conçues en utilisant un ou plusieurs des mécanismes de libération mentionnés. Dans ce qui suit, nous mentionnerons les plus représentatifs à titre d'illustration.

La première utilisation de nanoparticules polymériques pour des fins thérapeutiques date des années 1970 par Speiser et al.<sup>22, 23</sup> Depuis, les nanoparticules ont été amplement étudiées comme système cargo de principes pharmaceutiques moléculaires ou macromoléculaires comme les acides nucléiques, les peptides, les protéines et les hormones.<sup>24-27</sup> Un des grands avantages des nanoparticules sur les autres types de vecteurs est leur taille sub micrométrique qui leur permet de diffuser hors du flux sanguin par extravasation et de limiter l'occlusion des vaisseaux sanguins.<sup>28</sup>

L'agent thérapeutique peut être dispersé dans la matrice polymérique formant la nanoparticule ou bien être encapsulé dans le cœur hydrophobe d'une nanocapsule.<sup>29, 30</sup>

La libération du principe actif présente deux phases, la première étant reliée à la diffusion du principe actif à travers la matrice polymérique et la deuxième incluant le processus de diffusion et celui de dégradation de la nanoparticule.<sup>31</sup> Les copolymères d'acide lactique et d'acide glycolique (PLGA) possèdent un certain nombre d'avantages sur les autres polymères couramment utilisés dans le domaine des systèmes à relargage contrôlé. On mentionnera, entre autres, leur biodégradabilité, leur biocompatibilité et leur approbation pour usage chez l'humain par la Federal Drug Agency.<sup>32</sup> Le PLGA se dégrade chimiquement dans le corps humain par clivage hydrolytique du lien ester joignant les acides lactique et glycolique.<sup>33</sup> Ces résidus sont facilement métabolisés par le corps humain via le cycle de Krebs et sont éliminés sous forme de CO<sub>2</sub> et d'eau.<sup>34</sup> Le processus de dégradation des polymères *in vivo* et *in vitro* est affecté par différents facteurs incluant la technique de préparation, la présence de macromolécules de faible masse moléculaire, la taille, la forme et la morphologie, les propriétés intrinsèques du polymère<sup>32</sup> (si il est hydrophile ou hydrophobe, son poids moléculaire, sa structure chimique, sa cristallinité, sa température de transition vitreuse), les paramètres physicochimiques ambiants (le pH, la température et la force



ionique), le site d'implantation et le mécanisme d'hydrolyse. La dégradation physique du PLGA se fait principalement par érosion. Le processus de dégradation se fait principalement en trois phases.<sup>32</sup> Initialement, une décroissance du poids moléculaire du polymère est observée sans perte appréciable de polymère et sans aucune formation de monomères formés par la scission des chaînes. Cette phase est suivie par une décroissance rapide du poids moléculaire et d'une perte de masse accompagnée de la formation de monomères et oligomères. Finalement, la dégradation des oligomères en monomères entraîne la dégradation complète du polymère.<sup>32</sup> Les produits de dégradation du PLGA se forment à des vitesses très lentes ce qui n'affecte pas la fonction cellulaire. Les polymères de PLGA ont été testés pour leur toxicité dans de nombreuses études sur l'animal et sont déjà utilisés chez l'humain comme sutures dégradables ou comme implants osseux et contraceptifs.<sup>35, 36</sup> La biocompatibilité du PLGA à long terme a été démontrée par l'absence de complication après injection intra artérielle de nanoparticules de PLGA chez le rat et le porc.<sup>24, 37</sup>

Les nanoparticules de PLGA sont rapidement éliminées de la circulation systémique par le système réticulo endothélial (RES) après injection intraveineuse. Deux familles d'opsonines (les facteurs du complément et les immunoglobulines) s'absorbent principalement sur les nanoparticules et facilitent leur phagocytose déclenchant ainsi l'inflammation et une réponse des tissus. Ceci réduit fortement l'efficacité des nanoparticules pour livrer leur charge au site ciblé. Ce problème a soulevé un fort intérêt pour le développement de nanoparticules furtives capables de circuler dans le flux sanguin durant de longues périodes de temps et pouvant cibler des tissus autre que le système phagocytaire mononucléé.

Les principaux procédés de préparation de systèmes nanoparticulaires à livraison de médicament sont les suivants : la technique d'émulsification/évaporation, la technique de double émulsion, la technique par précipitation saline et la technique de nano précipitation. La technique d'émulsification/évaporation est certainement la plus utilisée. Le polymère préformé et l'agent thérapeutique sont dissous dans un solvant organique hydrophobe et sont ensuite émulsifiés dans une solution contenant un agent stabilisant. L'émulsification est ensuite poursuivie dans un appareil apportant un effort cisailant très important de sorte à réduire la taille des particules (moulins colloïdaux,

homogénéisateur à haute pression, bain à ultrasons). La phase organique est ensuite évaporée sous pression réduite et la suspension colloïdale est récupérée après plusieurs ultracentrifugations.<sup>38, 39</sup> Pour palier au problème de faible rétention des principes actifs hydrophiles observé dans la technique d'émulsification/évaporation, la technique de double émulsion est souvent utilisée. Dans une première étape le principe actif hydrophile est dissous dans une solution aqueuse et est émulsifié dans une solution organique contenant le polymère préformé. Cette émulsion eau dans huile est ensuite ajoutée à une solution aqueuse contenant l'agent stabilisant et est émulsifiée à son tour. La double émulsion est ensuite soumise aux mêmes traitements que le procédé d'émulsification/évaporation.<sup>33, 40</sup> La technique d'émulsification/diffusion est aussi une méthode très souvent utilisée. Le polymère est dissous dans un solvant organique partiellement miscible avec l'eau (comme l'acétate d'éthyle ou l'alcool benzylique) et préalablement saturé d'eau. La solution est ajoutée sous agitation vigoureuse à une solution aqueuse contenant l'agent stabilisant. L'addition d'eau provoque une déstabilisation de l'équilibre entre la phase aqueuse et la phase organique entraînant la diffusion du solvant dans la phase aqueuse. Ce processus de diffusion s'accompagne de la formation de nanoparticules qui s'appauvrissent graduellement en solvant.<sup>38, 41</sup> La technique par précipitation saline (salting-out) consiste à dissoudre le polymère dans un solvant partiellement miscible avec l'eau (comme l'acétone) et de mélanger le tout à une solution aqueuse saturée en sel et contenant l'agent stabilisant. Après agitation vigoureuse, l'émulsion est diluée avec un volume suffisant d'eau entraînant la formation des nanoparticules par diffusion du solvant dans la phase aqueuse.<sup>42</sup> La technique de nano-précipitation consiste à dissoudre le polymère et un surfactant lipophile dans un solvant semi-polaire et miscible à l'eau comme l'acétone ou l'éthanol. La solution est ensuite injectée sous agitation vigoureuse dans une solution aqueuse contenant l'agent stabilisant. Les nanoparticules sont formées instantanément par diffusion rapide du solvant vers la phase aqueuse.<sup>43, 44</sup>

La plupart des méthodes de préparation requièrent l'utilisation de solvants organiques qui ont tendance à dénaturer les protéines à usage pharmaceutique. De plus, pour obtenir des particules de taille nanométrique, il est nécessaire d'utiliser de grandes quantités de surfactant et des procédés d'émulsification à hauts efforts cisailants qui

peuvent aussi affecter l'intégrité des macromolécules utilisées. La nature toxique de certains solvant nécessite l'ajout des étapes de purifications.

Le fait que les nanoparticules soient rapidement captées par le RES représente un avantage pour certains traitements comme les thérapies contre le SIDA.<sup>45</sup> Cependant, la capture rapide des nanoparticules par les macrophages du foie et de la rate limite leur accessibilité à d'autres parties du corps humain. Après une injection intra-veineuse, les particules de taille supérieure à 1-3  $\mu\text{m}$  de diamètre sont éliminées par filtration capillaire dans les poumons alors que les particules de diamètre inférieur à 5  $\mu\text{m}$  sont généralement éliminées de la circulation par le RES. Il a été démontré dans différentes études qu'en recouvrant la surface des nanoparticules à l'aide de macromolécules ou de ligand il était possible de modifier la bio distribution *in vivo* des nanoparticules. Par exemple, en recouvrant les nanoparticules d'une couche de polyéthylène glycol (PEG), l'absorption de protéines sériques reconnue par le RES est fortement diminuée. Les nanoparticules peuvent ainsi circuler plus longtemps dans le flux sanguin sans être captées par le RES.<sup>46</sup> Ces nanoparticules furtives possèdent le potentiel de cibler les sites d'inflammation et les tumeurs ayant des capillaires poreux.<sup>47-49</sup> De manière générale, après injection, les nanoparticules de PLGA, furtives ou pas, sont absorbées via le tissu lymphoïde intestinal dans la circulation lymphatique ce qui évite leur élimination au cours du premier passage hépatique. Le ciblage de la voie lymphatique est avantageux dans le cas des traitements chimiothérapeutiques car il améliore la biodisponibilité perorale des principes pharmaceutiques macromoléculaires comme les polypeptides ou les protéines.<sup>50, 51</sup> L'encapsulation de peptides comme l'insuline ou la calcitonine dans des nanoparticules de PLGA couvertes de chitosan ou de Carbopol<sup>®</sup>, deux polymères reconnus pour être mucoadhésifs, a permis d'augmenter le temps de libération du médicament par voie orale et pulmonaire et de favoriser une forte pénétration des NPs dans la paroi mucoale.<sup>41</sup>

Panyam *et al.*<sup>34</sup> ont aussi montré que les nanoparticules de PLGA pouvaient être captées par les cellules des muscles lisses vasculaires et échapper à la dégradation lysosomale en s'évadant dans le cytosol. Ceci permet aux nanoparticules d'agir comme des réservoirs pour libérer lentement l'agent thérapeutique encapsulé. Le mécanisme responsable de l'évasion des nanoparticules des compartiments lysosomaux est

principalement dû à une inversion de charge de la surface des nanoparticules de PLGA dans les lysosomes.

### ***1.1.3 Les nanoparticules d'hydrogel***

Les nanoparticules d'hydrogel représentent une famille de vecteurs beaucoup plus vaste que les nanoparticules polymériques solides. Les particules d'hydrogel sont constituées d'une matrice polymérique poreuse élastique. Le polymère est généralement très hydrosoluble ce qui facilite l'entrée et la sortie de molécules d'eau ou de tout autre composé hydrosoluble. La fabrication de nanoparticules à partir de monomères acryliques utilise la polymérisation en émulsion ou en micro-émulsion.<sup>52</sup> Ces techniques sont d'autant plus recommandées si l'on utilise des monomères dit thermosensibles comme le N-isopropylacrylamide. Dans ce type de synthèse, le mécanisme de formation des particules s'initie par la polymérisation radicalaire en chaîne dans la phase aqueuse d'oligomères qui vont croître et s'effondrer à partir d'une certaine masse moléculaire. Ces oligomères formeront des précurseurs de particules et capteront les monomères en solution pour permettre la croissance de la particule. Afin de favoriser la nucléation des particules, il est possible d'ajouter un tensioactif qui favorisera la formation d'agrégats mixtes polymère-surfactant et la nucléation de particules.<sup>53</sup> La cohésion entre les chaînes polymériques constituant la particule est achevée à l'aide d'un monomère multifonctionnel dit réticulant. Parmi les monomères qui ont été étudiés on retrouve la N-isopropylacrylamide, le 2-hydroxy ethyl méthacrylate, l'acide acrylique, la N,N diéthylacrylamide, la N,N diméthylamine éthyl acrylate.<sup>54</sup> Les monomères aminés ont été utilisés surtout pour conférer aux particules des propriétés thermosensibles alors que l'incorporation de monomères comme l'acide acrylique procure aux particules une sensibilité au pH. D'autres monomères ont été récemment utilisés pour apporter de nouvelles fonctionnalités aux particules. Par exemple l'incorporation de réticulant biodégradable pour la libération de principe actif stimulée par la présence d'une enzyme ou encore l'ajout de fonctions chimiques permettant le couplage de la particule avec des ligands synthétiques ou des anticorps.<sup>55</sup>

Dans une étude récente, Vihola et col.<sup>56</sup> ont montré que la cytotoxicité *in vitro* de plusieurs polymères thermosensibles, dont le PNIPAM, dépend de la température et du temps d'incubation. En effet, lorsque le temps d'incubation est de 3 heures, la cytotoxicité du PNIPAM est faible à une température inférieure à la LCST du polymère et elle augmente faiblement lorsque la température est supérieure à la LCST. Ce phénomène est observé pour les polymères fortement hydrophobes à l'état déshydraté, comme le PNIPAM ou la poly(N-vinylcaprolactame) (PVCL) mais pas pour des polymères plus hydrophiles comme la PVCL greffée avec des chaînes pendantes de PEG. Ce phénomène est encore plus marqué lorsque le temps d'incubation est augmenté de 3 heures à 12 heures. Les auteurs expliquent ces résultats en invoquant le fait que le greffage de chaîne de PEG sur le polymère permet de diminuer l'interaction entre le polymère et la paroi cellulaire par interaction stérique.

D'autres techniques de fabrication utilisant des polymères naturels comme le chitosan et le dextran, ou des polymères synthétiques comme le PVA ont aussi été développées.<sup>55</sup> Leur procédé de fabrication se base sur la dispersion du polymère dans une émulsion eau dans huile en présence de tensioactifs suivi de la réticulation chimique des particules.

Si l'utilisation d'hydrogel pour des applications pharmaceutiques a été très largement étudiée (voir références<sup>54, 57</sup> pour des revues récentes) on compte peu d'études mentionnant l'utilisation de nanoparticules d'hydrogel. Ces études rapportent l'encapsulation de plusieurs principes actifs dans des particules d'hydrogel. Parmi les agents chimiothérapeutiques, on mentionnera la doxorubicine qui a été encapsulée dans des nanoparticules de pullulan<sup>58</sup>, de PVA<sup>59</sup> et de polyéthylène glycol copolymérisées avec le Pluronic F127.<sup>60</sup> De plus, You *et al.*<sup>61</sup> ont récemment reporté l'utilisation de particules de poly (N,N-diméthylaminoéthyl méthacrylate-co-2-hydroxyéthyl méthacrylate ) pour la libération contrôlée de l'agent anti-cancéreux paclitaxel. Des principes actifs plus sensibles à la dégradation enzymatique comme les peptides ont aussi été encapsulés dans des nanoparticules d'hydrogel. En particulier, l'insuline a été encapsulée avec succès dans des particules d'acide polyméthacrylique-chitosan-polyéthylène glycol<sup>62</sup> et de poly(éthylène glycol) diméthacrylate-co-acide méthacrylique.<sup>63</sup> Les particules fabriquées à base de chitosan et de dextran modifié sont

aussi une voie très prometteuse pour l'encapsulation de principes actifs hydrophiles ou hydrophobes.<sup>64-66</sup>

L'utilisation de nanoparticules d'hydrogel pour le développement de nouvelles thérapies a aussi été reportée. Par exemple l'encapsulation de molécules photosensibles dans des nanoparticules de N-isopropylacrylamide (NIPAM) a été utilisée pour le développement de thérapies photo-dynamiques contre le cancer.<sup>67-69</sup> L'usage de ces vecteurs nanoparticulaires devrait connaître un fort essor dans le domaine clinique dû à leur très faible toxicité cellulaire<sup>70, 71</sup> et à leur très large biodistribution.<sup>72</sup>

Les études publiées reportant l'utilisation de nanoparticules d'hydrogel montrent que ce type de vecteur présente de nombreuses qualités qui leur sont propres. Notamment la sensibilité à un stimuli physico-chimique leur permet de libérer leur charge de manière parfaitement contrôlée. Malgré tous ces avantages, très peu d'études fondamentales ont été effectuées pour identifier les facteurs physico chimiques responsables du captage et de l'internalisation de ces vecteurs. Ces vecteurs possédant entre autre la particularité d'être mécaniquement élastique, il est important de connaître l'effet de cette propriété intrinsèque sur l'interaction avec les cellules vivantes.

#### ***1.1.4 Paramètres physico-chimiques déterminant l'interaction particule - cellule***

Les effets de certains paramètres physico-chimiques sur l'interaction particule / cellule et sur leur devenir intracellulaire ont été étudiés pour un grand nombre de systèmes. Les résultats les plus significatifs sont les suivants.

##### *Effet de la taille des particules*

L'effet de la taille des particules sur leur devenir intracellulaire est un thème de recherche des plus importants du fait de ses implications dans la libération contrôlée de médicaments et dans la toxicité associée aux nanoparticules.<sup>73</sup> Plusieurs propriétés importantes des particules *in vivo* sont associées à la taille de particule : le temps de circulation, l'extravasation, le ciblage, l'internalisation, le trafic intracellulaire, la clairance et le mécanisme d'internalisation.<sup>74-77</sup> Le diamètre de particule détermine leur transport et leur adhésion dans les capillaires sanguins, les voies aériennes et gastro-

intestinales.<sup>78-80</sup> Il existe de nombreux mécanisme de clairance dans le sang.<sup>81</sup> Les microparticules sont capturées par les cellules de Kupffer dans le foie ou bien elles sont physiquement attrapées dans le lit des capillaires.<sup>81, 82</sup> Les nanoparticules en revanche, peuvent quitter les vaisseaux sanguins grâce à la fenestration des capillaires.<sup>82, 83</sup> Les particules de diamètre supérieure à 500 nm sont capturées et phagocytées par les macrophages alors que les particules plus petites peuvent être endocytées par des cellules phagocytaires ou non-phagocytaires.<sup>84, 85</sup>

L'internalisation de nanoparticules de polystyrène par des cellules cancéreuses a été reportée pour des tailles de particules variant de 50 nm à 1000 nm.<sup>84</sup> Les particules ayant une taille inférieure à 500 nm sont internalisées par un mécanisme énergie-dépendant. Les particules de taille inférieure à 200 nm sont internalisées par la voie des clathrines alors que les particules de taille supérieure à 200 nm sont préférentiellement internalisées via la voie cavéolaire. La destruction du réseau de microtubule affecte fortement le trafic intracellulaire des particules ayant un diamètre inférieur à 500 nm. Les particules de taille inférieure à 500 nm convergent vers les lysosomes alors que les particules de taille supérieure à 500 nm s'accumulent dans des compartiments neutres. Suivant la même lignée de recherche, Limbach *et al.* ont étudié l'effet de la taille de particule sur l'internalisation de particules d'oxyde de cérium par des fibroblastes du poumon.<sup>86</sup> Leur résultats ont montré que la taille des particules était le paramètre déterminant majoritairement la quantité internalisée devant la concentration et l'aire spécifique des particules. Les auteurs ont montré que les particules de tailles inférieures à 50 nm s'aggloméraient très vite alors que les particules de 200 nm étaient plus stable dans le milieu de culture. Cette instabilité des particules de petite taille serait à l'origine, selon les auteurs, de l'internalisation élevée des particules de taille inférieure à 50 nm comparativement à celles de taille de l'ordre de 200 nm.

Lohbach *et al.* ont réalisé une étude similaire en utilisant des particules fluorescentes dont la taille variait de 50 nm à 1000 nm.<sup>87</sup> Les auteurs ont trouvé que la quantité de particules internalisées était maximale pour les particules de 50 nm de diamètre et qu'elle pouvait encore être augmentée en adsorbant sur les particules du chitosan ou en greffant un motif de lectine.

Récemment Lai *et al.*<sup>88, 89</sup> ont démontré que des particules de polystyrène de taille inférieure à 40 nm étaient capables de pénétrer dans des cellules endothéliales HUVEC et épithéliales HeLa via un mécanisme n'impliquant pas la voie des clathrines. Cette étude a montré que les particules de taille inférieure à 25 nm possèdent la capacité d'échapper au trajet endosome-lysosome et s'accumulent autour du noyau cellulaire. Cette nouvelle trajectoire intracellulaire est cholestérol-indépendante, clathrines-indépendante et caveolae-indépendante. Ces résultats sont très prometteurs pour l'administration de principes actifs sensibles à la dégradation comme les protéines ou l'ADN car il permettrait à un vecteur de livrer sa charge près du noyau cellulaire sans passer par les lysosomes.<sup>90</sup>

#### *Effet de la forme des particules*

L'effet de la forme des NPs sur leur interaction et internalisation par des cellules macrophagiques a été rapporté pour des NPs de polystyrène micrométriques.<sup>91</sup> La vitesse de phagocytose de particules non sphériques mais à symétrie cylindrique est déterminée par l'angle tangentiel au point de contact entre la paroi cellulaire et l'axe principal de révolution la particule. Pour des angles inférieurs à 60 degrés, les particules sont internalisées indépendamment de leur forme alors que pour des angles supérieurs à 60 degrés la cellule s'étale sur la particule sans l'internaliser. Ce résultat montre que c'est la géométrie locale de la particule qui en structurant le réseau d'actine cellulaire détermine si la cellule s'étale sur la particule ou si elle l'internalise. Ces résultats ayant été obtenus avec des microparticules, il est difficile de les extrapoler à des tailles plus petites. En effet, les déformations mécaniques développées par la cellule au moment de la phagocytose d'un objet micrométrique peuvent être du même ordre de grandeur que la taille de la cellule ce qui n'est évidemment pas le cas si l'objet phagocyté a une taille de l'ordre de quelques centaines de nanomètres ou moins.

Muro *et al.*<sup>92</sup> ont étudié l'effet de la forme du vecteur (sphérique ou discoïdale) sur son internalisation par les cellules endothéliales *in vivo* et *in vitro*. Dans cette étude, l'endothélium était ciblé en fonctionnalisant les particules avec un anticorps anti-ICAM. *In vivo*, les vecteurs sphériques de taille micrométrique sont rapidement éliminés du flux sanguins (en moins de 30 min) alors que les particules sub-



micrométriques circulent plus longtemps. Les vecteurs discoïdaux résident plus longtemps dans le flux sanguin que leurs homologues sphériques et s'accumulent fortement dans les poumons. *In vitro*, les vecteurs sphériques micrométriques sont internalisés plus rapidement que les discoïdaux. Le mécanisme d'internalisation des vecteurs est le même, indépendamment de la forme des particules et semble suivre le trajet endosome-lysosome sans toutefois prendre les voies d'entrées déjà connues (classique, cavéolaire ou macropinocytaire). Cette voie de trafic intracellulaire est spécifique au récepteur ciblé (ICAM) et est indépendante de la forme ou de la taille du vecteur. Les résultats de cette étude montrent aussi un rôle prépondérant des filaments d'actine dans l'internalisation et le trafic de ces vecteurs. En effet, après internalisation, le réseau de filaments d'actine est fortement modifié et présente de nombreuses fibres sur lesquelles s'alignent les particules. Ceci constitue la première évidence d'un remodelage complet du cytosquelette induit par l'entrée des particules.

Decuzzi *et al.*<sup>93</sup> ont montré que l'effet de la géométrie du vecteur sur sa capacité d'internalisation pouvait être expliqué par un modèle mécanique simple prenant en compte l'énergie d'interaction cellule - particule (déterminée par le nombre de sites d'adhésion ligand-récepteur) et l'énergie de déformation de la membrane cellulaire (dont la contribution la plus importante est l'énergie de flexion). Pour des particules cylindriques, les auteurs ont démontré que le paramètre d'asymétrie des particules (le ratio longueur sur largeur) permet de prédire si il y a internalisation ou pas.

#### *Effet de la charge de surface*

La charge superficielle des particules est un facteur affectant aussi bien l'interaction avec les cellules que le devenir intracellulaire des NPs. La surface des cellules est chargée négativement dû entre autre à la présence des protéines protéoglycanes héparan sulfate négativement chargées sur la membrane cellulaire externe. Les particules positivement chargées auront donc une plus forte affinité pour la membrane cellulaire que leurs homologues neutres ou négativement chargées. Ce phénomène a été observé *in vitro* pour de nombreux systèmes qui démontrent une capacité d'internalisation des particules cationiques systématiquement plus élevée.<sup>94, 95</sup>

Le mécanisme d'internalisation des nanoparticules est aussi affecté par la charge des nanoparticules. Par exemple, les dendrimères positivement chargés et neutres sont internalisés par les cellules épithéliales du poumon par une voie autre que cavéolaire ou clathrine dépendante alors que les dendrimères anioniques pénètrent dans les cellules par la voie cavéolaire.<sup>96</sup> Les particules de PLA-PEG chargées positivement ou négativement entrent par la voie des clathrines dans les cellules épithéliales du rein.<sup>97</sup> Leur trajectoire intracellulaire présente malgré tout quelques différences : les particules anioniques convergent en partie vers les organelles digestives alors que les particules cationiques privilégient le trajet par la paroi cellulaire latérale (située sous les jonctions serrées). L'effet de la charge des nanoparticules sur leur capacité de pénétration de la paroi mucoale a été étudié mais demeure toujours un sujet de controverse. Les particules positivement chargées et neutres présentent généralement une forte affinité pour l'épithélium associé aux follicules ainsi qu'aux entérocytes alors que les particules négativement chargées présentent très peu d'affinité pour les tissus gastrointestinaux.<sup>25</sup>

#### *Effet des propriétés mécaniques du substrat*

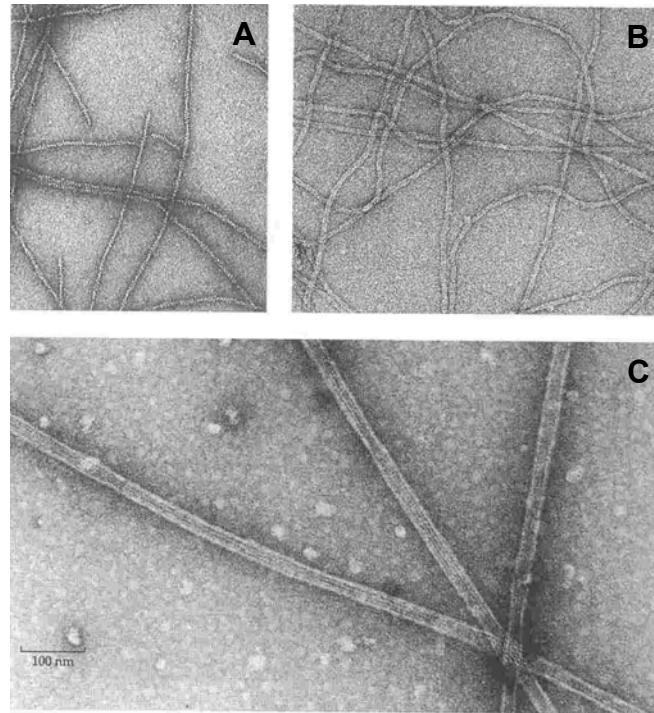
Les cellules adhérentes possèdent la capacité de « tester » l'élasticité d'un substrat en s'y attachant fermement et en le déformant.<sup>98</sup> Cette capacité dépend en partie de la contractilité du cytosquelette impliquant le moteur moléculaire myosine et des protéines de l'adhésion transcellulaire telles les intégrines et les cadhérines. Les cellules non seulement appliquent des forces sur le substrat mais répondent à la résistance à sa déformation en modifiant la structure de leur cytosquelette. Des corrélations entre l'adhésion cellulaire et l'accroissement de la contractilité cellulaire ont été mises en évidence<sup>99</sup> et il semble maintenant que cette capacité sensorielle de détecter la raideur d'un substrat soit dépendante de l'adhésion, du cytosquelette et de la contractilité cellulaire.<sup>100</sup> On sait aujourd'hui que la contractilité cellulaire, et par conséquent l'adhésion, sont impliquées dans un grand nombre de processus cellulaires. L'endocytose est un de ces processus qui implique entre autre la structure du réseau de filaments d'actine. Kong *et al.*<sup>101</sup> ont étudié l'internalisation de nanoparticules polymériques par des ostéoblastes de souris déposés sur un substrat polymérique réticulé. L'étude a montré que l'internalisation du vecteur augmentait avec le module

de Young du substrat. Dans une autre étude,<sup>102</sup> il a été montré que l'internalisation du vecteur était aussi dépendante de la densité de ligands greffés sur le substrat. Ces deux études démontrent qu'il existe une relation étroite entre la contractilité, l'adhésion cellulaire et l'endocytose. Ces résultats récents ouvrent la porte à de nombreuses interrogations. Par exemple, si la cellule est capable de sentir la rigidité d'un substrat, elle doit être capable d'en faire de même avec le vecteur nanoparticulaire au moment de leur contact. La rigidité du vecteur peut-elle à son tour moduler son internalisation ? De plus, si la densité de ligands greffés sur le substrat peut moduler le captage des nanoparticules, il se peut également que leur orientation ou leur type d'attachement à la surface affecte l'internalisation.

## ***1.2 Mécanique et fonction cellulaire***

### ***1.2.1 Les composantes mécaniques de la cellule***

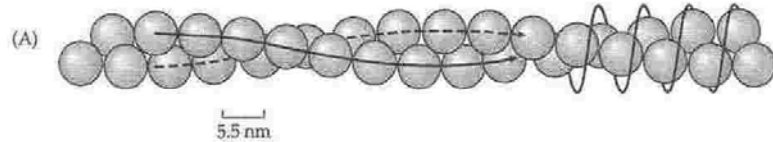
Les cellules eucaryotes possèdent trois classes principales de filaments constituant leur cytosquelette. La Figure 1.1 illustre des micrographies obtenues par microscopie électronique de chacune des trois familles de filament. Les filaments d'actine, aussi appelés microfilaments, ont une structure de câble d'un diamètre d'environ 6 nm. Les filaments intermédiaires ont une structure s'apparentant à celle d'une fibre tressée composée de plusieurs fils enchevêtrés ; leur diamètre est d'environ 10 nm. Les microtubules ont une structure tubulaire de diamètre externe d'environ 25 nm et de diamètre interne environ 18 nm.



**Figure 1.1 :** Micrographies obtenues par microscopie électronique à transmission dans lesquelles nous pouvons voir : (A) Les filaments d'actine, d'un diamètre d'environ 6 nm ; (B) Les filaments intermédiaires de 10 nm de diamètre et ayant une courbure plus prononcée que les filaments d'actine indiquant qu'ils sont aussi plus flexibles ; (C) Les microtubules, de 25 nm de diamètre. Les stries présentes sur les microtubules correspondent aux protofilaments.<sup>103</sup>

Un filament d'actine est un assemblage en double hélice de protéines d'actine dont la longueur de persistance est de l'ordre de 15  $\mu\text{m}$  (voir la Figure 1.1A et Figure 1.2).<sup>104</sup> La période de rotation du filament est de 72 nm et contient 26 sous unités d'actine. L'actine représente à peu près 1-10 % de la masse protéique totale d'une cellule non musculaire et jusqu'à 20 % d'une cellule musculaire. L'actine étant une protéine dissymétrique, le filament d'actine est polaire et ses extrémités sont structurellement différentes. Une conséquence directe de cette polarité est une différence marquée de la vitesse de polymérisation de l'actine entre les deux extrémités du filament. L'extrémité possédant la vitesse de polymérisation la plus élevée est alors appelée plus (+) alors que l'extrémité ayant une croissance moins rapide est appelée moins (-). La polymérisation de l'actine joue un rôle prépondérant dans la formation des filopodes et lamellipodes qui

apparaissent lors de la première étape de la migration cellulaire. Les filaments d'actine peuvent s'organiser en une structure tertiaire comme des réseaux ou en bouquets à l'aide de protéines qui leur sont associées. Dans la cellule, les réseaux de fibre d'actine s'attachent et se concentrent autour des sites d'adhésion entre la membrane cellulaire et le substrat.



**Figure 1.2** Représentation schématique d'un filament d'actine montrant la structure en hélice. Chaque sphère représente une unité structurale (d'après la référence <sup>103</sup> ).

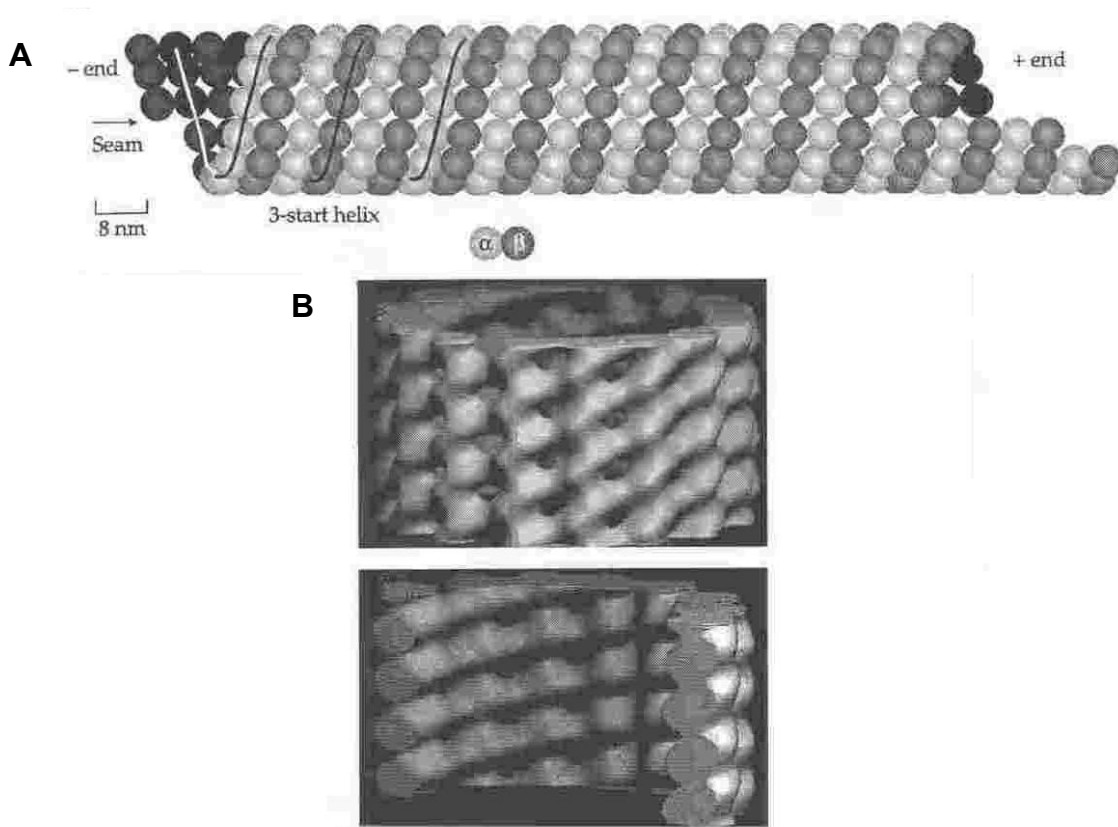
Le Tableau 1.1 donne les valeurs du module de Young de l'actine et des filaments d'actine obtenues par différents modes de déformation.

Tableau 1.1 Module de Young (GPa) de l'actine et des filaments d'actine

Mode de déformation	Filament d'actine	Actine seule
Traction	$2.3^{105}$	$2.3^{106}$
Flexion	-	$1.3^{107}$ , $2.6^{108}$
Torsion	-	$1.5^{109}$

L'unité primaire formant les microtubules est un hétérodimère  $\alpha\beta$  de tubuline très stable qui ne peut être dissocié que par des traitements chimiques très forts (comme l'ajout de détergent). Les dimères s'associent dans la direction queue-tête pour former un protofilament. Les protofilaments s'associent latéralement pour former un feuillet qui se referme pour former un tube cylindrique, le microtubule (voir Figure 1.3).<sup>110</sup> Le microtubule, tout comme le filament d'actine, est polaire. Les microtubules sont

généralement formés de 13 protofilaments mais leur polymorphisme est assez élevé, ainsi des microtubules de 8 à 19 protofilaments ont déjà été reportés. Les microtubules sont les principaux responsables de la forme des cellules et jouent un rôle prépondérant dans la migration cellulaire, spécialement durant la mitose. Certaines molécules comme la vincristine ou la vinblastine s'associent à la tubuline et peuvent éliminer l'addition de monomères au microtubule supprimant ainsi la mitose.



**Figure 1.3** (A) Représentation schématique d'un microtubule composé de 13 protofilaments. (B) Structure à basse résolution d'un microtubule déduite par cryomicroscopie électronique.<sup>103</sup>

Du fait de leur couplage mécanique avec le cytosquelette, les microtubules peuvent supporter de grands efforts en compression.<sup>111</sup> Le tableau 1.2 rapporte quelques unes des propriétés mécaniques des microtubules de différents organismes.

Tableau 1.2 Module de Young (GPa) des microtubules de différents organismes

Mode de déformation	Organisme		Module d'Young
Flexion	Cerveau bovin		1.9
Flexion	Sperme	ADP + V	2.7
Flexion	d'oursin de mer <sup>a</sup>	CO <sub>2</sub>	2.1

<sup>a</sup> L'élasticité dépend de l'état physiologique du sperme. L'ajout d'ADP ou de vanadate ou la présence de CO<sub>2</sub> permet de relaxer le microtubule. La variation de l'élasticité est due à la présence de réticulation par la dynéine entre les doublets de microtubules.

L'unité structurale des filaments intermédiaires est un dimère de deux hélices  $\alpha$  parallèles. Ces hélices sont hydrophobes d'un côté et hydrophiles de l'autre ce qui leur permet de s'associer en présence de solvant (voir Figure 1.4). L'organisation structurale de ces dimères dans le filament n'est pas encore connue et il est possible que leur arrangement diffère d'une classe à l'autre. Un modèle d'organisation considère deux dimères associés antiparallèlement pour former un tétramère. Les tétramères s'associent à leur tour pour former un protofilament. Une paire de protofilaments forme une protofibrille et quatre protofibrilles forment un filament dont la structure ressemble à celle d'une corde tressée.



**Figure 1.4 :** Diagramme en ruban montrant la structure enroulée des deux hélices  $\alpha$  constituant l'unité structurale des filaments intermédiaires.<sup>103</sup>

Les filaments intermédiaires sont généralement localisés autour de la membrane nucléaire des cellules. Ils constituent à peu près 1% de la quantité totale de protéine de la plupart des cellules exceptions faites des neurones et des kératinocytes qui en contiennent plus de 85 %. Il a été observé que les cellules épithéliales du sein normales et cancéreuses exprimaient différemment la kératine qui est une des protéines formant

les filaments intermédiaires.<sup>112</sup> La tableau 1.3 présente quelques valeurs de module de Young pour différents matériaux contenant de la kératine (constituant les filaments intermédiaires de type I)

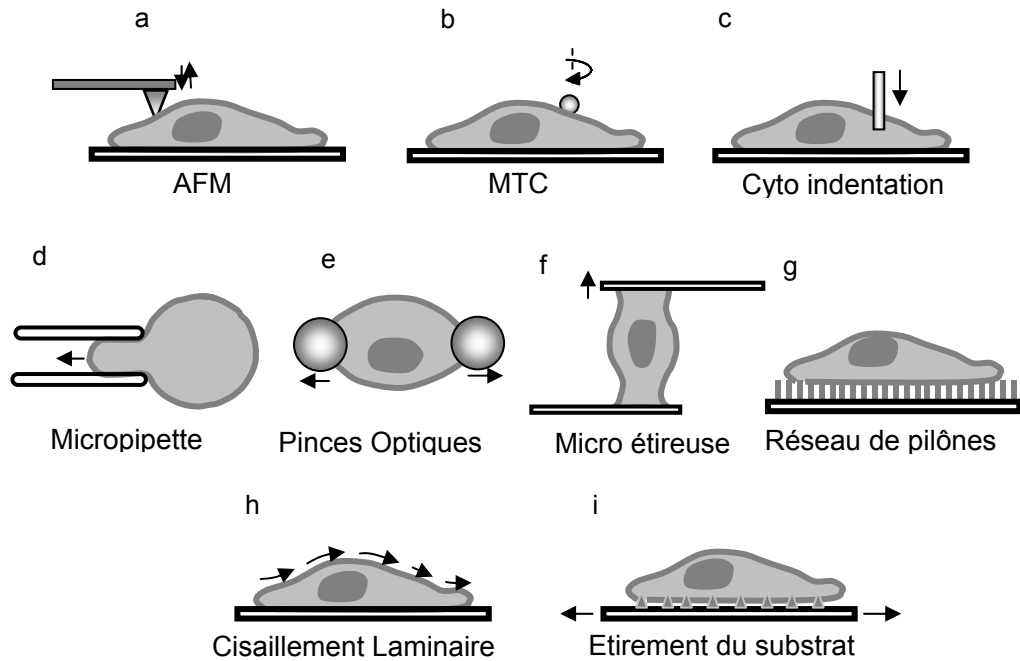
Tableau 1.3 Module de Young de différents matériaux contenant de la kératine<sup>113</sup>

Matériau	Direction	Module de Young (sec) (GPa)	Module de Young (humide) (GPa)
Poil de cheval	Longitudinale	6.8	2.4
Poil de cheval	Transversale	3.5	0.1
Laine de mouton	Longitudinale	5.6	2.0
Ongle	Longitudinale	2.3	1.5
Peau	Longitudinale	0.19	0.13

### *1.2.2 Approches expérimentales pour mesurer les propriétés mécaniques d'une cellule*

Un grand nombre de techniques expérimentales ont été développées pour mesurer les propriétés mécaniques des cellules. Ces techniques peuvent être classées en trois grandes catégories : dans la première catégorie se trouvent les techniques mesurant les propriétés mécaniques locales de la cellule. Les techniques les plus utilisées pour ce type de mesure sont l'AFM, la cyto indentation et la Magnetic Twisting Cytometry (MTC). La seconde catégorie de mesures consiste à déformer la cellule dans sa totalité. Dans cette catégorie se trouvent les techniques des pinces optiques, la micro-étireuse, l'aspiration par micropipette et la technique de déformation de micro-pylônes. La troisième catégorie regroupe les techniques déformant simultanément une large population de cellules. On compte dans cette catégorie les techniques de l'étirement de substrat et du cisaillement par courant laminaire. Toutes ces techniques sont brièvement schématisées à la Figure 1.5.





**Figure 1.5 :** Représentation schématique des différentes techniques utilisées pour mesurer les propriétés mécaniques cellulaires. Les techniques sont classées en trois catégories suivant l'étendue de la déformation cellulaire qu'elles génèrent. (a-c) : déformation locale de la cellule ; (d-g) : déformation de toute la cellule ; (h-i) : déformation d'un ensemble de cellules.

L'AFM<sup>114-116</sup> déforme localement la membrane cellulaire en appliquant une force grâce à une pointe conique supportée à l'extrémité d'un levier actionné. La déflexion du levier peut être calibrée pour connaître la force appliquée. Un des principaux désavantages de cette technique réside dans le fait que les fortes pressions appliquées localement sur la cellule peuvent affecter ses propriétés et sa viabilité. La magnéto cytométrie de cisaillement (« Magnetic Twisting Cytometry », MTC)<sup>117-119</sup> consiste à animer une bille ferromagnétique attachée à la cellule à l'aide d'un champ magnétique. Une partie de la membrane cellulaire est déformée par le mouvement de la particule induit par le champ magnétique. Le déplacement de la particule est mesuré par vidéo microscopie. Cette technique requiert une approximation de l'aire de contact entre la bille magnétique et la cellule afin de pouvoir estimer l'effort appliqué sur la membrane cellulaire. La cyto indentation<sup>116, 120</sup> consiste à appliquer une déformation

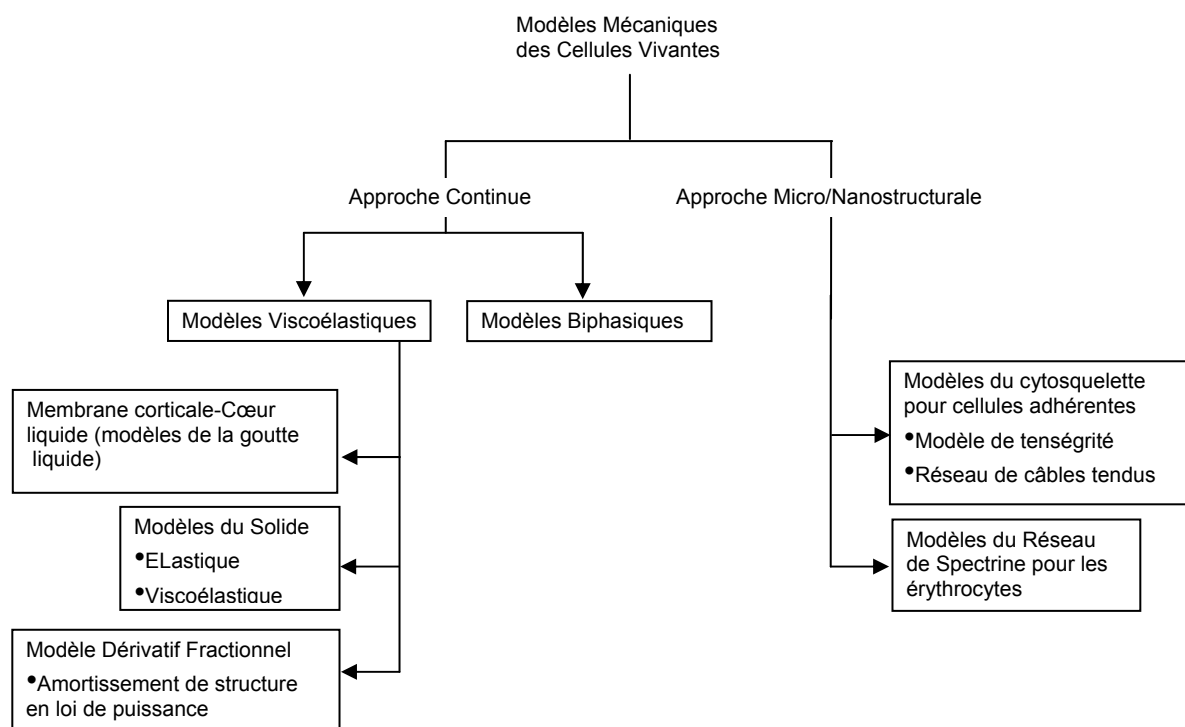
locale à la cellule à l'aide d'une pointe d'indentation de géométrie connue. La force appliquée est mesurée par des jauges de contraintes placées au dessus de l'indenteur. La déformation est estimée par microscopie. Le principal désavantage de cette technique est identique à celui de l'AFM c'est-à-dire que de fortes pressions sont appliquées localement sur la paroi cellulaire. Ces trois techniques permettent d'appliquer des forces de l'ordre de  $10^{-12}$ - $10^{-6}$  N et des déplacements de l'ordre de 1 nm.

