



Étude par microscopie électronique des mécanismes de transport des nanoparticules de silice au travers d'une barrière endothéliale

Grégoire Naudin

► **To cite this version:**

Grégoire Naudin. Étude par microscopie électronique des mécanismes de transport des nanoparticules de silice au travers d'une barrière endothéliale. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Bordeaux, 2014. Français. <NNT : 2014BORD0327>. <tel-01306288>

HAL Id: tel-01306288

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01306288>

Submitted on 22 Apr 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE
LA SANTÉ
Sciences, Technologie, Santé

THÈSE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR

DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
SPÉCIALITÉ : BIOCHIMIE

Présentée et soutenue par
Grégoire NAUDIN

**Étude par microscopie électronique des mécanismes de transport
des nanoparticules de silice au travers d'une barrière endothéliale**

Thèse dirigée par Olivier LAMBERT
soutenue le 17 décembre 2014

Jury :

<i>Rapporteurs :</i>	Florence GAZEAU	- Directeur de recherche, CNRS
	Armelle BAEZA	- Professeur, Université de Paris Diderot
<i>Directeur :</i>	Olivier LAMBERT	- Directeur de recherche, CNRS
<i>Président :</i>	Sébastien LECOMMANDOUX	- Professeur, Université de Bordeaux
<i>Examineurs :</i>	Claude ANTONY	- Directeur de recherche, CNRS
	Aloise MABONDZO	- Directeur de recherche, CEA, Saclay
	David JACOB	- Cordouan Technologies, Pessac

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE
LA SANTÉ
Sciences, Technologie, Santé

THÈSE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR

DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
SPÉCIALITÉ : BIOCHIMIE

Présentée et soutenue par
Grégoire NAUDIN

**Étude par microscopie électronique des mécanismes de transport
des nanoparticules de silice au travers d'une barrière endothéliale**

Thèse dirigée par Olivier LAMBERT
soutenue le 17 décembre 2014

Jury :

<i>Rapporteurs :</i>	Florence GAZEAU	- Directeur de recherche, CNRS
	Armelle BAEZA	- Professeur, Université de Paris Diderot
<i>Directeur :</i>	Olivier LAMBERT	- Directeur de recherche, CNRS
<i>Président :</i>	Sébastien LECOMMANDOUX	- Professeur, Université de Bordeaux
<i>Examineurs :</i>	Claude ANTONY	- Directeur de recherche, CNRS
	Aloïse MABONDZO	- Directeur de recherche, CEA, Saclay
	David JACOB	- Cordouan Technologies, Pessac

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Je tiens à remercier Monsieur le Pr Sébastien Lecommandoux de présider ce jury, Mesdames les Pr Armelle Baeza et Florence Gazeau d'être les rapporteurs de mon manuscrit, et Messieurs les Dr Claude Antony, Aloïse Mabondzo et David Jacob d'être examinateurs de mon travail.

Je voudrais tout particulièrement remercier mes deux "chefs". Tout d'abord, mon directeur de thèse, le Dr Olivier Lambert qui m'a supporté (dans tous les sens du terme), accompagné, défendu parfois, et surtout qui m'a appris à aimer la microscopie électronique à transmission et m'a permis de travailler sereinement tout au long de ces trois années de thèse. Un grand merci à vous, et un grand merci également, à Stéphane Aguy pour son dynamisme inépuisable, l'entrain et le volontarisme qui le caractérisent dans tout ce qu'il entreprend. Microtomes et mojitos resteront à jamais associés dans mon esprit, je le crains.

J'ai réalisé mon doctorat CIFRE au sein de l'entreprise Cordouan Technologies et du laboratoire de Chimie et de Biologie des Membranes et des Nano-objets (CBMN UMR 5248) de Pessac. Je voudrais remercier l'ensemble du personnel de Cordouan et en particulier, Benoit Maxit, pour sa disponibilité.

Je voudrais ensuite remercier l'ensemble des collègues de l'équipe d'architecture de complexes membranaires et processus cellulaires et particulièrement Jean-Christophe Taveau qui m'a autorisé à "bidouiller" les microscopes de l'institut lors de mon stage de master bioinformatique, Marion Decossas et Olivier Le Bihan qui m'ont appris avec patience et bonne humeur l'essentiel des techniques que j'utilise actuellement, Marie-Christine Gerbod Giannone, Pierre Bonnafous, Sylvie Poussard, Elise Dargelos, Laetitia Daury, François Orange et enfin Annelise Sahin pour ses conseils de mode et d'immunomarquage.

Je remercie également tous mes collaborateurs du projet TiSiTrans et en particulier Stéphane Mornet et Isabelle George pour m'avoir accueilli à leurs paillasses respectives lors de mes visites.

Je voudrais par ailleurs remercier mes collègues thésards et particulièrement ceux qui ont sué sang et eau sur leurs claviers en même temps que moi, le grand Alexis Mougeolle et le déterminé Denis Martinez. Je salue également les générations suivantes (Laurence, Émilie, Clémence, Tiphaine, Christelle, Antoine), ne vous inquiétez pas, votre tour arrive !

Je voudrais enfin remercier ma chère et tendre compagne et ma famille, tout particulièrement mes grand-parents et ma mère.

Merci à tous.

Table des matières

Liste des abréviations	xiii
Avant-propos	xvii
1 Introduction générale	1
1.1 Endothélium et transcytose	2
1.1.1 Quelques généralités sur l'endothélium	2
1.1.1.1 Le système cardio-vasculaire : organisation et composants	3
1.1.1.2 L'endothélium et la cellule endothéliale	4
1.1.2 Endocytose	6
1.1.2.1 Critères morphologiques et moléculaires des voies d'endocytose	7
1.1.2.2 Phagocytose	9
1.1.2.3 Macropinocytose	9
1.1.2.4 Endocytose clathrine dépendante	11
1.1.2.5 Endocytose cavéole dépendante	13
1.1.2.6 Endocytose clathrine et cavéole indépendantes	15
1.1.3 Transcytose	16
1.1.3.1 Transcytose dans le système vasculaire <i>in-vivo</i>	17
1.1.3.2 Transcytose <i>in-vitro</i>	19
1.2 Pathologie de l'endothélium, l'athérosclérose	21
1.2.1 Athérosclérose	21
1.2.1.1 Étapes majeures de l'athérosclérose	23
1.2.2 Phase initiale de l'athérosclérose : rôle du transport des lipoprotéines	24
1.2.2.1 Transport trans-endothélial du LDL : piste d'un transport cavéoles dépendant	25
1.2.2.2 Récepteurs potentiels impliqués dans le transport des lipoprotéines	26
1.2.3 Contexte physiologique de l'endothélium pathologique	27
1.2.3.1 Forces hémodynamiques : contraintes de cisaillement	27
1.2.3.2 Contraintes hémodynamiques et phases initiales de l'athérosclérose	28
1.3 NPs synthétiques, interactions cellulaires complexes	30
1.3.1 NPs et nano-médecine	30
1.3.1.1 Définitions	30
1.3.1.2 Principales caractéristiques des NPs	30
1.3.1.3 Apparition des nanomédecines	31
1.3.2 Applications des NPs en biologie	32
1.3.2.1 Interactions entre biomolécules et NPs	32
1.3.2.2 Biodétection, diagnostic et bio-imagerie	33
1.3.2.3 Vectorisation et approches thérapeutiques	34
1.3.2.4 Problèmes principaux des approches <i>in-vivo</i>	34
1.3.3 NPs de silice et barrières cellulaires	38