Les pinces optiques<sup>121-123</sup> ont été utilisées pour mesurer les propriétés mécaniques des cellules sous une déformation par traction. Deux billes micrométriques sont collées sur les deux extrémités de la cellule et celles-ci sont déplacées à l'aide des pinces. La déformation totale de la cellule est visualisée par microscopie et l'analyse de la forme de la cellule permet de mesurer ses propriétés élastiques à l'aide d'une modélisation par éléments finis. Cette technique se limite à l'étude des cellules non adhérentes. La mesure par micro-étireuse<sup>124-126</sup> consiste à coller une cellule entre deux micro-plateaux et à étirer la cellule en déplaçant le plateau supérieur. Le déplacement et la flexion du plateau mobile sont analysés par microscopie. Le principal problème de cette technique est que l'aire de contact entre la cellule et les plateaux ne reste pas constante durant l'étirement ce qui complique la mesure de force. La mesure par déformation d'un réseau de micro-pylônes<sup>116, 127</sup> consiste à déposer une cellule sur un réseau de micro-pylônes déformables et adhésifs. La cellule, en s'attachant aux pylônes qui la supportent, va les déformer en exerçant sur eux une force de traction. La déformation de chacun des pylônes est mesurée par analyse d'image. Les substrats utilisés dans ce type d'expérience étant fortement accidentés, les cellules adoptent sur leur surface une configuration peu naturelle qui peut altérer leurs propriétés mécaniques. La mesure par aspiration par micropipette<sup>128, 129</sup> consiste à aspirer une cellule à l'aide d'une micropipette de diamètre connu. La mesure de la dépression nécessaire pour aspirer partiellement la cellule ainsi que sa longueur de pénétration dans la micropipette permettent de déterminer le module élastique de la membrane cellulaire. Cette technique s'applique principalement aux cellules non adhésives et néglige la friction entre la micropipette et la cellule. Les forces appliquées par ces différentes techniques varient entre  $10^{-12}$  et  $10^{-7}$  N et sont appliquées sur la cellule dans son ensemble.

La mesure de cytoadhérence consiste à déposer les cellules dans une chambre à flux et à faire passer un débit de liquide relativement faible de sorte que le flux soit laminaire. En faisant varier le débit, il est possible de faire varier l'effort cisailant s'appliquant sur les cellules et de détecter entre autre leur seuil de détachement.<sup>130</sup> Cette technique ne mesure pas les propriétés mécaniques de la cellule mais la résistance au cisaillement dans des conditions très proches du vivant. La mesure de l'adhésion et la déformation cellulaire par étirement de substrat<sup>131, 132</sup> consiste à déposer les cellules sur un substrat élastique traité (de silicone par exemple) et à l'étirer. L'effet de l'effort sur la morphologie cellulaire, le phénotype et la viabilité peuvent être ainsi étudiés. Cet test vise à observer la réponse dynamique de cellules soumises à un stress mais ne permet pas de déterminer directement leurs propriétés mécaniques. Ces techniques appliquent des efforts cisailants variant de  $10^{-2}$  à  $10^{-4}$  N. Aucune étude sur la mesure des propriétés mécaniques d'un ensemble de cellules n'a été reportée. De telles études pourraient grandement aider la caractérisation *in vitro* de tissus cellulaires dans des conditions proches du vivant.

### ***1.2.3 Modélisations des propriétés mécaniques des cellules vivantes***

Une vue générale des différentes approches utilisées pour modéliser les propriétés mécaniques des cellules est schématisée à la Figure 1.6. Ces modèles sont obtenus soit en utilisant l'approche micro/nanostructurale soit l'approche continue. La première approche considère le cytosquelette comme le composant structural le plus important et a été développé pour étudier spécifiquement les propriétés mécaniques du cytosquelette des cellules adhérentes.<sup>133-135</sup> Pour les cellules suspendues comme les érythrocytes, le modèle du réseau de spectrine est utilisé pour déterminer les contributions respectives de la membrane et du réseau de spectrine sur la déformation des globules rouges.<sup>135, 136</sup> Une autre approche consiste à traiter les cellules comme un matériau possédant certaines propriétés mécaniques continues. A partir d'observations expérimentales, les lois constitutives du matériau et leurs paramètres associés sont obtenus. Bien que cette approche procure moins d'information à l'échelle moléculaire, elle est plus simple à utiliser pour extraire les propriétés mécaniques de la cellule toute entière.



**Figure 1.6** : Représentation générale des modèles mécaniques des cellules vivantes

Le modèle de la goutte liquide fut développé par Yeung et al.<sup>137</sup> pour décrire la déformation d'une cellule aspirée par une micropipette. Dans ce modèle, l'intérieur de la cellule est considéré comme un fluide newtonien et le cortex cellulaire comme une membrane fluide possédant une tension statique mais aucune résistance à la flexion. En utilisant ce modèle, les auteurs ont pu montrer que la dissipation dans la membrane corticale est très largement négligeable par rapport à celle du liquide intracellulaire. Ce modèle prédit aussi une relation linéaire entre la vitesse de déformation et le rayon cellulaire hors de la pipette. Cette relation a été confirmée expérimentalement avec des neutrophiles.<sup>138</sup> De manière générale, ce modèle permet de représenter les propriétés mécaniques des cellules non adhérentes soumises à de larges déformations (80-120 %). La viscosité du cytoplasme obtenue par ce modèle varie entre 100-200 Pa.s et la tension de surface de la membrane corticale entre  $0.02-0.04 \times 10^{-3}$  N/m. Une version évoluée du modèle consiste à inclure les propriétés mécaniques du noyau en le modélisant comme une seconde capsule baignant dans la cellule. Cette capsule est constituée d'un

fluide newtonien plus visqueux que le cytoplasme et d'une membrane élastique.<sup>139</sup> Ce modèle a permis entre autre de prédire que la viscosité nucléaire est en moyenne 10 fois supérieure à celle du cytoplasme. Malheureusement, ce modèle possède plusieurs paramètres variables ce qui le rend souvent peu pratique et peu fiable dans des configurations plus complexes que l'aspiration par micropipette.

Le modèle de la goutte liquide ne tient pas compte de certaines propriétés mécaniques observées sur un grand nombre de cellules non adhérentes comme l'augmentation de la viscosité cytoplasmique avec la vitesse de cisaillement. Ceci peut être corrigé en considérant le cytoplasme non plus comme un fluide newtonien mais comme un fluide à loi de puissance, c'est-à-dire un fluide dont la viscosité augmente exponentiellement avec la vitesse de cisaillement.<sup>140</sup> D'autres techniques comme la MTC ont été utilisées sans succès pour corroborer l'hypothèse du fluide à loi de puissance.<sup>117</sup> Les résultats obtenus sur des neutrophiles par aspiration de micropipette prouvent que ce modèle est valide aux larges déformations mais que la dépendance en loi de puissance disparaît à faible vitesse de cisaillement.

Une autre approche considère cette fois-ci le cytoplasme comme un fluide viscoélastique de Maxwell. L'inclusion d'une composante élastique pour modéliser les propriétés rhéologiques du cytoplasme a permis de reproduire un certain nombre de résultats expérimentaux obtenus par la méthode d'aspiration par micropipette comme par exemple l'évolution du temps de récupération en fonction du temps de déformation.<sup>141</sup>

Les modèles que nous venons de décrire ne permettent pas d'expliquer les propriétés mécaniques de tous les types de cellules. Par exemple, les cellules endothéliales et les chondrocytes ne peuvent pas être aspirées par une micropipette ce qui suggère qu'ils possèdent un comportement de solide élastique.<sup>142, 143</sup> Les modèles développés pour prendre en compte ce comportement considèrent la cellule comme un solide élastique ou viscoélastique homogène sans membrane corticale. Le modèle de la cellule purement élastique a été développé pour différentes techniques comme la micropipette,<sup>142</sup> l'AFM,<sup>144</sup> la cytoindentation<sup>145</sup> et la MTC.<sup>146</sup> Le modèle du solide viscoélastique a lui aussi été développé pour les mêmes techniques.<sup>147</sup> Bien que ces

modèles aient été d'abord développés pour étudier les propriétés mécaniques des leucocytes, il s'est avéré que ces cellules sont mieux représentées par le modèle de la goutte liquide décrit précédemment. Par contre, plusieurs cellules adhérentes comme les cellules endothéliales ou même le noyau cellulaire démontrent un comportement de solide élastique.

Les modèles décrits précédemment sont dits statiques car ils décrivent la déformation de la cellule soumise à une déformation instantanée. Cependant les cellules sont fréquemment soumises à des forces dynamiques dans leur environnement physiologique. Un des modèles dynamiques pouvant reproduire ce type de sollicitation mécanique est le modèle d'amortissement de structure en loi de puissance développé par Fabry *et coll.*<sup>133</sup> Il a été validé par la technique de MTC<sup>148, 149</sup> et par AFM.<sup>150, 151</sup> Il a été démontré que le module élastique d'un grand nombre de lignées cellulaires dépendait de la fréquence d'oscillation selon une loi de puissance. Pour des fréquences comprises entre 0.01 et 10<sup>3</sup> Hz, l'exposant de la loi de puissance varie entre 0.1 et 0.4. Pour des fréquences plus élevées, la composante visqueuse devient majoritaire.<sup>117, 149, 151</sup> Ce comportement rhéologique est parfaitement capturé par le modèle d'amortissement de structure développé par Fabry et al.<sup>149</sup>

#### ***1.2.4 Implications du cytosquelette dans l'adhésion cellulaire et l'endocytose***

##### *L'adhésion cellulaire et le cytosquelette*

L'adhésion entre la cellule et la matrice extra cellulaire (MEC) se fait par l'intermédiaire des intégrines qui sont des protéines transmembranaires interagissant à l'intérieur de la cellule avec le cytosquelette. Les intégrines interagissent en plus avec différents types de ligands présents dans la MEC comme la fibronectine, la vitronectine et différents types de collagène. L'adhésion entre la cellule et la MEC se caractérise par l'apparition de différentes structures adhésives localisées spatialement et temporellement. On compte parmi elles les sites d'adhésion focale (ou aussi appelés contacts focaux), les jonctions fibrillaires, les complexes focaux et les podosomes.

Le contact focal est une structure plane et allongée de plusieurs micromètres carré de surface et localisée à la périphérie des cellules.<sup>152-154</sup> Les contacts focaux, en plus de

permettre à la cellule d'adhérer fortement au substrat, sont le point d'ancrage de bouquets de filaments d'actine. L'ancrage des filaments d'actine sur le contact focal regroupe un grand nombre de protéines constituant la plaque adhésive. On compte plus de 50 protéines différentes constituant la plaque adhésive dont les plus étudiées sont la taline, la vinculine et la paxiline. Les contacts focaux sont issus de la maturation et la stabilisation des complexes focaux. Le complexe focal fait référence à une petite structure ponctuelle présente essentiellement à la périphérie du lamellipodium.<sup>155, 156</sup> Ces sites d'adhésion sont associés à la migration cellulaire et servent aussi de précurseurs aux contacts focaux. L'apparition d'un complexe focal débute par l'agrégation de plusieurs intégrines pour former le complexe. Celui-ci pourra disparaître ou mûrir pour former un contact focal d'adhésion. Le processus de maturation peut être activé de manière interne par la machine contractile de la cellule<sup>157, 158</sup> ou bien de manière externe en appliquant une force externe sur la cellule.<sup>159, 160</sup> L'ajout d'inhibiteurs de la contractilité actomyosinale produit une perte rapide des contacts focaux d'adhésion.<sup>161</sup>

Les jonctions fibrillaires, aussi appelées contacts adhésifs fibrillaires, se situent le plus souvent au centre de la cellule et sont très allongées.<sup>162-164</sup> Cette structure est souvent associée à la structure de la MEC sous-jacente. Les principaux composants des jonctions fibrillaires sont la fibronectine du côté de la MEC, l'intégrine  $\alpha_5\beta_1$  et la tensine du côté cellulaire.

Les podosomes sont de toutes petites structures cylindriques d'environ 500 nm de diamètre contenant principalement de la paxiline et vinculine. Leur formation est conditionnée à la présence de dynamine et de gelsoline.<sup>165, 166</sup>

Une particularité remarquable des protéines formant les contacts adhésifs est qu'elles sont capables d'interagir avec un grand nombre de partenaires. Par exemple la paxiline peut interagir avec plus de 10 protéines différentes dont les intégrines ce qui rend le nombre de combinaisons d'interactions moléculaires liant l'intégrine au cytosquelette incroyablement élevé. La mécanique des intégrines et les voies de signalisation qui leur sont associées permettent aux cellules de réguler la composition et la structure de la plaque adhésive.

### *Le cytosquelette et l'endocytose*

L'endocytose représente les différentes voies par lesquelles la cellule « sonde » le milieu extérieur en y prélevant de petites quantités qu'elle « trie et digère » dans des vésicules intracellulaires. Ce procédé est fondamental pour le contrôle de divers processus physiologiques comme la signalisation hormonale, la surveillance immunitaire, la présentation des antigènes et l'homéostasie cellulaire. On distingue trois modalités pour l'endocytose, suivant le type d'interaction par laquelle le matériel extracellulaire est intériorisé : l'endocytose en phase fluide, l'endocytose adsorptive non spécifique et l'endocytose médiée par récepteurs.

La capture de solutés par endocytose en phase fluide est très faible, ne dépend pas de la nature du traceur et son efficacité est strictement proportionnelle à la concentration des traceurs dans le milieu extracellulaire. L'endocytose fluide n'est pas associée spécifiquement à une structure particulière, mais regroupe tous les types de structures endocytaires, à l'exception des phagosomes où la membrane limitante, étroitement accolée à la paroi, ne laisse pas de place pour l'endocytose fluide.

L'endocytose adsorptive a lieu lorsqu'un soluté particulier peut s'adsorber sur une population généralement abondante de sites non spécifiques sur la membrane péricellulaire, par interactions électrostatiques, par formation de liaisons hydrogène ou par interactions hydrophobes. L'efficacité de la capture d'un traceur par endocytose adsorptive dépend de l'abondance des sites de fixation et de l'avidité du traceur pour ces sites. L'efficacité varie donc en fonction du type cellulaire et de la nature du traceur. La diversité des sites de liaison impliqués exclut une régulation sélective de l'endocytose adsorptive. Pour un traceur donné fortement adsorbé, la contribution relative de l'endocytose adsorptive est supérieure à celle de l'endocytose fluide. En revanche, si l'avidité de la membrane pour le traceur est faible, la composante adsorptive de l'endocytose est négligeable par rapport à la composante fluide.

L'endocytose médiée par des récepteurs implique la liaison spécifique, généralement de haute affinité, entre des ligands bien définis et un nombre limité de récepteurs transmembranaires exposés à la surface cellulaire. Ces complexes ligands-récepteurs se concentrent dans les puits mantelés et pénètrent dans des vésicules mantelées (recouvertes de clathrine). Les ligands se concentrent au niveau de la membrane



plasmique où ils s'associent à leurs récepteurs et au niveau des puits mantelés où l'adaptine de type AP2 entraîne la polymérisation du manteau de clathrine à la membrane plasmique. Cette polymérisation piège les complexes ligands-récepteurs sur une surface très restreinte de la membrane péricellulaire où a lieu l'endocytose. Au contraire de l'endocytose fluide, l'endocytose médiée par récepteurs est caractéristique d'un seul type de vésicules endocytaires primaires, les vésicules recouvertes de clathrine. L'endocytose liée aux récepteurs est le mécanisme le plus efficace pour la capture sélective de macromolécules présentes en faible concentration dans le milieu extracellulaire. Cette capture peut être finement régulée en contrôlant le nombre de récepteurs exprimés, de leur fraction exposée en surface et/ou de l'affinité de l'interaction entre le ligand et le récepteur.

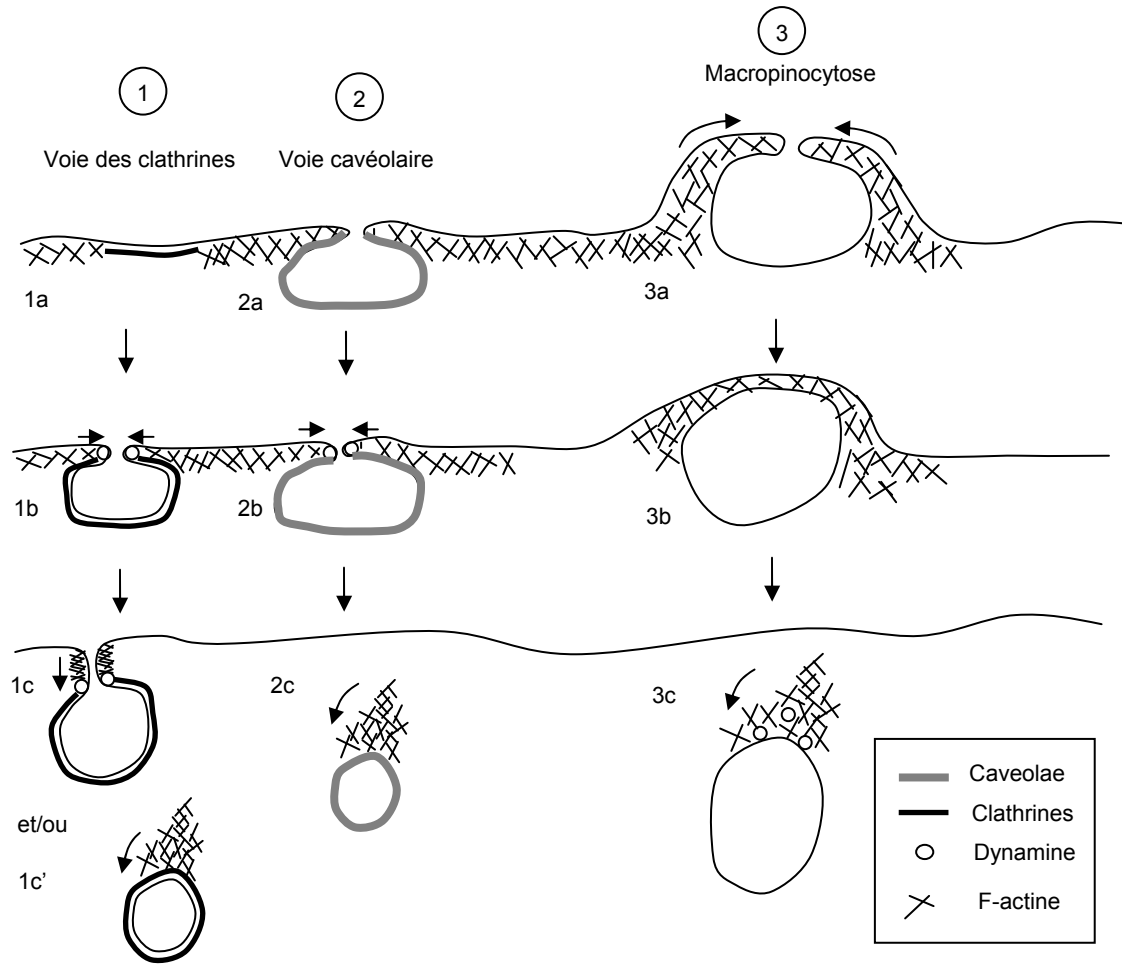
L'endocytose regroupe différentes voies d'internalisation. La phagocytose est réalisée par les cellules spécialisées comme les macrophages, les monocytes ou les neutrophiles qui ont tous pour fonctions de détecter et d'éliminer les pathogènes telles que les bactéries ou les levures. Ce processus est hautement régulé et implique des récepteurs cellulaires spécifiques.<sup>167</sup> Par exemple, les récepteurs Fc présents sur les macrophages sont activés par les anticorps liés aux antigènes des bactéries. Une cascade de signalisation déclenche l'assemblage et la formation de protubérances qui s'enroulent autour du pathogène recouvert d'anticorps. Suivent ensuite d'autres cascades de signaux servant à détruire l'élément ingurgité.

La macropinocytose prend naissance au niveau de la région marginale de la cellule riche en actine corticale polymérisée. Elle s'amorce par de fortes ondulations membranaires (dites « ruffling ») qui produisent des feuillet amincis en protusions vers l'extérieur de la cellule. Ces feuillet se prolongent puis se referment contre la membrane plasmique, générant ainsi des macropinosomes (Figure 1.7 3a-c).<sup>168</sup> Les macropinosomes sont de taille irrégulière et peuvent dépasser 10 µm de diamètre. La macropinocytose est limitée à certains types cellulaires. Elle peut être induite en quelques minutes mais de manière transitoire par les esters de phorbol (agents promoteurs de tumeurs) et par les facteurs de croissance qui stimulent la mitose et/ou préviennent l'apoptose.<sup>169</sup> L'actine est impliquée dans la formation des protusions membranaires et leur fermeture pour former les macropinosomes (Figure 1.7 3a). Son

rôle semble être similaire à celui qu'elle joue durant l'extension du lamellipode car les appareillages protéiques impliqués dans ce phénomène et la macropinocytose sont très similaires.<sup>170, 171</sup> De plus, une traînée de filaments d'actine peu stables dans le temps est observée en queue des pinosomes récemment formés. La polymérisation de l'actine propulse la vésicule dans le cytoplasme à une vitesse d'approximativement 200 nm/s durant quelques dizaines de secondes.<sup>171</sup> La présence de dynamine dans la traînée de filaments d'actine suggère que cette protéine joue un rôle important lors de la fermeture de la vésicule.<sup>172</sup>

La pinocytose fait référence au mécanisme donnant naissance à des vésicules endocytaires de petite taille (typiquement inférieures à 200 nm de diamètre) qui peuvent être ou non tapissées d'un manteau de clathrine. Elle regroupe trois types de mécanisme : la voie des clathrines, la voie cavéolaire et es voies alternatives (clathrine et caveolae indépendantes)

La voie des clathrines désigne la formation des vésicules tapissées d'un manteau de clathrine. C'est le processus qui assure l'endocytose médiée par récepteurs, permettant à la cellule de concentrer puis d'internaliser de manière spécifique des ligands extracellulaires tout en minimisant l'endocytose fluide concomitante obligée.<sup>173, 174</sup> La pinocytose associée à la clathrine est constitutive dans tous les types cellulaires. Les puits mantelés de clathrine occupent environ 2 % de la surface de la membrane plasmique. La durée de vie de ces invaginations est courte, dans la minute qui suit leur formation, les invaginations se détachent par pincement pour donner naissance à des vésicules recouvertes d'un manteau de clathrine (Figure 1.7 1a-c).



**Figure 1.7 :** Représentation schématique des différentes fonctions de l'actine dans les différentes voies d'endocytose. L'actine sert d'échafaudage pour la formation des invaginations couvertes par la clathrine ou la caveoline (1a et 1b), elle produit la force motrice pour la maturation et la scission des invaginations (1b, 1c et 2b) puis finalement elle propulse les vésicules formées dans chacune des voies loin de la membrane plasmique (1c', 2c et 3c). L'actine joue aussi un rôle important dans la formation des protubérances membranaires lors de la formation des vésicules macropinocytiques (3a).

La dynamine joue un rôle prépondérant dans cette étape en permettant la scission du col vésiculaire.<sup>175</sup> Très rapidement, ces vésicules perdent leur manteau et sont alors capables de fusionner avec les endosomes précoces. Plusieurs protéines de la membrane plasmique sont impliquées dans la machinerie endocytique des puits

mantelés, tels que l'adaptateur AP2 et ses partenaires directs (comme l'amphiphysine) ou indirects (comme la dynamine).

L'actine réalise diverses fonctions durant la pinocytose associée à la clathrine. Elle joue le rôle d'échafaudage pour l'assemblage et l'ancrage de la machinerie endocytique durant la formation des puits mantelés. Elle détermine aussi l'endroit précis où apparaissent les puits mantelés sur la membrane plasmatique.<sup>176</sup> La localisation de la machinerie endocytique sur certains sites de la membrane plasmatique est très importante pour l'organisation du cortex cellulaire et pour maintenir la polarité cellulaire. Cette fonction est primordiale pour les cellules neuronales ou épithéliales pour lesquelles les marqueurs doivent être internalisés à des sites particuliers de la membrane plasmatique.

La polymérisation de l'actine permet de générer l'énergie mécanique suffisante durant la constriction et la scission des vésicules mantelées (Figure 1.7 1b-c).<sup>177</sup> Une fois formées, les vésicules sont éloignées de la membrane plasmatique. Ce processus est réalisé en partie par la polymérisation de l'actine qui propulse les vésicules mantelées (Figure 1.7 1c').

Une forme particulière d'endocytose indépendante de la clathrine implique les cavéoles. Il s'agit d'invaginations membranaires de très petite taille (60 nm de diamètre) recouvertes sur leur face cytoplasmique d'un manteau spiralé formé de cavéoline. Cette protéine est capable de s'insérer profondément dans la membrane et d'y stabiliser des microdomaines riches en cholestérol. L'existence des cavéoles a été initialement observée dans les cellules endothéliales, les adipocytes et les cellules musculaires lisses, mais on les trouve dans presque toutes les cellules hormis les lymphocytes. Le cholestérol est nécessaire à la formation des cavéoles. En effet, la fonction des cavéoles est inhibée par la déplétion en cholestérol ou par le traitement à la filipine, qui complexe le cholestérol.<sup>178</sup> Les cavéoles sont caractérisées par leur insolubilité dans le triton X-100 à 4°C et leur très faible densité en gradient de flottation. Le rôle des cavéoles dans l'endocytose reste incertain. Initialement, ces structures ont été impliquées dans le transport de solutés à travers les cellules endothéliales et dans le phénomène de transcytose.<sup>179</sup>

Le mécanisme de formation des cavéoles présente certaines similarités avec celui des vésicules associées à la clathrine. La localisation des sites de formation des cavéoles semble être strictement contrôlée par l'actine. Celle-ci joue le rôle d'échafaudage limitant la mobilité des puits cavéolaires.<sup>180, 181</sup> La dynamine joue aussi le rôle de constriction et de scission du puit vésiculaire bien que son recrutement semble être régulé. Lors du recrutement de la dynamine, l'actine s'associe temporellement à la cavéoline pour former des fibres et des plaques associées à la vésicule (Figure 1.7 1b). La polymérisation de l'actine laisse une traînée de plusieurs micromètres de long et propulse la vésicule à l'une de ses extrémités. Ce mécanisme est très similaire à celui rencontré dans la voie des clathrines bien que la traînée associée aux cavéoles soit plus longue et plus stable dans le temps que celle associée aux vésicules mantelées de clathrine.

Les caveolae représentent un type de microdomaines de la membrane plasmique riche en cholestérol. Il existe d'autres microdomaines, appelés « rafts » lipidiques, qui diffusent librement à la surface cellulaire. Leur composition lipidique unique permet de ségréguer certaines protéines membranaires et / ou certains glycolipides par leur région transmembranaire.<sup>182, 183</sup> Ces domaines peuvent en principe être capturés et internalisés par n'importe quel type de vésicule endocytaire. Les mécanismes sous-jacents à cette voie d'internalisation alternative sont très peu connus jusqu'à ce jour.

### ***1.3 Hypothèses et objectifs***

L'objectif principal de cette thèse est d'étudier l'impact de certains paramètres physico-chimiques sur l'interaction entre des nanoparticules polymériques et des cellules vivantes. Trois paramètres ont été étudiés : (i) effet du greffage d'une molécule active à la surface des nanoparticules pour cibler l'endothélium, (ii) effet des propriétés mécaniques des cellules sur leur capacité d'internalisation des nanoparticules, (iii) effet des propriétés mécaniques des nanoparticules sur leur capacité de pénétration cellulaire.

### *Effet du greffage d'une molécule active pour le ciblage de l'endothélium*

Le ciblage de l'endothélium représente une voie de libération des principes actifs très intéressante pour les pathologies ayant une composante inflammatoire prononcée. Les stratégies qui ont été reportées jusqu'à aujourd'hui utilisent des nanoparticules fonctionnalisées en surface avec un ligand ciblant soit l'intégrine ICAM-1 soit les sélectines E et P. Dans le cas des sélectines, le ligand le plus utilisé est le sialyl Lewis<sup>x</sup>, présent sur la membrane externe des neutrophiles. Ce ligand étant naturellement présent dans le corps humain, son utilisation comme molécule active sur un vecteur ne garantit pas un ciblage efficace car des nanoparticules fonctionnalisées avec ce ligand seront automatiquement en compétition avec les autres formes de ligands présentes dans le flux sanguin.

Nous proposons donc de développer un nouveau système de transport de médicament basé sur des particules d'acide polylactique fonctionnalisées avec un nouveau ligand synthétique. Afin de garantir la présence du ligand tout au long de la durée de vie du vecteur, il sera nécessaire de concevoir une nouvelle stratégie de couplage du ligand avec le cargo. Pour ce faire la particule sera composée de deux polymères dont l'un possédera le ligand greffé. Ainsi une fraction du ligand greffé sera exposée sur la surface de la nanoparticule tandis que la fraction restante sera protégée à l'intérieur de la nanoparticule et sera exhibée plus tardivement par érosion de la nanoparticule.

Afin de démontrer que ce vecteur est capable de cibler l'endothélium des études ont été réalisées *in vitro* sur des cellules endothéliales activées avec différents médicaments afin de simuler différentes conditions pathologiques et de vérifier l'efficacité du vecteur. En cas de réussite, ces résultats devraient poser les bases nécessaires pour de futurs tests *in vivo*.

### *Effet des propriétés mécaniques cellulaires sur leur capacité à capter des nanoparticules*

Il est connu que les propriétés mécaniques du substrat sur lequel sont déposées les cellules ainsi que la densité de ligand présente sur le substrat peut influencer

l'internalisation des vecteurs nanoparticulaires. Il est donc concevable que les propriétés mécaniques du cytosquelette et l'adhésion cellulaire soient impliquées dans l'interaction d'une cellule avec un vecteur nanoparticulaire.

Cette hypothèse sera vérifiée en étudiant l'affinité de nanoparticules de PLA avec des macrophages murins déposés sur différents substrats fonctionnalisés capables de modifier les propriétés mécaniques et adhésives des cellules. Les propriétés mécaniques et adhésives des cellules seront mesurées simultanément en utilisant une nouvelle méthode.

### *Effet des propriétés mécaniques des nanoparticules sur leur capacité de pénétration cellulaire*

Étant donné que les cellules modifient leur comportement biologique en fonction de l'élasticité du substrat sur lequel elles reposent, il est proposé que les propriétés mécaniques des nanoparticules doivent aussi avoir un impact sur leur capacité à pénétrer une cellule. Cette hypothèse sera vérifiée en étudiant l'effet de l'élasticité de nanoparticules d'hydrogel sur leur capacité d'internalisation par des macrophages. Pour ce faire, des nanoparticules aux propriétés mécaniques contrôlées ont été préparées et leur internalisation et trafic intracellulaire ont été étudiés.

## ***1.5 Structure de la thèse***

La thèse est constituée de trois articles dont deux ont été acceptés et publiés et un troisième est en cours de révision au moment où cette thèse est écrite. L'objectif de cette thèse étant d'étudier l'impact des propriétés physico chimiques des NPs sur leur interaction avec les cellules, nous avons divisé la thèse en trois parties, chacune d'entre elle correspondant à un article qui a été publié ou qui est en cours de révision. Dans le chapitre 3, nous étudions l'effet de la modification des propriétés de surface des NPs sur leur propriété adhésive. Les particules étudiées sont des particules de PLA sur lesquelles est greffé un ligand synthétique des selectines. Cette étude a fait l'objet d'une publication dans *Bioconjugate Chemistry* et peut être trouvée sous la référence : « **Selectin Ligand Decorated Drug Carriers for Activated Endothelial Cell**

**Targeting** » Xavier Banquy, Grégoire Leclair, Jean-Michel Rabanel, Anteneh Argaw, Jean-François Bouchard, Patrice Hildgen and Suzanne Giasson *Bioconjugate Chemistry* 19, 2030-2039, 2008.

Dans le chapitre 4 nous étudions cette fois-ci l'effet des propriétés mécaniques des cellules sur l'interaction NPs-cellules. Pour contrôler les propriétés mécaniques des cellules nous avons développé différents substrats capables d'altérer la structure du cytosquelette de la cellule modifiant ainsi son élasticité. Cette étude a fait l'objet d'un article qui a été publié sous le titre : « **Direct Measurement of Mechanical and Adhesive Properties of Living Cells using Surface Forces Apparatus** » Xavier Banquy, Jean-Michel Rabanel, Patrice Hildgen and Suzanne Giasson. *Australian Journal of Chemistry* 60 (9): 638-645, 2007.

Le cinquième chapitre traite de l'effet des propriétés mécaniques des particules sur l'interaction NPs-cellules. Pour ce faire nous avons utilisé des NPs d'hydrogel réticulées afin de contrôler leur élasticité. Cette étude a fait l'objet d'une troisième publication intitulée « **Correlations between mechanical properties of hydrogel nanoparticles and their uptake by macrophage cells** » Xavier Banquy, Fernando Suarez, Anteneh Argaw, Jean-Michel Rabanel, Peter Grütter, Jean-François Bouchard, Patrice Hildgen, and Suzanne Giasson *Soft Matter*, DOI:10.1039/B821583A.

Le sixième et dernier chapitre discute de la portée générale des résultats obtenus dans les différentes études et présente certaines voies possibles de recherche.

## **1.6 Références**

1. Schwope, A. D.; Wise, D. L.; Howes, J. F., Lactic-Glycolic Acid Polymers as Narcotic-Antagonist Delivery Systems. *Life Sciences* **1975**, 17, (12), 1877-1885.
2. Couvreur, P.; Tulkens, P.; Roland, M.; Trouet, A.; Speiser, P., Nanocapsules - New Type of Lysosomotropic Carrier. *Febs Letters* **1977**, 84, (2), 323-326.
3. Kreuter, J., Nanoparticles and Nanocapsules - New Dosage Forms in Nanometer Size Range. *Pharmaceutica Acta Helveticae* **1978**, 53, (2), 33-39.
4. Gould, P. L.; Holland, S. J.; Tighe, B. J., Polymers for Biodegradable Medical Devices .4. Hydroxybutyrate Valerate Copolymers as Nondisintegrating Matrices for



Controlled-Release Oral Dosage Forms. *International Journal of Pharmaceutics* **1987**, 38, (1-3), 231-237.

5. Vilivalam, V. D.; Adeyeye, C. M., Development and Evaluation of Controlled-Release Diclofenac Microspheres and Tableted Microspheres. *Journal of Microencapsulation* **1994**, 11, (4), 455-470.

6. Codde, J. P.; Lumsden, A. J.; Napoli, S.; Burton, M. A.; Gray, B. N., A Comparative-Study of the Anticancer Efficacy of Doxorubicin Carrying Microspheres and Liposomes Using a Rat-Liver Tumor-Model. *Anticancer Research* **1993**, 13, (2), 539-543.

7. Langer, R., Drug delivery and targeting. *Nature* **1998**, 392, (6679), 5-10.

8. Langer, R., New Methods of Drug Delivery. *Science* **1990**, 249, (4976), 1527-1533.

9. Danilov, S. M.; Muzykantov, V. R.; Martynov, A. V.; Atochina, E. N.; Sakharov, I. Y.; Trakht, I. N.; Smirnov, V. N., Lung Is the Target Organ for a Monoclonal-Antibody to Angiotensin-Converting Enzyme. *Laboratory Investigation* **1991**, 64, (1), 118-124.

10. Atochina, E. N.; Balyasnikova, I. V.; Danilov, S. M.; Granger, D. N.; Fisher, A. B.; Muzykantov, V. R., Immunotargeting of catalase to ACE or ICAM-1 protects perfused rat lungs against oxidative stress. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **1998**, 19, (4), L806-L817.

11. Schnitzer, J. E., Caveolae: from basic trafficking mechanisms to targeting transcytosis for tissue-specific drug and gene delivery in vivo. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 49, (3), 265-280.

12. Muro, S.; Muzykantov, V. R., Targeting of antioxidant and anti-thrombotic drugs to endothelial cell adhesion molecules. *Current Pharmaceutical Design* **2005**, 11, (18), 2383-2401.

13. Scherpereel, A.; Wiewrodt, R.; Christofidou-Solomidou, M.; Gervais, R.; Murciano, J. C.; Albelda, S. M.; Muzykantov, V. R., Cell-selective intracellular delivery of a foreign enzyme to endothelium in vivo using vascular immunotargeting. *Faseb Journal* **2001**, 15, (2), 416-426.

14. Lindner, J. R.; Song, J.; Christiansen, J.; Klibanov, A. L.; Xu, F.; Ley, K., Ultrasound assessment of inflammation and renal tissue injury with microbubbles targeted to P-selectin. *Circulation* **2001**, 104, (17), 2107-2112.
15. Roberts, R. L.; Fine, R. E.; Sandra, A., Receptor-Mediated Endocytosis of Transferrin at the Blood-Brain-Barrier. *Journal of Cell Science* **1993**, 104, 521-532.
16. Lee, H. J.; Engelhardt, B.; Lesley, J.; Bickel, U.; Pardridge, W. M., Targeting rat anti-mouse transferrin receptor monoclonal antibodies through blood-brain barrier in mouse. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2000**, 292, (3), 1048-1052.
17. Danilov, S. M.; Gavriilyuk, V. D.; Franke, F. E.; Pauls, K.; Harshaw, D. W.; McDonald, T. D.; Miletich, D. J.; Muzykantov, V. R., Lung uptake of antibodies to endothelial antigens: key determinants of vascular immunotargeting. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **2001**, 280, (6), L1335-L1347.
18. Doerschuk, C. M.; Quinlan, W. M.; Doyle, N. A.; Bullard, D. C.; Vestweber, D.; Jones, M. L.; Takei, F.; Ward, P. A.; Beaudet, A. L., The role of P-selectin and ICAM-1 in acute lung injury as determined using blocking antibodies and mutant mice. *Journal of Immunology* **1996**, 157, (10), 4609-4614.
19. Keelan, E. T. M.; Harrison, A. A.; Chapman, P. T.; Binns, R. M.; Peters, A. M.; Haskard, D. O., Imaging Vascular Endothelial Activation - an Approach Using Radiolabeled Monoclonal-Antibodies against the Endothelial-Cell Adhesion Molecule E-Selectin. *Journal of Nuclear Medicine* **1994**, 35, (2), 276-281.
20. Muro, S.; Gajewski, C.; Koval, M.; Muzykantov, V. R., ICAM-1 recycling in endothelial cells: a novel pathway for sustained intracellular delivery and prolonged effects of drugs. *Blood* **2005**, 105, (2), 650-658.
21. Zhang, N.; Chittasupho, C.; Duangrat, C.; Siahaan, T. J.; Berkland, C., PLGA nanoparticle-peptide conjugate effectively targets intercellular cell-adhesion molecule-1. *Bioconjugate Chemistry* **2008**, 19, (1), 145-152.
22. Kreuter, J.; Speiser, P. P., Invitro Studies of Poly(Methyl Methacrylate) Adjuvants. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1976**, 65, (11), 1624-1627.
23. Couvreur, P.; Kante, B.; Roland, M.; Guiot, P.; Bauduin, P.; Speiser, P., Polycyanoacrylate Nanocapsules as Potential Lysosomotropic Carriers - Preparation,

Morphological and Sorptive Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1979**, 31, (5), 331-332.

24. Panyam, J.; Labhasetwar, V., Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, 55, (3), 329-347.

25. Jung, T.; Kamm, W.; Breitenbach, A.; Kaiserling, E.; Xiao, J. X.; Kissel, T., Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2000**, 50, (1), 147-160.

26. Kwon, H. Y.; Lee, J. Y.; Choi, S. W.; Jang, Y. S.; Kim, J. H., Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification-diffusion method. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **2001**, 182, (1-3), 123-130.

27. Brzoska, M.; Langer, K.; Coester, C.; Loitsch, S.; Wagner, T. O. F.; Mallinckrodt, C. V., Incorporation of biodegradable nanoparticles into human airway epithelium cells - in vitro study of the suitability as a vehicle for drug or gene delivery in pulmonary diseases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2004**, 318, (2), 562-570.

28. Barratt, G., Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2003**, 60, (1), 21-37.

29. Legrand, P.; Barratt, G.; Mosqueira, V.; Fessi, H.; Devissaguet, J. P., Polymeric nanocapsules as drug delivery systems - A review. *Stp Pharma Sciences* **1999**, 9, (5), 411-418.

30. Barratt, G., Therapeutic Applications of Colloidal Drug Carriers. *Pharm. Sci. Tech. Today* **2000**, 3, 163-171.

31. Panyam, J.; Dali, M. A.; Sahoo, S. K.; Ma, W. X.; Chakravarthi, S. S.; Amidon, G. L.; Levy, R. J.; Labhasetwar, V., Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles. *Journal of Controlled Release* **2003**, 92, (1-2), 173-187.

32. Jain, R. A., The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* **2000**, 21, (23), 2475-2490.

33. Vandervoort, J.; Ludwig, A., Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: a factorial design study. *International Journal of Pharmaceutics* **2002**, 238, (1-2), 77-92.
34. Panyam, J.; Zhou, W. Z.; Prabha, S.; Sahoo, S. K.; Labhasetwar, V., Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *Faseb Journal* **2002**, 16, (10).
35. Katz, J., Development in Medical Polymers for Biomaterial Application. *Med. Device Diagn. Indust.* **2001**, Jan, 122-133.
36. Hanafusa, S.; Matsusue, Y.; Yasunaga, T.; Yamamuro, T.; Oka, M.; Shikinami, Y.; Ikada, Y., Biodegradable Plate Fixation of Rabbit Femoral-Shaft Osteotomies - a Comparative-Study. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **1995**, (315), 262-271.
37. Guzman, L. A.; Labhasetwar, V.; Song, C. X.; Jang, Y. S.; Lincoff, A. M.; Levy, R.; Topol, E. J., Local intraluminal infusion of biodegradable polymeric nanoparticles - A novel approach for prolonged drug delivery after balloon angioplasty. *Circulation* **1996**, 94, (6), 1441-1448.
38. Quintanar-Guerrero, D.; Allemann, E.; Fessi, H.; Doelker, E., Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **1998**, 24, (12), 1113-1128.
39. Song, C. X.; Labhasetwar, V.; Murphy, H.; Qu, X.; Humphrey, W. R.; Shebuski, R. J.; Levy, R. J., Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery. *Journal of Controlled Release* **1997**, 43, (2-3), 197-212.
40. Lamprecht, A.; Ubrich, N.; Perez, M. H.; Lehr, C. M.; Hoffman, M.; Maincent, P., Biodegradable monodispersed nanoparticles prepared by pressure homogenization-emulsification. *International Journal of Pharmaceutics* **1999**, 184, (1), 97-105.
41. Takeuchi, H.; Yamamoto, H.; Kawashima, Y., Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 47, (1), 39-54.

42. Allemann, E.; Gurny, R.; Doelker, E., Preparation of Aqueous Polymeric Nanodispersions by a Reversible Salting-out Process - Influence of Process Parameters on Particle-Size. *International Journal of Pharmaceutics* **1992**, 87, (1-3), 247-253.
43. Molpeceres, J.; Guzman, M.; Aberturas, M. R.; Chacon, M.; Berges, L., Application of central composite designs to the preparation of polycaprolactone nanoparticles by solvent displacement. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1996**, 85, (2), 206-213.
44. Govender, T.; Stolnik, S.; Garnett, M. C.; Illum, L.; Davis, S. S., PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *Journal of Controlled Release* **1999**, 57, (2), 171-185.
45. Kreuter, J., Recent Advances in nanoparticles and nanospheres. In *Recent Advances in Nanoparticles and Nanospheres*, Hincal AA, K. H., Ed. Kluwer: New York, 1998.
46. Redhead, H. M.; Davis, S. S.; Illum, L., Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation. *Journal of Controlled Release* **2001**, 70, (3), 353-363.
47. Davis, S. S., Biomedical applications of nanotechnology - Implications for drug targeting and gene therapy. *Trends in Biotechnology* **1997**, 15, (6), 217-224.
48. Avgoustakis, K.; Beletsi, A.; Panagi, Z.; Klepetsanis, P.; Karydas, A. G.; Ithakissios, D. S., PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in Vivo drug residence in blood properties. *Journal of Controlled Release* **2002**, 79, (1-3), 123-135.
49. Leroux, J. C.; Allemann, E.; DeJaeghere, F.; Doelker, E.; Gurny, R., Biodegradable nanoparticles - From sustained release formulations to improved site specific drug delivery. *Journal of Controlled Release* **1996**, 39, (2-3), 339-350.
50. Hans, M. L.; Lowman, A. M., Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State & Materials Science* **2002**, 6, (4), 319-327.
51. Nishioka, Y.; Yoshino, H., Lymphatic targeting with nanoparticulate system. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 47, (1), 55-64.

52. Saunders, B. R.; Vincent, B., Microgel particles as model colloids: theory, properties and applications. *Advances in Colloid and Interface Science* **1999**, 80, (1), 1-25.
53. Colonne, M.; Chen, Y.; Wu, K.; Freiberg, S.; Giasson, S.; Zhu, X. X., Binding of streptavidin with biotinylated thermosensitive nanospheres based on poly(N,N-diethylacrylamide-co-2-hydroxyethyl methacrylate). *Bioconjugate Chemistry* **2007**, 18, (3), 999-1003.
54. Peppas, N. A.; Bures, P.; Leobandung, W.; Ichikawa, H., Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2000**, 50, (1), 27-46.
55. Oh, J. K.; Drumright, R.; Siegwart, D. J.; Matyjaszewski, K., The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. *Progress in Polymer Science* **2008**, 33, (4), 448-477.
56. Vihola, H.; Laukkanen, A.; Valtola, L.; Tenhu, H.; Hirvonen, J., Cytotoxicity of thermosensitive polymers poly(N-isopropylacrylamide), poly(N-vinylcaprolactam) and amphiphilically modified poly(N-vinylcaprolactam). *Biomaterials* **2005**, 26, (16), 3055-3064.
57. Peppas, N. A., Hydrogels and drug delivery. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **1997**, 2, (5), 531-537.
58. Na, K.; Lee, E. S.; Bae, Y. H., Self-organized nanogels responding to tumor extracellular pH: pH-dependent drug release and in vitro cytotoxicity against MCF-7 cells. *Bioconjugate Chemistry* **2007**, 18, (5), 1568-1574.
59. Cavalieri, F.; Chiessi, E.; Villa, R.; Vigano, L.; Zaffaroni, N.; Telling, M. F.; Paradossi, G., Novel PVA-based hydrogel microparticles for doxorubicin delivery. *Biomacromolecules* **2008**, 9, (7), 1967-1973.
60. Missirlis, D.; Kawamura, R.; Tirelli, N.; Hubbell, J. A., Doxorubicin encapsulation and diffusional release from stable, polymeric, hydrogel nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2006**, 29, (2), 120-129.
61. You, J. O.; Auguste, D. T., Feedback-regulated paclitaxel delivery based on poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate-co-2-hydroxyethyl methacrylate) nanoparticles. *Biomaterials* **2008**, 29, (12), 1950-1957.

62. Sajeesh, S.; Sharma, C. P., Novel pH responsive polymethacrylic acid-chitosan-polyethylene glycol nanoparticles for oral peptide delivery. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials* **2006**, 76B, (2), 298-305.
63. Kumar, A.; Lahiri, S. S.; Punyani, S.; Singh, H., Synthesis and characterization of pH sensitive Poly(PEGDMA-MAA) copolymeric microparticles for oral insulin delivery. *Journal of Applied Polymer Science* **2008**, 107, (2), 863-871.
64. Rokhade, A. P.; Patil, S. A.; Aminabhavi, T. M., Synthesis and characterization of semi-interpenetrating polymer network microspheres of acrylamide grafted dextran and chitosan for controlled release of acyclovir. *Carbohydrate Polymers* **2007**, 67, (4), 605-613.
65. Agnihotri, S. A.; Aminabhavi, T. M., Novel interpenetrating network chitosan-poly(ethylene oxide-g-acrylamide) hydrogel microspheres for the controlled release of capecitabine. *International Journal of Pharmaceutics* **2006**, 324, (2), 103-115.
66. Kumbar, S. G.; Soppimath, K. S.; Aminabhavi, T. M., Synthesis and characterization of polyacrylamide-grafted chitosan hydrogel microspheres for the controlled release of indomethacin. *Journal of Applied Polymer Science* **2003**, 87, (9), 1525-1536.
67. Gao, D.; Agayan, R. R.; Xu, H.; Philbert, M. A.; Kopelman, R., Nanoparticles for two-photon photodynamic therapy in living cells. *Nano Letters* **2006**, 6, (11), 2383-2386.
68. Koo, Y. E. L.; Reddy, G. R.; Bhojani, M.; Schneider, R.; Philbert, M. A.; Rehemtulla, A.; Ross, B. D.; Kopelman, R., Brain cancer diagnosis and therapy with nanoplatfoms. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, 58, (14), 1556-1577.
69. Tang, W.; Xu, H.; Kopelman, R.; Philbert, M. A., Photodynamic characterization and in vitro application of methylene blue-containing nanoparticle platforms. *Photochemistry and Photobiology* **2005**, 81, (2), 242-249.
70. Nguyen, K. T.; Shukla, K. P.; Moctezuma, M.; Braden, A. R. C.; Zhibing, J. Z.; Tang, H. L., Studies of the cellular uptake of hydrogel nanospheres and microspheres by phagocytes, vascular endothelial cells, and smooth muscle cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2008**, 10.1002/jbm.a.31734.

71. Weng, H.; Zhou, J.; Tang, L. P.; Hu, Z. B., Tissue responses to thermally-responsive hydrogel nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **2004**, 15, (9), 1167-1180.
72. Banerjee, T.; Mitra, S.; Singh, A. K.; Sharma, R. K.; Maitra, A., Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* **2002**, 243, (1-2), 93-105.
73. Unfried, K.; Albrecht, C.; Klotz, L. O.; Von Mikecz, A.; Grether-Beck, S.; Schins, R. P. F., Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms. *Nanotoxicology* **2007**, 1, (1), 52-71.
74. Kohane, D. S., Microparticles and nanoparticles for drug delivery. *Biotechnology and Bioengineering* **2007**, 96, (2), 203-209.
75. Singh, M.; Chakrapani, A.; O'Hagon, D., Nanoparticles and microparticles as vaccine-delivery systems. *Expert Review of Vaccines* **2007**, 6, (5), 797-808.
76. Kumar, M., Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **2000**, 3, (2), 234-258.
77. Gao, H. J.; Shi, W. D.; Freund, L. B., Mechanics of receptor-mediated endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, 102, (27), 9469-9474.
78. Goldsmith, H. L.; Turitto, V. T., Rheological Aspects of Thrombosis and Hemostasis - Basic Principles and Applications - Icth-Report - Subcommittee on Rheology of the International Committee on Thrombosis and Hemostasis. *Thrombosis and Haemostasis* **1986**, 55, (3), 415-435.
79. Patil, V. R. S.; Campbell, C. J.; Yun, Y. H.; Slack, S. M.; Goetz, D. J., Particle diameter influences adhesion under flow. *Biophysical Journal* **2001**, 80, (4), 1733-1743.
80. Lamprecht, A.; Schafer, U.; Lehr, C. M., Size-dependent bioadhesion of micro- and nanoparticulate carriers to the inflamed colonic mucosa. *Pharmaceutical Research* **2001**, 18, (6), 788-793.
81. Kwiatkowska, K.; Sobota, A., Signaling pathways in phagocytosis. *Bioessays* **1999**, 21, (5), 422-431.



82. Tabata, Y.; Ikada, Y., Phagocytosis of Polymer Microspheres by Macrophages. *Advances in Polymer Science* **1990**, 94, 107-141.
83. Stolnik, S.; Illum, L.; Davis, S. S., Long Circulating Microparticulate Drug Carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1995**, 16, (2-3), 195-214.
84. Rejman, J.; Oberle, V.; Zuhorn, I. S.; Hoekstra, D., Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin-and caveolae-mediated endocytosis. *Biochemical Journal* **2004**, 377, 159-169.
85. May, R. C.; Machesky, L. M., Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science* **2001**, 114, (6), 1061-1077.
86. Limbach, L. K.; Li, Y. C.; Grass, R. N.; Brunner, T. J.; Hintermann, M. A.; Muller, M.; Gunther, D.; Stark, W. J., Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: Effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environmental Science & Technology* **2005**, 39, (23), 9370-9376.
87. Lohbach, C.; Neumann, D.; Lehr, C. M.; Lamprecht, A., Human vascular endothelial cells in primary cell culture for the evaluation of nanoparticle bioadhesion. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2006**, 6, (9-10), 3303-3309.
88. Lai, S. K.; Hida, K.; Man, S. T.; Chen, C.; Machamer, C.; Schroer, T. A.; Hanes, J., Privileged delivery of polymer nanoparticles to the perinuclear region of live cells via a non-clathrin, non-degradative pathway. *Biomaterials* **2007**, 28, (18), 2876-2884.
89. Lai, S. K.; Hida, K.; Chen, C.; Hanes, J., Characterization of the intracellular dynamics of a non-degradative pathway accessed by polymer nanoparticles. *Journal of Controlled Release* **2008**, 125, (2), 107-111.
90. Lorenz, M. R.; Kohnle, M. V.; Dass, M.; Walther, P.; Hoherl, A.; Ziener, U.; Landfester, K.; Mailander, V., Synthesis of fluorescent polyisoprene nanoparticles and their uptake into various cells. *Macromolecular Bioscience* **2008**, 8, (8), 711-727.
91. Champion, J. A.; Mitragotri, S., Role of target geometry in phagocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, 103, (13), 4930-4934.
92. Muro, S.; Garnacho, C.; Champion, J. A.; Lefterovich, J.; Gajewski, C.; Schuchman, E. H.; Mitragotri, S.; Muzykantov, V. R., Control of endothelial targeting

and intracellular delivery of therapeutic enzymes by modulating the size and shape of ICAM-1-targeted carriers. *Molecular Therapy* **2008**, 16, (8), 1450-1458.

93. Decuzzi, P.; Ferrari, M., The receptor-mediated endocytosis of nonspherical particles. *Biophysical Journal* **2008**, 94, (10), 3790-3797.

94. Javier, A. M.; Kreft, O.; Alberola, A. P.; Kirchner, C.; Zebli, B.; Susa, A. S.; Horn, E.; Kempter, S.; Skirtach, A. G.; Rogach, A. L.; Radler, J.; Sukhorukov, G. B.; Benoit, M.; Parak, W. J., Combined atomic force microscopy and optical microscopy measurements as a method to investigate particle uptake by cells. *Small* **2006**, 2, (3), 394-400.

95. Chung, T. H.; Wu, S. H.; Yao, M.; Lu, C. W.; Lin, Y. S.; Hung, Y.; Mou, C. Y.; Chen, Y. C.; Huang, D. M., The effect of surface charge on the uptake and biological function of mesoporous silica nanoparticles 3T3-L1 cells and human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **2007**, 28, (19), 2959-2966.

96. Perumal, O. P.; Inapagolla, R.; Kannan, S.; Kannan, R. M., The effect of surface functionality on cellular trafficking of dendrimers. *Biomaterials* **2008**, 29, (24-25), 3469-3476.

97. Harush-Frenkel, O.; Rozentur, E.; Benita, S.; Altschuler, Y., Surface charge of nanoparticles determines their endocytic and transcytotic pathway in polarized MDCK cells. *Biomacromolecules* **2008**, 9, (2), 435-443.

98. Discher, D. E.; Janmey, P.; Wang, Y. L., Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* **2005**, 310, (5751), 1139-1143.

99. Leader, W. M.; Stopak, D.; Harris, A. K., Increased Contractile Strength and Tightened Adhesions to the Substratum Result from Reverse Transformation of Cho Cells by Dibutyl Cyclic Adenosine-Monophosphate. *Journal of Cell Science* **1983**, 64, (NOV), 1-11.

100. Pelham, R. J.; Wang, Y. L., Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility (vol 94, pg 13661, 1997). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, 95, (20), 12070-12070.

101. Kong, H. J.; Liu, J. D.; Riddle, K.; Matsumoto, T.; Leach, K.; Mooney, D. J., Non-viral gene delivery regulated by stiffness of cell adhesion substrates. *Nature Materials* **2005**, 4, (6), 460-464.

102. Kong, H. J.; Hsiong, S.; Mooney, D. J., Nanoscale cell adhesion ligand presentation regulates nonviral gene delivery and expression. *Nano Letters* **2007**, *7*, (1), 161-166.
103. Howard, J., *Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton*. Sinauer Associates, Inc.: Sunderland, Massachusetts, 2001.
104. Moore, P. B.; Huxley, H. E.; Derosier, D. J., 3-Dimensional Reconstruction of F-Actin, Thin Filaments and Decorated Thin Filaments. *Journal of Molecular Biology* **1970**, *50*, (2), 279-&.
105. Higuchi, H.; Yanagida, T.; Goldman, Y. E., Compliance of Thin-Filaments in Skinned Fibers of Rabbit Skeletal-Muscle. *Biophysical Journal* **1995**, *69*, (3), 1000-1010.
106. Kojima, H.; Ishijima, A.; Yanagida, T., Direct Measurement of Stiffness of Single Actin-Filaments with and without Tropomyosin by in-Vitro Nanomanipulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, *91*, (26), 12962-12966.
107. Isambert, H.; Venier, P.; Maggs, A. C.; Fattoum, A.; Kassab, R.; Pantaloni, D.; Carlier, M. F., Flexibility of Actin-Filaments Derived from Thermal Fluctuations - Effect of Bound Nucleotide, Phalloidin, and Muscle Regulatory Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270*, (19), 11437-11444.
108. Gittes, F.; Mickey, B.; Nettleton, J.; Howard, J., Flexural Rigidity of Microtubules and Actin-Filaments Measured from Thermal Fluctuations in Shape. *Journal of Cell Biology* **1993**, *120*, (4), 923-934.
109. Yasuda, R.; Miyata, H.; Kinosita, K., Direct measurement of the torsional rigidity of single actin filaments. *Journal of Molecular Biology* **1996**, *263*, (2), 227-236.
110. Amos, L. A.; Klug, A., Arrangement of Subunits in Flagellar Microtubules. *Journal of Cell Science* **1974**, *14*, (3), 523-549.
111. Brangwynne, C. P.; MacKintosh, F. C.; Kumar, S.; Geisse, N. A.; Talbot, J.; Mahadevan, L.; Parker, K. K.; Ingber, D. E.; Weitz, D. A., Microtubules can bear enhanced compressive loads in living cells because of lateral reinforcement. *Journal of Cell Biology* **2006**, *173*, (5), 733-741.

112. Trask, D. K.; Band, V.; Zajchowski, D. A.; Yaswen, P.; Suh, T.; Sager, R., Keratins as Markers That Distinguish Normal and Tumor-Derived Mammary Epithelial-Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1990**, 87, (6), 2319-2323.
113. Fraser, R. D.; Macrae, T. P., Molecular structure and mechanical properties of keratins. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **1980**, 34, 211-246.
114. Radmacher, M.; Fritz, M.; Kacher, C. M.; Cleveland, J. P.; Hansma, P. K., Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope. *Biophysical Journal* **1996**, 70, (1), 556-567.
115. Hessler, J. A.; Budor, A.; Putchakayala, K.; Mecke, A.; Rieger, D.; Holl, M. M. B.; Orr, B. G.; Bielinska, A.; Beals, J.; Baker, J., Atomic force microscopy study of early morphological changes during apoptosis. *Langmuir* **2005**, 21, (20), 9280-9286.
116. Van Vliet, K. J.; Bao, G.; Suresh, S., The biomechanics toolbox: experimental approaches for living cells and biomolecules. *Acta Materialia* **2003**, 51, (19), 5881-5905.
117. Fabry, B.; Maksym, G. N.; Butler, J. P.; Glogauer, M.; Navajas, D.; Taback, N. A.; Millet, E. J.; Fredberg, J. J., Time scale and other invariants of integrative mechanical behavior in living cells. *Physical Review E* **2003**, 68, (4).
118. Fabry, B.; Maksym, G. N.; Shore, S. A.; Moore, P. E.; Panettieri, R. A.; Butler, J. P.; Fredberg, J. J., Signal transduction in smooth muscle - Selected contribution: Time course and heterogeneity of contractile responses in cultured human airway smooth muscle cells. *Journal of Applied Physiology* **2001**, 91, (2), 986-994.
119. Feneberg, W.; Aepfelbacher, M.; Sackmann, E., Microviscoelasticity of the apical cell surface of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) within confluent monolayers. *Biophysical Journal* **2004**, 87, (2), 1338-1350.
120. Tai, K.; Dao, M.; Suresh, S.; Palazoglu, A.; Ortiz, C., Nanoscale heterogeneity promotes energy dissipation in bone. *Nature Materials* **2007**, 6, (6), 454-462.
121. Dao, M.; Li, J.; Suresh, S., Molecularly based analysis of deformation of spectrin network and human erythrocyte. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems* **2006**, 26, (8), 1232-1244.

122. Dao, M.; Lim, C. T.; Suresh, S., Mechanics of the human red blood cell deformed by optical tweezers. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids* **2003**, 51, (11-12), 2259-2280.
123. Dao, M.; Lim, C. T.; Suresh, S., Mechanics of the human red blood cell deformed by optical tweezers (vol 51, pg 2259, 2003). *Journal of the Mechanics and Physics of Solids* **2005**, 53, (2), 493-494.
124. Thoumine, O.; Ott, A.; Cardoso, O.; Meister, J. J., Microplates: a new tool for manipulation and mechanical perturbation of individual cells. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **1999**, 39, (1-2), 47-62.
125. Thoumine, O.; Ott, A., Time scale dependent viscoelastic and contractile regimes in fibroblasts probed by microplate manipulation. *Journal of Cell Science* **1997**, 110, 2109-2116.
126. Desprat, N.; Richert, A.; Simeon, J.; Asnacios, A., Creep function of a single living cell. *Biophysical Journal* **2005**, 88, (3), 2224-2233.
127. Tan, J. L.; Tien, J.; Pirone, D. M.; Gray, D. S.; Bhadriraju, K.; Chen, C. S., Cells lying on a bed of microneedles: An approach to isolate mechanical force. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, 100, (4), 1484-1489.
128. Evans, E.; Yeung, A., Apparent Viscosity and Cortical Tension of Blood Granulocytes Determined by Micropipet Aspiration. *Biophysical Journal* **1989**, 56, (1), 151-160.
129. Hochmuth, R. M., Micropipette aspiration of living cells. *Journal of Biomechanics* **2000**, 33, (1), 15-22.
130. Usami, S.; Chen, H. H.; Zhao, Y. H.; Chien, S.; Skalak, R., Design and Construction of a Linear Shear-Stress Flow Chamber. *Annals of Biomedical Engineering* **1993**, 21, (1), 77-83.
131. Ellis, E. F.; McKinney, J. S.; Willoughby, K. A.; Liang, S.; Povlishock, J. T., A New Model for Rapid Stretch-Induced Injury of Cells in Culture - Characterization of the Model Using Astrocytes. *Journal of Neurotrauma* **1995**, 12, (3), 325-339.
132. Pfister, B. J.; Weihs, T. P.; Betenbaugh, M.; Bao, G., An in vitro uniaxial stretch model for axonal injury. *Annals of Biomedical Engineering* **2003**, 31, (5), 589-598.

133. Satcher, R. L.; Dewey, C. F., Theoretical estimates of mechanical properties of the endothelial cell cytoskeleton. *Biophysical Journal* **1996**, 71, (1), 109-118.
134. Stamenovic, D.; Fredberg, J. J.; Wang, N.; Butler, J. P.; Ingber, D. E., A microstructural approach to cytoskeletal mechanics based on tensegrity. *Journal of Theoretical Biology* **1996**, 181, (2), 125-136.
135. Boey, S. K.; Boal, D. H.; Discher, D. E., Simulations of the erythrocyte cytoskeleton at large deformation. I. Microscopic models. *Biophysical Journal* **1998**, 75, (3), 1573-1583.
136. Li, J.; Dao, M.; Lim, C. T.; Suresh, S., Spectrin-level modeling of the cytoskeleton and optical tweezers stretching of the erythrocyte. *Biophysical Journal* **2005**, 88, (5), 3707-3719.
137. Yeung, A.; Evans, E., Cortical Shell-Liquid Core Model for Passive Flow of Liquid-Like Spherical Cells into Micropipets. *Biophysical Journal* **1989**, 56, (1), 139-149.
138. Needham, D.; Hochmuth, R. M., Rapid Flow of Passive Neutrophils into a 4  $\mu$ -M Pipette and Measurement of Cytoplasmic Viscosity. *Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme* **1990**, 112, (3), 269-276.
139. Dong, C.; Skalak, R.; Sung, K. L. P., Cytoplasmic Rheology of Passive Neutrophils. *Biorheology* **1991**, 28, (6), 557-567.
140. Tsai, M. A.; Frank, R. S.; Waugh, R. E., Passive Mechanical-Behavior of Human Neutrophils - Power-Law Fluid. *Biophysical Journal* **1993**, 65, (5), 2078-2088.
141. Dong, C.; Skalak, R.; Sung, K. L. P.; Schmidtschonbein, G. W.; Chien, S., Passive Deformation Analysis of Human-Leukocytes. *Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme* **1988**, 110, (1), 27-36.
142. Theret, D. P.; Levesque, M. J.; Sato, M.; Nerem, R. M.; Wheeler, L. T., The Application of a Homogeneous Half-Space Model in the Analysis of Endothelial-Cell Micropipette Measurements. *Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme* **1988**, 110, (3), 190-199.
143. Jones, W. R.; Ting-Beall, H. P.; Lee, G. M.; Kelley, S. S.; Hochmuth, R. M.; Guilak, F., Alterations in the Young's modulus and volumetric properties of

chondrocytes isolated from normal and osteoarthritic human cartilage. *Journal of Biomechanics* **1999**, 32, (2), 119-127.

144. Bilodeau, G. G., Regular Pyramid Punch Problem. *Journal of Applied Mechanics-Transactions of the Asme* **1992**, 59, (3), 519-523.

145. Shin, D.; Athanasiou, K., Cytoindentation for obtaining cell biomechanical properties. *Journal of Orthopaedic Research* **1999**, 17, (6), 880-890.

146. Mijailovich, S. M.; Kojic, M.; Zivkovic, M.; Fabry, B.; Fredberg, J. J., A finite element model of cell deformation during magnetic bead twisting. *Journal of Applied Physiology* **2002**, 93, (4), 1429-1436.

147. Schmiddschonbein, G. W.; Sung, K. L. P.; Tozeren, H.; Skalak, R.; Chien, S., Passive Mechanical-Properties of Human-Leukocytes. *Biophysical Journal* **1981**, 36, (1), 243-256.

148. Maksym, G. N.; Fabry, B.; Butler, J. P.; Navajas, D.; Tschumperlin, D. J.; Laporte, J. D.; Fredberg, J. J., Mechanical properties of cultured human airway smooth muscle cells from 0.05 to 0.4 Hz. *Journal of Applied Physiology* **2000**, 89, (4), 1619-1632.

149. Fabry, B.; Maksym, G. N.; Butler, J. P.; Glogauer, M.; Navajas, D.; Fredberg, J. J., Scaling the microrheology of living cells. *Physical Review Letters* **2001**, 8714, (14).

150. Mahaffy, R. E.; Shih, C. K.; MacKintosh, F. C.; Kas, J., Scanning probe-based frequency-dependent microrheology of polymer gels and biological cells. *Physical Review Letters* **2000**, 85, (4), 880-883.

151. Alcaraz, J.; Buscemi, L.; Grabulosa, M.; Trepast, X.; Fabry, B.; Farre, R.; Navajas, D., Microrheology of human lung epithelial cells measured by atomic force microscopy. *Biophysical Journal* **2003**, 84, (3), 2071-2079.

152. Abercrombie, M.; Dunn, G. A., Adhesions of Fibroblasts to Substratum During Contact Inhibition Observed by Interference Reflection Microscopy. *Experimental Cell Research* **1975**, 92, (1), 57-62.

153. Izzard, C. S.; Lochner, L. R., Cell-to-Substrate Contacts in Living Fibroblasts - Interference Reflection Study with an Evaluation of Technique. *Journal of Cell Science* **1976**, 21, (1), 129-159.

154. Sastry, S. K.; Burridge, K., Focal adhesions: A nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics. *Experimental Cell Research* **2000**, 261, (1), 25-36.
155. Bershadsky, A. D.; Tint, I. S.; Neyfakh, A. A.; Vasiliev, J. M., Focal Contacts of Normal and Rsv-Transformed Quail Cells - Hypothesis of the Transformation-Induced Deficient Maturation of Focal Contacts. *Experimental Cell Research* **1985**, 158, (2), 433-444.
156. Nobes, C. D.; Hall, A., Rho, Rac, and Cdc42 Gtpases Regulate the Assembly of Multimolecular Focal Complexes Associated with Actin Stress Fibers, Lamellipodia, and Filopodia. *Cell* **1995**, 81, (1), 53-62.
157. Laukaitis, C. M.; Webb, D. J.; Donais, K.; Horwitz, A. F., Differential dynamics of alpha 5 integrin, paxillin, and alpha-actinin during formation and disassembly of adhesions in migrating cells. *Journal of Cell Biology* **2001**, 153, (7), 1427-1440.
158. ChrzanowskaWodnicka, M.; Burridge, K., Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *Journal of Cell Biology* **1996**, 133, (6), 1403-1415.
159. Rivelino, D.; Zamir, E.; Balaban, N. Q.; Schwarz, U. S.; Ishizaki, T.; Narumiya, S.; Kam, Z.; Geiger, B.; Bershadsky, A. D., Focal contacts as mechanosensors: Externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *Journal of Cell Biology* **2001**, 153, (6), 1175-1185.
160. Balaban, N. Q.; Schwarz, U. S.; Rivelino, D.; Goichberg, P.; Tzur, G.; Sabanay, I.; Mahalu, D.; Safran, S.; Bershadsky, A.; Addadi, L.; Geiger, B., Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nature Cell Biology* **2001**, 3, (5), 466-472.
161. Volberg, T.; Geiger, B.; Citi, S.; Bershadsky, A. D., Effect of Protein-Kinase Inhibitor H-7 on the Contractility, Integrity, and Membrane Anchorage of the Microfilament System. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **1994**, 29, (4), 321-338.
162. Chen, W. T.; Singer, S. J., Immunoelectron Microscopic Studies of the Sites of Cell-Substratum and Cell-Cell Contacts in Cultured Fibroblasts. *Journal of Cell Biology* **1982**, 95, (1), 205-222.



163. Zamir, E.; Katz, B. Z.; Aota, S.; Yamada, K. M.; Geiger, B.; Kam, Z., Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *Journal of Cell Science* **1999**, 112, (11), 1655-1669.
164. Zamir, E.; Katz, M.; Posen, Y.; Erez, N.; Yamada, K. M.; Katz, B. Z.; Lin, S.; Lin, D. C.; Bershadsky, A.; Kam, Z.; Geiger, B., Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nature Cell Biology* **2000**, 2, (4), 191-196.
165. Chellaiah, M.; Kizer, N.; Silva, M.; Alvarez, U.; Kwiatkowski, D.; Hruska, K. A., Gelsolin deficiency blocks podosome assembly and produces increased bone mass and strength. *Journal of Cell Biology* **2000**, 148, (4), 665-678.
166. Ochoa, G. C.; Slepnev, V. I.; Neff, L.; Ringstad, N.; Takei, K.; Daniell, L.; Kim, W.; Cao, H.; McNiven, M.; Baron, R.; De Camilli, P., A functional link between dynamin and the actin cytoskeleton at podosomes. *Journal of Cell Biology* **2000**, 150, (2), 377-389.
167. Hall, A.; Nobes, C. D., Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **2000**, 355, (1399), 965-970.
168. Swanson, J. A.; Watts, C., Macropinocytosis. *Trends in Cell Biology* **1995**, 5, (11), 424-428.
169. Hewlett, L. J.; Prescott, A. R.; Watts, C., The Coated Pit and Macropinocytic Pathways Serve Distinct Endosome Populations. *Journal of Cell Biology* **1994**, 124, (5), 689-703.
170. Hacker, U.; Albrecht, R.; Maniak, M., Fluid-phase uptake by macropinocytosis in Dictyostelium. *Journal of Cell Science* **1997**, 110, 105-112.
171. Insall, R.; Muller-Taubenberger, A.; Machesky, L.; Kohler, J.; Simmeth, E.; Atkinson, S. J.; Weber, I.; Gerisch, G., Dynamics of the Dictyostelium Arp2/3 complex in endocytosis, cytokinesis, and chemotaxis. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **2001**, 50, (3), 115-128.
172. Lee, E.; De Camilli, P., Dynamin at actin tails. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, 99, (1), 161-166.
173. Schmid, S. L., Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: An integrated process. *Annual Review of Biochemistry* **1997**, 66, 511-548.

174. Brodsky, F. M.; Chen, C. Y.; Knuehl, C.; Towler, M. C.; Wakeham, D. E., Biological basket weaving: Formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **2001**, 17, 517-568.
175. Hinshaw, J. E., Dynamin and its role in membrane fission. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **2000**, 16, 483-+.
176. Gaidarov, I.; Santini, F.; Warren, R. A.; Keen, J. H., Spatial control of coated-pit dynamics in living cells. *Nature Cell Biology* **1999**, 1, (1), 1-7.
177. Lamaze, C.; Fujimoto, L. M.; Yin, H. L.; Schmid, S. L., The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272, (33), 20332-20335.
178. Schnitzer, J. E.; Oh, P.; Pinney, E.; Allard, J., Filipin-Sensitive Caveolae-Mediated Transport in Endothelium - Reduced Transcytosis, Scavenger Endocytosis, and Capillary-Permeability of Select Macromolecules. *Journal of Cell Biology* **1994**, 127, (5), 1217-1232.
179. Mellman, I., Endocytosis and molecular sorting. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **1996**, 12, 575-625.
180. Pelkmans, L.; Helenius, A., Endocytosis via caveolae. *Traffic* **2002**, 3, (5), 311-320.
181. Pelkmans, L.; Puntener, D.; Helenius, A., Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* **2002**, 296, (5567), 535-539.
182. Edidin, M., Shrinking patches and slippery rafts: scales of domains in the plasma membrane. *Trends in Cell Biology* **2001**, 11, (12), 492-496.
183. Anderson, R. G. W.; Jacobson, K., Cell biology - A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* **2002**, 296, (5574), 1821-1825.

## CHAPITRE 2

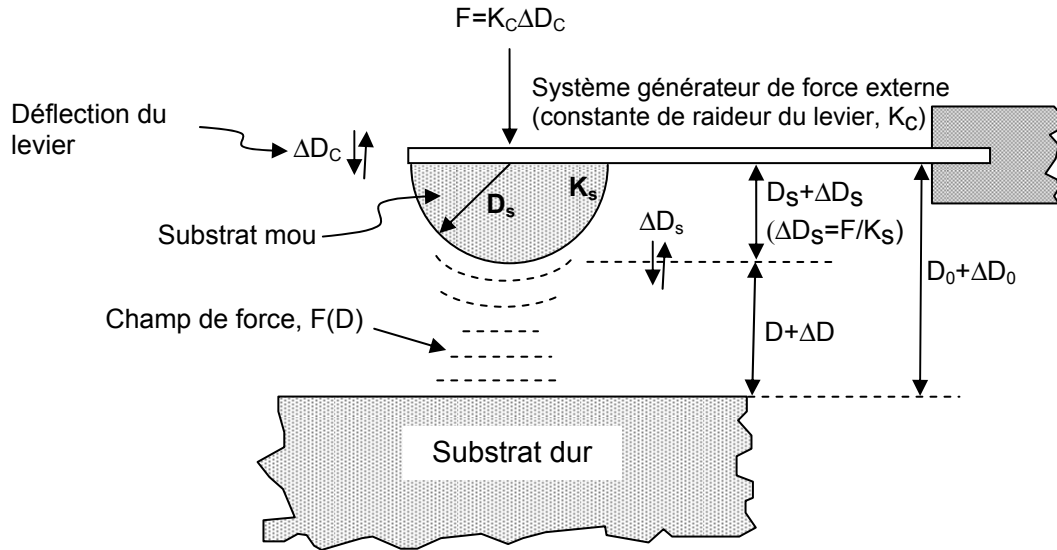
### TECHNIQUES EXPERIMENTALES

#### *2.1 La mesure des forces d'interaction entre surfaces*

##### *2.1.1 Principe de la mesure*

Il existe un certain nombre de techniques capables de mesurer les forces d'interaction entre deux surfaces placées face à face. Ces techniques partagent des points communs dans leur principe de mesure. La Figure 2.1 représente un schéma général d'un système de mesure de forces d'interaction entre une surface mobile supportée par un bras de levier et un substrat. Les principaux paramètres qui peuvent être mesurés par ces systèmes expérimentaux sont : la force d'interaction  $F$ , la distance de séparation entre les surfaces  $D$ , la variation de distance associée  $\Delta D$ , le pas d'approche du bras de levier  $\Delta D_0$ , la déflexion du bras de levier  $\Delta D_c$ , la déformation du substrat mou  $\Delta D_s$ , le module de compression normale du substrat mou  $K_s$  et la constante de raideur du bras de levier  $K_c$ . La majeure partie de ces paramètres peut être contrôlée de manière indépendante et directement mesurée expérimentalement.

La mesure de la loi de force  $F(D)$  entre les deux surfaces, c'est-à-dire la force en fonction de la séparation  $D$ , s'effectue de la manière suivante. Les surfaces sont séparées d'une distance  $D$  suffisamment grande de telle sorte que  $F(D) = 0$  (ce qui correspond à un état de référence arbitraire). La base du levier de constante de raideur  $K_c$  est déplacée de  $\Delta D_0$  (connue) vers une nouvelle position où il existe un champ de force (attractif ou répulsif) entre les deux surfaces. Cette force est détectée car elle cause la déflexion  $\Delta D_c$  du levier.



**Figure 2.1** : Géométrie générale utilisée pour la mesure des forces d'interaction entre deux surfaces ainsi que les paramètres importants qui doivent être contrôlés et/ou mesurés.

Elle provoque aussi la déformation du substrat mou ( $\Delta D_s = F/K_s$ ). En même temps, la séparation entre les deux surfaces change de  $\Delta D$  pour se stabiliser à la nouvelle séparation  $D + \Delta D$ . La force d'interaction  $F(D)$  est donc :

$$F(D) = K_c \Delta D_c \quad (2.1)$$

La force d'interaction est aussi donnée par  $F(D) = K_s \Delta D_s$  ce qui permet d'obtenir la déformation du substrat connaissant  $F$  et  $K_s$ .

L'équation 2.1 permet de mesurer la force d'interaction, attractive ou répulsive, à une séparation  $D$  quelconque.

### 2.1.2 Effet de la géométrie du système et approximation de Derjaguin

Généralement, il est difficile de mesurer les forces entre deux surfaces planes car elles doivent être atomiquement planes et leur alignement parallèle doit être parfait. Il est donc beaucoup plus simple de mesurer les forces entre des surfaces courbes comme deux sphères, une sphère et un plan ou bien deux cylindres croisés. La résultante des forces d'interaction  $F_c(D)$  entre deux surfaces courbes peut être directement reliée à l'énergie de surface  $E_p(D)$  mesurée entre deux surfaces planes à la même distance de

séparation  $D$ . Cette relation est connue sous le nom d'approximation de Derjaguin et s'écrit :

$$F_c(D) = 2\pi R E_p(D) \quad (2.3)$$

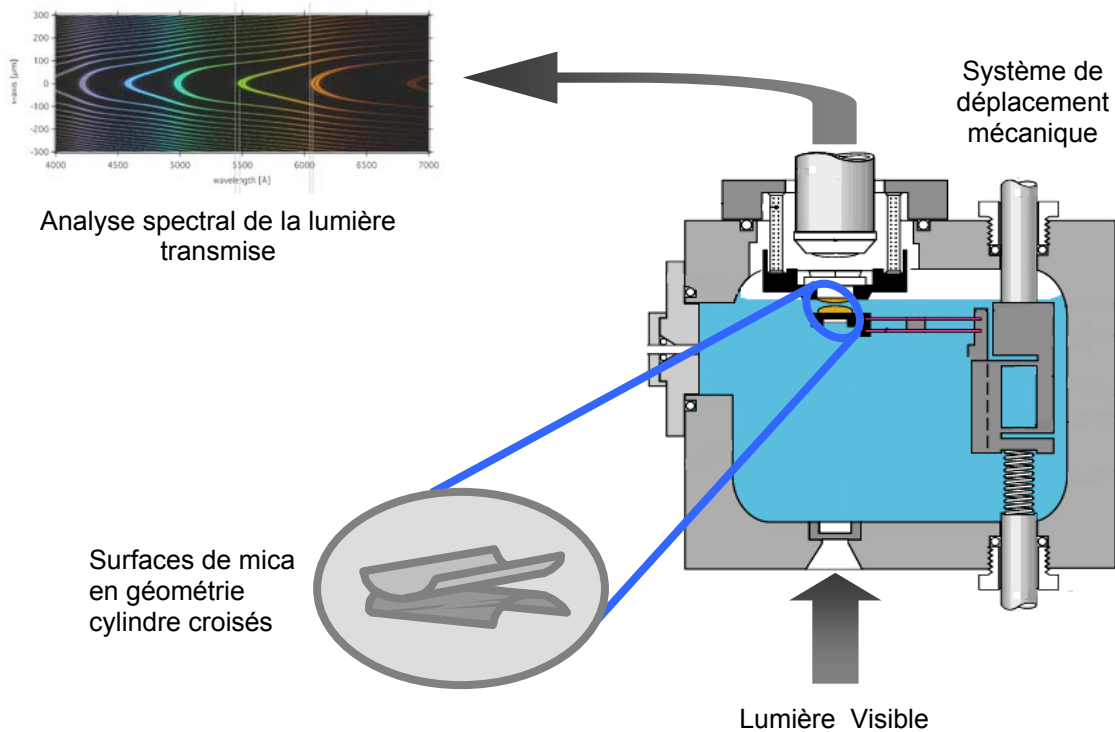
Où  $R$  est le rayon de courbure de la sphère (pour une géométrie sphère-plan) ou bien le rayon moyen des cylindres (pour deux cylindres croisés).

Cette relation est très importante d'un point de vue fondamental car elle permet de calculer simplement l'énergie d'interaction entre deux corps indépendamment de leur géométrie. De manière générale, on reporte rarement  $F$  en tant que telle. Il est préférable de reporter  $F/R$ , c'est-à-dire  $E_p$ , pour que les résultats puissent être comparés d'une technique à une autre indépendamment de la géométrie utilisée.

## ***2.2 L'appareil de forces de surface, Surface Force Apparatus SFA***

Le SFA<sup>1-3</sup> est la seule technique permettant la mesure directe de la force  $F$ , de la séparation absolue  $D$  entre les deux surfaces et la visualisation simultanée de la géométrie locale des deux surfaces en interaction. La distance de séparation peut être mesurée quantitativement avec une précision de  $\pm 0.2 \text{ nm}^4$ . Les dimensions latérales ou l'aire de contact peuvent être mesurées avec une résolution de  $1 \text{ }\mu\text{m}$  seulement. Si l'on se réfère à la Figure 2.1, la technique du SFA peut être utilisée pour mesurer directement  $D$ ,  $\Delta D$ ,  $\Delta D_0$ , le rayon de l'aire de contact  $a$ ,  $R$  (avec une précision de  $\pm 10\%$ ).

Dans le SFA, représenté schématiquement à la Figure 2.2, les surfaces sont montées sur deux substrats courbes qui peuvent être approchés ou séparés de manière contrôlée dans un intervalle allant de quelques millimètres jusqu'au contact moléculaire. Les vitesses d'approche et de séparation peuvent être variées sur un intervalle de huit ordres de grandeur (de  $1 \text{ mm.s}^{-1}$  jusqu'à  $0.1 \text{ nm.min}^{-1}$ ). Les supports utilisés sont des disques cylindriques de rayon  $R = 20 \text{ mm}$ .

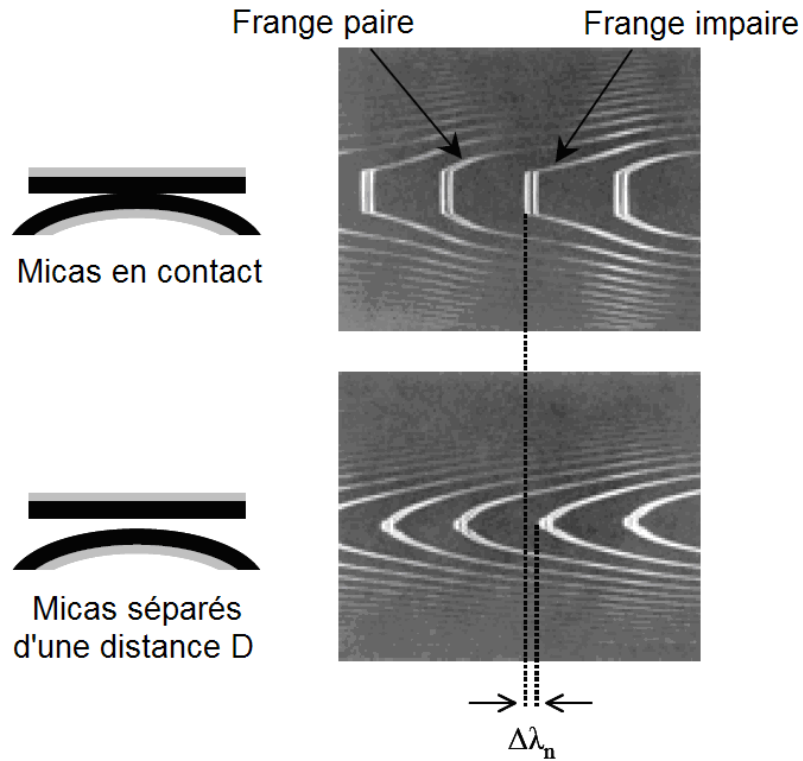


**Figure 2.2 :** Représentation schématique du SFA (modèle MK II). Un faisceau de lumière visible pénètre dans la chambre de mesure et traverse deux cylindres croisés sur lesquels sont déposés des feuillets de mica. La lumière transmise est collectée dans un spectromètre où la longueur d’onde des franges d’interférence est mesurée.

La géométrie du contact et la distance de séparation entre les surfaces sont déterminées à l’aide d’une technique d’interférométrie optique. De la lumière blanche est envoyée perpendiculairement aux deux surfaces et le faisceau transmis est collimaté sur la fente d’entrée d’un spectromètre à réseau. Des feuillets très fins d’un matériau transparent tel que le mica, et argentés sur leur face non exposée au milieu ambiant, permettent l’obtention de réflexions multiples du faisceau lumineux qui les traverse.<sup>4, 5</sup> Après diffraction par le réseau du spectromètre, le patron des franges d’interférence, ou le spectrogramme peut être observé au travers d’un oculaire positionné en sortie du spectromètre ou à l’aide d’une caméra. Les franges colorées sont connues sous le nom de franges d’ordre chromatique égal (Fringes of Equal Chromatic Order, FECO).<sup>4-6</sup>

La Figure 2.3 illustre des franges FECO typiques (en noir et blanc, les franges originales étant en couleur) produites dans l’air par deux surfaces de mica de même

épaisseur en interaction. La forme et la position des franges, mesurées en longueur d'onde, sont directement reliées à la topographie réelle et à la distance de séparation entre les deux surfaces.



**Figure 2.3** : Principe de la mesure de distance de séparation entre deux surfaces en utilisant les FECO. La forme des franges *FECO* observées au spectromètre diffère lorsque les surfaces de mica sont en contact adhésif (extrémité des franges aplatie) ou séparées d'une distance  $D$  (pas de région aplatie). La longueur d'onde des franges d'interférence ( $\lambda_n$ ) permet de déterminer la distance de séparation  $D$ .

La forme des franges représente la géométrie des surfaces. La séparation absolue  $D$  entre deux surfaces de mica de même épaisseur est obtenue à l'aide de l'équation suivante :<sup>7</sup>

$$\tan\left(\frac{2\pi\mu D}{\lambda_n^D}\right) = \frac{2\bar{\mu} \sin\left[\frac{1-\lambda_n^0/\lambda_n^D}{1-\lambda_n^0/\lambda_{n-1}^0} \pi\right]}{(1+\bar{\mu}^2) \cos\left[\frac{1-\lambda_n^0/\lambda_n^D}{1-\lambda_n^0/\lambda_{n-1}^0} \pi\right] \pm (\bar{\mu}^2 - 1)} \quad (2.5)$$

où le signe « + » fait référence aux franges impaires (d'ordre  $n$ ) et le signe « - » aux franges paires (d'ordre  $n-1$ ). Avec  $\bar{\mu} = \mu_{mica} / \mu$ , où  $\mu_{mica}$  est l'indice de réfraction du mica à la longueur d'onde  $\lambda_n^D$  et  $\mu$  est l'indice de réfraction du milieu entre les surfaces de mica à  $\lambda_n^D$ .  $\lambda_n^0$  et  $\lambda_{n-1}^0$  correspondent aux longueurs d'onde des franges *FECO* paires et impaires respectivement lorsque les surfaces sont en contact et  $\lambda_n^D$  et  $\lambda_{n-1}^D$  correspondant aux longueurs d'ondes des franges *FECO* paires et impaires lorsque les surfaces sont séparées d'une distance  $D$ .

## 2.3 La microscopie à force atomique (AFM)

### 2.3.1 Principe de la mesure

Le principe de mesure de cette technique est identique à celui du SFA décrit précédemment et est présenté à la Figure 2.1. Toutefois quelques différences sont à noter. Comme nous l'avons vu, l'équation 2.2 permet de reconstruire la loi de force  $F(D)$  sur l'intervalle de séparation désiré si est seulement si on peut mesurer de manière indépendante la séparation  $D$ , la déflexion du levier  $\Delta D_c$  et la raideur du levier  $K_c$ . L'AFM ne permet malheureusement pas de mesurer directement  $D$  et il est donc nécessaire d'utiliser une méthode alternative. Les quatre distances importantes définissant le système (voir Figure 2.1) sont reliées par  $D_0 = D + D_c + D_s$ , donc leur variation est reliée par l'équation suivante :

$$\Delta D = \Delta D_0 - [\Delta D_c + \Delta D_s] \quad (2.6)$$

Donc, une mesure simultanée de  $\Delta D_0$ ,  $\Delta D_c$  et  $\Delta D_s$  permet de déterminer la variation de  $D$  mais pas sa valeur absolue. Les AFM commerciaux sont généralement conçus pour mesurer  $\Delta D_0$  et  $\Delta D_c$  mais ne permettent pas de mesurer  $D$  ou la déformation des substrats dans la zone d'interaction  $\Delta D_s$ . La constante de raideur du levier peut être mesurée suivant plusieurs méthodes<sup>8, 9</sup> mais les paramètres dépendant de la géométrie et la composition locale des surfaces, tels que  $R$ ,  $\Delta D_s$ ,  $a$  et  $K_s$  ne sont pas mesurables directement et doivent être supposés ou modélisés.