1.3.3.1	Interactions de NPs avec des membranes modèles	38
1.3.3.2	Transport cellulaire de nanoparticules de silice	40
1.3.3.3	Nanoparticules de silice et endothélium	42
2	Endocytose	45
2.1	Objectifs de l'étude	46
2.2	Résultats	47
2.2.1	Caractérisation des NPs et de leur effet sur la toxicité cellulaire	47
2.2.1.1	Caractérisation des NPs en solution	47
2.2.1.2	Toxicité cellulaire des NPs	48
2.2.2	Internalisation des nanoparticules dans les cellules endothéliales humaines	50
2.2.2.1	Analyse par MET et MOE de l'internalisation de NPs après une heure	50
2.2.2.2	Accumulation intra-cellulaire des NPs 24, heures après exposition	54
2.2.3	Étude de l'internalisation des NPs à 4°C	56
2.2.4	Identification des voies d'endocytose	57
2.2.5	Cryo-microscopie électronique - méthode CEMOVIS, exemple des NPs de 15 nm	61
2.2.6	Effet des NPs sur l'adhérence cellulaire	64
2.3	Discussion	66
2.4	Partie expérimentale	70
2.4.1	Préparation des NPs fluorescentes	70
2.4.1.1	Production des NPs de 15 nm	70
2.4.1.2	Production des NPs de 50 et 100 nm	70
2.4.2	Caractérisation de NPs en solution	71
2.4.3	Culture cellulaire	72
2.4.3.1	Modèle cellulaire	72
2.4.3.2	Protocoles d'incubation des cellules avec les nanoparticules	73
2.4.3.3	Toxicité cellulaire des NPs	73
2.4.4	Expériences d'inhibition des voies d'endocytose	74
2.4.4.1	Cytotoxicité des inhibiteurs et impact sur le tapis cellulaire	75
2.4.5	Cytométrie en flux	76
2.4.5.1	Préparation des échantillons	77
2.4.5.2	Acquisition des données	77
2.4.5.3	Analyse des résultats	77
2.4.6	Microscopie électronique	77
2.4.6.1	Résolution en microscopie électronique et limitations en biologie	78
2.4.6.2	Cryo-microscopie électronique	79
2.4.6.3	Microscopes utilisés dans cette étude	79
2.4.7	Préparation d'échantillons biologiques pour la microscopie électronique à transmission	79
2.4.7.1	Fixations chimiques d'échantillons cellulaires pour la MET	80
2.4.7.2	Déshydratation et inclusion en résine d'échantillons biologiques	81
2.4.7.3	Obtention de coupes ultra-fines pour la MET	82
2.4.7.4	Préparation de grilles pour la MET	83
2.4.7.5	Contrastes des échantillons biologiques	84

2.4.8	Préparation d'échantillons biologiques pour la cryo-microscopie électronique à transmission	85
2.4.8.1	Fixation physique d'échantillons orientés	85
2.4.8.2	Cryo-ultramicrotomie	86
2.4.9	Microscopie corrélative <i>in-situ</i>	87
2.4.10	Caractérisation de l'adhérence cellulaire après exposition aux NPs	88
2.4.10.1	Résistance initiale au décrochement	88
2.4.10.2	Détachement cellulaire après remise en culture	89
3	Transcytose	91
3.1	Objectifs de l'étude	92
3.2	Résultats	93
3.2.1	Caractérisation de la barrière endothéliale reconstituée	93
3.2.1.1	Perméabilité de la mono-couche cellulaire	93
3.2.1.2	Influence des NPs sur la perméabilité de la mono-couche cellulaire	94
3.2.1.3	Caractérisation des jonctions intercellulaires après exposition aux NPs	95
3.2.2	Transcytose des NPs sur membranes supportées	97
3.2.2.1	Transport trans-cellulaire des NPs de 15 nm	97
3.2.2.2	Transport trans-cellulaire des NPs de 50 nm	98
3.2.2.3	Transport trans-cellulaire des NPs de 100 nm	99
3.2.3	Quantification stéréologique de la transcytose et de la distribution intracellulaire des NPs	100
3.2.3.1	Quantification de la transcytose après une heure d'exposition aux NPs	100
3.2.3.2	Distribution intra-cellulaire des NPs	102
3.2.3.3	Analyse par MET du devenir à long terme des NPs	103
3.3	Discussion	106
3.4	Partie expérimentale	110
3.4.1	Culture cellulaire sur membranes supportées	111
3.4.2	Mesure de l'imperméabilité de la mono-couche cellulaire	112
3.4.2.1	Résistance trans-endothéliale	112
3.4.2.2	Coefficient de perméabilité, passage paracellulaire du <i>Lucifer Yellow</i>	112
3.4.3	Protocole d'inclusion en résine des membranes supportées pour la microscopie électronique	114
3.4.4	Approche de quantification par stéréologie	115
3.4.4.1	Étude de ratios volumiques	116
3.4.4.2	Approche utilisée	117
3.4.4.3	Surestimation du volume des NPs	119
4	Développements techniques	121
4.1	Objectifs de l'étude	122
4.2	Résultats	123
4.2.1	Développement d'un système de culture cellulaire sous flux laminaire	123
4.2.2	Modifications morphologiques des cellules HCAECs sous flux	125
4.2.3	Effet du stress de cisaillement sur la cavéoline 1 et les cavéoles	128