La mesure d'une loi de force par AFM utilise l'approximation  $\Delta D_s = 0$ . Ceci permet de mesurer la variation de la distance de séparation et de la force lors d'un changement de position du levier. Les équations 2.2 et 2.6 sont alors simplifiées :

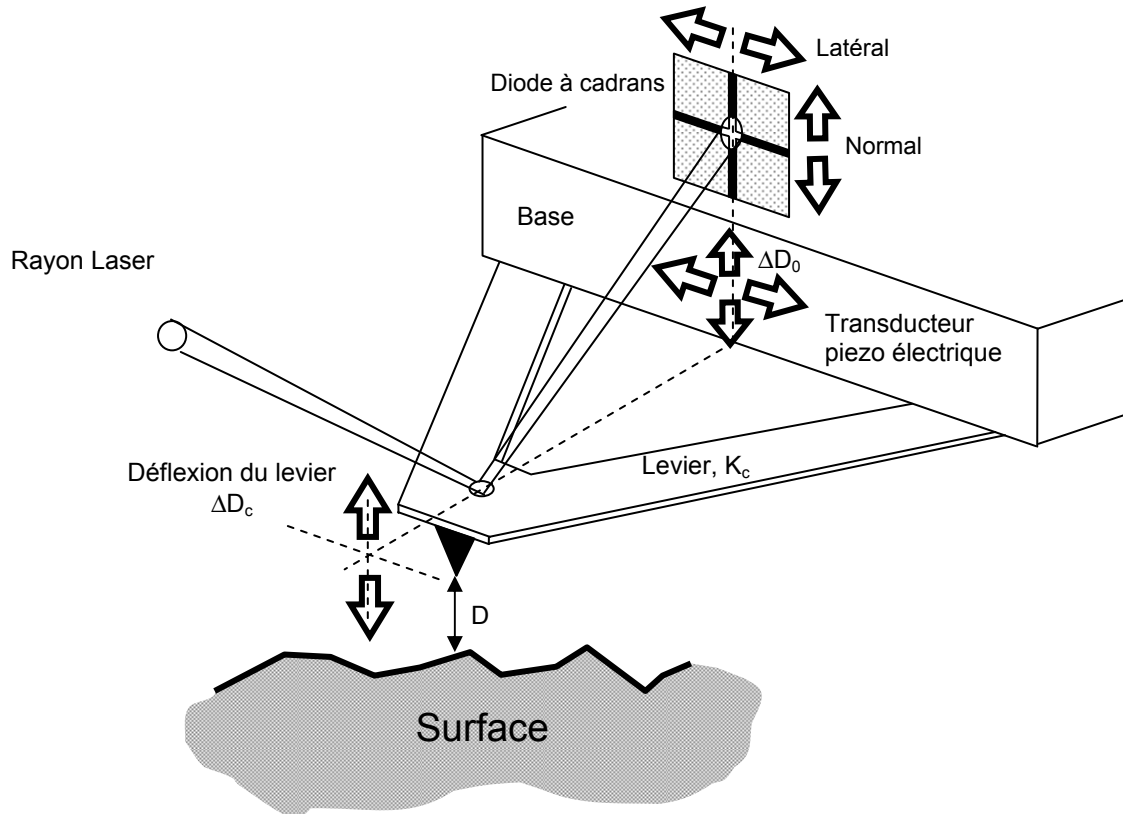
$$\Delta D = \Delta D_0 - \Delta D_c \quad (2.7)$$

et

$$\Delta F = K_c \Delta D_c \quad (2.8)$$

### 2.3.2 Le microscope à force atomique

Il existe un grand nombre de modèles d'AFM possédant chacun des caractéristiques particulières. Certains modèles sont spécialisés pour les mesures en phase aqueuse, alors que d'autres sont conçus pour les mesures sous ultra vide. Malgré certaines différences de conception, tous les microscopes utilisent le même principe technique pour la mesure de la déflexion du levier,  $\Delta D_c$  (voir Figure 2.5 ci-dessous).



**Figure 2.4 :** Représentation schématique du microscope à force atomique (modèle Multi Mode Dimension vendu par Digital Instrument) servant à imager la

topographie de surface grâce à la force d'interaction que détecte une pointe se déplaçant verticalement ou latéralement sur l'échantillon.<sup>10</sup> La pointe est attachée au bout d'un levier de raideur  $K_c$  dont la déflexion  $\Delta D_c$  permet d'obtenir la force normale ou latérale exercée sur la pointe. Ces déflexions sont détectées par une diode à cadrans en suivant le mouvement d'un rayon laser réfléchi à l'extrémité du levier. Le déplacement relatif  $\Delta D_0$  de la pointe par rapport à la surface est accompli par un transducteur piezo électrique dans les 3 directions  $x$ ,  $y$  et  $z$ .

L'imagerie par *AFM* peut se faire en mode contact ou en mode contact intermittent. Dans la mode contact, la pointe reste en contact permanent avec la surface pendant le balayage. Ce mode permet d'obtenir des images de haute résolution sur des objets peu rugueux. Dans le mode contact intermittent, la pointe oscille verticalement à une distance de quelques angströms de la surface. Ce mode est recommandé pour les surfaces revêtant un matériau souple et fragile car il endommage peu les surfaces et limite les déformations latérales. En mode contact intermittent, trois types d'image peuvent être collectés simultanément durant le balayage : les images topographiques (ou images isoforce), les images de déflexion (correspondant à la dérivée des mouvements de réajustement de la position relative entre la pointe et l'échantillon) faisant ressortir les détails de la surface et enfin les images de déphasage entre le mouvement oscillant imposé et le mouvement réel qui met en avant des zones de propriétés de surface différentes (adhésion, élasticité). La résolution latérale de cette technique est de l'ordre de l'Angström dans la plupart des modèles commerciaux et dépend de beaucoup de paramètres expérimentaux comme la géométrie de la sonde balayante, du système mécanique de balayage ou du contrôleur utilisé.

### ***2.3.3 La nano-indentation***

La mesure des propriétés mécaniques d'une surface ou d'un objet déposé sur une surface peut se faire par AFM en utilisant le mode profil de force (technique de nano-indentation). Dans ce mode, la pointe de l'AFM suit une trajectoire verticale sur une distance prédéterminée par l'utilisateur tout en conservant les mêmes coordonnées

latérales. De cette manière, la force d'interaction pointe-substrat peut être obtenue avec une résolution de quelques pN.<sup>11</sup> Le profil de force obtenu peut ensuite être utilisé pour extraire le module de Young du substrat. Pour un matériau élastique, linéaire, isotrope et semi-infini indenté par une sonde non-adhésive, rigide et de géométrie connue, le profile de force peut être décrit par les relations suivantes :

$$\Delta F = \frac{2E \tan(\theta)}{\pi(1-\nu^2)} \Delta D_c^2 \text{ pour un indenteur conique}$$

$$\Delta F = \frac{2ER^{1/2}}{3(1-\nu^2)} \Delta D_c^{3/2} \text{ pour un indenteur sphérique}$$

où E est le module de Young du matériau indenté,  $\nu$  le ratio de Poisson,  $\theta$  le demi angle d'ouverture du cône d'indentation et R le rayon de la sonde.

Les sondes commerciales ne sont généralement ni sphériques ni coniques mais plutôt pyramidales avec un demi-angle d'ouverture de 35°. Pour de petites indentations, seul l'apex de la sonde entre en contact avec l'échantillon et par conséquent peut être considéré comme étant sphérique. Pour des indentations plus importantes, l'échantillon interagit fortement avec une grande partie de la géométrie pyramidale de la sonde qui doit être approximée comme un cône. L'erreur commise en approximant une géométrie pyramidale par une géométrie conique peut être partiellement corrigée en utilisant une sonde ayant un demi angle d'ouverture plus grand (38° au lieu de 35°)<sup>12</sup> ou bien en utilisant un coefficient numérique différent dans l'équation de l'indenteur conique (3/4 au lieu de 2/ $\pi$ )<sup>13</sup>. Les deux géométrie conique et pyramidale peuvent être combinées en une seule fonction continue décrivant le profile de force<sup>14</sup>. La validité des approximations utilisées doit être testée en caractérisant la sonde mais aussi en s'assurant que les modèles Hertzien présentés s'ajustent bien aux données expérimentales.

Une alternative au problème du contrôle et de la caractérisation de la géométrie de l'indenteur est l'utilisation de sondes faites maison conçues pour avoir une géométrie très bien définie. Par exemple, il est possible de coller une particule micrométrique sur la pointe d'une sonde afin d'obtenir un indenteur sphérique. La garantie d'un contact sphérique permet d'améliorer la précision et de réduire l'étendue du champ de déformations autour de la sonde. Pour des échantillons mous (ayant un module de Young entre 1 et 100 kPa), les déformations induites par un une sonde pointue peuvent facilement excéder le régime de

déformation linéaire considéré par les modèles hertzien.<sup>15</sup> Bien que l'utilisation de microsphères comme sondes permette de réduire énormément ce problème, elle génère aussi une perte importante de la résolution latérale. Le modèle de Hertz pour un indenteur sphérique donne un rayon de contact de l'ordre de  $(R\Delta Dc)^{1/2}$  soit approximativement 390 nm pour une sphère de 5  $\mu\text{m}$  et une indentation de 30 nm typique pour les hydrogel.

En plus des problèmes mentionnés précédemment, il est possible que le champ de déformations induit par l'indenteur se propage le long de l'axe d'indentation. Pour des échantillons relativement fins, ceci peut introduire de fortes déviations au modèle de Hertz qui considère l'échantillon comme semi infini. La contribution de cet effet génère une erreur qui varie comme  $(R\Delta Dc)^{1/2}/h$ ,  $h$  étant l'épaisseur de l'échantillon.<sup>15</sup>

L'AFM et le SFA permettent tous deux de mesurer des profils de force dans un nombre très varié de milieux. Les deux techniques présentent malgré tout des différences majeures. La mesure par AFM ne permet pas d'obtenir la séparation absolue entre surfaces ce qui oblige à faire une approximation souvent hasardeuse pour son obtention. De plus, les sondes utilisées à l'AFM ont un rayon de courbure allant de quelques nanomètres (sonde pyramidale) à quelques microns (sonde colloïdale). La pression appliquée au contact sonde-substrat est donc très élevée ce qui a pour conséquence la dégradation mécanique rapide du substrat. De plus, les sondes utilisées en AFM sont connues pour être rugueuses au niveau de l'apex (aussi bien pour les sondes colloïdales que pyramidales) ce qui complique bien souvent l'interprétation des résultats obtenus. Du fait de la petite taille des sondes utilisées en AFM, cette technique permet de mesurer les propriétés mécaniques locales d'un matériau et de combiner cette information avec des données topographiques ou tribologiques. La résolution latérale de la technique étant excellente, il est possible de faire des mesures mécaniques à l'échelle atomique de manière quasi routinière.

Le SFA permet de mesurer la distance de séparation entre surfaces avec une précision de l'ordre de l'Angstrom ce qui en fait un outil idéal pour la mesure des profils de force. Les surfaces utilisées ayant des dimensions beaucoup plus grandes qu'à l'AFM, la technique permet de mesurer des propriétés physiques à l'échelle atomique sur des systèmes macroscopiques. La technique permet d'obtenir certaines informations sur la géométrie du contact avec une résolution latérale beaucoup moins bonne que celle de

l'AFM. Le SFA ne permet pas d'obtenir les propriétés physiques locales d'un matériau mais plutôt une moyenne de celles-ci sur l'aire de contact.

## ***2.4 Les microscopies à fluorescence***

### ***2.4.1 Origines de la fluorescence***

L'absorption d'une onde électromagnétique par une molécule est soumise aux règles de la mécanique quantique. Pour qu'un photon d'énergie  $h\nu$  soit absorbé, il faut que cette énergie corresponde au minimum à la différence d'énergie entre le niveau électronique de plus basse énergie et celui des niveaux excités de plus haute énergie. De plus, pour que cette transition soit possible, il est nécessaire que la multiplicité des états soit compatible à savoir une transition de type singulet – singulet ( $S_0 \rightarrow S_n$ ). Après excitation, la molécule se désactive suivant des processus radiatifs et non radiatifs. Les processus non radiatifs correspondent aux mécanismes de relaxation non associés à une émission de photon tel la relaxation vibrationnelle, la conversion inter-système singulet – triplet, le transfert d'électron, la séparation de charges, et la réaction chimique. Les processus radiatifs correspondent au retour de l'électron excité  $S_1$  à son niveau fondamental  $S_0$  par émission d'un photon d'énergie égale à la différence d'énergie entre le niveau excité et le niveau fondamental.

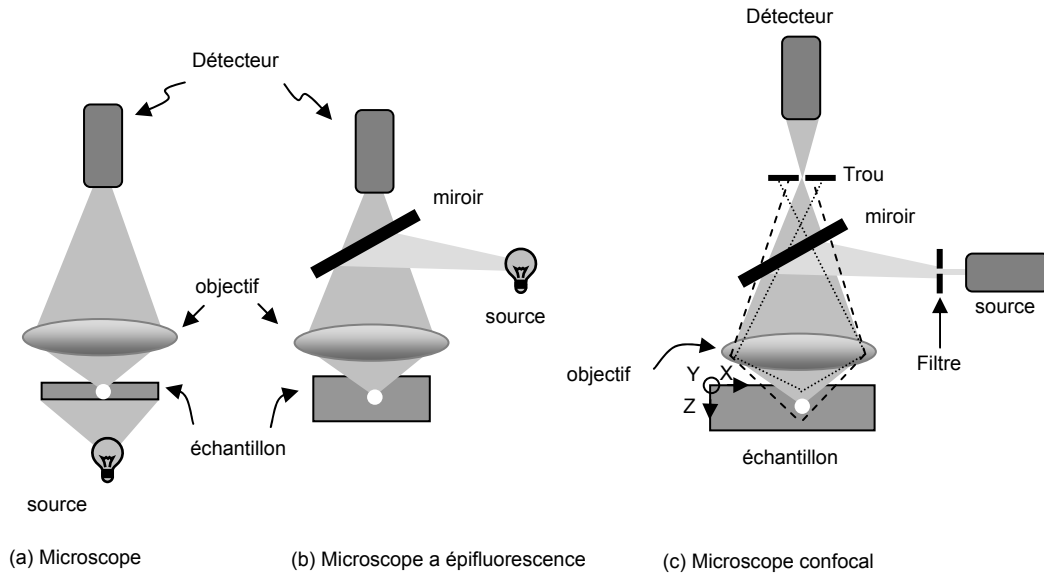
Les transitions électroniques entre niveaux de multiplicités différentes sont interdites par les règles de la mécanique quantique, ce qui signifie qu'expérimentalement elles sont très peu accessibles. Les phénomènes de fluorescence sont donc des mécanismes rapides (quelques picosecondes à quelques nanosecondes). Les processus de fluorescence à partir de niveaux électroniques autres que  $S_1$  (premier niveau électronique excité) sont extrêmement rares et donc de faible intensité. Si la molécule est excitée à un niveau électronique supérieur, elle relaxe généralement par un mode vibrationnel pour atteindre le niveau  $S_1$ .

### ***2.4.2 La microscopie confocale et à fluorescence***

Le couplage des méthodes d'analyse de la fluorescence aux techniques de microscopie est couramment utilisé en biologie.<sup>16</sup> Les techniques de fluorescence permettent aussi bien l'observation de particules ou structures métaboliques par marquage direct<sup>16</sup> que la mise en évidence de processus biologiques en utilisant des procédés de révélation ou d'extinction de fluorescence.<sup>17, 18</sup> On compte à l'heure actuelle de nombreuses techniques de microscopie à fluorescence. Nous nous limiterons à décrire celles qui ont été utilisées dans le cadre de ce travail, c'est-à-dire la microscopie confocale et la microscopie à épifluorescence.

En microscopie à fluorescence, la source lumineuse est placée sous l'échantillon à analyser ce qui limite son champ d'utilisation aux échantillons très minces. Pour pouvoir observer des échantillons plus épais, le faisceau d'excitation percute l'échantillon par le dessus en passant par l'objectif (voir Figure 2.6). La séparation du faisceau excitant incident du faisceau émis se fait à l'aide d'un miroir dichroïque.

La microscopie confocale utilise les mêmes principes que la microscopie à épifluorescence. La source lumineuse d'excitation est un faisceau laser pulsé focalisé sur un premier filtre spatial (voir Figure 2.6). Ce filtre a pour but de définir avec précision la position du point de la source d'excitation. L'émission de fluorescence de l'échantillon collectée par l'objectif est focalisée sur le trou confocale placé devant le détecteur. Le détecteur sélectionne les photons provenant uniquement du plan focal de l'objectif. Les photons émis avant ou après le plan focal sont éliminés par le filtre spatial. L'émission de fluorescence est alors spatialement localisée au sein de l'échantillon. Un système de déplacement fin permet de mesurer l'émission de fluorescence sur différents plans XY et à différentes profondeurs Z de l'échantillon. La résolution latérale de ces techniques est de l'ordre de la longueur d'onde de la lumière utilisée pour illuminer l'échantillon, autrement dit de l'ordre de la centaine de nanomètre ce qui limite son usage à des systèmes de tailles micrométriques comme des cellules.



**Figure 2.5 :** Schéma de principe des trois types de microscopies : (a) microscopie optique ; (b) microscopie à épifluorescence et (c) microscopie confocale

## 2.5 Références

1. Israelachvili, J. N.; McGuiggan, P. M., Adhesion and Short-Range Forces between Surfaces .1. New Apparatus for Surface Force Measurements. *Journal of Materials Research* **1990**, 5, (10), 2223-2231.
2. Israelachvili, J. N., *Intermolecular and Surface Forces*. 2nd edn. ed.; Academic PRes: London & New York, 1990.
3. Israelachvili, J. N.; Adams, G. E., Measurement of Forces between 2 Mica Surfaces in Aqueous-Electrolyte Solutions in Range 0-100 Nm. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions I* **1978**, 74, 975-&.
4. Israelachvili, J. N., Thin-Film Studies Using Multiple-Beam Interferometry. *Journal of Colloid and Interface Science* **1973**, 44, (2), 259-272.
5. Heuberger, M.; Luengo, G.; Israelachvili, J., Topographic information from multiple beam interferometry in the surface forces apparatus. *Langmuir* **1997**, 13, (14), 3839-3848.
6. Tolansky, S., *Multiple Beam Interferometry of Surfaces and Films*. Oxford University Press: 1948.

7. Israelachvili, J. N., *J. Colloid Interface Sci.* **1973**, 44, 259.
8. Hutter, J. L.; Bechhoefer, J., Calibration of Atomic-Force Microscope Tips (Vol 64, Pg 1868, 1993). *Review of Scientific Instruments* **1993**, 64, (11), 3342-3342.
9. Sader, J. E.; Chon, J. W. M.; Mulvaney, P., Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers. *Review of Scientific Instruments* **1999**, 70, (10), 3967-3969.
10. Leckband, D.; Israelachvili, J., Intermolecular forces in biology. *Quarterly Reviews of Biophysics* **2001**, 34, (2), 105-267.
11. Heinz, W. F.; Hoh, J. H., Spatially resolved force spectroscopy of biological surfaces using the atomic force microscope. *Trends in Biotechnology* **1999**, 17, (4), 143-150.
12. Radmacher, M., Measuring the elastic properties of living cells by the atomic force microscope. *Atomic Force Microscopy in Cell Biology* **2002**, 68, 67-90.
13. Bilodeau, G. G., Regular Pyramid Punch Problem. *Journal of Applied Mechanics-Transactions of the Asme* **1992**, 59, (3), 519-523.
14. Costa, K. D.; Yin, F. C. P., Estimating mechanical properties by indentation with the atomic force microscope. *Biophysical Journal* **1999**, 76, (1), A264-A264.
15. Dimitriadis, E. K.; Horkay, F.; Maresca, J.; Kachar, B.; Chadwick, R. S., Determination of elastic moduli of thin layers of soft material using the atomic force microscope. *Biophysical Journal* **2002**, 82, (5), 2798-2810.
16. Amos, W. B.; White, J. G., How the Confocal Laser Scanning Microscope entered Biological Research. *Biology of the Cell* **2003**, 95, (6), 335-342.
17. Vaiana, A. C.; Neuweiler, H.; Schulz, A.; Wolfrum, J.; Sauer, M.; Smith, J. C., Fluorescence quenching of dyes by tryptophan: Interactions at atomic detail from combination of experiment and computer simulation. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, (47), 14564-14572.
18. Bastiaens, P. I. H.; Pepperkok, R., Observing proteins in their natural habitat: the living cell. *Trends in Biochemical Sciences* **2000**, 25, (12), 631-637.



## CHAPITRE 3

# Selectins Ligand Decorated Drug Carriers for Activated Endothelial Cell Targeting

### ABSTRACT

New active particulate polymeric vectors based on branched polyester copolymers of hydroxy-acid and allyl glycidyl ether were developed to target drugs to the inflammatory endothelial cell surface. The hydroxyl and carboxyl derivatives of these polymers allow grafting of ligand molecules on the polyester backbones at different densities. A known potent non-selective selectin ligand was selected and synthesized using a new scheme. This synthesis allowed the grafting of the ligand to the polyester polymers, preserving its binding activity as assessed by docking simulations. Selectin expression on human umbilical cord vascular endothelial cells (HUVEC) was induced with the pro-inflammatory bacterial lipopolysaccharide (LPS) or with the non-selective inhibitor of nitric oxide synthase L-NAME. Strong adhesion of the ligand decorated nanoparticles was evidenced in vitro on activated HUVEC. Binding of nanoparticles bearing ligand molecules could be efficiently inhibited by prior incubation of cells with free ligand demonstrating that adhesion of the nanoparticles is mediated by specific interaction between the ligand and selectin receptors. These nanoparticles could be used for specific drug delivery to the activated vascular endothelium suggesting their application in the treatment of diseases with an inflammatory component such as rheumatoid arthritis and cancer.

### ***3.1 Introduction***

Inflammation is a naturally occurring defense mechanism upon exposure to specific antigens, chemicals, infections, and physical stress. It is characterized by different events taking place at or near the injured area, including vascular endothelium cell (VEC) activation and leukocyte accumulation. VEC, upon activation by pro-inflammatory cytokines, increases the expression of cell adhesion molecules (CAMs) in a highly regulated and sequential process. This sequence involves expression of P-selectin followed by E-selectin, which promote rolling and tethering of leukocytes along the vessel wall <sup>1</sup>. Exaggerated and/or prolonged inflammatory response is associated with a large number of acute and chronic disorders, including organ ischemia/reperfusion injury, allergic asthma, rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, and atherosclerosis.

The selectin family has three members, namely, L-, E-, and P-Selectin. Their expression is restricted to circulating leukocytes (L-selectin) and VEC (P- and E-selectins). Upon inflammatory stimulation, P-selectin (CD62P) appears rapidly at the cell surface, owing to its intracellular storage in Weibel-Palade bodies. On the other hand, maximum levels of E-selectin (CD62E) are reached in 4-6 h after activation, due to de novo synthesis <sup>2</sup>. Since E-selectin is expressed in both acute and chronic inflammation, it has been considered as a good candidate for drug targeting. In addition, the cytokines IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ , as well as bacterial lipopolysaccharide (LPS), have been shown to stimulate the expression of E-selectin <sup>3</sup>. Moreover, E selectin is reported to exhibit a highly localized expression in neovasculature <sup>4</sup> and prostate cancer <sup>5</sup>. The natural ligands of E- and P-selectin are either fucosylated glycoproteins (ESL-1, for E-selectin ligand) or sialomucin glycoproteins (PSGL-1 for P-selectin glycoprotein-1) presenting sialylated carbohydrate moieties (sialyl-Lewis x, sLe<sup>x</sup>) epitopes. These selectin ligands are known to be present on circulating leukocytes plasmatic membrane <sup>6,7</sup>. Synthetic analogues of the natural ligands have been investigated for their ability to block inflammation <sup>6,8,9</sup>. Some of these analogues have been reported to have higher affinity to the target compared to the natural ligand, rendering them very attractive molecules for active drug targeting developments.

Among promising new therapeutic approaches, targeted drug carriers have received increasing interest during the past few decades<sup>10</sup>. These carriers aim to release the drug close to the pathologic site, protecting the active substance from fast degradation and elimination leading to dose reduction and avoiding side effects. Several approaches such as drug immunoconjugation, bioconjugation, liposomes, dendrimers, micelles, or coated nanoparticles (NPs) have been proposed to achieve active or passive targeting of drug. However, compared to other delivery systems, polymeric NP drug carriers offer the possibility of encapsulating several types of molecules and protecting them from enzymatic degradation. The polymers forming the NP carriers are generally highly stable in physiological media and allow controlled release by matrix degradation.

A general approach to confer targeting capabilities to NPs is to functionalize their surface with a specific ligand. This approach is strongly limited by the stability of the link between the ligand and the NP surface. If this link is not stable enough in physiological media, release of the ligand (by hydrolysis, for example) from the NP surface could be rapid. To circumvent this severe drawback and to improve the binding properties of the NPs, new coupling strategies must be investigated. Specific drug delivery to activated VECs to modulate the inflammation response have been shown to be a valid therapeutic strategy<sup>11</sup>. Drug immunoconjugation<sup>12, 13</sup> and immunoliposomes directed against E-selectin<sup>14-16</sup>, as well as liposomes incorporating sLe<sup>x</sup> as ligands<sup>17-19</sup>, are among the most described methods. They all present the strong disadvantage of using natural ligands (as sLe<sup>x</sup>) which are in competition with the free homologue in the bloodstream.

In this study, a ligand of E- and P-selectin was synthesized and conjugated to a poly-L,D-lactic acid polymer (PLA). The ligand is a nonselective selectin antagonist, which may be advantageous in pathological settings involving both P- and E-selectin activities. The conjugation was done using carboxylic acid functions introduced in the PLA backbone. This functionalized polymer was subsequently mixed with pure PLA to form the NPs. NPs formulated with ligand functionalized PLA (NPL) present higher adhesive capabilities to HUVEC plasmatic membrane compared to non functionalized PLA NPs. Inhibition of binding could be observed for NP-L when cells are incubated with free ligand prior to the NP introduction. This study provides strong evidence that

NPs functionalized with the synthetic ligand can specifically bind to endothelial cells activated by proinflammatory molecules.

### ***3.2 Experimental procedures***

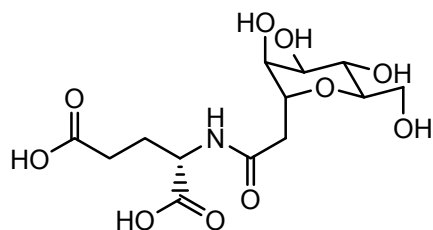
#### ***3.2.1 Materials.***

Chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Solvents were from Laboratoire MAT (Que'bec, PQ, Canada). All media and reagents for cell culture were purchased from Gibco (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Human vascular endothelial cells (CRL 1730) were from ATCC; Raw 264.7 murine macrophage cell line was a gift from Pr. J. C. Leroux.

#### ***3.2.2 Ligand docking simulations.***

All simulations were performed with E-selectin receptor using GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking) docking program<sup>20</sup> in order to identify the most probable conformation of the free and grafted ligand interacting with its receptor. The structure of the chosen ligand can be seen in Scheme 1. The protein data file was obtained from the structure published by Somers et al.<sup>21</sup> The protein was prepared as described by Jones et al.<sup>20, 22</sup> The ligand and grafted ligand (Scheme 1 and compound **(9)**) were built using Material Studio software (Accelrys, San Diego, USA) and their structure was minimized using the Discover module assigning CFF force field to each atom. The grafted ligand consisted of a ligand molecule linked to a PLA chain (of 4 monomers) via a glycidyl linker. For the docking simulations, the binding pocket of E-selectin was defined using the conformation of the natural ligand sialyl Lewis acid X (sLe<sup>x</sup>) given by Somers et al. The two equatorial hydroxyl groups of the mannose ring of the studied ligand were constrained to bind the calcium ion present in the binding pocket. In that way, the mannose ring of the ligand overlaid onto the L-fucose ring of the sLe<sup>x</sup> and the glutamate side chain was free to bind to the protein amino acids. More than 30 genetic algorithm runs were performed in order to identify best fitting

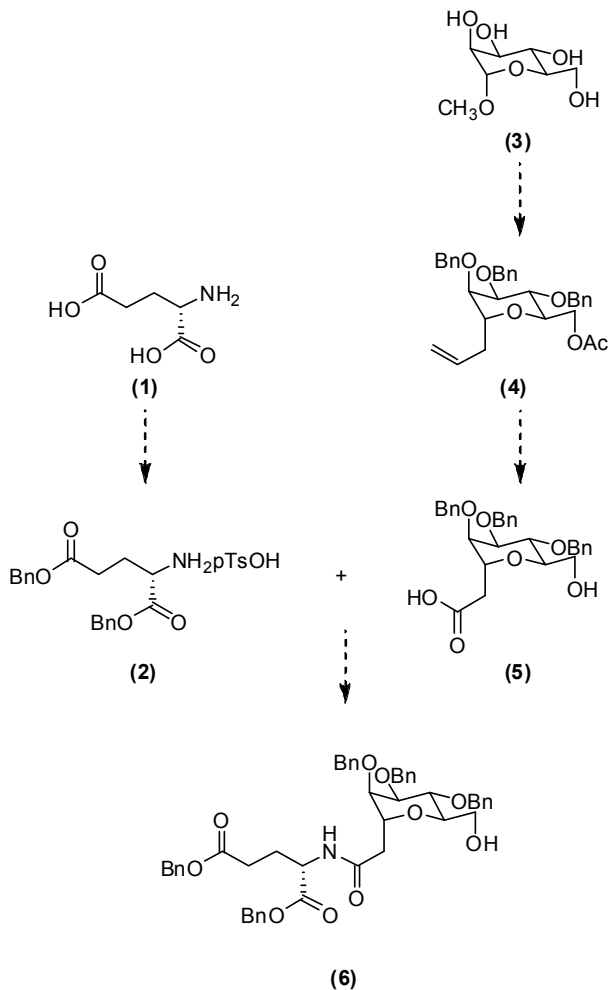
structures. The final optimized conformations were picked using GOLD scoring function.



**Scheme 3.1** Chemical structure of the synthetic ligand of E and P-selectin

### 3.2.3 Ligand synthesis

A general scheme of the ligand synthesis is represented in Scheme 2.



**Scheme 3.2** General synthesis of the selectin ligand

### *Synthesis of fragment 2*

25.5 g of *p*-toluene sulfonic acid (*p*TsOH) were added to a solution of 10 g glutamic acid **1** in 100 g of benzylic alcohol under N<sub>2</sub> atm. The mixture was heated at 80 °C for 24 h under stirring and subsequently poured onto 1 L aqueous solution of 1 M NaOH and extracted three times with diethyl ether (Et<sub>2</sub>O). The organic phases were pooled and dried on Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A solution of 10 g (*p*TsOH) sulfonic acid (*p*TsOH) in 100 mL Et<sub>2</sub>O was added to the organic phase, which was kept at 4 °C for 24 h. The crystals obtained were filtered and washed with ether to yield 12.3 g of product **2** (36% yield)

NMR <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ 2.00-2.17 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH-), 2.28 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>- (*p*TsO<sup>-</sup>)), 2.43-2.66 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>Bn), 4.17 (t, 6.60 Hz, 1 H, -CH(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)-CO<sub>2</sub>-), 5.05-5.12 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-Ph), 5.17-5.26 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-Ph), 7.12 (d, 8.0 Hz, 2 H, aromatic *p*TsO<sup>-</sup>), 7.31-7.43 (m, 10 H, aromatic -Bn), 7.51 (d, 8.0 Hz, 2 H, aromatic *p*TsO<sup>-</sup>), 8.28-8.64 (m, 3 H, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>). SM (FAB) m/e 328.5 (M+H-*p*TsOH, 100 %), 192.3 (10 %), 154.2 (32 %).

### *Synthesis of fragment 4*

3.8 g of tetrabutyl ammonium iodide (TBAI) and 54 mL of bromobenzyl (BnBr) were added to a 10% (w/w) solution of D-methylmannoside **3** in dimethyl formamide (DMF) under N<sub>2</sub> atmosphere. The mixture was cooled down to 0 °C and 18.2 g of NaH was slowly added to avoid a temperature rise. The mixture was stirred for 16 h and cooled down to 0 °C. 100 mL of isopropanol was slowly added, followed by 20 g of salicylic acid. The solution was evaporated and redissolved in 500 mL of ethyl acetate (EtAc). The organic phase was washed three times successively with 100 mL NaOH 10%, 100 mL 1 N HCl, and 100 mL NaCl saturated salt solutions. The organic phase was dried on Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated. The residual product was purified by flash chromatography on silica with an eluent mix 10:90 to 20:80 Et<sub>2</sub>O and hexane (HEX) to yield 27.3 g (43%) of intermediate product.

NMR <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.35 (s, 3 H, -OCH<sub>3</sub>), 3.74-3.84 (m, 4 H), 3.90-3.93 (m, 1 H), 3.97-4.04 (m, 1 H), 4.51-4.82 (m, 8 H), 4.91 (d, 11.0 Hz, 1 H), 7.17-7.42 (m, 20 H, aromatic). NMR <sup>13</sup>C (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 54.7, 69.2, 71.6, 72.0, 72.5, 73.3, 74.4,

74.8, 75.0, 80.2, 98.9, 127.4-128.4 (m, 20 C), 138.2-138.4 (m, 4 C). SM (FAB) m/e 553.4 (M-H, 7 %), 271.4 (10 %), 181.3 (100 %). SMHR Calculated for C<sub>35</sub>H<sub>37</sub>O<sub>6</sub> (M-H) 553.2590, found 553.2600 (-1.8 ppm).

Allyl-trimethylsilane (14.3 mL) and trimethylsilyl triflate (4.1 mL) were added to a solution of 25 g of intermediate product in acetonitrile (ACN) at 0 °C under N<sub>2</sub> atmosphere. The mixture was maintained at 4 °C for 16 h and then 65 mL of anhydrous acetic acid were added. Under stirring at room temperature, 600 mL of dichloromethane (DCM) and 60 mL of aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> were added to the mixture. The pH was adjusted to 12 with 10%w/v NaOH. After phase separation, the aqueous phase was extracted with 300 mL of DCM. The obtained organic phases were pooled, dried on Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and filtered. The solvents were eliminated by distillation under vacuum. The residual product was purified by flash chromatography on silica, using a mix of Et<sub>2</sub>O and HEX in proportion ranging from 25:75 to 100:0 to yield 18.5 g (79 %) of product **4**.

NMR <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.05 (s, 3 H, Ac-), 2.24-2.40 (m, 2 H), 3.61-3.64 (m, 1 H), 3.75-3.83 (m, 3 H), 4.05-4.10 (m, 1 H), 4.23-4.27 (m, 1 H), 4.37-4.42 (m, 1 H), 4.53-4.63 (m, 5 H), 4.74-4.77 (m, 1 H), 4.99-5.04 (m, 2 H), 5.67-5.77 (m, 1 H), 7.27-7.37 (m, 15 H, aromatic).

#### *Synthesis of fragment 5*

90 mL water and 4.5 mL of an aqueous solution of 50 % (w/w) of 4-Methylmorpholin *N*-oxyde (NMO) were added to a solution of 9.00 g of compound **4** in 90 mL distilled acetone, followed by an addition of 2.25 mL of a 2.5 % (w/w) solution of osmium tetroxyde in *t*-butanol. The solution was stirred for 3 h, then 2.25 mL of an aqueous solution of 10 % (w/w) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 9 g of Florisil<sup>®</sup> and 180 mL of water were added. The pH was adjusted to 1 with HCl 1 M. The aqueous phase was extracted three times with 500 mL of EtAc. The organic phases were pooled, dried on Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and filtered. The solvent was eliminated by distillation under vacuum. The diol intermediate product was used in the next step without purification. 4.5 g of sodium periodate and 90 mL of water were added to a solution of 17.4 mM of the intermediate diol in 90 mL THF. The solution was stirred for 1 h and then 450 mL of water were added. The

aqueous phase was extracted three times with 450 mL of EtAc. The organic phases were pooled, dried on Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was eliminated by distillation under vacuum. The residual aldehyde product was used in the next step without further purification. 20.9 mM of CrO<sub>3</sub> from the Jones reagent (CrO<sub>3</sub> : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : H<sub>2</sub>O, 1 : 1 : 3) were added to a solution of 17.4 mM of aldehyde product in 90 mL of distilled acetone at 0 °C. After 15 min, reagent in excess was neutralized by the addition of 10 mL of isopropanol. The solution was poured on 900 mL of HCl 1 M, and extracted three times with 400 mL of EtAc. The organic phases were pooled and the remnant solvent was eliminated by distillation under vacuum. The aldehyde product was used in the next step without further purification. A solution of 4.0 g Potassium Hydroxyde was prepared with 20 mL water and 20 mL of methanol (MeOH). This solution was added to a solution of 17.4 mM of intermediate aldehyde compound in 100 mL MeOH. 100 mL of potassium hydroxyde 10 % (w/v) was further added and the mixture and poured in 1 L HCl 1 N then the aqueous phase was extracted three times with 500 mL EtAc. The organic phases were pooled, dried on Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was eliminated by distillation under vacuum. The residual product was purified by flash chromatography on silica using Et<sub>2</sub>O as the eluent to obtain 7.56 g of acid alcohol **5**. The yield of the synthesis was 88 %.

NMR <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.54 (dd, 9.9 and 16.7 Hz, 1 H), 2.82 (dd, 3.3 and 16.8 Hz, 1 H), 3.45 (dd, 3.7 and 12.1 Hz, 1 H), 3.55 (dd, 3.6 and 5.0 Hz, 1 H), 3.62 (dd, 2.8 and 7.6 Hz, 1 H), 3.81 (dd, 3.0 and 5.0 Hz, 1 H), 3.84-3.92 (m, 1 H), 4.21 (dd, 9.1 and 12.2 Hz, 1 H), 4.39-4.59 (m, 7 H), 7.22-7.38 (m, 15 H), -OH and -COOH absent. SM (FAB) m/e 515.2 (M + Na, 4 %), 271.1 (8 %), 181.1 (100 %), 132.9 (51 %). SMHR Calculated for C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>O<sub>7</sub>Na (M + Na) 515.2046, found 515.2032 (+ 2.7 ppm).

#### *Coupling 2 and 5 : protected ligand 6*

9.5 g of amine tosylate **2** were solubilised in 200 mL of EtAc and mixed three time with the same volume of sodium hydroxyde 1 N. The amine compound corresponding to **2** was obtained after drying the organic phase on Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtration and elimination of the solvent by evaporation under vacuum. A 10 % (w/w) solution of the acid alcohol **5** in DCM was added with a canula to a solution containing 2.4 g of ethyl-3-(3-



dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC). 1,7 g of 1-hydroxybenzotriazole hydrate (HOBt) and compound **2** were mixed in 31 mL DCM under N<sub>2</sub> atmosphere. The solution was stirred for 16 h. Solvents were eliminated by distillation under vacuum. The residual product was purified by flash chromatography on silica using 1: 1 EtAc/HEX to get 3.17 g of the protected ligand **6** (yield of 63 %).

NMR <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.92-2.02 (m, 1 H), 2.14-2.23 (m, 1 H), 2,31-2.45 (m, 3 H), 2.69 (dd, 2.0 and 15.4 Hz, 1 H), 3.40 (dd, 3.0 and 12.3 Hz, 1 H), 3.50 (dd, 3.0 and 4.8 Hz, 1 H), 3.57 (dd, 2.6 and 8.2 Hz, 1 H), 3.78 (dd, 3,1 and 4.4 Hz, 1 H), 3.96-4.01 (m, 1 H), 4.26 (dd, 9.9 and 12.4 Hz, 1 H), 4.33-4.40 (m, 1 H), 4.43-4.61 (m, 6 H), 4.67-4.74 (m, 1 H), 5.05 (d, 12.3 Hz, 1 H), 5.09 (d, 12.4 Hz, 1 H), 5.14 (s, 2 H), 7.15-7.39 (m, 25 H), -OH and -CONH- absent. NMR <sup>13</sup>C (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 27.07, 30.28, 37.27, 51.49, 59.92, 66.51, 67.50, 71.52, 72.47, 72.83, 74.69, 75.72, 76.89, 127.76-128.60 (25 °C), 134.98, 135.66, 137.63, 137.68, 137.78, 171.20, 172.51, 172.70. SM (FAB) m/e 802.2 (M+H, 68 %), 694.3 (10 %), 418.2 (8 %), 328.1 (12 %), 271.1 (6 %), 181.1 (100 %), 136.0 (14 %). SMHR Calculated for C<sub>48</sub>H<sub>52</sub>NO<sub>10</sub> (M+H) 802.3591, found 802.3554 (+4.6 ppm).

### ***3.2.4 Polymer synthesis and subsequent ligand conjugation and deprotection***

Synthesis of PLA polymer bearing pendant carboxyl groups for ligand grafting has been described elsewhere.<sup>23</sup> A solution of PLA 1 mg/mL with 1% (mol/mol) (relative to lactic monomer) acyl chloride pendant groups in chloroform was prepared (polymer **7**) and to this were added successively 1.5 equiv of **6** in chloroform at a concentration of 0.25 mM and a 10% (w/v) solution of dimethylamino propane (DMAP) in pyridine. The mixture was stirred for 3 h after which a 1 N HCl solution was added to neutralize the pyridine. Chloroform was evaporated and the aqueous phase was filtered to yield the protected ligand-PLA. Activated palladium (Pd-C 5%) was added to a solution of 0.8 mg/mL of protected ligand-polymer in glacial acetic acid at a ratio of 1 mg/mg. This mixture was placed under hydrogen (atmospheric pressure) for 16 h. Pd-C was eliminated by filtration on Celite (MeOH as eluent). Solvent was eliminated by evaporation, and the product dissolved in chloroform. Chloroform was eliminated by

evaporation in the presence of an equivalent volume of water to yield the precipitated polymer in aqueous phase. This step was repeated twice to obtain PLA with 5 mol % of grafted selectin synthetic ligand (compound **9** or PLA-SEL<sub>5%</sub>) with a 70% yield for the two-step procedure after drying.

PLA polymer bearing hydroxyl groups was synthesized as described in Nadeau *et al.*<sup>23</sup>. Rhodamine B was grafted to the PLA backbone using standard EDC/NHS coupling reaction. The obtained polymer (PLA-Rhod<sub>5%</sub>) was precipitated in water and dissolved in DCM after complete water removal. This operation was repeated three times for complete elimination of remnant chemicals.

### ***3.2.5 NPs preparation***

NPs were prepared by the solvent evaporation method. Briefly, 500 mg of a 1:1 mixture of PLA-Rhod<sub>5%</sub> and PLA (or PLA-Sel<sub>5%</sub>) were dissolved in 15 mL of DCM. The polymer solution was then gently injected into 100 mL of aqueous 15% (w/v) of sucrose solution containing a surfactant mixture (2.5% Tween 20, 0.5% PEG Laurate), while emulsification was being achieved by means of high-pressure homogenization (Emulsiflex C30, Avestin, Ottawa, ON, Canada) at 10 000 psi for 3 min in order to obtain the NP suspension. After collection of the NPs, the suspension was stirred for 5 h under reduced pressure to allow solvent evaporation and NP solidification. NP suspension was then lyophilized (Freeze-Dry System, Lyph.Lock 4.5, Labconco) and stored at 4 °C until further use.

### ***3.2.6 NPs characterization***

#### *Particle size distribution.*

NPs size distribution was measured by photon correlation spectroscopy (PCS) (N4 Plus, Coulter Electronics, Miami, FL, USA) at 90 ° scattering angle for 180 seconds and at 25 °C. The mean particle diameter was calculated using differential size distribution processor (SDP) intensity analysis program.

*Zeta potential measurements.*

NPs were suspended in 0.25 % (w/v) saline solution filtered through 0.22  $\mu\text{m}$  filter and zeta potential was measured at 25 °C on Malvern ZetaSizer Nanoseries ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) in triplicate.

*Time-of-Flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS).* NPs samples were analyzed using a TOF-SIMS IV (ION-TOF GmbH, Munster, Germany). The mass spectra were produced by irradiating the NPs with a 15 keV monoisotopic  $^{69}\text{Ga}^+$  primary ion source with a target current of 1.02 pA in order to stay in static regime (ionic dose lower than  $10^{13}$  ions/ $\text{cm}^2$ ). Mass resolution was above 8200  $\mu\text{ma}$  for  $^{29}\text{Si}^+$ . The scanned surface area was 40  $\mu\text{m}$  x 40  $\mu\text{m}$ . Both positive and negative secondary ions were collected over a mass range of 5-800 and analyzed.

*Cytotoxicity assay of NPs.*

Cytotoxicity assay was performed on two cell lines using MTT cell proliferation assays. RAW 264.7 murine macrophage cell line was cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) and Penicillin/Streptomycin (Invitrogen Canada, Burlington, ON, Canada). Human vascular endothelium cells were cultivated in F12 Kaighn's modification medium, 10 % FBS with Penicillin/Streptomycin supplemented with heparin and endothelial growth supplement from neural bovine tissue (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). Both cell lines were grown in tissue culture flasks and incubated at 37 °C in a 5 %  $\text{CO}_2$  atmosphere.

Raw 264.7 cells were diluted in complete medium at a final concentration of  $5 \times 10^5$  cells/mL and plated (100  $\mu\text{L}$ /well) on a 96 well-flat bottom microplate (Corning, NY, USA). NPs suspended in 10  $\mu\text{L}$  PBS sterile buffer were added in the wells in triplicate for each concentration. The plates were incubated for 24 h after which cellular proliferation was assessed by MTT assay. Cell medium was removed and cell monolayer washed with PBS. Complete medium was replaced and 10  $\mu\text{L}$  of thiazolyl blue tetrazolium bromide (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) dissolved in PBS (10 mM, pH 7.4) at a concentration of 5 mg/mL and filtered on 0.22  $\mu\text{m}$  sterile filter

(Millipore, Bedford NMA USA), was added to each well. After 3 h incubation time at 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere, 50 µL of solubilising solution (Isopropanol, 10 % Triton 100X, 0.1 N HCl) was added to each well to dissolve the dark blue formazan crystals. Absorbance was read at a wavelength of 570 nm on a microplate reader (SAFIRE, Tecan, Austria). Procedures with HUVECs were similar, except for initial seeding densities of 2 x 10<sup>4</sup> cell/m were plated on 96 well-flat bottom microplate (treated with fibronectin) and extra incubation time of 6 h was used prior to addition of solubilising solution.

### **3.2.7 *In vitro* binding assays.**

#### *Selectin induction by pro-inflammatory drugs*

HUVEC were plated on sterile round cover slips (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) treated with human fibronectin at a seeding density of 5×10<sup>4</sup> cells/wells and grow for 48 h prior to experiment in 24-wells plate (Costar, Corning). Selectin expression on cell surface was induced by LPS (5 µg/mL) or with L-NAME (3 mM) for 4 h. After repeated rinsing with cold PBS, the activated cells were fixed with a filtered 1 % (w/w) formaldehyde PBS solution for 10 min. After addition of 250 µL of blocking solution (2 % (w/v) BSA in PBS) cells were incubated overnight at 4 °C with mouse anti-E-Selectin (clone BBIG-E4 (5D11), R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) or P-Selectin (clone P8G8, Chemicon, Temecula, CA,USA) antibodies. After washing with PBS, secondary goat anti-mouse Alexa546 antibody (Invitrogen) was added for 2 h. Cell nucleus staining was performed using Hoechst 33352. All micrographs were taken using an inverted Olympus IX71 microscope (Olympus Canada Inc., Markham, ON) and an Evolution VF camera (MediaCybernetics, Bethesda, MD) with the same 60X objective lens and exposure time to allow comparison of measurements. All images were processed with ImagePro® software (MediaCybernetics, Bethesda, MD).

#### *NPs binding assays*

HUVECs were activated as described above and cooled to 4 °C prior incubation with cold NPs suspension for 5 min (100 µg/wells) in serum free medium. After repeated

rinsing with cold PBS, cells were lysed for 2 h at 2 °C with a 0.2 % (w/w) Triton 100 solution (1 N NaOH) and fluorescence intensity was read with a fluorescence plate reader (Ex., 550 nm; Em., 580 nm). A similar procedure was used for studies using the free ligand as an inhibitor. Activated HUVECs were incubated for 30 min at 37 °C with different concentrations of free ligand and cooled to 4 °C before incubation with NPs (50 µg/mL) in serum free medium. After repeated rinsing with cold PBS, cells were lysed during 2 h and fluorescence was read at 25 °C.

### ***3.2.8 Statistical analysis***

The data were calculated as means  $\pm$  standard error, where statistical significance was determined by Student's t-test ( $p < 0.01$ ).

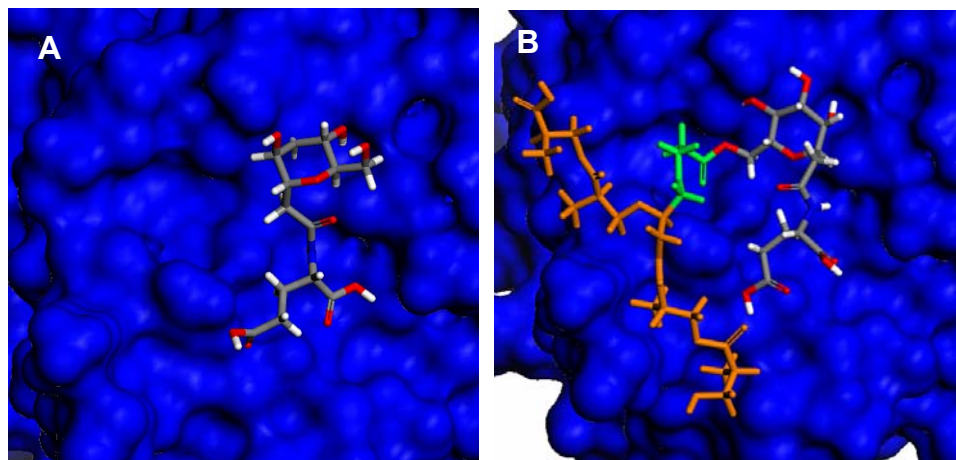
## ***3.3 Results***

### ***3.3.1 Ligand docking Simulations***

The synthetic ligand (see Scheme 1), an analogue of the sLe<sup>x</sup> epitope, was selected in this study due to its high binding affinity for P- and E-selectin<sup>8</sup> compared to sLe<sup>x</sup><sup>9</sup>. Ligand docking simulations were performed on E-selectin in order to confirm that grafted ligands still possess high binding affinity to receptors. The synthetic ligand is a mannose-based mimic of sLe<sup>x</sup>, whose structure incorporates a carboxylate group which replaces the Gal residue. Interaction between sLe<sup>x</sup> and E-selectin has been extensively described and is now well-understood. The binding site of E-selectin is known to be located on the lectin domain of the protein. The calcium ion present in this domain has two main functions: to maintain the structure of the binding site (the calcium ion interacts with 5 residues of the protein, namely, Glu80, Asn82, Asn83, Asn105, and Asp106) and to bind the two hydroxyl groups in the equatorial position of the l-fucose ring of the sLe<sup>x</sup> ligand. This last function has been extensively used to develop ligands derived from mannose and having two hydroxyl functions in the equatorial position and another one in the radial position.

Results from docking simulations performed with the synthetic ligand showed that the mannose cycle fits in the binding site and interacts strongly with a large number of amino acids forming the binding pocket. One of the two equatorial hydroxyl functions of the mannose ring was able to bond strongly to the calcium ion of the lectin domain, while the other one interacted with Asp106 and Asn83 side chains. Moreover, one carboxylate of the glutamate moiety of the ligand binds strongly to Arg97 and to Tyr48. These interactions allow the ligand to be positioned in a similar direction to sLe<sup>x</sup>. It is interesting to note that the synthetic ligand interacts with the same amino acid as sLe<sup>x</sup> but with almost no steric constraint, which is certainly the cause of its potent inhibition capacity. Moreover, these docking simulations showed that one hydroxyl group of the mannose ring is not involved in the binding pattern and could be used as a coupling function with a macromolecule.

We performed another series of docking simulations using the synthetic ligand grafted to a PLA chain of 5 monomers. The interaction pattern of the grafted ligand was very similar to the original nongrafted ligand. We observed that the fitness index of the best structure was much higher for the grafted ligand than for the nongrafted ligand, indicating that the presence of the polymer chain favored binding of the ligand. The conformations of the free and grafted ligands in the binding pocket are slightly different. One remarkable difference is the position of the mannose ring, which is flipped in the case of the grafted ligand (Figure 1). This conformational change allows the polymer chain to lie aside from the binding pocket. Surprisingly, this conformation does not affect the interaction pattern of the ligand. The hydrogen bond network between the receptor and the grafted ligand was identical to that of the free ligand. The same amino acids from the receptor were involved in the interaction pattern as well as the same hydroxyl groups from the mannose ring and the carboxylate groups from the glutamate moiety of the ligand. The main difference between the two interaction patterns is located in the two hydroxyl groups of the mannose ring, which are inverted in the case of the grafted ligand compared to the free ligand configuration.

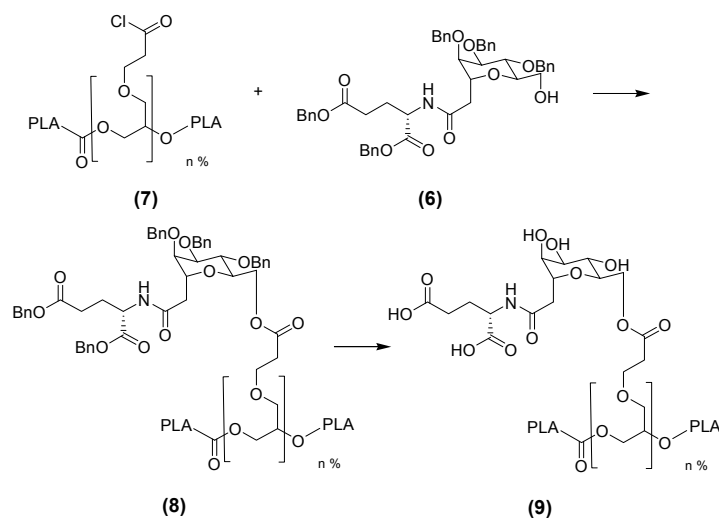


**Figure 3.1** Conformation of the ligand in the bonded state obtained from docking experiments. (A) and (B) Top view of the binding pocket. Protein is represented by the Connolly surface in blue. PLA is represented in orange. Linker monomer is represented in green.

### 3.3.2 Ligand and Polymer Synthesis

Protected ligand **6** was obtained from the coupling between the amine of the protected amino acid **2** and the acid **5** (Scheme 2). A challenging aspect of this reaction was to realize the coupling in the presence of free hydroxyl functions on **5**. The reaction sequence was important in order to prevent oxidation of the primary hydroxyl groups into carboxylic acid. We used acetyl functions to protect the primary alcohol during the reaction. As illustrated in Scheme 3, the coupling reaction yielded the amide ligand **6** ready to be grafted to PLA. The grafting of the synthetic ligand to PLA was mediated by an ester linkage on pendant groups of a new family of polyester polymers developed in our laboratory.<sup>23</sup> For this purpose, the ligand must present only one reactive hydroxyl group, which does not belong to the active part of the ligand. The use of a benzyl group to protect the other hydroxyl and carboxyl functions was guided by the ease of removal by hydrogenation in one step after polymer grafting. The presence and removal of the benzyl group before and after deprotection of the grafted ligand was confirmed by NMR (data not shown). The ligand grafting reaction takes place between the unprotected hydroxyl group on the ligand **6** and the acyl chloride groups present on the

polymer pendant groups **7** in the presence of DMAP and pyridine (Scheme 3). Molecular weights of the synthesized polymers, determined by GPC, were found to be  $M_n$  23 103,  $M_w$  41 623 for PLA and  $M_n$  16 412,  $M_w$  34 868 for PLA-SEL<sub>5%</sub>. A small decrease of the molecular weight of PLASEL<sub>5%</sub> could be due to partial hydrolysis of the polymer, as some reaction steps of the ligand grafting reaction involve acidic or basic treatments. The free ligand was obtained by catalytic hydrogenation of **6**, which removed the benzyl protecting groups and gave the ligand described by Wong et al.<sup>8, 24</sup> The structure of the free ligand was confirmed by mass spectrometry as well as <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR.



**Scheme 3.3** Grafting reaction of the synthetic ligand on a PLA chain and deprotection

### 3.3.3 Preparation and Characterization of NPs.

Particle size and zeta potential measurements performed on the NPs used in this study are summarized in Table 1. As expected, no significant differences in zeta potential between bare PLA and PLA-SEL<sub>5%</sub> NPs were observed due to the low concentration of synthetic ligand in the NPs. The negative surface charge of the NPs is mostly due to the remnant carboxylic groups of PLA.

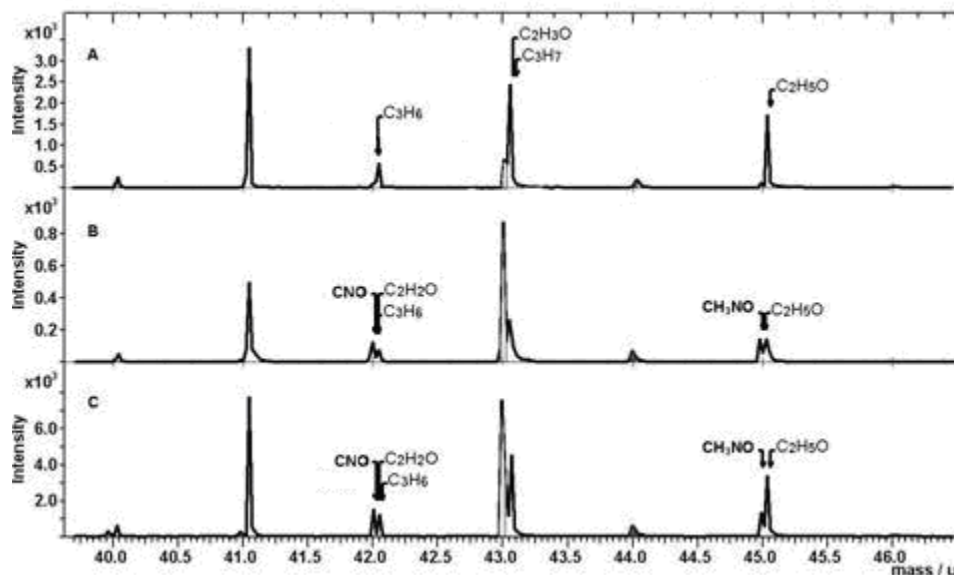


Table 3.1 Particle size and Zeta potential measurements of the different NPs used in this study.

Tested Nanoparticles	Particle size (nm)	Zeta potential (mV)
PLA-Rhod/PLA-SEL5%	173 ± 23	-25.7
PLA-Rhod/PLA	168 ± 37	-19.2

*NP Surface Characterization.*

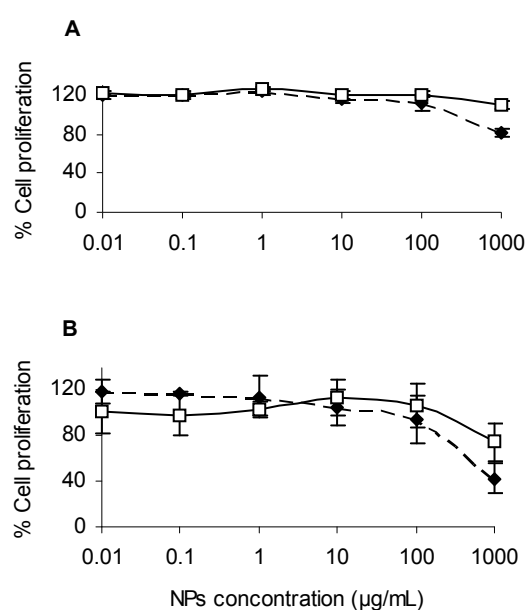
We used TOF-SIMS to detect the presence of the ligand directly on the surface of the NPs. For these experiments, no fluorescently labeled polymers were used. Excipients coming from NP preparation and polymers used did not contain any nitrogen atoms. TOF-SIMS is a very surface specific technique and sensitive to the outermost 10 Å of the NP surface. In Figure 2, the 40-46 amu region of the mass spectra is displayed, showing peak differences that can be attributed to nitrogen compounds found on ligand-functionalized NPs only.



**Figure 3.2** Partial TOF-SIMS spectrum (40-46 amu). (A) NPs made of PLA; (B) NPs made of PLA and PLA-SEL<sub>5%</sub> (50:50) and (C) NPs made of PLA-SEL<sub>5%</sub> alone. Significant peaks are identified by arrows.

### *NP Cytotoxicity Studies.*

Cytotoxicity of NPs made of PLA or PLA- SEL<sub>5%</sub> was investigated *in vitro* on two different cell lines, namely, rat macrophages (Raw 264.7) and human vascular endothelial cells (Figure 3A,B). Blank experiments showed no significant polymer absorbance in the concentration range studied. Results of MTT assay demonstrated that the NPs are nontoxic in concentration lower than 100  $\mu\text{g/mL}$ . Moreover, microscopic observations of the macrophage or human vascular endothelial monolayer during the study showed no changes in cell morphology or growing patterns (data not shown).

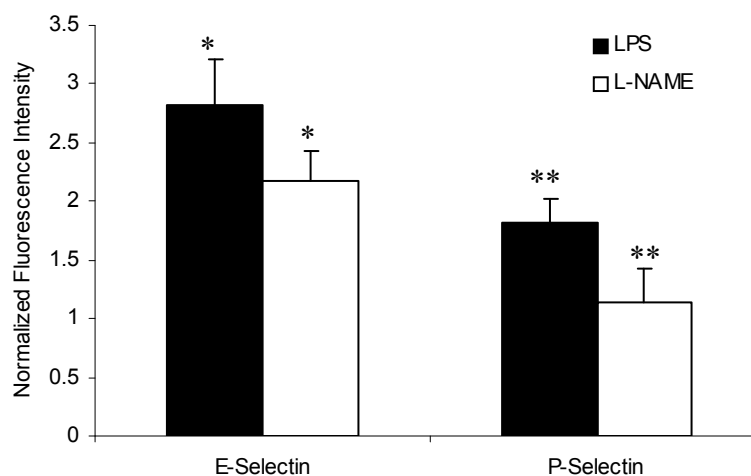


**Figure 3.3** Cytotoxicity assays of NPs on endothelial cells and rat macrophages. (A) NPs suspended in PBS were incubated with Raw 264.7 murine macrophage cell line; (B) NPs were incubated with HUVEC □: NPs bearing the synthetic ligand; ◆: NPs made of PLA only. Lines are guide for the eye.

### **3.3.4 Binding capacity of the NPs *in vitro*.**

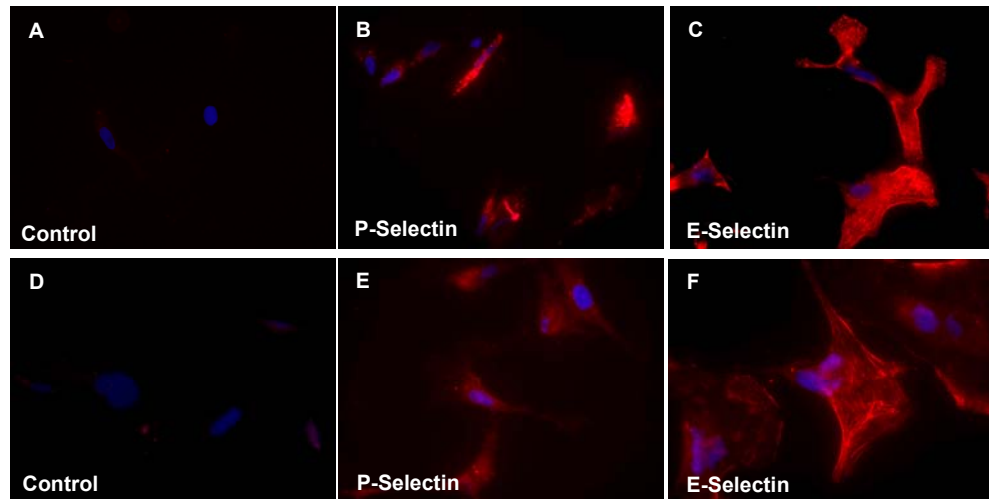
Selectin expression by HUVECs incubated with pro-inflammatory drugs was characterized by fluorescence microscopy. The relative concentration of E- and P-

selectins on HUVEC surface was quantified using fluorescent anti-E-selectin and anti-P-selectins mAbs and normalized to basal concentrations on control cells (Figure 4).



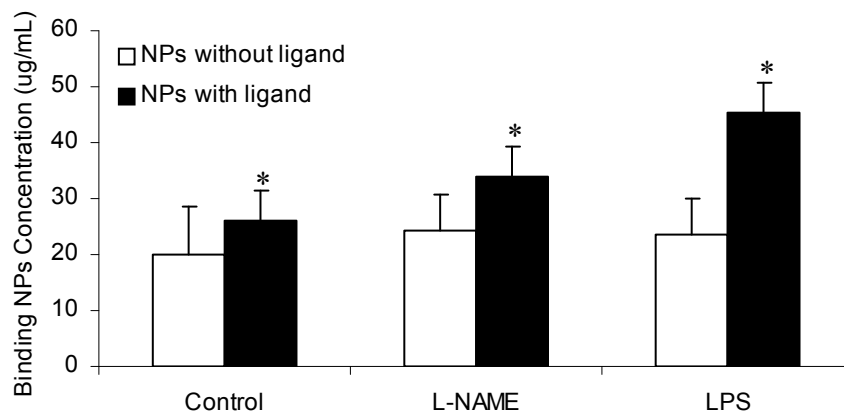
**Figure 3.4** Normalized E and P-selectin expression quantification from fluorescence microscopy in response to LPS and L-NAME activation ( $p < 0.01$ ,  $n = 3$ ). Fluorescence intensity per cell was quantified and normalized to basal expression.

Upon incubation with LPS, E- and P-selectin concentrations could be enhanced 3- and 2-fold, respectively. Incubation of cells with the drug L-NAME leads to lower expression of the receptors but was still significantly higher than control cells. Fluorescence micrographs also evidenced differences in E-selectin distribution on the surface of activated cells dependently of the activating drug (Figure 5). P-selectin stained with anti-P-selectin mAbs appeared to be uniformly distributed around the cell nucleus independently of the activating drug (Figure 5B,E). E-Selectin exhibits a very different distribution pattern depending on the activating molecules. With LPS activation, a large fraction of the proteins are uniformly distributed on cell surfaces, (Figure 5C), while with L-NAME, a significant amount are clustered in filamentous structures (Figure 5F).



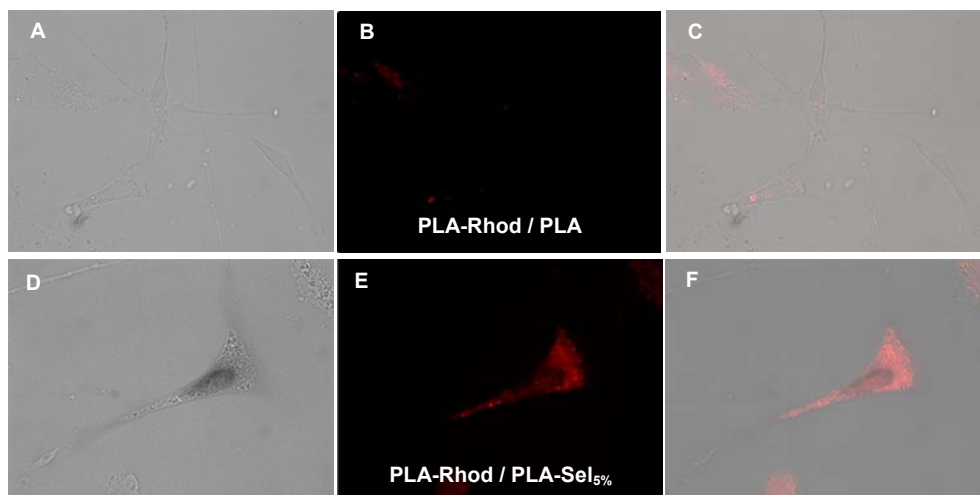
**Figure 3.5** Fluorescent micrographs of HUVECs activated with LPS (B and C) and with L-NAME (E and F). Significant localisation of fluorescence was observed for E-selectin induced by L-NAME compared to LPS while LPS activated cells demonstrate higher level of E and P-selectin on their surface. Control experiments represent E-selectin (A) and P-selectin (D) expression under basal conditions.

Cytoskeletal staining with anti-F-actin mAbs was done to ensure that cell membrane permeability was not increased by formaldehyde treatment. To determine the binding capacity of NPs to HUVECs expressing basal or high levels of selectin receptors, cells were treated with NPs for 5 min at 4 °C in order to decrease uptake by active endocytosis. After this short incubation, cells were abundantly washed and the concentration of bound NPs was quantified at 25 °C by fluorescence photospectrometry (Figure 6). For cells incubated with LPS, NPs formulated with PLASel<sub>5%</sub> present a 2-fold enhancement of bound concentration compared to nonactivated cells and a 30% enhancement for cells incubated with L-NAME. NPs formulated with PLA were not sensitive to expression levels of selectins and exhibit a constant but low bound NPs concentration independently of the experimental conditions. The level of NPs bearing the synthetic ligand corresponds well with the level of expression of E- and P-selectin induced by LPS and L-NAME, indicating that adhesion of these NPs is strongly dependent on selectin expression.



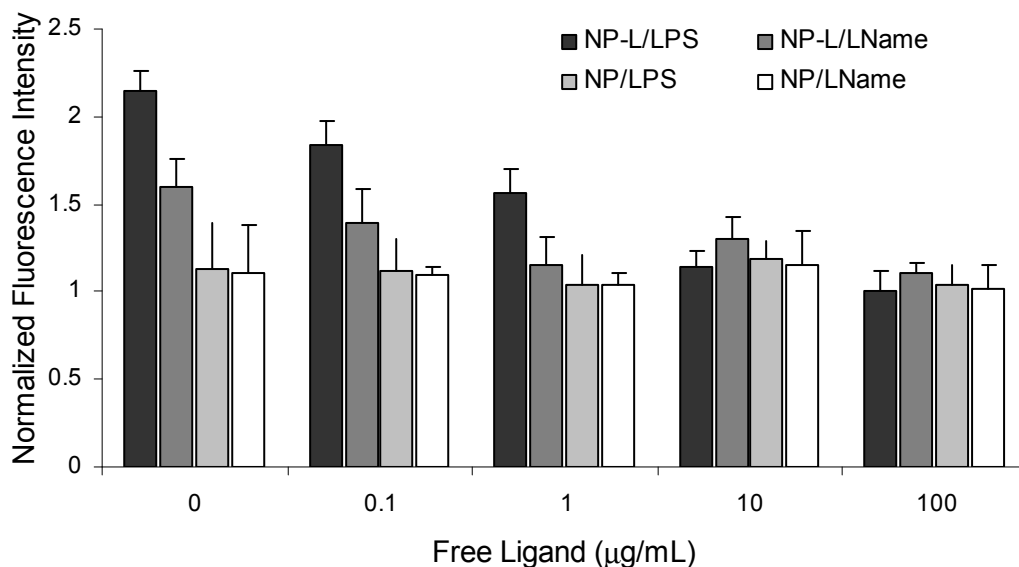
**Figure 3.6** Fluorescence spectrophotometry demonstrates that binding of the NPs is regulated by receptor expression. The concentration of bound NPs on the cells surface was dependent on the activating molecule and was maximum for LPS ( $p < 0.01$ ,  $n = 3$ ). NPs binding time was 5 min at 4 °C followed by extensive washing and cell lysis.

Fluorescent micrographs of cells activated with LPS confirmed this result. Strong fluorescence localized on the whole surface of the cell was observed after just 5 min of incubation with NPs bearing the synthetic ligand, while almost no fluorescence could be observed with the NPs formulated with PLA (Figure 7). Control experiments of F-actin staining on permeabilized and nonpermeabilized cells were also realized and confirmed that the observed fluorescence in micrographs came from cell surfaces and not from cytosol.



**Figure 3.7** Fluorescence microscopy was used to assess localization of the NPs (red) on LPS activated cell surface. Images confirmed that NPs bearing ligand molecules rapidly adhere to the cell surface (E) compared to the bare NPs (B). NPs binding time was 5 min at 4 °C and was followed by extensive washing and fixation of the cells. (A) and (D) are DIC images, (C) and (F) are merged images.

Binding assay of NPs in the presence of free ligand was also realized. Free ligand was incubated for 30 min with HUVEC, which were activated with LPS or L-NAME. They were cooled to 4 °C prior to the introduction of the NPs. An increase of the free ligand concentration was followed by a decrease in the fluorescence intensity only for the NPs bearing the synthetic ligand (Figure 8). Fluorescence intensities similar to those of control cells, which were not activated or incubated with the free ligand, were obtained for free ligand concentrations higher than 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . NPs formulated with PLA were not sensitive to the presence of free ligand in the whole range of concentration studied.



**Figure 3.8** Fluorescence spectrophotometry demonstrated that free ligand can inhibit binding of NPs bearing ligand molecules ( $p < 0.01$   $n = 3$ ). Binding of bare NPs was not affected. NPs binding time was 5 min at 4 °C and was followed by extensive washing and cell lysis.

### 3.4 Discussion

The natural ligand of E- and P-selectin, the tetrasaccharide sialyl Lewis x (sLe<sup>x</sup>), has a weak affinity (around 0.6 mM) for E-selectin as determined in cell-free assays.<sup>25</sup> Development of synthetic carbohydrate ligands having higher affinities has been hindered by the fact that the synthesis of modified carbohydrate is complex and expensive. Moreover, most proteins bind carbohydrates with weak affinity. At a molecular level, X-ray diffraction analysis of E- and P-selectin<sup>21</sup> binding sites of natural ligand sLe<sup>x</sup> had recently shown the essential chemical groups involved in the binding pocket. Consequently, several designs of antagonist ligands have been proposed<sup>8, 9</sup>. Among them, carbohydrate mimetics of sLe<sup>x</sup> based on a mannose ring have been extensively studied.<sup>24, 26</sup> The advantage of these molecules is the relative ease of their synthesis and their high affinity toward E- and P-selectin. The binding pattern and conformation of the synthetic ligand grafted to a polymeric chain of PLA was evaluated and compared to the free synthetic ligand. Docking experiments performed on the free

synthetic ligand showed that one of the anomeric hydroxyl functions present at the 6-O position of the  $\alpha$ -D-mannopyranosyl ring is nonessential for the binding of the ligand. Thus, it could be possible to graft a polymeric chain at that position. The simulation results showed that grafting the synthetic ligand to a hydrophobic polymeric chain like PLA did not alter significantly the interaction pattern of the ligand with the protein. This is in agreement with previous experimental observations made by Wong et al. who showed that conjugation of hydrophobic groups like C16 alkyl chains on the nonessential hydroxyl group of the ligand strongly increased the affinity of the ligand to E- and P-selectin.<sup>24</sup> The technique used to evaluate the NPs allows mixing of functionalized and nonfunctionalized PLA chains and offers the possibility of adjusting the concentration of ligand in the NPs. This versatility in the formulation has also allowed encapsulation of hydrophilic<sup>27</sup> or hydrophobic drugs<sup>28</sup> in PLA NPs and fine-tuning of the delivery kinetics of these drugs. An important advance of the present approach resides in the fact that, by mixing a ligand functionalized polymer with a nonfunctionalized homologue, a high concentration of ligand on the NP surface can be maintained during the whole lifetime of the NPs, contrary to NPs that are surface-functionalized only.<sup>29</sup> As already mentioned, the presence of the synthetic ligand on the NPs is a key factor to ensure strong affinity of the NPs to their target. TOF-SIMS results ensured that functionalized NPs really exposed the synthetic ligand on their surfaces. Cytotoxicity assays did not reveal any toxicity associated with NPs over a large range of NP concentrations, ensuring that binding of NPs was not affected by the chemical components of the polymers. Under normal conditions, both E-selectin and P-selectin are present in low concentrations in vascular endothelial cells but can be induced by interleukins (IL), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), lipopolysaccharides, endotoxins,<sup>30</sup> and cytomegalovirus infection.<sup>31</sup> Expression of E- and P-selectin by L-NAME has been used in model systems of ischemia or atherosclerosis, as it has been reported to inhibit the production of nitric oxide from endothelial cells. Our observation showed that the concentration and the distribution of E-selectin following L-NAME activation and LPS activation in HUVECs are very different. E- and P-selectin levels are higher on cells stimulated with LPS after 4 h of induction. Maximum expression of selectin on the cell surface has been reported to be at 4 h for both LPS and L-NAME



activation<sup>32, 33</sup>, suggesting that the differences observed in selectin concentration do not come from different expression kinetics. We observed marked differences in selectin distribution on endothelial cells activated by L-NAME or LPS. Scholz et al. reported a more diffuse pattern of E-selectin distribution on HUVEC cells activated by IL- $\beta$ .<sup>34</sup> This suggest that receptor distribution on the cell surface is strongly dependent on the stimulating molecule and therefore on the regulation process. More experiments are needed to truly characterize the effect of the protein distribution on the adhesive capacity of the NPs, but it can be advanced that this factor is expected to strongly affect the adhesive properties of the NPs as already suggested by other studies. Indeed, it has been reported that the location of the ligand-receptor bond relative to the endothelial or particle surface influences the adhesion of NPs to the endothelium.<sup>35, 36</sup>

Results from *in vitro* adhesion tests demonstrated that the presence of the ligand was necessary to achieve strong adhesion between cells and NPs. Given that the NPs used in this study have the same particle size and similar zeta potentials, differences in binding properties of the NPs could be directly correlated with the presence of the ligand on NP surface. We observed that NP binding was modulated by selectin upregulation. Indeed, different levels of selectin expression could be achieved by incubating the cells with different pro-inflammatory drugs. These differences in receptor expression could be correlated with differences in binding concentrations for the NPs bearing the synthetic ligand.

In a nutshell, these results obtained *in vitro* confirm the adhesion capabilities of NPs functionalized with selectin ligand, which makes them good candidates for active targeting of the endothelium. Such findings provide important information regarding possible treatments of acute inflammation using drug delivery systems.

### ***3.5 References***

1. Simon, S. I.; Green, C. E., *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2005**, 7, 151-85.
2. Colden-Stanfield, M.; Gallin, E. K., *Am. J. Physiol.* **1998**, 275, (1 Pt 1), C267-77.
3. Ye, C.; Kiriya, K.; Mistuoka, C.; Kannagi, R.; Ito, K.; Watanabe, T.; Kondo, K.; Akiyama, S.; Takagi, H., *Int. J. Cancer* **1995**, 61, (4), 455-60.

4. Vallien, G.; Langley, R.; Jennings, S.; Specian, R.; Granger, D. N., *Microcirculation* **2000**, 7, (4), 249-58.
5. Bhaskar, V.; Law, D. A.; Ibsen, E.; Breinberg, D.; Cass, K. M.; DuBridg, R. B.; Evangelista, F.; Henshall, S. M.; Hevezi, P.; Miller, J. C.; Pong, M.; Powers, R.; Senter, P.; Stockett, D.; Sutherland, R. L.; von Freeden-Jeffry, U.; Willhite, D.; Murray, R.; Afar, D. E.; Ramakrishnan, V., *Cancer Res.* **2003**, 63, (19), 6387-94.
6. Ehrhardt, C.; Kneuer, C.; Bakowsky, U., *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, 56, (4), 527-49.
7. Magnani, J. L., *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, 426, (2), 122-31.
8. Simanek, E. E.; McGarvey, G. J.; Jablonowski, J. A.; Wong, C. H., *Chem. Rev.* **1998**, 98, 833-862.
9. Kaila, N.; Thomas, B. E. t., *Med. Res. Rev.* **2002**, 22, (6), 566-601.
10. Allen, T. M.; Cullis, P. R., *Science* **2004**, 303, (5665), 1818-22.
11. Kuldo, J. M.; Ogawara, K. I.; Werner, N.; Asgeirsdottir, S. A.; Kamps, J. A.; Kok, R. J.; Molema, G., *Curr. Vasc. Pharmacol.* **2005**, 3, (1), 11-39.
12. Everts, M.; Kok, R. J.; Asgeirsdottir, S. A.; Melgert, B. N.; Moolenaar, T. J.; Koning, G. A.; van Luyn, M. J.; Meijer, D. K.; Molema, G., *J. Immunol.* **2002**, 168, (2), 883-9.
13. Everts, M.; Asgeirsdottir, S. A.; Kok, R. J.; Twisk, J.; de Vries, B.; Lubberts, E.; Bos, E. J.; Werner, N.; Meijer, D. K.; Molema, G., *Inflamm. Res.* **2003**, 52, (12), 512-8.
14. Spragg, D. D.; Alford, D. R.; Greferath, R.; Larsen, C. E.; Lee, K. D.; Gurtner, G. C.; Cybulsky, M. I.; Tosi, P. F.; Nicolau, C.; Gimbrone, M. A., Jr., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, (16), 8795-800.
15. Bendas, G.; Krause, A.; Schmidt, R.; Vogel, J.; Rothe, U., *Pharm. Acta Helv.* **1998**, 73, (1), 19-26.
16. Kessner, S.; Krause, A.; Rothe, U.; Bendas, G., *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, 1514, (2), 177-90.
17. Murohara, T.; Margiotta, J.; Phillips, L. M.; Paulson, J. C.; DeFrees, S.; Zalipsky, S.; Guo, L. S.; Lefer, A. M., *Cardiovasc. Res.* **1995**, 30, (6), 965-74.

18. Vodovozova, E. L.; Moiseeva, E. V.; Grechko, G. K.; Gayenko, G. P.; Nifant'ev, N. E.; Bovin, N. V.; Molotkovsky, J. G., *Eur. J. Cancer* **2000**, 36, (7), 942-9.
19. DeFrees, S. A.; Phillips, L.; Guo, L.; Zalipsky, S., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, (26), 6101-6104.
20. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C., *J. Mol. Biol.* **1995**, 245, (1), 43-53.
21. Somers, W. S.; Tang, J.; Shaw, G. D.; Camphausen, R. T., *Cell* **2000**, 103, (3), 467-79.
22. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R., *J. Mol. Biol.* **1997**, 267, (3), 727-748.
23. Nadeau, V.; Leclair, G.; Sant, S.; Rabanel, J. M.; Quesnel, R.; Hildgen, P., *Polymer* **2005**, 46, (25), 11263-11272.
24. Wong, C. H.; MorisVara, F.; Hung, S. C.; Marron, T. G.; Lin, C. C.; Gong, K. W.; WeitzSchmidt, G., *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, (35), 8152-8158.
25. Weitz-Schmidt, G.; Gong, K. W.; Wong, C. H., *Anal. Biochem.* **1999**, 273, (1), 81-8.
26. Marron, T. G.; Woltering, T. J.; WeitzSchmidt, G.; Wong, C. H., *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, (50), 9037-9040.
27. Hammady, T.; Nadeau, V.; Hildgen, P., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2006**, 62, (2), 143-154.
28. Sant, S.; Thommes, M.; Hildgen, P., *Langmuir* **2008**, 24, (1), 280-287.
29. Eniola, A. O.; Hammer, D. A., *Biomaterials* **2005**, 26, (6), 661-70.
30. Fries, J. W. U.; Williams, A. J.; Atkins, R. C.; Newman, W.; Lipscomb, M. F.; Collins, T., *Am. J. Pathol.* **1993**, 143, (3), 725-737.
31. Scholz, M.; Hamann, A.; Blaheta, R. A.; Auth, M. K. H.; Encke, A.; Markus, B. H., *Human Immunology* **1992**, 35, (4), 230-238.
32. Leeuwenberg, J. F. M.; Smeets, E. F.; Neefjes, J. J.; Shaffer, M. A.; Cinek, T.; Jeunhomme, T.; Ahern, T. J.; Buurman, W. A., *Immunology* **1992**, 77, (4), 543-549.
33. Armstead, V. E.; Minchenko, A. G.; Schuhl, R. A.; Hayward, R.; Nossuli, T. O.; Lefer, A. M., *Am. J. Physiol.* **1997**, 273, (2), H740-746.

34. Scholz, D.; Devaux, B.; Hirche, A.; Potzsch, B.; Kropp, B.; Schaper, W.; Schaper, J., *Cell Tissue Res.* **1996**, 284, (3), 415-23.
35. Patel, K. D.; Nollert, M. U.; McEver, R. P., *J. Cell Biol.* **1995**, 131, (6), 1893-1902.
36. Schaffer, D. V.; Lauffenburger, D. A., *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, (43), 28004-28009.

## **CHAPITRE 4**

# **Direct measurement of Mechanical and Adhesive Properties of Living Cells using the Surface Forces Apparatus**

### ***ABSTRACT***

The adhesive and mechanical properties of living cells assembled into a monolayer on two different substrates were investigated using the surface forces apparatus (SFA) technique. The force measurements allowed elastic and bending moduli of the cells plated on substrates to be determined. The moduli are in good agreement with data reported in the literature for single cells determined using atomic force microscopy. Results confirm that the nature of the cell–substrate interactions can mediate cell mechanical and adhesive properties.

### ***4.1 Introduction***

Cell attachment to a surface represents a crucial step in several biological processes such as wound healing, cell differentiation, cell migration, tissue organization, or immunological response. Understanding the phenomena that underlie cell–substrate interactions as well as the effect of the substrate on the mechanical properties of cells are key factors for designing and functionalizing a wide range of biomaterials.

From a molecular point of view, cell–surface interactions involve both specific and non-specific interactions. Specific interactions such as bio-specific, lock-and-key, and ligand–receptor are short ranged (typically of the order of several tenths of

nanometers), are strongly dependent on the chemical structure of the interacting molecules, and may progress in time and space. Non-specific interactions, such as electrostatic and van der Waals interactions can act on a much larger distance scale (typically several hundreds of nanometers) and are less sensitive to the chemical structure of the interacting bodies.

From a macroscopic point of view, interactions of cells with a substrate depend on the chemical and physical properties of the substrate, such as its chemical structure,<sup>1</sup> roughness,<sup>2-4</sup> geometry,<sup>5, 6</sup> mechanical properties,<sup>7</sup> and wettability.<sup>8</sup> These properties regulate cell adhesion to surfaces and alter cell behavior. For example, it has been shown that the stiffness of polymeric surfaces can regulate stem cell lineage speciation<sup>9</sup> or nanoparticle uptake by endothelial cells.<sup>10</sup>

It is well known that cell–surface interactions are not considered passive processes and are able to trigger a cascade of biochemical signals in and out of the cells. These biochemical mechanisms allow the cell to ‘sense’ its environment and to consequently adapt its behaviour and, more particularly, its mechanical properties to external stimuli.<sup>11</sup> The regulation of the mechanical properties of living cells is a very dynamic process and is known to be driven by actin cortex remodeling. The structure and stiffness of the cellular actin network are believed to be responsible for the cell mechanical elasticity.<sup>12</sup>

Several studies that use techniques such as atomic force microscopy (AFM)<sup>13-16</sup> and similar techniques<sup>17, 18</sup> have assessed either mechanical or adhesive properties of single cells deposited on a substrate but very few have focused on correlating cell–substrate interactions to cell mechanical properties. To our knowledge, only one study that simultaneously assesses adhesive and mechanical properties of single cells, using reflection interference contrast microscopy (RICM), has been reported in the literature.<sup>19</sup> In this study, the effect of the membrane bending elasticity on the adhesion energy was investigated by comparing the adhesion energy of different cells with the same substrate. The low membrane bending modulus of talin-deficient cells compared with wild-type cells was associated with a decrease in cell–substrate adhesion energy. The decrease in cell adhesion energy of talin-deficient cells was ascribed to an increase in thermally induced membrane undulations.

Most of the techniques used to investigate cell properties have the same drawback of being limited to local measurement on isolated or single cells. However, a cell monolayer represents a better model to assess mechanical properties of complex tissues than single isolated cells.<sup>20</sup> Surprisingly, measurements of adhesive and mechanical properties of cell monolayers have received little attention. In this study, we propose an approach that consists of measuring the mechanical and adhesive properties of living cell monolayers plated on substrates using the surface forces apparatus (SFA). We used macrophage cells that play a central role in immune response. Upon molecular interaction recognition with an external stimulus or infectious agent, these cells undergo a cascade of biological and chemical responses, which cause morphological changes to the cells. Because macrophages are very sensitive cells, their interactions with different substrates are expected to trigger different biochemical responses, which might affect their adhesive and mechanical properties.

To investigate the effect of cell–substrate interactions on the resulting adhesive and mechanical properties of macrophage cells, we used two different substrates; poly(l-lysine) polymer (PLL) and fibronectin proteins (FN) grafted on mica substrates. Living cells are known to interact non-specifically with PLL, whereas specific interactions control their adhesion with FN substrates. These different cell–substrate interactions are expected to trigger different biochemical mechanisms, and therefore, to affect the cell mechanical and adhesive properties differently.

## ***4.2 Experimental procedures***

### ***4.2.1 Materials***

Glutaraldehyde, *N*-aminopropyltriethoxysilane (APTES), poly(l-lysine) (PLL, 190 kDa), and salts (NaCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) were purchased from Sigma Aldrich (Oakland, ON, Canada) and used as received. Human FN was purchased from CHEMICON. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and fetal bovine serum were purchased from Invitrogen Corp. MilliQ quality water was obtained from a

Millipore Gradient A 10 purification system (resistance 18.2M / cm, TOC = 4 ppb). Ruby mica sheets were obtained from S & J Trading Inc., USA.

#### ***4.2.2 Chemical grafting of APTES and glutaraldehyde onto mica surfaces***

Muscovite mica is the most suitable substrate for surface forces measurements using SFA because it can be cleaved into very thin, transparent, and molecularly smooth layers required for optical distance measurement. However, mica is chemically inert and requires activation of silanol groups in order to covalently attach any molecule onto its surface. Therefore, mica surfaces were first plasma activated under a water/argon atmosphere according to the methodology developed by Liberelle et al.<sup>21</sup> Immediately after plasma activation, mica surfaces were transferred into an evaporation chamber under vacuum (1.6 mmHg) for subsequent reaction with APTES as previously described in the literature.<sup>22-25</sup> The evaporation chamber was connected by a valve to a small glass reservoir that contained 100 $\mu$ L of APTES. After purging the chamber for 15 min, the valve was opened to allow APTES vapors to react with activated mica surfaces. During this step, the vacuum was maintained in order to ensure a constant flux of APTES vapors in the chamber and to avoid condensation of the silanes on the activated mica surfaces. Evaporation was allowed to proceed for 4 h. The valve was closed and remnant APTES vapors were pumped out for two more hours. APTES covalent grafting was completed by annealing the surfaces for 1 h at 120°C under atmospheric pressure. The surfaces bearing APTES were then immersed in a 1% (w/w) water solution of glutaraldehyde for 8 h where a coupling reaction between the APTES amine function and the glutaraldehyde carbonyl function took place.<sup>26, 27</sup> The resulting glutaraldehyde-functionalized mica surfaces were thoroughly rinsed with MilliQ water before use.



#### ***4.2.3 Chemical grafting of FN and PLL onto glutaraldehyde-functionalized mica surfaces***

FN was chemically grafted onto glutaraldehyde-functionalized mica surfaces by adsorption from a  $5\mu\text{g mL}^{-1}$  solution in sterile phosphate buffer saline (PBS,  $136 \times 10^{-3}\text{M}$  NaCl,  $1.4 \times 10^{-3}\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $17 \times 10^{-3}\text{M}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) at  $4^\circ\text{C}$  for 8 h. PLL was grafted at ambient temperature from a  $0.1\text{ mg mL}^{-1}$  aqueous solution. Amine functions present on FN and PLL can quickly react with pendant aldehyde moieties present on glutaraldehyde-functionalized mica surfaces to form a covalent bond. After the grafting reaction, the surfaces were thoroughly rinsed with cold sterile PBS.

#### ***4.2.4 Cell culture and cell monolayer formation on functionalized mica surfaces***

Murine macrophage cells RAW 264.7 were cultured in Gibco's DMEM ( $4500\text{ mg mL}^{-1}$  d-glucose, without l-glutamine) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1 % penicillin–streptomycin at  $37^\circ\text{C}$  and 5 %  $\text{CO}_2$  atmosphere. Cells were used between passages 7 and 14. Once 80 % of cells confluence was reached in the culture flasks, cells were scrapped and suspended in serum free DMEM solution at a concentration of  $1.8 \times 10^6\text{ cells mL}^{-1}$ . Two functionalized mica substrates were placed in a 24-well cell culture plate and rinsed several times with PBS. One milliliter of the cell suspension was added dropwise onto one of the two substrates and the culture plate was placed in the incubator for 3 h.

#### ***4.2.5 Optical microscopy***

The surfaces covered with cells were analyzed using an optical microscope (Zeiss, Germany) in order to visualize the shape of the cells and to determine the surface density of cells. Images were recorded using a 10X objective and analyzed using NIH ImageJ software. Ten separate images were analyzed for each substrate and the data were statistically combined to determine the mean cell surface density.