4.2.4	Effet du stress de cisaillement sur CD36	130
4.3	Discussion	134
4.4	Partie expérimentale	136
4.4.1	Culture cellulaire	136
4.4.1.1	Matériel biologique	136
4.4.1.2	Culture cellulaire sous flux laminaire	136
4.4.2	Microscopie photonique à fluorescence	137
4.4.2.1	Fixation des échantillons	137
4.4.2.2	Protocole d'immunofluorescence	137
4.4.3	Protocole d'immuno-marquage en pré-inclusion pour la MET	137
5	Conclusion générale et perspectives	139
	Bibliographie	143
A	Stratégies de marquage du LDL	167
B	Agrandissements de figures	169
C	Article en cours de soumission	173
D	Valorisation scientifique	207

Table des figures

1.1	Évolution temporelle de la perméabilité et de la résistance de la mono-couche cellulaire	2
1.2	Ultra-structure d'un réseau de capillaires sanguins, cellule endothéliale et cavéoles.	5
1.3	Schémas simplifié : Endocytose, dégradation et exocytose.	6
1.4	Endocytoses spécifiques et non-spécifiques	7
1.5	Principales voies d'internalisation cellulaire.	8
1.6	Voie d'internalisation : macropinocytose	10
1.7	Voie d'internalisation clathrine dépendante, formation du bourgeon	11
1.8	Diagramme schématique des différents stades de bourgeonnement et de scission des puits mantelés clathrine.	12
1.9	Mécanismes de scission d'une vésicule mantelée clathrine.	12
1.10	Représentation schématique de l'insertion des cavéolines dans la membrane plasmique.	14
1.11	Localisation de la dynamine au niveau du col de cavéoles dans l'endothélium <i>in-vivo</i> .	15
1.12	Morphologie 3D des CLICs en microscopie électronique.	16
1.13	Transport trans-endothélial.	17
1.14	Répartition vésiculaire dans la cellule endothéliale.	18
1.15	Transcytose de la BSA conjuguée à de l'or colloïdal dans l'endothélium micro-capillaire cardiaque de rat.	19
1.16	Étapes principales du développement d'une plaque d'athérome.	22
1.17	<i>Low-density lipoprotein</i> - LDL.	25
1.18	Transport trans-endothélial du LDL.	26
1.19	Organisation du flux dans les vaisseaux sanguins.	28
1.20	Exemples de NPs.	32
1.21	Opsionisation protéique des NPs.	35
1.22	Schéma des principaux dysfonctionnements cellulaires induits par les NPs.	37
1.23	Internalisation de NPs d'or dans des cellules démunies de voies d'endocytose actives.	38
1.24	Internalisation de NPs de silice dans de larges liposomes uni-lamellaires	39
1.25	Localisations intra-cellulaires de NPs de silice dans des cellules A549.	41
1.26	Transport de NPs de silice de 50 nm dans la barrière hémato-encéphalique <i>in-vitro</i> .	43
2.1	Micrographes des 3 types de NPs synthétisées dans l'eau.	46
2.2	Micrographes NPs dans ECBM	47
2.3	Micrographes NPs dans ECGM	48
2.4	Cyto-toxicité des NPs après 24 heures en milieu complet.	49
2.5	Cyto-toxicité des NPs après 24 heures en milieu dépourvu de sérum.	49
2.6	NPs de 15nm : internalisation	51
2.7	NPs de 50nm : internalisation	52
2.8	NPs de 100nm : internalisation	53
2.9	Cellules HPAEC 24 heures après exposition en MOE.	54
2.10	MOF NPs 50 nm 4-48 heures ; MET 15, 50 et 100 nm - 24 heures	55
2.11	NPs incubées une heure à 4°C	56