#### 4.2.6 SFA measurements

For use in the SFA, mica surfaces were first back silvered, and glued onto two cylindrical silica disks of curvature radius  $r = 2$  cm, mounted in a crossed cylinder configuration. Briefly, the SFA enables the force as a function of surface separation between the surfaces to be determined by measuring the deflection of a variable stiffness spring that supports the lower disk. The distance between the back-silver-coated mica substrates was controlled with a positioning mechanism for displacing the lower surface and was measured by an interferometric technique that uses fringes of equal chromatic order (FECO).<sup>28, 29</sup> The directly measured force  $F$  between two identical cylindrically curved surfaces can be related to the free energy of interaction per unit area between two infinite flat surfaces  $W$ , using the Derjaguin approximation:<sup>30</sup>

$$F(D) = \pi RW(D) \quad (4.1)$$

where  $F$  is the interaction force between the two surfaces,  $D$  the separation distance, and  $R$  the curvature radius of the mica surfaces supported by the cylindrical disks.  $R$  was determined using FECO fringes. The separation distance between the surface  $D$  was determined using the two adjacent fringes approximation<sup>29</sup> to allow a determination of  $D$  with 1 % of error. The resolution in measuring force was 0.1mNm<sup>-1</sup>.

In a typical experiment, the surface covered by the cell monolayer was transferred from the incubator into the SFA chamber on the lower disk support and the chamber was filled with sterile PBS at 37.2°C. The second surface was installed on the upper disk support and the SFA chamber was closed and allowed to reach thermal equilibrium for 1 h.

For compression experiments, the two surfaces, initially far apart from each other, were slowly brought into contact by steps of 0.5  $\mu\text{m}$  with an average approach velocity of 50  $\text{nm s}^{-1}$ . After each compression experiment, the surfaces were separated at a constant velocity and fringe positions were monitored in real time. Surfaces suddenly jumped out when the restoring force of the cantilever was larger than the attractive

force between the surfaces. This resulting measured force, i.e., the force necessary to detach the two surfaces at a given separation velocity, is called rupture force. Each measurement was repeated three times for both compression and decompression profiles.

The reference distance,  $D = 0$ , corresponds to bare mica– bare mica contact in air. Since the refractive index  $\mu$  of the medium between the two surfaces cannot be measured simultaneously with  $D$  using the approximate method for distance measurement, the value of  $\mu$  was arbitrarily fixed. The refractive index of living cells can be very difficult to determine because of their complex organizational structure. Different approaches have been proposed to model optical properties of cells. The particle approximation, based on the optical contribution of the nucleus, the organelles, and the intracellular fluid, is generally used.<sup>31</sup> According to this approximation, the cell is considered as a spherical scatterer with a mean refractive index of 1.39.

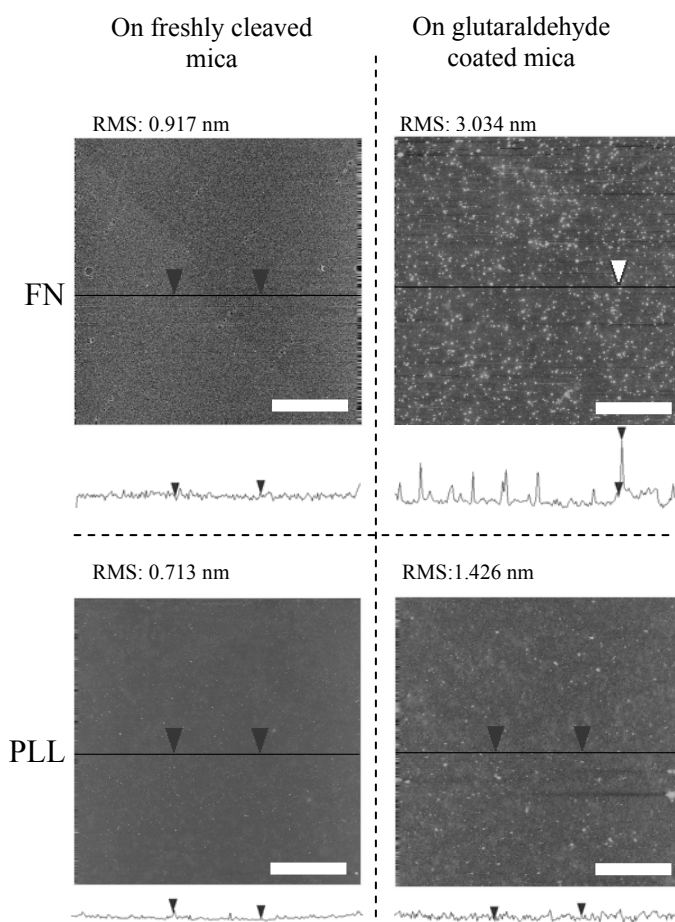
#### ***4.2.7 AFM measurements***

Surface analysis of the functionalized substrates were performed in tapping mode on a Multimode Dimension 3100 atomic force microscope with a Nanoscope IIIa controller (Digital Instruments). Aluminium-coated silicon tips from NanoWorld (ARROW-NCR-20) with a force constant of  $42 \text{ Nm}^{-1}$  and a resonance frequency between 270 and 290 kHz were used for all scanned samples. Data analysis was performed using the NanoScope III software (version 5.12r2).

### ***4.3 Results and discussion***

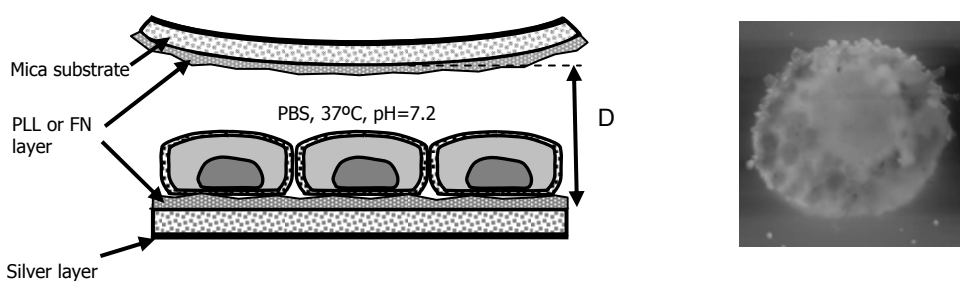
FN and PLL were grafted on glutaraldehyde-coated mica surfaces as reported in the literature<sup>32</sup> and as detailed in Experimental section. AFM characterization was performed on functionalized (glutaraldehyde) and non-functionalized substrates in order to assess the attachment strength of FN and PLL on the glutaraldehyde-coated mica surfaces. Both surfaces underwent PLL and FN grafting as described in the Experimental section. The topography analysis and the determination of the root-mean-square (RMS) roughness, illustrated in Figure 1, were performed after thoroughly

rinsing the FN- and PLL-coated substrates with MilliQ quality water. Therefore, any residual molecules on the surface are assumed to be strongly attached to the substrate. As reference, freshly cleaved mica surfaces and glutaraldehyde-coated mica surfaces exhibit a roughness of 0.10 and 1.05 nm respectively (data not shown). The values of RMS for the PLL and FN coatings on the glutaraldehyde-coated mica surfaces are in agreement with reported values for similar substrates.<sup>33, 34</sup> The surface coatings are significantly rougher on glutaraldehyde-coated mica surfaces compared with freshly cleaved mica surfaces and we can clearly distinguish the presence of molecules on the glutaraldehyde-coated mica surfaces compared with bare mica. These observations indicate the presence of strongly attached PLL and FN molecules on the glutaraldehyde-coated mica surfaces.



**Figure 4.1:** AFM images of PLL and FN coatings on freshly cleaved mica and glutaraldehyde-coated substrates. AFM images were taken in air after thoroughly rinsing the coated substrates with water and drying in air (see Experimental section for details). Scale bar represents 7.5  $\mu\text{m}$ , color scale: 50 nm. Image area size is 30  $\times$  30  $\mu\text{m}$ .

Mechanical and adhesive properties of a monolayer of macrophage cells plated on PLL- and FN-functionalized mica surfaces were determined at 310K using SFA as described in the Experimental section. Briefly, the interaction force was measured between a monolayer of macrophage cells plated on a functionalized mica surface and a similarly functionalized mica surface bearing no cells as a function of surface separation distance. A schematic representation of the configuration used for the SFA measurements is illustrated in Figure 2. The optical method used in SFA, which produces a series of fringes known as fringes of equal chromatic order (FECO), allows the simultaneous monitoring of the surface shape, the contact area, the geometry around the contact position, and the homogeneity of the medium trapped between the two surfaces. Optical microscopy was used to monitor the average surface coverage of the cells.

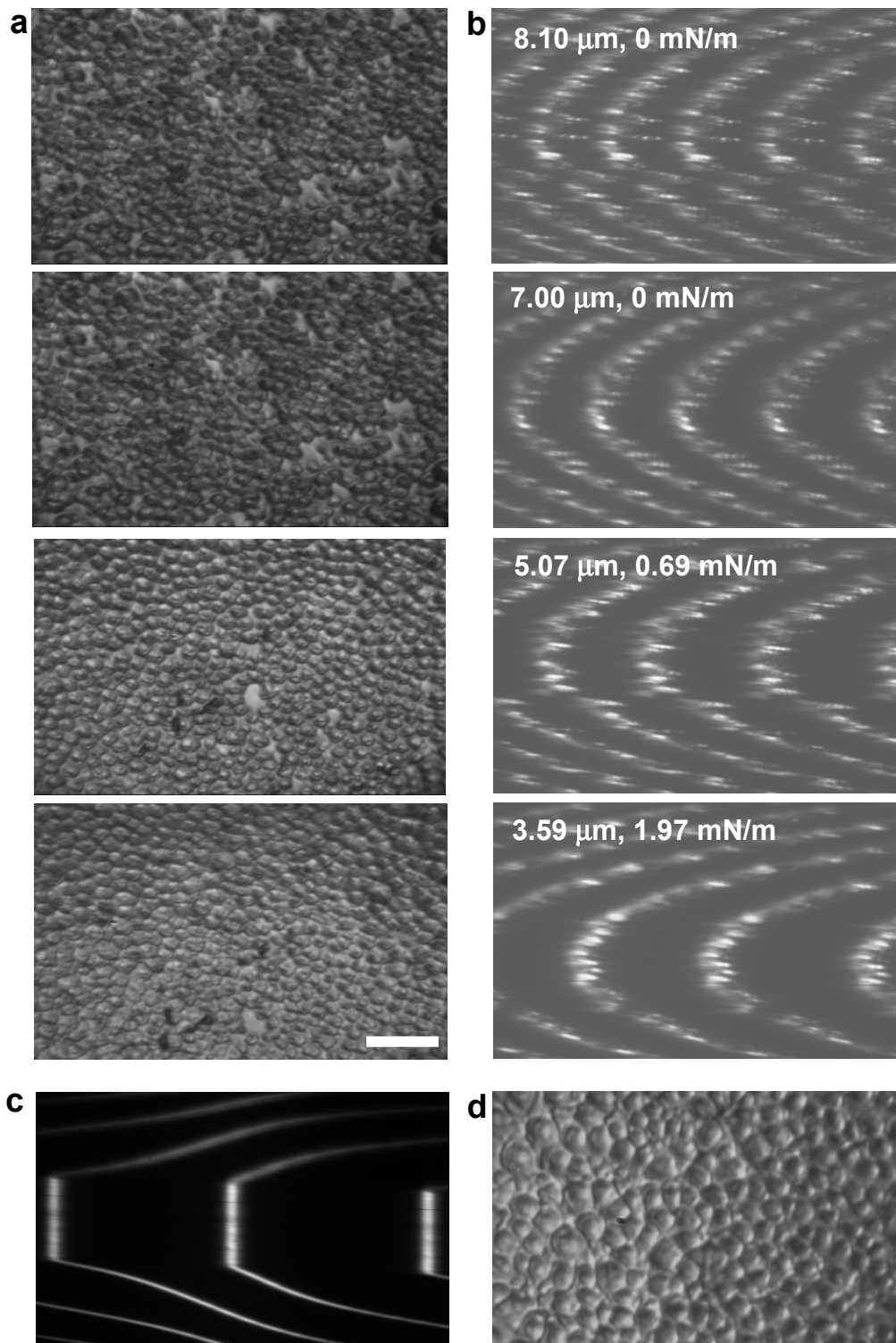


**Figure 4.2 :** Schematic representation of a cell monolayer deposited on a functionalized mica surface. The lower surface supports the cell monolayer and the upper surface, with no cell, is coated with the same material as the lower surface. Also shown, an AFM image of a macrophage cell on an FN-coated mica surface in air (horizontal scale is 25 $\times$ 25 $\mu\text{m}^2$ , color scale: 2 $\mu\text{m}$ ).

As observed using optical microscopy (Figure 3a), plated macrophage cells adopt a spherical shape of diameter  $7.2 \pm 0.3 \mu\text{m}$  in a monolayer with a surface coverage of  $8.54 \times 10^3 \pm 900 \text{ cells mm}^{-2}$ . The cell height was measured using SFA by considering the onset of the first interaction profile as the contact between the upper surface and the undeformed cells. The onset occurs at  $6.10 \pm 0.05 \mu\text{m}$  and is close to the cell diameter observed by optical microscopy. Therefore, the cells can be considered as spherical.

Figure 3b illustrates the FECO fringes observed when light passes through a cell monolayer for different surface separation distances  $D$ , ranging from 8.10 to 3.59  $\mu\text{m}$ . For comparison, FECO fringes obtained for mica–mica contact in air are illustrated in Figure 3c. The presence of the cell monolayer between two mica surfaces alters the shape of the FECO fringes. They become more diffuse, irregular, and broader compared with the FECO fringes observed for mica–mica in contact (Figure 3c) or for homogeneous and very thin films trapped in between surfaces.<sup>35</sup> The presence of several spikes on the fringes is attributed to spatial refractive index fluctuations because of the inner heterogeneous structure of the cells. The change in cell shape, as the compression force on the cell monolayer is increased, was monitored by optical microscopy. No protrusion formation is observed (Figures 3a and 3d), which is evidence that cells are not structurally damaged during the course of a compression experiment. Indeed, cell damage caused by compression has been shown to be associated with protrusion formation.<sup>36</sup> As illustrated in Figure 3a, the cells progressively deform under compression and they all come in close contact with each other. This regular compact configuration is not observed in the initial state, instead, voids between cells are observed. The cells do not recover their initial round shape after complete separation from contact (Figure 3d) but they rather exhibit an irregular shape while remaining in close contact configuration. The resulting adhesion between adjacent cells after compression is most probably mediated by cadherin extra cellular domains.

To assess the mechanical properties of the cell monolayer, we performed a series of compression measurements as described in the Experimental section. In these measurements, the surfaces were slowly brought into contact using 0.5  $\mu\text{m}$  steps (with an average approach velocity of 50  $\text{nm s}^{-1}$ ) and left to equilibrate

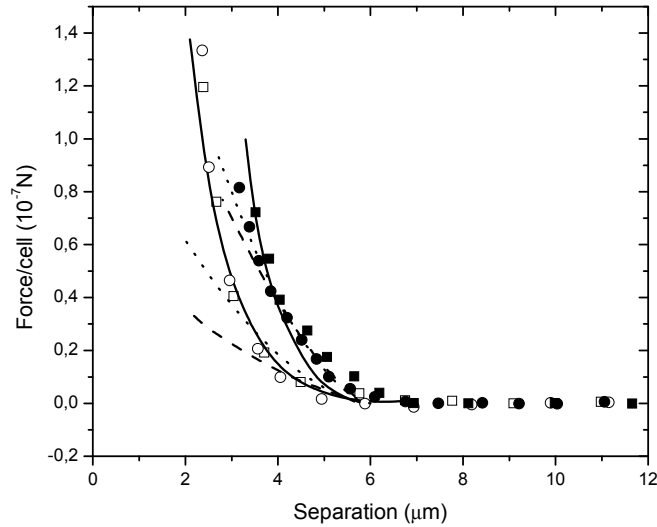


**Figure 4.3:** (a) Microscopy imaging of a cell monolayer under different compression forces, and (b) the corresponding FECO fringes. (c) FECO fringes corresponding to the mica–mica contact in air, (d) microscopy imaging of the cell monolayer after decompression. Scale bars represent 50  $\mu\text{m}$ .

between each step until variation of the separation distance was less than 1%. The resulting compression force profile of the cell monolayer between two functionalized mica surfaces immersed in PBS buffer at 37°C is illustrated in Figure 4. The measured force was normalized by the number of cells using the following approximation:

$$F(D) = F_{\text{exp}}(D) / A_{\text{int}}N_D \quad (4.2)$$

where  $F_{\text{exp}}$  is the experimental measured force,  $A_{\text{int}}$  is the effective interaction area corresponding to  $2\pi RD^{30}$  for a separation distance  $D$  much smaller than the radius of curvature of the surfaces  $R$ , and  $N_D$  is the surface density of cells at a separation distance  $D$ . The significant difference observed between the force profiles obtained with PLL and that with FN-functionalized mica surfaces clearly indicates an effect of the nature of the substrate on the resulting cell compression behavior.



**Figure 4.4:** Compression force profiles of a cell monolayer plated on a FN coated substrate (filled symbols) and on a PLL-coated substrate (empty symbols). Best fitted curves are illustrated for: (—) the capsule model, Eqn 4.3, (---) the Hertz model, Eqn 4.5, and (- - -) the Tatara model, Eqn 4.6. Inset: compression (filled symbols) and decompression force profiles (empty symbols) at a velocity of 6 nms<sup>-1</sup> performed on a cell monolayer plated on a PLL-coated substrate. Also represented, the rupture force measured at the jump out transition in the decompression profile.



No attractive forces between cell monolayer and functionalized mica surfaces were measured on approach for both substrates, within the limits of our experimental setup, even though attractive interactions between cells and the substrates are expected. Our experimental conditions, more particularly the resolution of distance measurement in the presence of cells between surfaces (approximately 10 nm, see Experimental), did not allow short-range biospecific interactions and electrostatically screened non-specific interactions to be measured. The range of these interactions is much smaller than the distance resolution of our experimental conditions.

The force profiles were analyzed using three different mechanical models. The first model considers a cell as a capsule made of an elastic membrane and filled with an incompressible liquid.<sup>37, 38</sup> Therefore, the two main contributions to the compression force are the stretching and the bending forces of the peripheral membrane. The total force  $F$  can be expressed as follows:<sup>37</sup>

$$\begin{aligned}
 F &= F_{stretching} + F_{bending} \\
 &= 2\pi \frac{E_m}{1-\nu_m} h R_0 \delta^3 + \pi \frac{E_m}{2\sqrt{2}} h^2 \delta^{1/2}
 \end{aligned}
 \tag{4.3}$$

where  $E_m$  and  $\nu_m$  are the Young modulus and Poisson ratio (0.5 for incompressible materials) of the membrane, respectively,  $h$  is the thickness of the membrane (4 nm for a cell membrane),  $\delta$  is the relative deformation defined as  $1-D/2R_0$ , and  $R_0$  is the cell radius (3.05 $\mu$ m, which corresponds to half the onset of interaction in the force profiles). One drawback of this model relies on the fact that the capsule is assumed to remain non permeable under compression. We used a simple permeability test, using trypan blue dye,<sup>37</sup> to confirm that macrophage cells in the monolayer were impermeable at rest (under no applied force). However, this test has not yet been completed for cells under compression. The capsule model can fit our data relatively well for both substrates over all deformations (Figure 4) so that the Young and bending moduli of the membrane,  $E_m$  and  $K_m$ , were extracted from Eqn 2 and from the following expression:<sup>39</sup>

$$K_m = \frac{E_m h^3}{12(1-\nu_m^2)} \quad (4.4)$$

The resulting moduli are summarized in Table 4.1. The Young and bending moduli of the cell membrane measured at 310 K on the PLL-functionalized mica ( $E_m = 2.5$  MPa and  $K_m = 4 k_B T$ ) are slightly smaller than values reported in the literature for T-cells deposited on a similar substrate ( $E_m = 10\text{--}35$  MPa and  $K_m = 17\text{--}52 k_B T$  at 300 K).[27] These differences could be ascribed to the higher temperature used in our measurements as elastic moduli are expected to decrease with temperature elevation. Young and bending moduli measured on the FN substrate (6.5 MPa and  $12 k_B T$ ) are significantly larger than the values measured on the PLL substrate at the same temperature.

**Table 4.1** : Mechanical parameters of cells obtained by fitting the capsule model (CM), Hertz theory (HT) and the extended Hertz theory (Tatara model, EHT) to the experimental force profiles

Substrate	Young Modulus (kPa)			Bending Modulus ( $k_B T$ ) <sup>A</sup>
	CM	HT	EHT	CM
PLL coated substrate	$2.5 \pm 0.5 \times 10^3$	$10 \pm 2$	$7 \pm 2$	$4 \pm 1$
FN coated substrate	$6.5 \pm 1 \times 10^3$	$35 \pm 5$	$15 \pm 3$	$12 \pm 2$

<sup>A</sup> $T = 310 K$

Other mechanical models have been proposed in the literature in order to extract mechanical properties of living cells. A simple model based on the Hertzian contact theory of homogenous elastic spheres is often used. The Hertzian model is valid for small deformations as it treats deformation in the sphere–surface contact area while considering the rest of the sphere undeformed. Moreover, this model assumes no friction at the contact area and no adhesion between the interacting bodies. A well-known result of this theory is a 3/2 power law dependence of the applied force with deformation  $\delta$ .

$$F = \frac{\sqrt{2}E}{3(1-\nu^2)} R^2 \delta^{3/2} \quad (4.5)$$

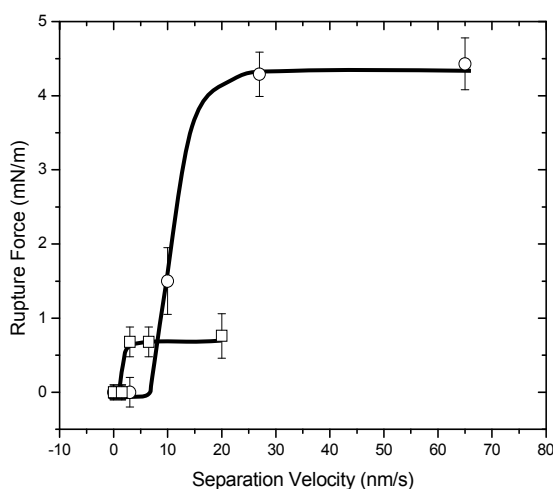
The Young modulus  $E$  was used as a fitting parameter to our experimental data. As shown in Figure 3, the Hertz model could represent the experimental data relatively well for FN and PLL coated substrates up to 30% of relative deformation allowing the Young modulus  $E$ , to be estimated. For larger deformations ( $\delta > 0.3$ ), the experimental data significantly deviate from the Hertz model as deformation values are no longer within the limits of the model and as additional internal pressure, which arises from the lateral pressure between highly compressed adjacent cells, is involved. Tatara proposed an extended version of the Hertz model<sup>40, 41</sup> that treats small and large deformations and assumes, as in Hertz theory, non-adhesive spheres and no friction at the contact area. However, this model does not relate the applied force to the deformation through simple analytical expressions. Nevertheless, the Tatara's expressions (Equation 5) can be numerically solved at each deformation  $\gamma$  (which is equivalent to  $\delta$  in the Hertzian model), assuming a constant Young modulus  $E$ :<sup>41</sup>

$$\begin{aligned} \gamma &= \frac{3(1-\nu^2) F}{4Ea} - \frac{f(a) F}{\pi E} \\ a^3 &= \frac{3(1-\nu^2) R_0 F}{4E} \\ f(a) &= \frac{2(1+\nu) F}{(a^2 + 4R^2)^{3/2}} + \frac{1-\nu^2}{(a^2 + 4R^2)^{1/2}} \end{aligned} \quad (4.6)$$

where  $F$  is the applied normal load and  $E$  the Young modulus of the compressed sphere. Tatara's model can fit our experimental data relatively well, as illustrated in Fig. 3, using a constant Poisson ratio  $\nu = 0.5$  and treating the Young modulus as a fitting parameter. Tatara's extension of the Hertz model gives a better representation of our experimental data than the Hertz theory over a large range of separation distances

for both PLL- and FN coated substrates. Young moduli extracted from Hertz and Tataru models for the PLL coating (10 and 7 kPa, respectively) are in good agreement with reported values of 1–7 kPa using AFM and Hertz theory for rat liver macrophages<sup>42</sup> and human umbilical vein endothelial cells<sup>43</sup> on similar PLL substrates. Using both Hertz and Tataru models, we obtained a higher Young modulus for cells on the FN-functionalized substrate (20–35 kPa), compared with that on the PLL-functionalized substrate (7–10 kPa) (Table 4.1). Among the three models used, the capsule model gives a better representation of our experimental data compared with the models based on homogenous elastic spheres. Indeed, the concept of a homogenous elastic sphere is too simple to represent the complexity of living cells. The capsule model would be more realistic but also incomplete since it represents the cell as a ‘balloon’ filled with an incompressible liquid whose mechanical properties are totally neglected. As the cytoplasm is a very complex medium where actin and microtubule filaments continuously undergo remodeling into a complex viscoelastic structure, the mechanical properties of the internal cells should not be ignored for modeling. However, despite the fact that the models used are not perfectly realistic, they can represent our data relatively well and predict the same trend regarding the change in mechanical properties of cells as a function of nature of substrate, i.e., the Young modulus of cells is larger for cells interacting with FN than for cells interacting with PLL. The effect of the substrate on the mechanical properties of cells can be attributed to the different biochemistry mechanisms involved upon recognition of the different cell–surface interactions. FN is known to bind to cellular  $\alpha_5\beta_1$  integrin, which is associated with actin filaments within cells through different proteins.<sup>44</sup> Cell adhesion on FN substrates is mediated by two different adhesive mechanisms, fibrogenesis and focal contact generation. However, it has been shown that fibrogenesis, which leads to fibrillar adhesion, does not occur for cells on FN covalently attached to a substrate.<sup>45</sup> In this situation, integrins form highly tyrosine-phosphorylated focal contacts between cells and the substrate and triggers actin polymerization, leading to an increase in cell elasticity. These focal contacts are known to be directly associated with the termini of actin stress fibers that regulate cell elasticity.<sup>46</sup>

On the other hand, cells interact non-specifically with PLL by electrostatic interactions between extracellular heparin sulfated proteoglycans, which carry electrostatic charges, and PLL.<sup>47</sup> As there is no direct evidence that these non-specific interactions can trigger actin polymerization, cells on the PLL substrate are expected to exhibit lower mechanical moduli compared with cells on the FN substrate. As already mentioned, cell mechanical properties are expected to regulate cell adhesion to the substrate.<sup>19, 48</sup> In order to determine adhesive properties, we determined the rupture force between the cell and the substrate by performing decompression measurements at different separation velocities as described in the Experimental section. The initial position of the surfaces corresponds to deformations of  $\delta = 0.5$  and  $\delta = 0.4$  for PLL- and FN-coated substrates, respectively. The force measured at the rupture distance, i.e., the distance at which the surfaces jumped-out of contact, is called the rupture force. The variation of the rupture force as a function of the decompression velocity (or separation velocity) is illustrated in Figure 5.



**Figure 4.5:** Variation of the rupture force between the cells and the substrate: (□) PLL substrate, (○) substrate, as function of the separation velocity. Solid lines are guides for the eye.

Three different regimes can be observed for both substrates. The first regime is identified at low separation velocities ( $v_s < 5 \text{ nms}^{-1}$ ) where the rupture force is null. A second regime is observed where the rupture force increases with the separation velocity. Finally, a third regime is reached at large velocities where the rupture force is maximal ( $4.2 \text{ mNm}^{-1}$  at  $v_s = 28 \text{ nm s}^{-1}$  and  $0.58 \text{ mNm}^{-1}$  at  $v_s = 5 \text{ nms}^{-1}$  for FN and PLL-coated mica surfaces, respectively) and does not depend on separation velocity. It is well known that the detachment dynamics of cells that interact with a substrate by specific interactions is controlled by a protein–protein unbinding process.<sup>49, 50</sup> The variation of the rupture force required for single protein–protein unbinding with separation velocity has been shown to be associated with bond lifetime.<sup>51, 52</sup> The apparent rupture force is expected to be negligible and independent of the separation velocity when the velocity of dissociation of FN–integrin bonds is much faster than the separation velocity.<sup>52</sup> This is the thermally activated regime of bond dissociation that occurs for  $v_s < 5 \text{ nms}^{-1}$  in our experiments. The protein–protein unbinding approach qualitatively predicts the same unbinding dynamics for parallel multiple bonds.<sup>49</sup> There exists an intermediate separation velocity regime for which the rupture velocity of the integrin–FN bond is comparable to the separation velocity. In this regime, the rupture force is expected to strongly depend on the separation velocity as the pulled cells are nearly equilibrated between the binding and unbinding states at any stage in the separation process. The kinetically trapped associated FN–integrin bonds and the repopulation of the bound state on the time scale of the separation determine the rupture force. This intermediate regime can be observed in Figure 5 for intermediate velocities, i.e., 5 to  $25 \text{ nms}^{-1}$  for the FN substrate. When separation velocities are much larger than the velocity of dissociation of integrin–FN bonds, the rupture force is independent of the separation velocity and mainly depends on the number of adhesive bonds (forced unbinding regime).<sup>49</sup> This high velocity regime occurs for  $v_s > 25 \text{ nm s}^{-1}$  in our experiments.

The arguments for the protein–protein unbinding process cannot be used to interpret the three different regimes observed for the rupture force–separation velocity relationship for the PLL substrate, as no specific adhesive bonds exist between the cell and the substrate. For non-specific cell–substrate interactions, the adhesion–velocity

relationship depends on several parameters such as the geometry and mechanical properties of the interacting bodies. No mechanism has been proposed to explain adhesion–velocity dependency for cells that interact nonspecifically with substrates. However, some studies have shown a similar separation velocity dependence of the rupture force for gels and amorphous polymers, which was associated with a viscous peeling mechanism of energy dissipation.<sup>53, 54</sup> The similarity between these reported studies and our data suggests that viscous peeling is most probably the mechanism that controls cell detachment from the PLL substrate at intermediate velocities.

As in the forced unbinding regime, the rupture force is mainly dependant on the number of adhesive bonds and their individual adhesive energy,<sup>49</sup> the difference in maximal rupture forces observed between cells on FN- and PLL-coated surfaces can be associated with the different strengths of interaction, or number of bonds, involved for both substrates. Specific interactions being stronger than non-specific interactions could simply explain the difference in maximal rupture force considering a similar amount of adhesive bonds.

However, it is also known that membrane bending elasticity can regulate the adhesion between cells and substrates.<sup>48</sup> The bending energy at the contact lines, typically  $1\text{--}20 k_B T$ , is one to two orders of magnitude larger than the typical values of the cell adhesion energy.<sup>48</sup> The mechanical rigidity, related to high bending modulus, will prevent the cell from decreasing its contact area with the substrate until the pulling force is large enough to simultaneously break all adhesive bonds (parallel unbinding regime). This unbinding mechanism generates high rupture forces that are expected to be proportional to the number of adhesive bonds in the contact area. On the other hand, a low membrane bending modulus favors membrane deformation and thermal undulation, and both phenomena are known to decrease adhesion.<sup>30</sup> In this case, the adhesive bonds are preferentially detached from the periphery of the contact area where the membrane bending occurs. The rupture force will be smaller as the adhesive bonds are broken sequentially at the cell–substrate contact line (peeling regime). These arguments can also explain the difference in maximal rupture forces measured with cells plated on PLL and FN substrates.

#### ***4.4 Conclusions***

Mechanical and adhesive properties of macrophage living cells were directly measured on different substrates using the surface forces apparatus. The bending and elastic moduli of the cells, extracted from different models used to fit our data, are shown to be dependent on the nature of the substrate. Higher moduli are obtained for cells plated on a fibronectin compared with cells on a poly(l-lysine)-coated substrate. The high moduli are attributed to actin polymerization, which is triggered by the recognition of the specific fibronectin–integrin interaction. The absence of actin polymerization for non-specific cell–substrate interactions explains the lower elastic and bending moduli for cells plated on PLL. The adhesive properties of the cells, quantified by the rupture force required to separate the cells from the substrate, are also strongly dependent on the nature of the substrate as well as on the velocity at which surfaces are separated. Moreover, a higher maximal rupture force was associated with higher cell mechanical moduli, which was explained by a more favorable parallel unbinding process of FN–integrin bonds. Our results confirm that cell–substrate interactions can mediate cell mechanical and adhesive properties.

#### ***4.5 Internalisation de NPs de PLA par des macrophages déposés sur différents substrats fonctionnalisés***

Cette partie expérimentale n'a fait l'objet d'aucune publication.

L'objectif de cette étude est de mesurer la concentration de NPs internalisées par les cellules macrophagiques RAW 264.7 déposées sur différents substrats de mica fonctionnalisés avec différents polymères. Les polymères choisis permettent de modifier l'interaction entre le substrat et la membrane cellulaire. Le polystyrène a été choisi comme substrat hydrophobe. La poly-l-lysine a été greffée sur le mica pour interagir avec la membrane cellulaire par interaction électrostatique. La fibronectine a été aussi greffée sur le mica pour créer une interaction spécifique entre la surface et les récepteurs membranaires de la famille des intégrines de la cellule. Enfin, la surface de



mica non fonctionnalisée étant négativement chargée, son interaction avec la membrane cellulaire est électrostatique et répulsive.

#### ***4.5.1 Protocole expérimental***

##### ***4.5.1.1 Fonctionnalisation du mica***

Des disques de mica de 1 cm de diamètre ont été découpés à l'aide d'une poinçonneuse conçue au laboratoire. Les disques ont ensuite été clivés pour obtenir des surfaces de mica vierges de toutes contaminations.

Le greffage de la poly-l-lysine et de la fibronectine sur les disques de mica s'est fait comme décrit aux paragraphes 4.2.2 et 4.2.3. Le greffage du polystyrène s'est fait suivant la procédure développée au laboratoire par Benoît Liberelle.<sup>55</sup> Brièvement, les disques de mica fraîchement clivés sont d'abord traités au plasma suivant la procédure décrite dans le paragraphe 4.2.2. Une fois activés, les disques sont introduits dans une solution de cyclohexane et de polystyrène fonctionnalisé en bout de chaîne avec une fonction chlorodiméthylsilyle (50 µg/mL). La réaction de greffage se fait pendant 2.5 h à température ambiante en présence de 5 µl de pyridine fraîchement distillée. Après la réaction, les disques sont retirés des viales de réaction et placés à l'étuve pendant 12 h à 120 °C. À la fin de cette étape, les surfaces sont retirées de l'étuve et abondamment rincées avec du toluène fraîchement distillé. Les surfaces ainsi obtenues possèdent une rugosité (RMS) mesurée par AFM de l'ordre de 0.14 nm et ne présentent pas de démouillage du polymère ou de formation d'agrégats.

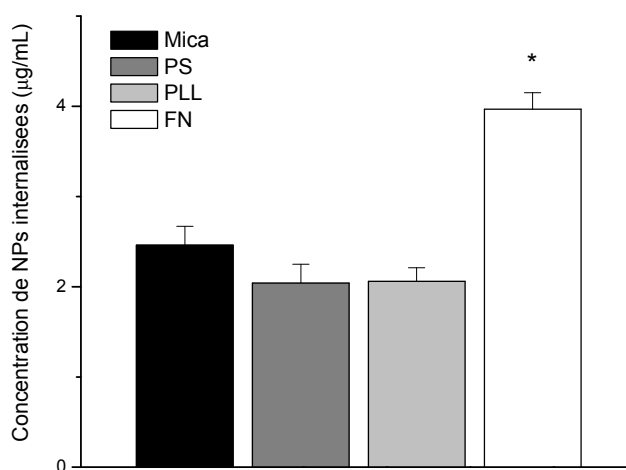
##### ***4.5.1.2 Culture cellulaire et internalisation des particules de PLA***

Les cellules RAW 264.7 ont été cultivées comme décrit au paragraphe 4.2.4. Une fois en suspension dans du milieu de culture libre de sérum, les cellules sont redéposées sur les substrats fonctionnalisés préalablement introduits dans des puits de culture cellulaire (plaque de 24 puits). La concentration de cellules à l'état suspendue est de  $2 \cdot 10^6$  cell/mL. Les cellules sont laissées dans l'incubateur pendant 2 h à 37 °C sous 5 % de CO<sub>2</sub>. Ensuite le milieu de culture est enlevé et une suspension de NPs de PLA marquées à la

rhodamine B (voir paragraphe 3.2.5) dans du milieu de culture sans sérum est introduite (20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Les cellules sont traitées avec la suspension de NPs pendant 3 h dans l'incubateur et sont ensuite rincées et lysées avec une solution de NaOH 1 M et de Triton X100 à 0.2 % pendant 2 h. La fluorescence du lysat est quantifiée à l'aide d'un lecteur de plaques (SAFIRE, Tecan, Autriche) à une longueur d'onde de 570 nm à 25 °C. L'intensité de fluorescence mesurée dans chaque puit est convertie en concentration de NPs en utilisant une courbe de calibration faite parallèlement dans les mêmes conditions expérimentales et sur les mêmes substrats que l'expérience d'internalisation.

#### 4.5.2 Résultats

Les résultats obtenus sont présentés à la figure 4.6.



**Figure 4.6 :** Internalisation de particules de PLA fluorescentes par des macrophages murins déposés sur différents substrats. Mica : substrat de mica fraîchement clive ; PS : substrat de polystyrène greffé sur une surface de mica ; PLL : substrat de poly-l-lysine greffé sur une surface de mica ; FN : substrat de fibronectine greffée sur une surface de mica (\*  $p < 0.01$ ,  $n = 3$ ).

Il est clair que seul le substrat de fibronectine affecte l'internalisation des NPs. La concentration de NPs internalisées est deux fois plus importante sur le substrat de fibronectine que sur les autres substrats.

La concentration de NPs internalisées par des cellules déposées sur un substrat de polystyrène est identique à celle observée sur des cellules déposées directement sur des puits de culture (eux même en polystyrène).<sup>56</sup>

Ces résultats montrent que la nature chimique du substrat est capable de modifier la capacité d'internalisation des cellules. L'interaction spécifique qui existe entre la fibronectine et les intégrines membranaires favorise l'internalisation des NPs. Ce surcroît d'internalisation s'accompagne aussi d'une augmentation de l'élasticité cellulaire, ce qui prouverait que les deux phénomènes sont liés.

Les possibles raisons de ce phénomène seront discutées au chapitre 6.

#### **4.6 References**

1. Sun, T. L.; Han, D.; Rhemann, K.; Chi, L. F.; Fuchs, H., *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, (6), 1496-1497.
2. Vonrecum, A. F.; Vankooten, T. G., *J. Biomat. Sci.- Polym. Ed.* **1995**, 7, (2), 181-198.
3. Anselme, K.; Bigerelle, M.; Noel, B.; Dufresne, E.; Judas, D.; Iost, A.; Hardouin, P., *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, 49, (2), 155-166.
4. Lampin, M.; Warocquier Clerout, R.; Legris, C.; Degrange, M.; SigotLuizard, M. F., *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, 36, (1), 99-108.
5. Dike, L. E.; Chen, C. S.; Mrksich, M.; Tien, J.; Whitesides, G. M.; Ingber, D. E., *In Vitro Cell. Dev. Biol., Anim.* **1999**, 35, (8), 441-448.
6. Chen, C. S.; Mrksich, M.; Huang, S.; Whitesides, G. M.; Ingber, D. E., *Biotechnol. Progr.* **1998**, 14, (3), 356-363.
7. Discher, D. E.; Janmey, P.; Wang, Y. L., *Science* **2005**, 310, (5751), 1139-1143.
8. Pesakova, V.; Kubies, D.; Hulejova, H.; Himmlova, L., *J. Mater. Sci.-Mater. Med.* **2007**, 18, (3), 465-473.

9. Engler, A. J.; Sen, S.; Sweeney, H. L.; Discher, D. E., *Cell* **2006**, 126, (4), 677-689.
10. Kong, H. J.; Liu, J. D.; Riddle, K.; Matsumoto, T.; Leach, K.; Mooney, D. J., *Nature Materials* **2005**, 4, (6), 460-464.
11. Miranti, C. K.; Brugge, J. S., *Nature Cell Biology* **2002**, 4, (4), E83-E90.
12. Bausch, A. R.; Ziemann, F.; Boulbitch, A. A.; Jacobson, K.; Sackmann, E., *Biophys. J.* **1998**, 75, (4), 2038-2049.
13. Bremmell, K. E.; Evans, A.; Prestidge, C. A., *Colloids Surf., B* **2006**, 50, (1), 43-48.
14. Scheffer, L.; Bitler, A.; Ben-Jacob, E.; Korenstein, R., *EBJ* **2001**, 30, (2), 83-90.
15. Liu, K. K., *J. phys. D* **2006**, 39, (11), R189-R199.
16. Canetta, E.; Leyrat, A.; Verdier, C., *Math. Comp. Model.* **2003**, 37, (11), 1121-1129.
17. Wang, C. X.; Wang, L.; Thomas, C. R., *Ann. Bot.* **2004**, 93, (4), 443-453.
18. Sagvolden, G.; Giaever, I.; Pettersen, E. O.; Feder, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1999**, 96, (2), 471-476.
19. Simson, R.; Wallraff, E.; Faix, J.; Niewohner, J.; Gerisch, G.; Sackmann, E., *Biophys. J.* **1998**, 74, (1), 514-522.
20. Verdier, C., *J. Theo. Med.* **2003**, 5, (2), 67-91.
21. Liberelle, B.; Giasson, S., *Langmuir* **2007**, accepted.
22. Kurth, D. G.; Bein, T., *Langmuir* **1995**, 11, (8), 3061-3067.
23. Hong, H. G.; Jiang, M.; Sligar, S. G.; Bohn, P. W., *Langmuir* **1994**, 10, (1), 153-158.
24. Lyubchenko, Y.; Shlyakhtenko, L.; Harrington, R.; Oden, P.; Lindsay, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1993**, 90, (6), 2137-2140.
25. Okusa, H.; Kurihara, K.; Kunitake, T., *Langmuir* **1994**, 10, (10), 3577-3581.
26. Jirku, V.; Turkova, J., *Methods in Enzymology* **1987**, 135, 341-357.
27. Mansson, M. O.; Mosbach, K., *Methods in Enzymology* **1987**, 136, 3-9.
28. Fisher, L. R.; Israelachvili, J., *J. Coll. Int. Sci.* **1981**, 80, (2), 528-541.
29. Israelachvili, J., *J. Coll. Int. Sci.* **1973**, 44, (2), 259-272.

30. Israelachvili, J., *Intermolecular and Surface Forces*. 2d ed.; Academic Press Inc., San Diego, CA: 1992.
31. Schmitt, J. M.; Kumar, G., *Appl. Opt.* **1998**, 37, (13), 2788-2797.
32. Wang, H. D.; Bash, R.; Yodh, J. G.; Hager, G. L.; Lohr, D.; Lindsay, S. M., *Biophys. J.* **2002**, 83, (6), 3619-3625.
33. Ngankam, A. P.; Mao, G. Z.; Van Tassel, P. R., *Langmuir* **2004**, 20, (8), 3362-3370.
34. Meadows, P. Y.; Walker, G. C., *Langmuir* **2005**, 21, (9), 4096-4107.
35. Benz, M.; Rosenberg, K. J.; Kramer, E. J.; Israelachvili, J. N., *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, (24), 11884-11893.
36. Peeters, E. A. G.; Oomens, C. W. J.; Bouten, C. V. C.; Bader, D. L.; Baaijens, F. P. T., *J. Biomech.* **2005**, 38, (8), 1685-1693.
37. Lulevich, V.; Zink, T.; Chen, H. Y.; Liu, F. T.; Liu, G. Y., *Langmuir* **2006**, 22, (19), 8151-8155.
38. Lulevich, V. V.; Andrienko, D.; Vinogradova, O. I., *J. Chem. Phys.* **2004**, 120, (8), 3822-3826.
39. Landau, L. D.; Lifshitz, E. M., *Theory of elasticity, vol. 7 of Course of Theoretical Physics*. 3rd ed.; Butterworth-Heinemann: Oxford, 1995.
40. Shima, S.; Tatara, Y.; Iio, M.; Shu, C.; Lucero, J. C., *JSME Int. J. A-Mech. M.* **1993**, 36, (2), 197-205.
41. Tatara, Y., *JSME Int. J. A-Mech. M.* **1993**, 36, (2), 190-196.
42. Rotsch, C.; Braet, F.; Wisse, E.; Radmacher, M., *Cell Biol. Int.* **1997**, 21, (11), 685-696.
43. Mathur, A. B.; Truskey, G. A.; Reichert, W. M., *Biophys. J.* **2000**, 78, (4), 1725-1735.
44. Zamir, E.; Geiger, B., *J. Cell Sci.* **2001**, 114, (20), 3583-3590.
45. Pankov, R.; Cukierman, E.; Katz, B. Z.; Matsumoto, K.; Lin, D. C.; Lin, S.; Hahn, C.; Yamada, K. M., *J. Cell Biol.* **2000**, 148, (5), 1075-1090.
46. Katz, B. Z.; Zamir, E.; Bershadsky, A.; Kam, Z.; Yamada, K. M.; Geiger, B., *Mol. Biol. Cell* **2000**, 11, (3), 1047-1060.

47. Ahimou, F.; Denis, F. A.; Touhami, A.; Dufrene, Y. F., *Langmuir* **2002**, 18, (25), 9937-9941.
48. Sackmann, E., *J. Phys.-Condens. Matter* **2006**, 18, (45), R785-R825.
49. Li, F.; Leckband, D., *J. Chem. Phys.* **2006**, 125, (19), 194702.
50. de Gennes, P. G.; Puech, P. H.; Brochard-Wyart, F., *Langmuir* **2003**, 19, (17), 7112-7119.
51. Evans, E.; Ritchie, K., *Biophys. J.* **1997**, 72, (4), 1541-1555.
52. Leckband, D.; Israelachvili, J., *Q. Rev. Biophys.* **2001**, 34, (2), 105-267.
53. Ruths, M.; Granick, S., *Langmuir* **1998**, 14, (7), 1804-1814.
54. Sato, T.; Goto, M.; Nakano, K.; Suzuki, A., *Jpn. J. Appl. Phys.* **2005**, 44, (11), 8168-8173.
55. Liberelle, B.; Giasson, S., *Langmuir* **2007**, 23, (18), 9263-9270.
56. Sant, S.; Poulin, S.; Hildgen, P., *J. Biomed. Mater. Res. A* **2008**.

## CHAPITRE 5

# Effect of Mechanical Properties of Hydrogel Nanoparticles on Macrophage Cell Uptake

### *ABSTRACT*

Uptake and intracellular trafficking of hydrogel nanoparticles (NPs) of N,N-diethyl acrylamide and 2-hydroxyethyl methacrylate crosslinked with N,N'-methylene-bis-acrylamide were studied with a RAW 264.7 murine macrophage cell line. Results show that the uptake rate, the mechanism of internalization and the concentration of internalized NPs are correlated to the NP Young modulus. Soft NPs were found to be internalized preferentially via macropinocytosis, while the uptake of stiff NPs was mediated by a clathrin dependent mechanism. NPs with an intermediate Young modulus exhibited multiple uptake mechanisms. The accumulation rate of the NPs into lysosomal compartments of the cell is also found to depend on the NP elasticity. Our results suggest that the control over mechanical properties of hydrogel NPs can be used to tailor the cellular uptake mechanism and kinetics of drug.

## ***5.1 Introduction***

Different drug-carrier systems, such as liposomes, polymeric micelles, polymer conjugates and polymeric nanoparticles have been investigated for intracellular delivery of therapeutics. Nanoparticles (NPs) based on crosslinked water soluble polymers forming hydrogels have shown to be very good candidates for drug carriers<sup>1</sup> because of their low cytotoxicity<sup>2</sup> and their tunable properties such as swelling and mechanical properties which can be controlled by the crosslinking density. Moreover, NPs are relatively stable against biodegradation,<sup>3, 4</sup> show excellent transfection capabilities,<sup>5</sup> promote uptake by a large number of cell lines<sup>2</sup>, and can also be used as intracellular nanosensors.<sup>6-8</sup>

The efficiency of therapeutic carriers for intracellular delivery largely depends on their interactions with cell membrane and the uptake mechanism. Most of NPs are found to be internalized into cells by means of endocytic mechanisms.<sup>9</sup> The interactions of carriers with cell membrane can be made specific by using ligands that can bind to their receptors on cell membranes. This biorecognition interaction usually increases the intracellular internalization<sup>9</sup>

Physicochemical parameters (i.e. surface charge, NP size, substrate elasticity) of polymer-based carriers have shown to influence the interactions with cells or the intracellular fate of the carriers. For example, surface charge of polyamidoamine dendrimers was found to be a determinant factor of the intracellular trafficking.<sup>5</sup> Anionic dendrimers were found to be internalized via caveolae mediated endocytosis while neutral and cationic dendrimers were mostly internalized by non-clathrin and non-caveolae mediated endocytosis mechanism in A549 cells.<sup>5</sup> Surface charge of poly-D,L-lactic acid (PLA) NPs has shown to strongly affect the intracellular fate in MDCK cells but to a less extent the entry mechanism.<sup>10</sup> Both cationic and anionic PLA NPs were found to be mainly internalized by a clathrin dependent mechanism. Only anionic NPs were found in the lysosomal compartments while significant amounts of cationic NPs were found to be exocytosed. Particle size has also shown to affect the uptake mechanism and the intracellular fate.<sup>11</sup> Small polystyrene particles (nanometer size) were found to exhibit higher intracellular uptake compared to microspheres. Moreover, the small particles were found to be internalized by murine melanoma cells B16-F10 almost exclusively via clathrin dependent pathway and their intracellular trafficking was



found to be microtubule dependent. Larger particles were found to be internalized via caveolae related mechanism and systematically exhibited slower kinetics to reach lysosomal compartments. The elasticity of the cell substrate was recently found to have a significant effect on the uptake of polyplexes by murine MC3T3-E1 preosteoblasts.<sup>12</sup> An increase in substrate elasticity led to an increase in the NPs uptake which was correlated with enhanced cell proliferation and survival.

In the present study, we investigated the effect of the mechanical properties of hydrogel NPs on the cellular uptake and intracellular fate in murine macrophage cells. Macrophage cells represent a good model system for the evaluation of the cytotoxicity of nanoparticulate vectors and for the investigation of treatments against pathologies related to bacterial invasion as bacteria and pathogens are sheltered from host immune defense system in host macrophages. The mechanical properties of the NPs were controlled by varying the concentration of the crosslinking agent used for the NP synthesis and measured using atomic force microscopy (AFM). The NP elasticity was quantified by the Young modulus. The uptake mechanisms of the different NPs were identified using different inhibitors of known entry routes. The intracellular localization of the NPs was assessed by fluorescence microscopy. Colocalization assays with endosomal and lysosomal markers allowed identifying the intracellular pathways pursued by the NPs after their internalization.

## ***5.2. Materials and Methods***

### ***5.2.1 Materials***

N,N-diethyl acrylamide (DEA) was synthesized as previously described<sup>13</sup>. Unless stated, all chemical products were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Solvents used were analytical grade and all other chemicals were commercially available reagent grade. 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) was vacuum distilled prior to use. N,N'-methylene-bis-acrylamide (BIS) was recrystallized twice in hexane. Sodium dodecyl sulfate (SDS) was crystallized in pure ethanol. Amonium persulfate (APS), Rhodamine B, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) were used as

received. Water was obtained from a Milli-Q<sup>®</sup> Gradient System from Millipore equipped with a Quantum<sup>™</sup> cartridge.

### ***5.2.2 Nanoparticles synthesis***

The NPs were synthesized as previously reported<sup>13</sup>. The monomers (DEA 90 mol% and HEMA 10 mol%, total amount of 26.5 mM in water), BIS and SDS (0.040 g) were added to 200 mL of Milli-Q<sup>®</sup> water under stirring followed by nitrogen purging for 30 min at 70 °C. APS aqueous solution (0.120 g in 15 mL) was subsequently added to the reacting medium. The reaction was allowed to proceed for 4 h and then cooled at room temperature before filtering the milky suspension through 2.0 µm Millipore Isopore<sup>®</sup> membrane filters. The filtrate was centrifuged for 15 min at 15 000 rpm. The polymer NPs were collected and purified by dialysis for 1 week against Milli-Q water. 4 different batches of NPs were prepared using 4 different concentrations of BIS in order to vary the mechanical properties of the nanoparticles. The NPs used in this study are known to be thermosensitive with a lower critical temperature (LCT) value ranging from 23 to 28 °C depending on the monomer concentration<sup>13</sup>.

All nanoparticles were labeled with Rhodamine B using standard EDC/NHS coupling reactions. After labeling, NPs were centrifuged for 15 min at 15 000 rpm and the supernatant was replaced by Milli-Q<sup>®</sup> water. The polymer NPs were collected and purified by dialysis in Milli-Q water for 1 week.

### ***5.2.3 Nanoparticles characterization***

NP suspensions were prepared at a final concentration of 0.1 mg/mL in filtered phosphate buffer saline (PBS) and the particle size distribution was measured using dynamic light scattering with a Nano-ZS Zetasizer (Malvern Instrument Ltd., Malvern, Worcestershire, UK) at 37 °C in back scattering mode. Zeta potential of the NP suspensions was measured in triplicate at 37 °C using the Zetasizer. Surface imaging was carried out in tapping mode using a Multimode atomic force microscopy (AFM) equipped with a NanoScope IIIa controller (Digital Instruments, Santa Barbara, CA). The NPs were deposited by spreading a 20 µl suspension droplet on a freshly cleaved mica surface and stored in 30 % relative humidity (RH) atmosphere 2 h prior to AFM

analysis. All images were obtained in air using commercial etched silicon cantilevers with a tip of radius ranging from 5 to 10 nm and a spring constant of 20-100 N/m. Image analysis was performed using the NanoScope III software (version 512r2).

#### ***5.2.4 Immobilization of the nanoparticles on mica surfaces***

The NPs were grafted on modified mica surfaces as described elsewhere<sup>14</sup>. Briefly, large sheets (1.5 x 4 cm) of freshly cleaved mica surfaces were first plasma activated to create OH groups on their surface as described in detail elsewhere<sup>15, 16</sup>. Plasma activation was performed for 5 min at 40 W using argon and water vapors at a partial pressure of 80 mTorr and 300 mTorr respectively. After the plasma treatment, the mica surfaces were left in the plasma chamber under vacuum (0.5 mTorr) for 5 min. Then, the surfaces were transferred to an evaporation chamber and stored under vacuum (1.6 mmHg). The evaporation chamber was connected via a valve to a small glass reservoir containing 100  $\mu$ L of APTES. After purging the evaporation chamber for 15 min, the valve was opened allowing APTES vapors to react with activated mica surfaces. Evaporation was allowed to proceed for 4 h. The valve was closed and remnant APTES vapors were pumped out for 2 h. The grafting reaction of APTES was completed by annealing the surfaces for 30 min at 90 °C under atmospheric pressure. Then, the surfaces bearing grafted APTES molecules were immersed overnight in a 1% (w/w) water solution of glutaraldehyde where the coupling reaction between APTES amine function and glutaraldehyde carbonyl function took place in presence of NaBH<sub>3</sub>CN. The resulting glutaraldehyde functionalized mica surfaces were thoroughly rinsed with Milli-Q water prior to NP deposition. The deposition was performed using the horizontal convective evaporation method<sup>17</sup>. A small drop of a 0.1 % (w/w) NP suspension (25  $\mu$ L) was placed between a glass applicator and the treated mica surface prior to substrate translation. As the surface was translated at a fixed velocity, the NP suspension drop could spread on the substrate forming a uniform monolayer of nanoparticles. Final concentration of grafted NPs on the treated mica surfaces was  $2.6 \pm 0.4$  NPs /  $\mu\text{m}^2$  as determined by AFM imaging.

#### ***5.2.5 Mechanical characterization of the nanoparticles***

Mechanical properties of the NPs grafted on mica surfaces were measured using a Bioscope AFM equipped with a G-type piezotube scanner, Nanoscope IIIa controller, and version 4.43r8 of the Nanoscope software (Veeco Metrology, Santa Barbara, CA). Silicon nitride microlevers with spring constant  $k = 0.01$  N/m were used. Mica substrates bearing grafted NPs were immersed in PBS at 37 °C 1 hour prior to measurement. Localization of the NPs was realized by scanning the surface in contact mode over a  $3 \times 3 \mu\text{m}^2$  area. The scanning area was progressively decreased to visualize only one NP in the scanned area. Force curve were measured by approaching the tip to the NP on the surface at a fixed velocity and recording the cantilever deflection. Young modulus was extracted from experimental curves by fitting the force profiles with the Hertz model for a conical indenter <sup>18</sup>:

$$F = \frac{2E \tan(\theta)}{\pi(1-\nu^2)} \delta^2 \quad (1)$$

where  $F$  is the indentation force,  $E$  and  $\nu$  are the Young modulus and the Poisson ratio of the NP,  $\delta$  is the indentation and  $\theta$  is the half-opening angle of the indenter <sup>19</sup>. One monolayer of NPs was prepared for each of the different NP batches. Five to ten force profiles were recorded on one single NP and 6 different NPs were analyzed for all surfaces. The Young moduli reported in this study represent the average value obtained from all recorded force profiles.

### **5.2.6 Cell Culture**

Macrophage cells, RAW 264.7 were a kind gift from Dr. J.C. Leroux (Université de Montréal). Cells were grown in complete medium consisting of Dulbecco's modified Eagle culture medium (DMEM) containing 10 % (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin-G, and 100 mg/mL streptomycin (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) in a 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C. The cells were used between passage 4 and 15.

### **5.2.7 NPs Cytotoxicity**

NPs cytotoxicity was assessed using MTT and LDH assays. Raw 264.7 cells were diluted in complete medium at a final concentration of  $5 \times 10^5$  cells/mL and plated (100

$\mu\text{L}/\text{well}$ ) on a 96 well-flat bottom microplate (Corning, NY, USA). NPs suspended in 10  $\mu\text{L}$  PBS were added in the wells in triplicate for each different NP concentrations (0 et 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). The plates were incubated for 24 h after which cellular proliferation was assessed by MTT assay. Cell medium was removed and the cell monolayer was washed with PBS. Then fresh medium 90  $\mu\text{L}$  and 10  $\mu\text{L}$  of thiazolyl blue tetrazolium bromide dissolved in PBS (10 mM, pH 7.4) at a concentration of 5 mg/mL and filtered on 0.22  $\mu\text{m}$  sterile filter (Millipore, Bedford NMA USA) were added to each well. After 3 h incubation time at 37 °C in 5 %  $\text{CO}_2$  atmosphere, 50  $\mu\text{L}$  of solubilising solution (Isopropanol, 10 % (w/v) Triton-X 100, 0.1 N HCl) was added to each well to dissolve the dark blue formazan crystals. Absorbance was measured at a wavelength of 570 nm using a microplate reader (SAFIRE, Tecan, Austria).

The presence of lactate deshydrogenase (LDH) in the supernatant obtained from proliferation assays was used as an indicator of cell lysis. It was determined using a commercial dosing kit (Sigma, Oakville, ON, Canada). Briefly, after incubation of Raw 264.7 cells with the NPs, 5  $\mu\text{l}$  of cell supernatant were transferred to a new microplate and incubated in the dark with the reaction mixture from the dosing kit for 30 minutes. The reaction was stopped with 0.1 N HCl. Microplates were analyzed using a microplate reader at a wavelength of 450 nm (reference wavelength at 690 nm). Results are compared with positive control wells consisting of 100 % Triton-X 100 lysed cells.

### ***5.2.8 Uptake study***

RAW 264.7 cells were plated in 96-well flat bottom plates ( $2 \times 10^5$  cells/well) and allowed to adhere overnight in complete medium. Then, the medium was removed and replaced with DMEM. The cells were then incubated in fluorescently-labeled NP solutions at different concentrations at 37 °C for 2 h. The cells were washed with PBS and lysed with 0.2 % (w/v) Triton-X 100 in 0.2 N NaOH solution. The lysate fluorescence was measured on a microplate reader at excitation and emission wavelengths of 550 and 580 nm respectively. The concentration of internalized NPs was determined from an internal calibration curve. This internal calibration curve, i.e. fluorescence intensity versus NP concentration, was determined in parallel to all experiments using known NP concentrations under the same conditions of incubation followed by cell lysis without washing the cells with PBS. The uptake kinetics of the

NPs was studied following a similar protocol. For a fixed NP concentration of 70  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , the cells were treated with the NPs at different incubation times and were lysed as previously described.

To determine the uptake mechanism of the NPs, cells were incubated with endocytic and metabolic inhibitors prior to NPs introduction. The cells were incubated in complete medium in presence of one inhibitor for 1 h and then incubated with the NP solution (70  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , serum free medium) for 2 h. Cells were washed three times with PBS and lysed. Lysate fluorescence was measured as previously described.

### ***5.2.9 Intracellular trafficking***

To establish the intracellular pathways pursued by the NPs, RAW 264.7 cells were plated on round shape cover slips (Fisher Scientific, CA) and incubated overnight at 37  $^{\circ}\text{C}$  in the presence of fluorescein isothiocyanate labeled dextran (DX-FITC, Mw 77000 g/mol, 1 mg/mL in complete medium) as lysosome marker. Then, the cells were washed with DMEM and 8  $\mu\text{L}$  of NP suspension were added to reach a final concentration of 70  $\mu\text{g}$  NPs/mL per well. After 60 min of incubation, the cells were washed with DMEM and incubated in complete medium for different incubation times allowing intracellular trafficking. Following incubation, the cells were fixed with a 4 % (v/v) formaldehyde solution for 10 min and mounted on glass slides for subsequent fluorescence microscopy.

Staining of endocytic vesicles was done as follow. After fixation, the cells were incubated in 250  $\mu\text{L}$  of blocking solution (2 % w/v bovine serum albumine in PBS) for 2h. Then the cells were incubated overnight at 4  $^{\circ}\text{C}$  with goat anti-mouse EEA1 (clone 281.7 from Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) antibody. After washing with PBS, anti-goat ALEXA FLUOR<sup>®</sup> 488 (Invitrogen, Burlington, CA) secondary antibody was added for 2 h.

All samples were analyzed on a fluorescence microscope (Olympus IX71 microscope, Olympus, Markham, ON) using filters optimized for the different fluorescent probes. Images were obtained using an Evolution VF camera (MediaCybernetics, Bethesda, MD) with a 100X objective lens and a constant optimal exposure time. All images were processed with ImagePro<sup>®</sup> 5.0 (MediaCybernetics, Bethesda, MD) image analysis software.

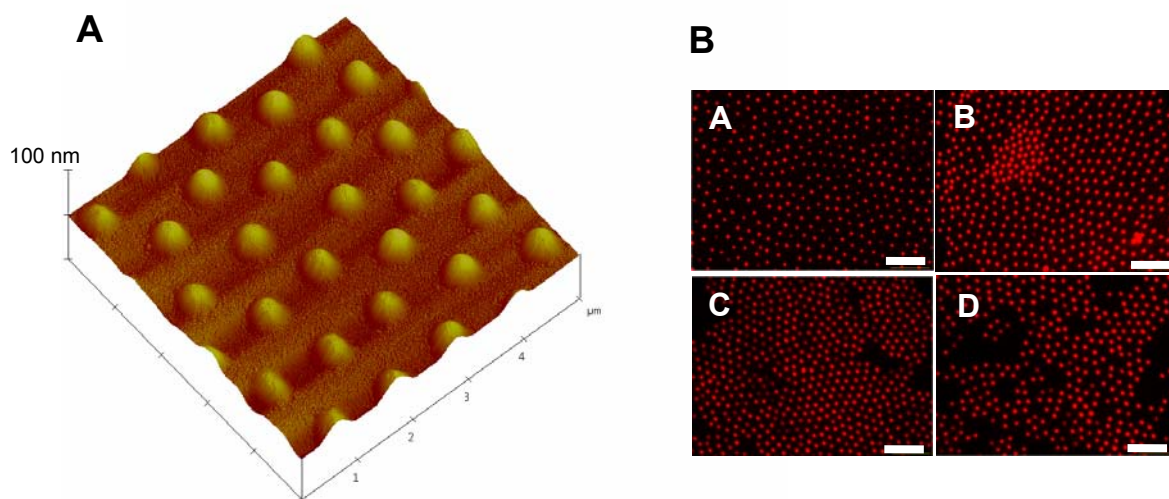
### 5.2.10 Statistical Analysis

All in vitro experiments were repeated three times and values are presented as the mean  $\pm$  standard deviation. Statistical significance was determined by Student's t-test.

## 5.3 Results

### 5.3.1 Particle Size, zeta potential and morphology

All NPs were synthesized by emulsion polymerization at a constant ratio of 9:1 of DEA:HEMA monomers. Four different batches were prepared using four different crosslinker concentrations ranging from 1.7 to 15 mol% (Table 1). Typical AFM image of the particles deposited on a bare mica substrate at 25 °C is illustrated in Figure 5.1A. All NPs exhibit a round shape and a smooth surface topography. No aggregates were observed for all batches under the deposition conditions used. The NP size measured by dynamic light scattering in PBS at 37 °C, which is well above their lower critical temperature, are reported in Table 1. The particle size is independent of the crosslinker concentration and ranges from 150 to 170 nm.



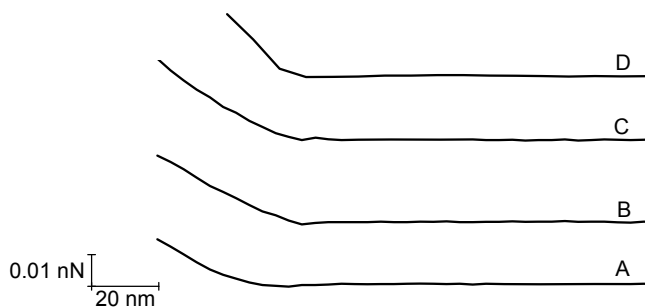
**Figure 5.1:** Surface imaging of the hydrogel nanoparticles (A) deposited from PBS solution at 37 °C on mica surfaces and analyzed using AFM in air at 25 °C in tapping mode (see methodology for details) (B) NPs deposited on glass slides by self-

adsorption from PBS solution at 37 °C and analyzed using fluorescence microscopy. No particle aggregates were observed under the experimental conditions used in this study. (A) Vertical scale: 100 nm, (B) Scale bar: 5  $\mu$ m

Zeta potentials of the NPs at 37°C in PBS are also reported in Table 1. The values are slightly negative for all NP batches. However, the variability in zeta potential for such low potentials is known to be  $ca \pm 5$  V. Therefore, the NP surface potential is assumed to be negligible which is consistent with the fact that only uncharged monomers were used. NPs were also observed by fluorescence microscopy in order to assess their aggregation state under the experimental conditions used for in vitro experiments. NPs suspended in DMEM were deposited on glass cover slips and mounted on slides for fluorescence microscopy analysis. Images shown in Figure 5.1B reveal that the NPs are well organized on the substrate and do not form aggregates. These results confirm the stability of the NPs under the experimental conditions used

### 5.3.2 Mechanical Properties of the NPs

Young modulus of the NPs grafted on smooth mica surfaces were extracted from force curves measured using AFM in PBS at 37 °C. Only force curves obtained on approach, as illustrated in Figure 5.2, were used to determine Young moduli.



**Figure 5.2:** Characteristic approach force curves measured using AFM between a cantilever tip and one nanoparticle grafted on mica surface for the 4 NP batches. The NPs were immersed in PBS at 37 °C for 1 h prior to the experiment. The increase in the slope of the curve in the indentation regime (corresponding to the left part of the force



curve) from batch A to batch D corresponds to an increase in Young modulus as described by the equation 1.

The force curves were repeated several times on the same contact point of the particle. The results were reproducible and confirmed the absence of irreversible deformation of the NPs during the indentation. Young modulus of the NPs was calculated by fitting the experimental data into equation 1 considering a Poisson ratio of 0.5 (rubber like material). As illustrated in Table 1, the increase in Young modulus from batch A to D is directly related to the increase in the crosslinker concentration as expected from elastic theory of rubber like materials.<sup>20</sup> The Young modulus of the NPs from batch A (1.7 mol % of crosslinker) and batch D (15 mol % of crosslinker) are  $18.04 \pm 4.98$  and  $211.39 \pm 43.28$  kPa respectively.

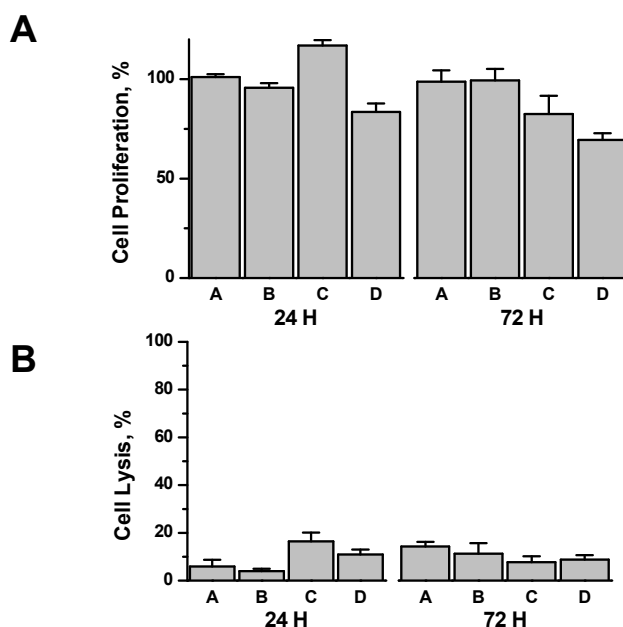
**Table 5.1** Properties of the hydrogel nanoparticles used in the present study. All measurements were done in PBS at 37 °C

	Crosslinker content (% mol)	Particle diameter (nm)	Zeta Potential (mV)	Young Modulus (kPa)
A	1.7	$169.9 \pm 13.3$	$-8.06 \pm 1.02$	$18.04 \pm 4.98$
B	5	$162.1 \pm 22.8$	$-10.70 \pm 1.47$	$35.84 \pm 10.84$
C	10	$176.4 \pm 28.4$	$-7.81 \pm 2.01$	$136.28 \pm 39.55$
D	15	$153.0 \pm 35.3$	$-13.6 \pm 2.30$	$211.39 \pm 43.28$

### 5.3.3 Cytotoxicity of the NPs

Cytotoxicity of the NPs was evaluated by MTT and LDH assays in RAW 264.7 cell line. Cells were treated with NPs at different concentrations for 24 h and 72 h. No cytotoxicity, assessed by both assays, could be evidenced for 72 h for NPs from the 4 batches for concentrations lower than 100 µg NPs/mL (data not shown). At a concentration of 100 µg NPs/mL, the cell proliferation remained relatively large for batches A, B, C, i.e. > 85 %, and decreased to 75% for D (Figure 3A). However, the cell

lysis remained relatively low for all batches (Figure 3B). Therefore, the NPs from all batches are not considered as cytotoxic. No changes in cell morphology were observed during the experiment which indicates that the presence of NPs did not activate the cells.

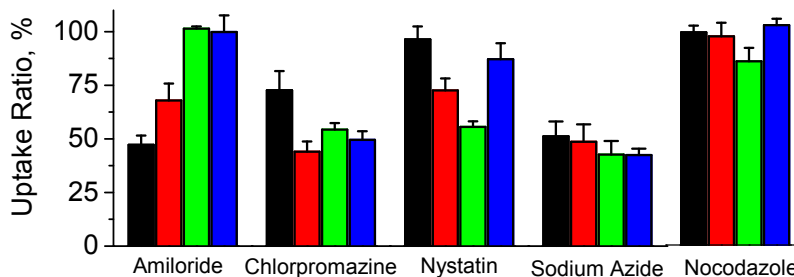


**Figure 5.3:** Cytotoxicity of hydrogel NPs (100 µg/mL) on macrophage RAW 264.7 cell line evaluated using (A) MTT and (B) LDH assays. No significant level of cytotoxicity of the four batches of NPs used could be evidenced for NP concentrations inferior to 100 µg/mL.

#### **5.3.4 Uptake Mechanism**

Uptake experiments at 4 °C are usually performed in order to stop any energy dependent process like endocytosis in the cell. However, these experiments could not be performed because the NPs are thermosensitive and a change in temperature can give rise to a significant change in NPs size. Therefore, the uptake mechanism of the NPs was elucidated by treating the cells with endocytic and metabolic inhibitors prior to incubation with the NP solutions. Sodium azide was used at 37 °C as a metabolic inhibitor as it prevents the production of ATP by interfering with the glycolytic and

oxydative metabolic pathways of the cell.<sup>21, 22</sup> Figure 5.4 illustrates the uptake concentration of NPs in sodium azide treated cells normalized by the uptake by non-treated cells. Upon treatment, intracellular concentration of NPs for the four different batches corresponds to 40 % of the concentration found in non-treated cells indicating the presence of an active uptake process (Figure 5.4).



**Figure 5.4** Cellular uptake mechanisms of the NPs assessed by treating the cells with different inhibitors of endocytic entry routes. The drug concentrations used were: Sodium azide: 100 mM, Amiloride: 200  $\mu$ g/mL, Chlorpromazine: 200  $\mu$ g/mL, Nystatin: 100 U/mL, Nocodazole: 5  $\mu$ g/mL. Cells were incubated with the drug 1h prior to NP treatment. After 2h of NP treatment cells were washed, lysed and lysate fluorescence was quantified. The uptake ratio represents the fluorescence intensity in presence of added drug normalized by fluorescence intensity under control conditions (without added drug) Black: batch A; red: batch B; green: batch C; blue: batch D.

Chlorpromazine was used for the specific inhibition of clathrin mediated endocytosis as it is known to impede the formation and budding of clathrin-coated pits.<sup>23</sup> When treated with chlorpromazine, NP concentrations of batches B, C and D correspond to 50 % of the concentration found in non-treated cells while it corresponds to 80 % for batch A. These results indicate that NPs from batches B, C and D were internalized by clathrin mediated endocytosis whereas NPa A were not (Figure 5.4).

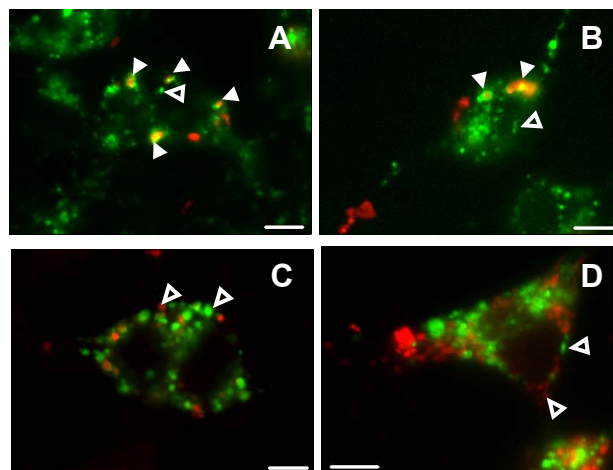
Nystatin was used to inhibit caveolae mediated endocytosis. This drug is well known to perturb cholesterol rich membrane microdomains which are precursors of caveolae invaginations.<sup>21</sup> The cellular uptake of NPs from the batches A and D was not significantly affected by the presence of the drug indicating that none of these particles

were taken in by caveolae mediated endocytosis (Figure 5.4). Uptake concentrations for batches B and C were significantly reduced (30 % and 45 % of the concentration found in non-treated cells) in the presence of nystatin which confirms that internalization mechanism of the NPs is partially caveolae dependent.

Amiloride is an inhibitor of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange protein and was used to hinder macropinocytosis.<sup>24</sup> The cellular uptake of NPs in the presence of amiloride for batches A and B correspond to 45 % and 65 % of the concentration found in non-treated cells respectively. No effect of amiloride was observed for batches C and D. The results indicate that cellular uptake of NPs from batches A and B was mediated by macropinocytosis while NPs from batches C and D were not internalized through this process (Figure 5.4).

Nocodazole is known to inhibit microtubules assembly which is involved in intracellular trafficking of vesicles.<sup>25</sup> No significant effect of nocodazole treatment on cell uptake was observed for the 4 batches of NPs indicating that their uptake is microtubule independent (Figure 5.4).

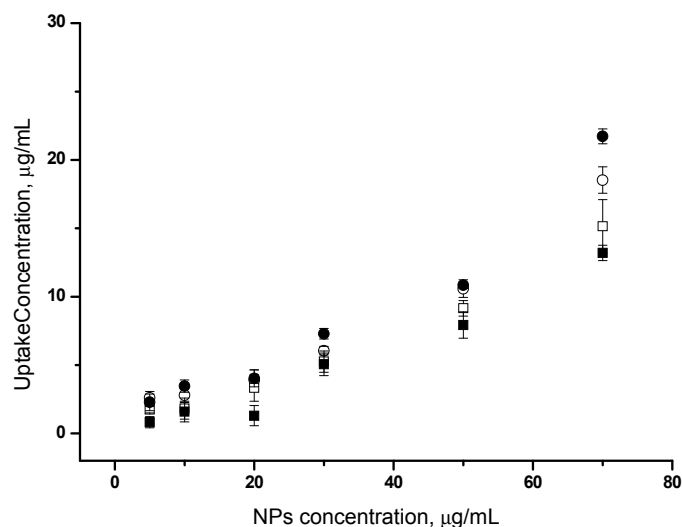
An experiment was carried out with cells treated simultaneously with NPs (70 mg/mL) and DX-FITC (250 mg/mL) for 1 h allowing internalization of both components within common endocytic vesicles. The cells were fixed after 15 min chasing and analyzed by fluorescence microscopy to determine the colocalization of the NPs with DX-FITC. Figure 5.5 shows that NPs from batches A and B colocalized with DX-FITC in small spherical vesicles. NPs from batches C and D did not present any colocalization with DX-FITC indicating that fractionation between NPs and DX-FITC occurred upon internalization. These results strongly suggest that NPs from batches C and D are not internalized by the same mechanism as DX-FITC.



**Figure 5.5** Fluorescence micrographs of macrophage cells incubated simultaneously for 1 h with DX-FITC (green channel) and NPs (red channel) from batch A to D. After abundant rinsing, cells were incubated with complete medium during 15 min chase. The internalization of DX-FITC and NPs in small spherical vesicles is indicated by the empty arrows. Colocalization of both species is observed for NPs from batches A and B (filled arrows, images A and B) while segregation for NPs from batches C and D is observed (images C and D). Scale bar: 5  $\mu$ m.

### ***5.3.5 Effect of NP concentration on cellular uptake***

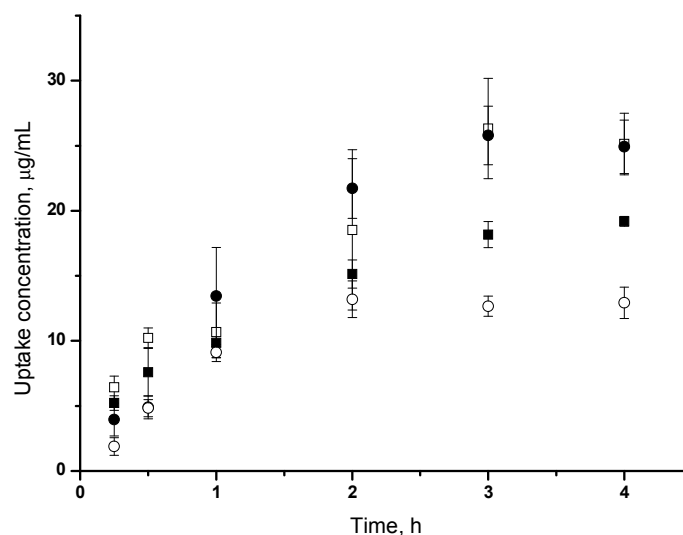
The cells were treated for 2 h with different NP concentrations ranging from 5  $\mu$ g/mL to 70  $\mu$ g/mL. The concentrations of internalized NPs were quantified by spectrophotometry using the internal calibration curve described in *materials section*. Results, reported in Figure 5.6, show that the concentration of internalized NPs increases monotonically with the initial NP concentration for the 4 batches of NPs. For low initial NP concentrations, no difference in the uptake concentration between the 4 batches of NPs could be evidenced. However, for concentrations larger than 50  $\mu$ g/mL, batches B and C exhibit larger internalized NP concentrations (18.5  $\mu$ g/mL and 21.7  $\mu$ g/mL respectively) compared to batches A and D (15.1  $\mu$ g/mL and 13.2  $\mu$ g/mL respectively). No signs of macrophage activation-like changes in cell morphology were observed during the experiments.



**Figure 5.6** Effect of the NPs concentration of the uptake concentration by macrophage cells (○: batch A; □: batch B; ●: batch C; ■: batch D). Cells were treated with different concentrations of NPs during 2h. After abundant rinsing, cells were lysed and fluorescence of the lysate was determined. Results were converted to NPs concentration using a calibration curve.

### 5.3.6 Uptake Kinetics

Kinetics of the cellular uptake was studied at 37 °C for a NP concentration of 70 µg/mL. For the 4 batches of NPs, the uptake concentration increases initially linearly with time and reached a plateau at  $2.5 \pm 0.5$  h (Figure 5.7). The initial uptake kinetics is similar for the 4 NP batches. However, the concentrations observed at the plateau are significantly different. Batches B and C exhibit large uptake concentrations (25.1 µg/mL and 24.9 µg/mL respectively) compared to batch A (12.1 µg/mL) and batch D (12.9 µg/mL).

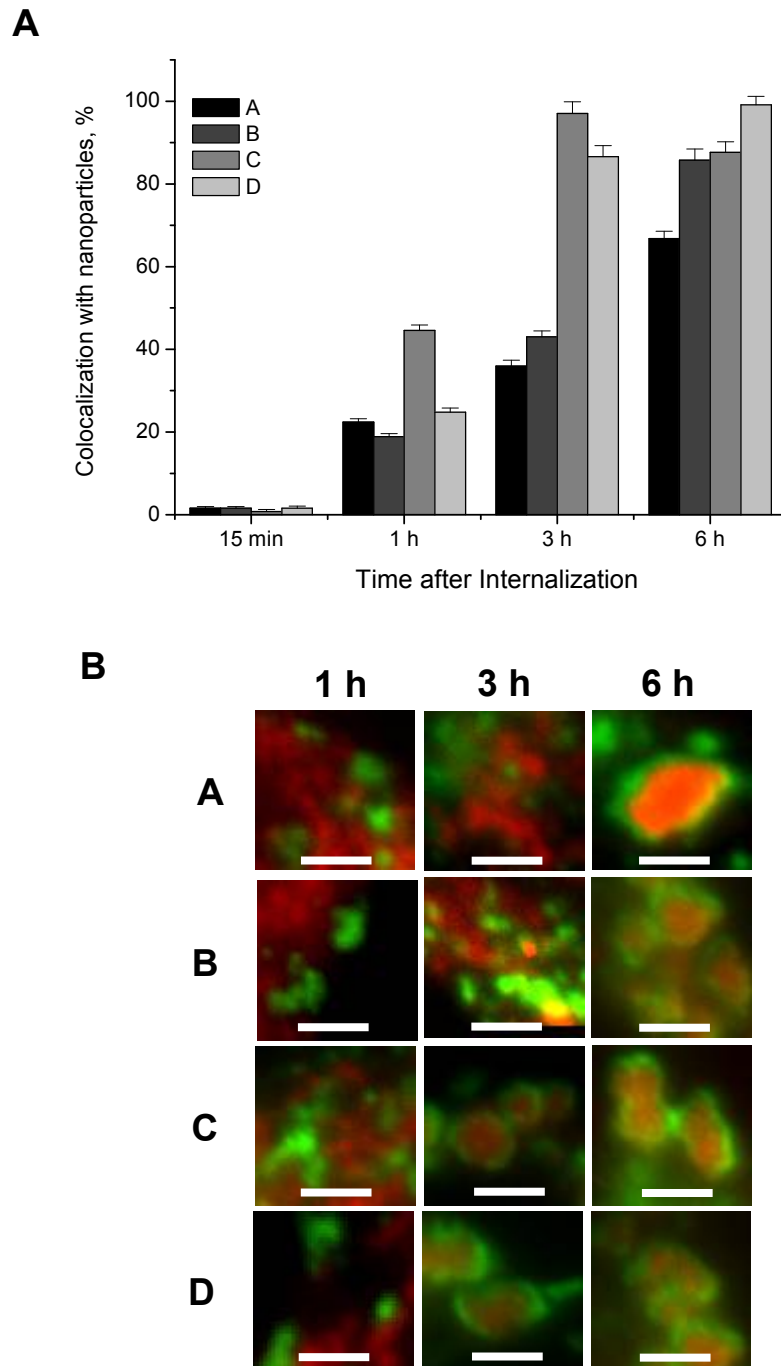


**Figure 5.7:** Uptake kinetics of NPs by macrophage cells. Cells were treated with a 70  $\mu\text{g/mL}$  NP suspension for a certain period of time. After rinsing with PBS, cells were lysed and fluorescence was quantified by spectrophotometry. Results were converted to uptake concentrations using internal calibration.  $\circ$ : batch A;  $\square$ : batch B;  $\bullet$ : batch C;  $\blacksquare$ : batch D.

### 5.3.7 Intracellular trafficking

NP intracellular trafficking was observed by fluorescence microscopy. As shown in Figure 5.8A, colocalization percentage of the NPs with DX-FITC increases with chasing time, for the 4 batches and reached a plateau after few hours. These results indicate that the compartments containing the internalized NPs are slowly merging with lysosomes and that NPs are not released in the cytosol during their transport. However, noticeable differences in the kinetics of intracellular trafficking are observed between the different batches. NPs from batches B and C reached the lysosomes within 3 h whereas the NPs from batches A and D attained the lysosomes after 6 h.

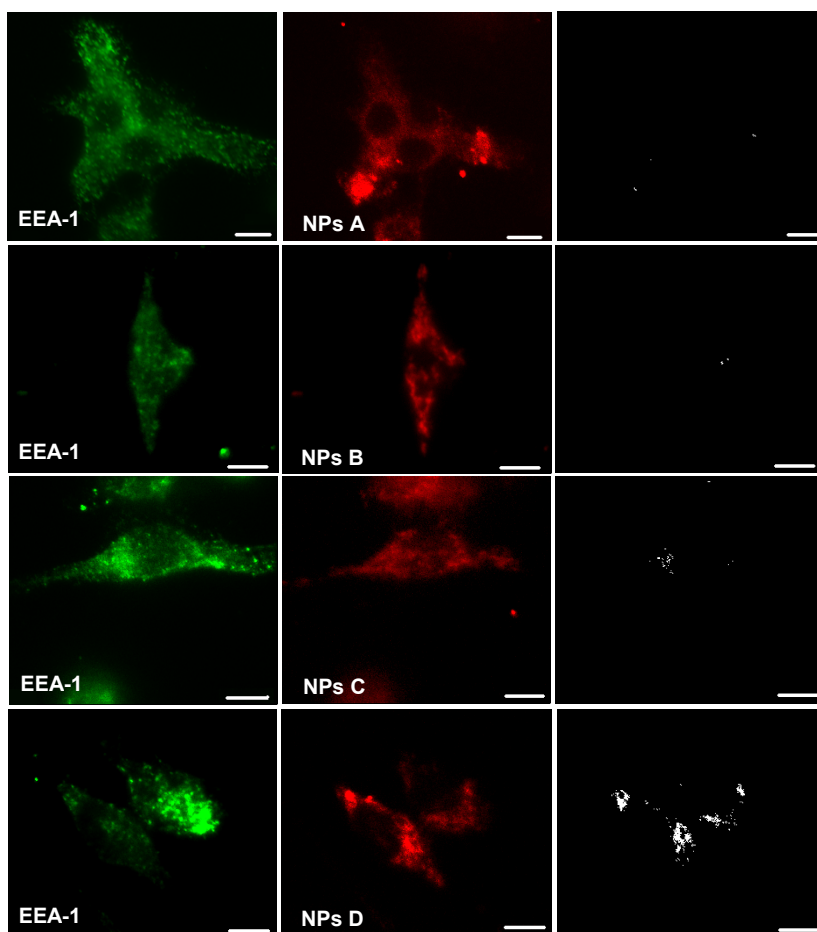
Figure 5.8B shows the localization of the NPs in macrophage cells. The NPs (red channel) are colocalized with DX-FITC (green channel) after 3h of chasing. Following 6h of chasing, NPs from batches B, C and D concentrate in large vesicles where DX-FITC molecules are present at the cell periphery.



**Figure 5.8:** (A) Percentage of colocalization of DX-FITC to rhodamine B labeled NPs, quantified by fluorescence image analysis and plotted as a function of time after internalization of the NPs. (B) Fluorescence microscopy of rhodamine B labeled NPs in RAW 264.7 cells at different times after internalization. Cells were treated with green marker DX-FITC 12 h prior to the NPs treatment in order to label cell lysosomes. Scale bar 2  $\mu$ m.



Colocalization of NPs with early endosome marker EEA-1 was difficult to assess. The main reason was the rapid trafficking of the vesicles in the cells upon NP internalization as already reported in human hepatocarcinoma cells<sup>25</sup>. However, it was possible to detect some colocalization spots after 15 min chase exclusively in cells treated with batch D (Figure 5.9). No colocalization of NPs with endosome markers was observed after 30 min chase for the 4 batches of NPs.



**Figure 5.9:** Fluorescence micrograph showing colocalization of NPs (red channel) with early endosome marker EEA-1 (green channel). Cells were incubated with NPs for 1h and chase for 15min. Cells were washed and fixed and endosome staining was performed using goat anti mouse EEA-1 mAb (see material and method for more details) followed by a secondary antibody (Alexa 488) to reveal vesicles localization. The colocalization mask of the red and green channels is represented in white. From

these pictures it can be seen that only NPs from batch D present significant colocalization. Scale bar = 5  $\mu$ m.

#### ***5.4 Discussion***

The differences observed in the uptake mechanisms are associated to the mechanical properties of the NPs as the Young modulus is the only physical parameter differentiating the four NP batches. Results show an inhibition of NP uptake in presence of sodium azide for all NP batches suggesting the presence of an active process of internalization. Nanoparticles with low Young modulus were almost exclusively internalized by macropinocytosis while more elastic nanoparticles (batch C and D) exhibited clathrin and/or caveolae mediated entry routes. The highly elastic NPs (batch D) were uptaken mainly by clathrin mediated endocytosis. Previous studies have shown that the physical structure of macromolecules plays a role in determining the cellular uptake mechanism. Ma et al.<sup>27</sup> recently showed that free chitosan macromolecules were internalized by Caco-2 cells via caveolae mediated endocytosis while NPs of crosslinked chitosan were internalized via clathrin mediated endocytosis. Chitosan NPs showed larger uptake concentrations compared to free chitosan. Differences in binding and cell uptake between linear and branched polyethylene imines (PEI) were also observed.<sup>28</sup> Branched PEI demonstrated five fold greater binding to B16f10 melanoma cells than its linear homologue. Addition of methyl- $\beta$ -cyclodextrin which sequesters cholesterol inhibiting caveolae mediated endocytosis induced a dramatic decrease in the cell uptake of branched PEI while it increased the uptake of linear PEI. Although the different mechanisms observed were not directly correlated with the differences in carrier size or elasticity, these studies clearly show that the physical structure of carriers affect cellular uptake mechanisms.

Differences in the NP uptake concentration are also observed among the different NP batches. NPs with intermediate Young modulus (batch B and C) gave rise to the largest uptake concentrations as they exhibited multiple entry mechanisms. In comparison, the NPs from batch A and D were internalized by only one main entry mechanism and exhibited small uptake concentrations.

Significant contribution of macropinocytosis in the entry routes for batch A and B

was confirmed by fluorescence microscopy. Cells treated simultaneously with DX-FITC and NPs present small spherical vesicles containing both NPs and dextran after 15 min of chase. As DX-FITC is well known to be internalized via macropinocytosis and phagocytosis,<sup>29</sup> the existence of a significant number of NPs close to DX-FITC indicates the presence of macropinocytosis for batches A and B.

Following cellular uptake, all NPs converged to lysosomal compartments independently of their elasticity. Macropinocytosis and clathrin mediated endocytosis are two mechanisms by which internalized particles can traffic to lysosomal compartments. Caveolae mediated endocytosis does not give rise to accumulation in lysosomal compartments as it is known to be a non acidic and non digestive internalization route.<sup>30</sup> Because all NP batches are found to be partly or mainly internalized via macropinocytosis and/or clathrin mediated endocytosis (Figure 5.4), they all converged to lysosomal compartments.

Colocalization of NPs with the endosomal marker EEA-1 revealed that NPs from batch A to C were not internalized via endosomal vesicles which is consistent with a non clathrin mediated entry mechanism. Colocalization of NPs from batch D with an early endosomal marker after 15 min chase indicates that internalized NPs were rapidly delivered to sorting vesicles. Addition of nocodazole, which inhibits microtubule dependent transport, has been reported to stop the transport cycle from sorting to recycling vesicles.<sup>26</sup> No effect of nocodazole was observed on the uptake of NPs from all batches. Therefore, very low level of partitioning of NPs from early endosomes to recycling vesicles was expected to occur. This is also supported by the fact that all NP batches exhibited similar level of colocalization with lysosomal marker DX-FITC after 6 h chase. It is noteworthy that microtubule independent transport mechanism to lysosomes discards the possibility of uptake by phagocytosis.<sup>31, 32</sup>

The multiplicity of entry mechanism observed for batches B and C can not be attributed to particle size or aggregation of particles even though it is known that the particle size can strongly affect the uptake mechanism. Recently, it has been reported that particles of diameter lower than 200 nm were preferentially internalized via clathrin coated pits whereas particles of 500 nm diameter penetrated into the cells via the caveolae.<sup>11</sup> In the present study, the particle size is not significantly different between the different NP batches and no signs of aggregation induced by the high salinity of the medium could be evidenced by fluorescence microscopy. NP aggregation in vitro was observed only after

2 to 3 h of chase. These observations suggest that neither size variation nor aggregation is the main factor responsible of the multiplicity of uptake mechanism observed for batches B and C. The cellular uptake of the NPs is therefore regulated by their elasticity.

The mechanism by which NP elasticity modulates the entry route remains unknown. The dynamics of the membrane-NP interface deformation could play a role in controlling the cellular uptake. As a NP approaches the cell membrane, the thermal fluctuations of the membrane-NP interface could impede the formation of stable contacts and the subsequent receptor recruitment. As soft NPs are expected to deform more easily under thermal fluctuations forces than more elastic NPs, their binding with cell membrane would be less favorable. Therefore, soft NPs uptake would be expected to be mediated by a receptor independent mechanism such as macropinocytosis while more elastic NPs could trigger receptor dependent internalization.

## ***5.5 Conclusions***

In the present study we have investigated the relationship between the mechanical properties of hydrogel nanoparticles NPs, assessed by the Young modulus, and the cellular uptake mechanism and kinetics. All NPs were internalized by an energy dependent mechanism but the endocytic mechanism showed to be dependant on the NP elasticity. Soft NPs were preferentially internalized by macropinocytosis while hard spheres uptake involved the clathrin mediated routes. NPs exhibiting intermediate elasticity were found to be internalized via multiple mechanisms which were correlated with a greater uptake rate.

The present study has shown that control over the elasticity of hydrogel NPs can be used to target cellular entry routes. The control of mechanical properties of NPs represents a promising route to design new polymeric drugs carriers with specific subcellular delivery.

## ***5.6 References***

1. You, J. O.; Auguste, D. T., *Biomaterials* **2008**, 29, (12), 1950-1957.

2. Nguyen, K. T.; Shukla, K. P.; Moctezuma, M.; Braden, A. R. C.; Zhibing, J. Z.; Tang, H. L., *J Biomed. Mat. Res. A* **2008**, 10.1002/jbm.a.31734.
3. Li, Y.; Sun, G.; Xu, J.; Wooley, K. L., Shell Crosslinked Nanoparticles: A progress report of their design for drug delivery. In *Nanotechnology in Therapeutics: Current technology and applications*, Hilt, J. Z., Ed. Horizon Bioscience: Wymondham, UK, 2007; pp 381-407.
4. Turner, J. L.; Chen, Z. Y.; Wooley, K. L., *J. Controlled Release* **2005**, 109, (1-3), 189-202.
5. Perumal, O. P.; Inapagolla, R.; Kannan, S.; Kannan, R. M., *Biomaterials* **2008**, 29, (24-25), 3469-3476.
6. Clark, H. A.; Hoyer, M.; Philbert, M. A.; Kopelman, R., *Anal. Chem.* **1999**, 71, (21), 4831-4836.
7. Clark, H. A.; Kopelman, R.; Tjalkens, R.; Philbert, M. A., *Anal. Chem.* **1999**, 71, (21), 4837-4843.
8. Xu, H.; Aylott, J. W.; Kopelman, R.; Miller, T. J.; Philbert, M. A., *Anal. Chem.* **2001**, 73, (17), 4124-4133.
9. Khalil, I. A.; Kogure, K.; Akita, H.; Harashima, H., *Pharmacol. Rev.* **2006**, 58, (1), 32-45.
10. Harush-Frenkel, O.; Rozentur, E.; Benita, S.; Altschuler, Y., *Biomacromolecules* **2008**, 9, (2), 435-443.
11. Rejman, J.; Oberle, V.; Zuhorn, I. S.; Hoekstra, D., *Biochem. J.* **2004**, 377, 159-169.
12. Kong, H. J.; Liu, J. D.; Riddle, K.; Matsumoto, T.; Leach, K.; Mooney, D. J., *Nat. Mater.* **2005**, 4, (6), 460-464.
13. Colonne, M.; Chen, Y.; Wu, K.; Freiberg, S.; Giasson, S.; Zhu, X. X., *Bioconjugate Chem.* **2007**, 18, (3), 999-1003.
14. Banquy, X.; Zhu, X. X.; Giasson, S., *J. Phys. Chem. B* **2008**, jp-2008-03605d.
15. Liberelle, B.; Banquy, X.; Giasson, S., *Langmuir* **2008**, 24, (7), 3280-3288.
16. Liberelle, B.; Giasson, S., *Langmuir* **2007**, 23, (18), 9263-9270.
17. Prevo, B. G.; Velev, O. D., *Langmuir* **2004**, 20, (6), 2099-2107.
18. Johnson, K. L., *Contact mechanics*. Cambridge University Press,: Cambridge, 1987.
19. Radmacher, M.; Fritz, M.; Hansma, P. K., *Biophys. J.* **1995**, 69, (1), 264-270.

20. Lamaze, C.; Schmid, S. L., *Curr. Opin. Cell Biol.* **1995**, 7, (4), 573-580.
21. Saraste, J.; Palade, G. E.; Farquhar, M. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, 83, (17), 6425-6429.
22. Wang, L. H.; Rothberg, K. G.; Anderson, R. G. W., *J. Cell Biol.* **1993**, 123, (5), 1107-1117.
23. Hewlett, L. J.; Prescott, A. R.; Watts, C., *J. Cell Biol.* **1994**, 124, (5), 689-703.
24. Zieve, G. W.; Turnbull, D.; Mullins, J. M.; McIntosh, J. R., *Exp. Cell Res.* **1980**, 126, (2), 397-405.
25. Goncalves, C.; Mennesson, E.; Fuchs, R.; Gorvel, J. P.; Midoux, P.; Pichon, C., *Mol. Ther.* **2004**, 10, (2), 373-385.
26. Flory, P. J., *Polymer* **1979**, 20, (11), 1317-1320.
27. Ma, Z. S.; Lim, L. Y., *Pharm. Res.* **2003**, 20, (11), 1812-1819.
28. Seib, F. P.; Jones, A. T.; Duncan, R., *J. Controlled Release* **2007**, 117, (3), 291-300.
29. Hacker, U.; Albrecht, R.; Maniak, M., *J. Cell Sci.* **1997**, 110, 105-112.
30. Ferrari, A.; Pellegrini, V.; Arcangeli, C.; Fittipaldi, A.; Giacca, M.; Beltram, F., *Mol. Ther.* **2003**, 8, (2), 284-294.
31. Conner, S. D.; Schmid, S. L., *Nature* **2003**, 422, (6927), 37-44.
32. Allen, L. A. H.; Aderem, A., *Curr. Opin. Immunol.* **1996**, 8, (1), 36-40.

## CHAPITRE 6

### DISCUSSION GÉNÉRALE

#### *6.1 Le ciblage de la voie endothéliale*

L'étude des interactions entre nanoparticules, NPs, et cellules vivantes représente un enjeu stratégique très important pour le développement de nouvelles formulations thérapeutiques et pour l'étude de leur toxicité. De nombreuses études ont déjà rapporté l'effet de plusieurs paramètres physicochimiques comme la taille ou la charge superficielle des particules sur leur capacité de pénétration cellulaire. Mais devant la grande disparité des résultats publiés qui sont souvent contradictoires, force est de constater qu'il est difficile d'établir des modèles phénoménologiques permettant de prédire les propriétés biologiques des NPs. Ceci est certainement dû au fait qu'il existe encore des paramètres physicochimiques non étudiés jouant un rôle majeur dans l'interaction NP-cellule. Dans le but de combler ce vide scientifique, les travaux de cette thèse se sont attachés à l'étude de l'effet de la modification des propriétés de surface et des propriétés mécaniques des particules sur leur capacité d'adhésion et de pénétration dans les cellules.

Dans la première partie de cette thèse nous avons étudié l'effet du greffage d'une molécule active sur l'affinité de la NP avec sa cible. Cette molécule est connue pour être un ligand potentiel très puissant des sélectines E et P. Le choix de ce ligand a été orienté par différents facteurs. Premièrement le ligand possède une affinité pour les sélectines E et P supérieure à celle du ligand naturel sLe<sup>x</sup> et deuxièmement sa synthèse implique peu d'étapes et est relativement simple. Au début de ce projet, le ligand choisi présentait les meilleures caractéristiques recherchées mais il est toutefois

possible qu'aujourd'hui (7 ans plus tard) d'autres molécules aient été développées présentant une plus grande affinité pour leur cible et un procédé de synthèse plus simple. Le ciblage des sélectines représente une voie très intéressante pour le traitement des maladies ayant une composante inflammatoire vasculaire. En effet, il est connu que ces récepteurs sont surexprimés par les cellules endothéliales du site inflammé. Une approche classique de la vectorisation consisterait à greffer en surface des NPs un ligand des sélectines afin d'augmenter l'affinité des NPs pour cette cible. Cette approche ne garantit aucunement que le ligand restera présent à la surface de la particule une fois injectée chez le patient. En effet, la présence d'enzymes hydrolytiques dans le flux sanguin est connue pour accélérer le processus de dégradation des particules de PLA ce qui provoque l'élimination généralement très rapide du ligand de la surface des NPs. Pour palier à ce problème, notre approche a consisté à greffer directement sur le polymère un ligand peptidique non naturel des sélectines. De cette manière la présence du ligand à la surface de la particule peut être garantie tout au long du temps de passage de la NP dans le flux sanguin. Ce polymère fonctionnalisé est mélangé avec un polymère non fonctionnalisé afin d'ajuster la concentration de ligand dans la formulation. Ce mélange de polymère sert de matrice pour la fabrication de nanoparticules par la méthode d'émulsification / évaporation de solvant. Nous avons montré que cette technique permet d'obtenir des nanoparticules arborant une quantité détectable par ToF-SIMS de ligand à leur surface. De plus le ligand greffé sur le polymère possède une affinité envers ces récepteurs supérieure à celle de son homologue non greffé. En effet nous avons pu montrer par simulation que la présence d'un segment hydrophobe en alpha du ligand favorise l'interaction avec le récepteur. Il est à noter que ces observations ont été faites sur la sélectine E uniquement et nous ne savons pas encore si le greffage du ligand avec le PLA peut affecter la liaison du ligand avec la sélectine P.

L'adhésion des NPs pour leur cible cellulaire a été quantifiée par microscopie à fluorescence. Nos résultats ont montré que les particules fonctionnalisées possèdent une capacité d'adhésion sur les cellules endothéliales *in vitro* supérieure à celle de leurs homologues non fonctionnalisées. Ceci prouve en partie que la présence du ligand permet bien d'augmenter l'affinité de la particule pour sa cible. De plus, ces



tests ont montré que la quantité de NPs adsorbées est directement proportionnelle à la quantité de récepteurs exprimés dans un rapport légèrement inférieur à un. Le fait que le rapport soit inférieur à un peut être dû à plusieurs raisons. Nous avons montré que la distribution de selectines à la surface des cellules activées n'était pas uniforme et qu'il existait des agrégats de protéines très localisés. Ceci a pour conséquence directe de diminuer le recrutement des nanoparticules car celles-ci sont dispersées de manière homogènes dans le milieu de culture et entrent en contact avec le récepteur membranaire par diffusion simple. De plus, les nanoparticules étant sphériques, leur contact avec la membrane cellulaire ce fait par le recrutement d'un petit nombre de récepteurs membranaires. Autour de la zone de contact entre la nanoparticule et la membrane, il existe une zone de la membrane cellulaire non accessible à d'autres particules dû à leur courbure. Cette zone « morte » est un réservoir de récepteurs non accessibles. Des tests d'adhésion des NPs en présence de ligand libre ont montré que la forte affinité des NPs fonctionnalisées avec le ligand était bien due à l'interaction spécifique de type ligand / récepteurs. La valeur de l'IC50 de la NP peut être calculée à partir des données obtenues dans cette étude et comparée avec celle du ligand libre. Nos résultats montrent que l'IC50 de la NP est de 21  $\mu\text{M}$  alors que celui du ligand libre est de 110  $\mu\text{M}$ <sup>1</sup> pour la selectine E. A titre de comparaison, l'IC50 du SLe<sup>x</sup> est de 800  $\mu\text{M}$  pour la selectine E et de 8000  $\mu\text{M}$  pour la selectine P. Ces résultats montrent clairement que la NP possède une affinité supérieure pour le récepteur comparé au ligand libre ou au SLe<sup>x</sup>. Ce résultat confirme donc les observations faites par simulation moléculaire qui avaient permis de définir le site de greffage du ligand comme très favorable car il possédait la capacité d'augmenter l'affinité du ligand pour sa cible.

Nos résultats peuvent être comparés avec d'autres études utilisant d'autres récepteurs membranaires aussi surexprimés par les cellules endothéliales inflammées. Il existe différents exemples de ciblage de ICAM-1 utilisant soit un anticorps anti-ICAM-1<sup>2</sup> soit un peptide cyclique<sup>3</sup>. Le ciblage de ICAM-1 en utilisant des particules de PLA fonctionnalisées en surface avec le peptide cyclo(1,12)PenITDGEATDSGC<sup>3</sup> a montré que les particules fonctionnalisées possédaient une affinité supérieure pour leur cible cellulaire comparée à leurs homologues non fonctionnalisées. En particulier, il a été

observé que lorsque la concentration de récepteurs membranaires était multipliée par deux, la quantité de NPs fonctionnalisées internalisées était aussi multipliée par deux. Ce phénomène a aussi été observé dans notre étude. En effet, l'activation des cellules HUVEC avec différentes drogues pro-inflammatoires a permis de moduler l'expression des sélectines E et P. Par exemple, en traitant les cellules avec 10 µg/mL de LPS, le niveau d'expression de la sélectine E est multiplié par quasiment 3 et l'expression de la sélectine P est multipliée par 2. Nous avons montré que l'adhésion des NPs fonctionnalisées est multipliée par 2.5 sur les cellules activées par LPS comparées aux cellules contrôles non activées. La similitude de nos résultats avec ceux de l'étude publiée par Zang et al.<sup>3</sup> suggère que l'utilisation d'un ligand peptidique greffé en surface de NPs permet d'augmenter significativement l'affinité du vecteur pour sa cible.

L'efficacité d'un principe actif encapsulé dans une NPs dépend grandement de sa distribution intracellulaire. Celle-ci est déterminée par le mécanisme d'internalisation emprunté par la NP pour pénétrer dans la cellule. Les études ciblant ICAM-1 soit à l'aide d'un anticorps soit à l'aide d'un peptide ont montré que la NP converge systématiquement vers les organelles digestives de la cellule telles que les lysosomes. Nous n'avons pas fait d'études expérimentales permettant de déterminer la localisation intracellulaire des NPs de PLA fonctionnalisées utilisées dans notre étude mais il est fort probable que celles-ci convergent aussi vers les lysosomes. En effet, plusieurs études ont montré que des vecteurs ciblant les sélectine E et P sont internalisés via la voie des clathrines et convergent vers les lysosomes très rapidement.<sup>4, 5</sup> L'accumulation des NPs dans les lysosomes peut être vue comme un avantage dans le contexte de certaines interventions thérapeutiques comme les thérapies de remplacement d'enzyme pour le traitement de pathologie liées aux lysosomes comme la déficience en hydrolase lysosomale.

Les résultats que nous avons présentés démontrent la possibilité d'utiliser le vecteur développé pour cibler spécifiquement l'endothélium inflammé. Pour tester le vecteur sur un modèle animal d'inflammation il sera nécessaire d'effectuer certaines modifications sur la composition du vecteur. En particulier, il sera nécessaire de greffer en surface de la NP une couche de polymère hydrophile comme le

polyéthylène glycol (PEG) capable de diminuer l'adsorption des protéines du complément responsables de l'élimination rapide des NPs. En effet, plusieurs études ont montré que différentes protéines comme l'albumine ou IgG<sup>6, 7</sup> s'adsorbent à la surface des NPs très peu de temps après leur incubation dans du plasma humain. Cette modification peut être faite très simplement en utilisant le même principe que nous avons utilisé pour fonctionnaliser les NPs avec le ligand. Il serait juste nécessaire de mélanger un polymère fonctionnalisé avec du PEG avec un polymère inerte (PLA) et un polymère actif (fonctionnalisé avec le ligand) pour former la particule.

Ce concept est facilement extrapolable à la multi fonctionnalisation des nanoparticules, c'est-à-dire au greffage de multiple molécules actives permettant d'augmenter l'efficacité du ciblage et le captage des NPs par leur cible cellulaire.

## ***6.2 Effet de l'élasticité cellulaire sur la capacité d'internalisation des nanoparticules***

La deuxième partie de notre étude s'est concentrée sur l'effet des propriétés mécaniques des cellules sur leur capacité à capter des particules de PLA non fonctionnalisées. Pour ce faire, il a été nécessaire de développer une méthode pour mesurer les propriétés élastiques des cellules. Il existe un grand nombre de techniques capables de mesurer les propriétés élastiques des cellules, c'est-à-dire leur module de Young. Malgré tout, il n'existe aucune technique capable de mesurer l'élasticité cellulaire sur un grand nombre de cellules simultanément. En effet, seule la chambre à flux laminaire et la technique d'étirement de substrat permettent d'analyser les propriétés mécaniques d'un grand nombre de cellules simultanément mais aucune de ces deux techniques ne permet l'obtention du module de Young. Nous avons donc choisi d'utiliser l'appareil de forces de surface (SFA) pour évaluer les propriétés élastiques de monocouches de cellules déposées sur un substrat fonctionnalisé. Nous avons montré que la technique permet de mesurer très précisément la déformation appliquée aux cellules grâce à l'exploitation des franges d'ordre chromatique égal. La forme des franges d'interférence est aussi un indicateur de la géométrie du contact entre les deux surfaces en approche. En présence de cellules, nous avons vu que les

franges d'interférence possédaient une forme dentelée très prononcée à faible compression qui devenait de plus en plus lisse au fur et à mesure que l'effort normal appliqué augmentait. Ceci traduit un changement de géométrie des cellules induit par la force normale appliquée. Ce changement de géométrie a aussi été observé par microscopie optique. Lorsque la force normale appliquée est supprimée, les cellules ne retrouvent pas leur forme initiale. En effet, la microscopie optique a démontré que les cellules gardaient une forme identique à celle adoptée à haute pression. La forme des franges d'interférence ne retrouve pas sa forme dentelée caractéristique à pression appliquée nulle. Ces observations traduisent une déformation irréversible des cellules due à un remodelage du cytosquelette induit par l'application d'une force normale. Comme nous l'avons montré, ceci n'empêche pas d'obtenir des valeurs de module de Young qui sont très proches de celles déjà reportées dans d'autres études utilisant des techniques comme l'AFM. Un des résultats très importants de l'étude est qu'il est possible de modifier l'élasticité des cellules macrophagiques par une simple modification chimique du substrat. Les approches les plus utilisées pour modifier les propriétés mécaniques des cellules utilisent des molécules en solution (et non greffées sur un substrat). Par exemple la profiline est connue pour favoriser la nucléation et l'assemblage de nouveaux filaments d'actine et aussi de promouvoir la polymérisation de l'actine globulaire. Ceci a pour effet global d'augmenter l'élasticité de la cellule. La modification chimique du substrat permet entre autre d'évaluer l'interaction entre les cellules et la matrice extracellulaire et de mieux comprendre le rôle qu'elle joue dans la régulation des propriétés mécaniques des cellules. Nous avons donc modifié chimiquement le substrat de mica afin d'y greffer différentes molécules biologiques comme la fibronectine et la poly-L-lysine. Ces deux substrats ont été choisis car les cellules de type macrophage y adhèrent fortement ce qui permet une manipulation facile des surfaces. D'autres substrats comme des surfaces de mica fraîchement clivée ou recouverte d'une couche de polystyrène n'ont pu être utilisés pour les mesures au SFA car les cellules n'y adhéraient pas suffisamment ce qui rendait la manipulation des surface très délicate. Ce problème a pu être contourné pour les expériences *in vitro* ce qui nous a permis d'inclure les surfaces de mica et de polystyrène dans cette partie de notre étude.

Les résultats des mesures d'élasticité ont montré que le substrat de fibronectine provoque une augmentation marquée de l'élasticité cellulaire. Ceci peut être attribué à la présence dans la fibronectine de la séquence RGD connue pour être reconnue par les intégrines. L'association fibronectine-intégrine déclenche la formation d'un complexe focal qui pourra évoluer en contact focal. Ce processus s'accompagne de la polymérisation des filaments d'actine et de leur assemblage en bouquets naissants du contact focal.

Nos expériences ont aussi montré que le substrat de poly-L-lysine ne provoquait aucune modification de l'élasticité cellulaire. Ceci prouve que l'interaction spécifique du substrat avec les protéines d'adhésion cellulaire comme les intégrines est capable de modifier significativement la structure mécanique des cellules.

Les tests d'internalisation que nous avons effectués *in vitro* avec des particules de PLA non fonctionnalisées ont montré que les cellules déposées sur un substrat de fibronectine avait une capacité à capter les NPs bien plus élevée que les cellules déposées sur un autre substrat comme le mica ou le polystyrène. Ce résultat remarquable est spécifique au substrat fonctionnalisé avec la fibronectine et n'a été observé sur aucun des quatre autres substrats que nous avons testés. Ceci prouve clairement que la présence de fibronectine altère une fonction physiologique cellulaire essentielle qui est l'endocytose. Le mécanisme d'entrée des nanoparticules de PLA dans les macrophages que nous avons utilisées a été reporté récemment.<sup>7</sup> Un traitement des cellules macrophagiques avec une solution de sucrose hyper osmotique, connue pour inhiber l'internalisation en phase fluide, provoque une diminution drastique de l'internalisation des NPs. Il en est de même en traitant les cellules avec une solution de chlorpromazine. Ces deux observations montrent que les NPs de PLA pénètrent dans les cellules RAW 264.7 via un mécanisme clathrine dépendant et par macropinocytose. Bien que ces résultats aient été observés sur des cellules déposées sur un substrat de polystyrène il est probable que ces mêmes mécanismes soient aussi impliqués chez des cellules déposées sur d'autres substrats. L'augmentation de la capacité d'internalisation observée sur le substrat de fibronectine pourrait être due en partie à une stabilisation des puits mantelés de clathrine par le réseau de filament d'actine. En effet, l'internalisation par la voie des clathrine s'initie par la formation de

puits mantelés dont la position et la densité est définie par un échafaudage de filament d'actine réticulée. En absence de cet échafaudage, les puits mantelés ne sont pas stables à la surface membranaire et ont tendance à se déplacer rapidement par diffusion brownienne. Le réseau de filament d'actine permet de fixer leur position et donc de faciliter la capture des NPs.

Les résultats de cette étude mettent en valeur l'importance de l'interaction substrat-cellule sur la capture des nanoparticules. Nous avons montré que la présence sur le substrat de molécules bioactives comme la fibronectine pouvait augmenter significativement l'internalisation d'un vecteur et par conséquent augmenter son efficacité thérapeutique. Dans un contexte pharmacologique, il serait possible d'utiliser ces résultats pour développer de nouvelles stratégies de capture des NPs par leur cible en utilisant le contrôle de la structure du réseau d'actine corticale.

### ***6.3 Effet des propriétés élastiques des nanoparticules sur leur capacité de pénétration cellulaire***

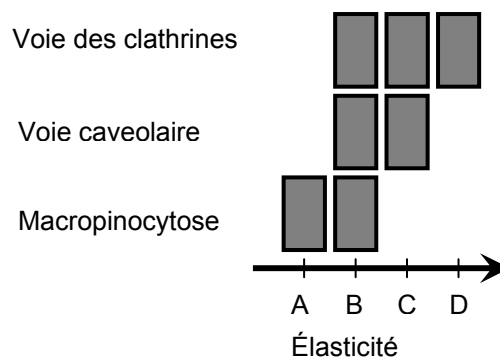
La troisième partie de notre projet a visé l'exploration de l'effet des propriétés mécaniques des NPs sur leur capture par les cellules de type macrophage. Pour ce faire nous avons synthétisé des NPs d'hydrogel thermosensibles possédant différents taux de réticulation. De cette manière, nous avons pu contrôler le module de Young des particules sur intervalle allant de quelques dizaines à plusieurs centaines de kPa.

La mesure des propriétés élastiques des NPs s'est faite en utilisant la technique de nanoindentation par AFM. Cette technique permet de mesurer le module de Young local dans une zone ayant approximativement la taille de la pointe utilisée (environ 10 nm x 10 nm). Les propriétés élastiques mesurées par cette technique doivent donc être moyennées sur toute la NP car la densité d'agent réticulant, et donc les propriétés élastiques, ne sont pas nécessairement homogènes sur toute la NP.<sup>8</sup>

Nos résultats ont montré qu'une augmentation de la concentration d'agent réticulant dans la formulation des NPs se traduisait par une augmentation du module de Young mesuré par AFM sur tout l'intervalle de concentration étudié. Ceci est en accord avec la théorie classique de l'élasticité macromoléculaire et aussi avec des résultats récents

publiés sur des macrogels de PLA-PEG<sup>9</sup>. D'autres études réalisées sur des macrogels d'acide acrylique ont montrées que la relation entre module de Young et concentration d'agent réticulant n'est pas linéaire mais présente un plateau de saturation. L'existence de ce plateau est d'ordre chimique et non mécanique, c'est-à-dire que son apparition est reliée à la réactivité des monomères, spécialement de l'agent réticulant. Katime et col. ont montré par exemple que la présence d'acide acrylique (AA) dans la formulation d'un gel d'acide acrylique-co-acrylate de méthyle réticulé avec la N,N méthylène bisacrylamide (NMBA) limitait la réactivité de NMBA au delà de 2% de AA.<sup>10, 11</sup>

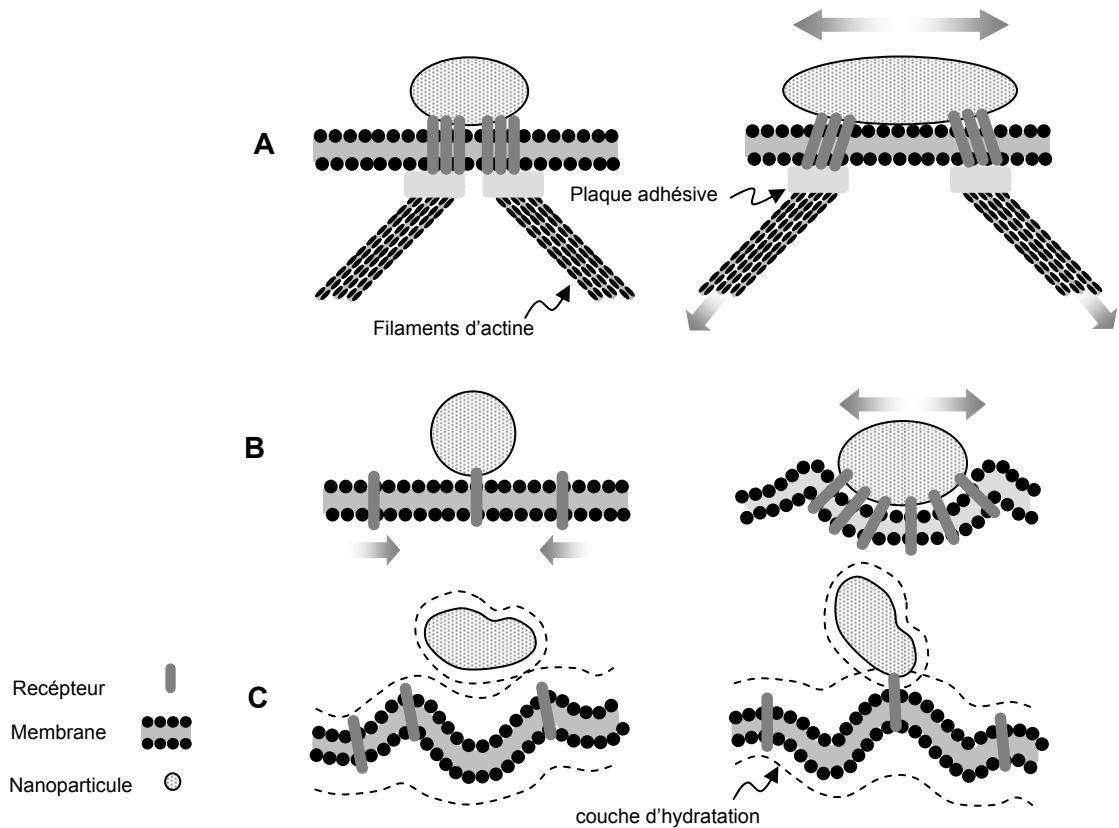
Les résultats de l'internalisation des NPs par des cellules macrophagiques ont montré qu'il y avait une forte dépendance des propriétés élastiques sur l'internalisation des NPs. Ces différences sont liées aux multiples voies d'entrée empruntées par les particules. En effet, les tests d'inhibitions spécifiques ont montré que les NPs ayant un module de Young de l'ordre d'une dizaine de kPa entrent très majoritairement par macropinocytose. Ce mécanisme d'entrée est caractéristique de l'endocytose en phase fluide et est la voie privilégiée d'un grand nombre de macromolécules naturelles comme le dextran. Les NPs ayant un module de Young de quelques centaines de kPa pénètrent dans les cellules par un mécanisme faisant intervenir la voie des clathrines. Les particules ayant une élasticité intermédiaire présentent de multiples voies d'entrée qui font intervenir entre autre la voie cavéolaire. Cette évolution du mécanisme d'internalisation avec l'élasticité de la NPs est schématisé à la figure 6.1. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène.



**Figure 6.1 :** Représentation schématique du changement de mécanisme d’entrée des NPs d’hydrogel en fonction de leur élasticité

Il est d’abord possible d’invoquer un mécanisme de mécanosensation. Celui-ci fait intervenir la formation de sites focaux d’adhésion entre la NP et la membrane corticale (Figure 6.2 A). Ces contacts, facilités par l’agrégation des intégrines, sont directement liés à la machine contractile de la cellule ce qui lui permet de déformer les NPs et par le fait même d’en « mesurer » les propriétés mécaniques. Ce modèle se base sur de nombreuses observations expérimentales faites sur les cellules adhérentes. Les cellules, via leurs sites d’adhésion, sont capables de déformer le substrat sous jacent en appliquant une tension tangentielle au substrat. Cette tension est générée par la machine contractile de la cellule qui induit à son tour la déformation de certaines protéines associées au site d’adhésion et au cytosquelette déclenchant ainsi une cascade de signalisation qui permettra entre autre de réguler la tension mécanique appliquée sur le substrat. Cela dit, la formation d’un contact focal implique nécessairement le recrutement des intégrines dont le rôle dans l’endocytose n’a pas été reporté jusqu’à présent. De plus la taille d’un contact focal à maturité peut atteindre quelques micromètres de diamètre ce qui est très supérieur à la taille des NPs que nous avons utilisées dans notre étude. Il est donc fort peu probable qu’un mécanisme mécanosensoriel soit à l’origine de l’implication de l’élasticité des NPs dans l’internalisation.





**Figure 6.2 :** Représentation schématique des différents modèles de déformation induites lors du contact entre une particule d’hydrogel et une membrane cellulaire. (A) Modèle considérant la formation de plusieurs contacts focaux d’adhésion sur la NP. La déformation de la NP est induite par la tension générée par les fibres d’actine attachées à la plaque adhésive, (B) Modèle mécanique statique considérant l’adhésion forte de la NP à un récepteur membranaire. La concentration de récepteurs dans la zone de contact permet d’envelopper partiellement la NP et de la déformer, (C) Modèle considérant la dynamique de l’interface de contact. La NP et la membrane étant déformables, une force de fluctuation thermique ou d’hydratation stérique, s’exerce entre les deux corps limitant leur contact.

Une autre approche consiste à supposer que les particules possèdent intrinsèquement une forte affinité pour la paroi membranaire. Cette affinité peut être due à la présence d’un récepteur membranaire ayant la capacité d’adhérer fermement à la surface des NPs. Au moment du contact, la NP s’étale sur la membrane cellulaire dû à sa forte affinité pour la membrane. Moins la NP est élastique, plus elle aura tendance à s’étaler

sur la membrane. L'équilibre mécanique de l'interface de contact cellule / NP est atteint lorsque l'énergie élastique générée par la déformation de la NP est égale à l'énergie d'adhésion générée par l'interaction NP-cellule additionnée à l'énergie générée lors de la déformation par flexion de la membrane (voir figure 6.2 B). Ainsi, les NPs peu élastiques posséderont une aire de contact avec la cellule bien plus importante que les particules élastiques et auront une plus grande capacité à recruter des récepteurs membranaires. Cette différence de capacité de recrutement des récepteurs membranaires pourrait être à l'origine des différents mécanismes d'entrée observés. Ce modèle reste malgré tout incomplet car nos observations ont montré que les NPs ayant un module de Young de quelques kPa entrent dans la cellule par macropinocytose ce qui élimine l'implication d'un récepteur. En effet, la macropinocytose n'implique aucun contact entre la particule et la cellule.

Ce modèle peut être affiné en considérant cette fois-ci que les NPs molles possèdent une surface très malléable. Sous l'effet de l'agitation thermique, la NP se déforme constamment à l'approche de la membrane cellulaire qui elle aussi ondule de manière aléatoire. Ces modifications constantes de l'interface NP-cellule génèrent une force dite de fluctuation thermique connue pour être de nature répulsive.<sup>12</sup> L'interface d'interaction étant peu stable, la formation d'un contact adhésif et le recrutement de récepteurs membranaires sont très peu favorisés (Figure 6.2 C). Ce phénomène expliquerait pourquoi les NPs faiblement élastiques pénètrent dans la cellule par macropinocytose plutôt que par une autre voie impliquant un récepteur membranaire. Les particules très élastiques maintiennent une interface plus stable au contact avec la membrane ce qui permet le recrutement des récepteurs membranaires dans la zone de contact. Selon l'élasticité de la particule, l'aire de contact et le nombre de récepteurs recrutés seront plus ou moins élevés ce qui déterminera la voie d'internalisation. Ce modèle est certainement celui qui est le plus en accord avec nos observations expérimentales. En effet, d'après nos résultats, les particules ayant un module de Young de quelques centaines de kPa sont internalisées par les puits mantelés de clathrine. Cela signifie que cette voie d'internalisation nécessite le recrutement d'un petit nombre de récepteurs. Les particules ayant un module de Young intermédiaire (compris entre 20 et 100 kPa) sont internalisées par plusieurs mécanismes dont la voie

cavéolaire. Toujours d'après notre modèle, ceci tendrait à prouver que l'entrée par la voie cavéolaire nécessite le recrutement d'un plus grand nombre de récepteurs que la voie classique des clathrines.

Nous avons montré l'existence de nouveaux paramètres physico-chimiques importants contrôlant l'interaction NP – cellule. L'élasticité cellulaire et l'élasticité de la NP sont deux nouveaux paramètres qu'il est important de prendre en compte pour la conception d'un vecteur et pour le traitement d'une pathologie. Le contrôle de l'élasticité de la NP permet en outre de modifier leur voie d'internalisation ce qui est d'un intérêt majeur pour la libération de molécules sensibles comme les protéines ou l'ADN. Un vecteur capable d'éviter les voies digestives de la cellule pourrait permettre de délivrer de l'ADN à l'intérieur de la cellule sans être dégradé.

L'élasticité cellulaire est un autre paramètre important à considérer pour le développement d'un vecteur. En effet, nous avons montré que la cellule cible doit présenter des propriétés mécaniques adéquates pour pouvoir maximiser l'entrée de la NP. Les propriétés mécaniques cellulaires sont essentiellement contrôlées par le substrat sur lequel elle repose. L'élasticité du substrat et sa composition sont deux facteurs très importants déterminant les propriétés mécaniques cellulaires. Il est bien connu que certaines pathologies comme le cancer se développent en modifiant drastiquement le milieu extracellulaire. Nos résultats prouvent que le ciblage thérapeutique de ces pathologies doit nécessairement tenir compte de « l'état mécanique » du milieu ciblé afin de maximiser l'efficacité d'un possible traitement.

## **6.4 REFERENCES**

1. Simanek, E. E.; McGarvey, G. J.; Jablonowski, J. A.; Wong, C. H., *Chem. Rev.* **1998**, 98, 833-862.
2. Muro, S.; Garnacho, C.; Champion, J. A.; Leferovich, J.; Gajewski, C.; Schuchman, E. H.; Mitragotri, S.; Muzykantov, V. R., *Molecular Therapy* **2008**, 16, (8), 1450-1458.
3. Zhang, N.; Chittasupho, C.; Duangrat, C.; Siahaan, T. J.; Berkland, C., *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, (1), 145-152.

4. Everts, M.; Kok, R. J.; Asgeirsdottir, S. A.; Melgert, B. N.; Moolenaar, T. J. M.; Koning, G. A.; van Luyn, M. J. A.; Meijer, D. K. F.; Molema, G., *J. Immun.* **2002**, 168, (2), 883-889.
5. Kessner, S.; Krause, A.; Rothe, U.; Bendas, G., *B.B.A.* **2001**, 1514, (2), 177-190.
6. Leroux, J. C.; Gravel, P.; Balant, L.; Volet, B.; Anner, B. M.; Allemann, E.; Doelker, E.; Gurny, R., *J. Biomed. Mater. Res.* **1994**, 28, (4), 471-481.
7. Sant, S.; Poulin, S.; Hildgen, P., *J. Biomed. Mater. Res. A* **2008**.
8. Hoare, T.; Pelton, R., *Curr. Op. Coll & Int. Sci.* **2008**, 13, (6), 413-428.
9. Bryant, S. J.; Anseth, K. S., *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, 59, (1), 63-72.
10. Katime, I.; de Apodaca, E. D.; Rodriguez, E., *J. Appl. Polym. Sci.* **2006**, 102, (4), 4016-4022.
11. Rodriguez, E.; Katime, I., *Macrom. Mater. Eng.* **2003**, 288, (8), 607-612.
12. Israelachvili, J. N.; Wennerstrom, H., *J. Phys. Chem.* **1992**, 96, (2), 520-531.

## CHAPITRE 7

### CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce projet rapporte l'étude des propriétés physico-chimiques de nanoparticules à usage pharmaceutique et leur impact sur l'interaction avec les cellules vivantes. Pour ce faire nous avons exploré l'effet de trois propriétés distinctes : l'effet du greffage en surface d'une molécule active permettant de cibler un récepteur cellulaire, l'effet des propriétés élastiques des cellules sur leur capacité d'internalisation et enfin l'effet des propriétés élastiques des nanoparticules sur leur capacité de pénétration cellulaire.

Pour étudier l'effet du greffage d'une molécule active en surface de la NP, nous avons développé une nouvelle méthode de greffage du ligand qui garantit sa présence à la surface du vecteur durant toute sa durée de vie. Les tests *in vitro* sur des cellules endothéliales ont montré que les NPs formulées avec le polymère fonctionnalisé avaient une affinité accrue pour les cellules activées comparées aux NPs formulées avec du PLA seulement. Des tests de compétition entre les NPs fonctionnalisées et le ligand libre ont montré que cette augmentation de l'affinité des NPs fonctionnalisées était bien due à l'interaction spécifique du ligand greffé avec sa cible cellulaire.

Avant d'utiliser ces NPs comme vecteur thérapeutique il est nécessaire de connaître leur devenir intracellulaire. En effet, certains principes pharmaceutiques sont facilement dégradables en conditions acides ce qui interdit leur libération dans les organelles digestives de la cellule. De plus il est possible qu'une fraction des NPs internalisées soit recyclée à la surface de la cellule par exocytose. Ces deux facteurs limitent bien évidemment l'efficacité du principe actif. Si au contraire, le vecteur est utilisé pour libérer un principe pharmaceutique spécifiquement dans les organelles

digestives de la cellule, il faudra garantir qu'une fraction conséquente des NPs atteigne bien la cible intracellulaire sans être libérée dans le cytosol ou recyclée à l'extérieur de la cellule. Une étude d'internalisation *in vitro* devrait permettre de mieux connaître la trajectoire intracellulaire suivie par les NPs. Par microscopie à fluorescence il est possible de suivre l'internalisation de NPs marquées à l'aide d'une sonde fluorescente. L'utilisation d'un second marqueur spécifique d'une organelle permettra de savoir si les deux espèces, NPs et organelles, sont colocalisées et pour combien de temps. Dans le cas du ciblage des sélectines, la voie d'internalisation que l'on privilégie est la voie des clathrines. Il est donc aussi intéressant de suivre la colocalisation des clathrines avec les NPs afin de pouvoir établir précisément la trajectoire suivie par les NPs.

Pour compléter l'étude que nous avons réalisée, des tests *in vivo* permettraient de valider notre approche de formulation des NPs. Pour ce faire il serait nécessaire avant tout de modifier légèrement la formulation du vecteur pour éviter son élimination rapide du flux sanguin après injection. Pour cela, il est possible d'ajouter à la formulation du vecteur un troisième polymère fonctionnalisés avec un polymère hydrophile comme le PEG. Ceci permettra de former une couronne protectrice à la surface de la NP capable d'éviter l'adsorption de protéines et d'opsonines responsables de l'élimination des NPs. La présence de PEG à la surface de la NP peut aussi avoir certains désavantages car le polymère pourrait masquer le ligand présent à la surface de la NP diminuant ainsi l'affinité de la particule pour sa cible. Pour éviter cela, il est possible de greffer le ligand à l'extrémité d'un bras espaceur lui aussi hydrophile. De cette manière, l'exposition du ligand dans le milieu sérique sera favorisée et sa mobilité facilitera sa capture par le récepteur membranaire cible.

Pour étudier l'effet de l'interaction entre cellules et substrat sur la capacité d'internalisation des NPs, nous avons développé différentes techniques permettant de mesurer l'adhésion et l'élasticité des cellules adhérentes sur un substrat de mica fonctionnalisés. Nous avons utilisé l'appareil de forces de surface pour mesurer l'adhésion et l'élasticité d'une monocouche de cellules. Cette nouvelle approche permet d'effectuer la mesure sur un grand nombre de cellules simultanément ce qui permet d'obtenir une mesure moyenne de leur propriété. Nos résultats ont montré que la

présence de fibronectine sur le substrat augmente significativement l'élasticité et l'adhésion cellulaire comparé au substrat fonctionnalisé avec la poly-L-lysine. Cette augmentation de l'élasticité cellulaire est due à la polymérisation de l'actine qui est déclenchée par l'interaction entre la fibronectine et l'intégrine. Les tests d'internalisation *in vitro* ont montré que la capacité de pénétration des NPs dépendait fortement du substrat sur lequel étaient déposées les cellules. Les résultats indiquent qu'il existe une corrélation entre les propriétés élastiques cellulaire et l'internalisation des NPs. L'élasticité cellulaire étant due en partie à la présence de filament d'actine corticale, le substrat de fibronectine favorise la formation et la densification du réseau d'actine. Ceci à pour cause de stabiliser les sites d'internalisation et notamment les puits mantelés de clathrine. La stabilisation des puits mantelés favorise l'internalisation des NPs de PLA déjà connue pour pénétrer dans les cellules macrophagiques par cette voie.

Afin d'explorer plus profondément la relation entre cytosquelette et internalisation des vecteurs nanoparticulaire, il serait nécessaire de reproduire les résultats de notre étude sur d'autres lignées cellulaires afin de pouvoir généraliser les résultats que nous avons exposé. De plus il serait important de déterminer si les voies d'internalisation des NPs peuvent être modifiées par le contrôle des propriétés élastiques des cellules. Pour ce faire, une étude d'inhibition sélective des voies d'internalisation réalisée sur des cellules dont les propriétés mécaniques seraient connues devrait permettre d'identifier les relations entre les voies d'entrée des NPs et l'élasticité membranaire.

Enfin, l'effet de l'élasticité des NPs sur leur capacité de pénétration a été étudié sur des cellules macrophagiques de souris. Dans un intervalle d'élasticité allant de quelques dizaines kPa à quelques centaines de kPa, nous avons observé un changement dans les mécanismes d'entrée des NPs dans les macrophages. Les NPs très molles entrent préférentiellement par macropinocytose alors que les NPs très élastiques sont internalisées par la voie des clathrines. Entre ces deux situations, les NPs ayant un module élastique intermédiaire pénètrent dans les cellules en utilisant plusieurs voies d'internalisation dont la voie cavéolaire. Ces différences peuvent être expliquées en considérant les propriétés élasto-dynamiques des NPs et de la membrane

cellulaire. Une fois internalisées, les NPs suivent une trajectoire endosome-lysosome qui semble être indépendante des microtubules. Les NPs s'accumulent dans les lysosomes avec différentes de cinétique principalement liées aux différentes de voies d'entrées.

Afin de vérifier si ces observations sont généralisables, il est proposé de reproduire les tests que nous avons effectué sur d'autres lignées cellulaires.

Les particules d'hydrogel présentent certains avantages quand à leur possibilité de fonctionnalisation. Comme nous l'avons montré, il est possible de leur greffer des marqueurs fluorescent mais l'on pourrait utiliser la même approche pour greffer une molécules bioactives comme un ligand spécifique d'une récepteur ou même une molécule de PEG afin de conférer à la NP des propriétés furtives. De plus la formulation de NPs peut être modifiée très simplement pour leur conférer une certaine sensibilité à un stimuli physicochimique comme le pH. Cette sensibilité peut se traduire par une contraction de son volume interne après acidification du milieu (comme c'est le cas lors d'une passage des endosomes aux lysosomes)