2.12	Inhibition des voies principales d'endocytose	57
2.13	MET - Amiloride	58
2.14	MET - Génistéine	59
2.15	MET - Chlorpromazine	60
2.16	MET - DéoxyDglucose	61
2.17	NPs de 15nm , CEMOVIS préparation	62
2.18	NPs de 15nm , CEMOVIS	63
2.19	Représentation schématique du rôle de l'adhésion active et du cytosquelette.	64
2.20	Détachement cellulaire au cours du temps après exposition aux NPs.	65
2.21	Internalisation de NPs en présence de milieu complet.	67
2.22	Internalisation des NPs en présence de sérum observée par MET.	67
2.23	Gamme d'appareils Cordouan Technologies pour la caractérisation de NPs.	71
2.24	Déstabilisation d'une solution de NPs 50 nm dans du milieu ECGM au cours du temps.	72
2.25	Protocole d'application des NPs.	73
2.26	Protocole d'application des NPs et inhibiteurs.	74
2.27	Cytotoxicité des inhibiteurs après une heure d'exposition.	75
2.28	Effet des inhibiteurs chimiques sur l'aspect morphologique du tapis cellulaire en présence de NPs 50 nm.	76
2.29	Microscopes utilisés au cours de cette étude.	79
2.30	Techniques de préparations d'échantillons biologiques pour la MET développées au laboratoire.	80
2.31	Ultra-microtomie.	83
2.32	Grilles de microscopie électronique à transmission.	83
2.33	Congélation sous haute pression d'échantillons cellulaires orientés.	86
2.34	Cryo-ultramicrotomie.	86
2.35	Module multi-lambda.	87
2.36	Schéma simplifié de l'expérience d'adhésion cellulaire au support.	88
2.37	Adhérence initiale des cellules exposées aux NPs.	89
3.1	Cellule HPAECs cultivée sur membrane supportée en vue transversale MET.	92
3.2	Évolution temporelle du coefficient de perméabilité et de la résistance électrique de la mono-couche cellulaire.	93
3.3	Évolution de la RETE après exposition aux NPs	94
3.4	Marquage immuno-fluorescence de ZO1 après exposition aux NPs	95
3.5	Jonctions cellulaires après exposition aux NPs	96
3.6	Transcytose 15 nm	97
3.7	Transcytose 50 nm	98
3.8	Transcytose 100 nm	99
3.9	Transcytose des NPS à 1 h	100
3.10	Répartitions des NPs dans l'échantillon	101
3.11	Répartitions des NPs dans l'échantillon	102
3.12	Transcytose des NPS à 24 h	103
3.13	Localisation et quantification du volume de NPs après 24 h	104
3.14	Localisation et quantification du volume de NPs après 24 h	105

3.15	Schéma du transport trans-endothélial et de l'accumulation des trois types de NPs. . .	109
3.16	Schéma du système Transwell [®] d'insert supportés pour la culture cellulaire.	111
3.17	Inclusion à plat d'échantillons orientés.	114
3.18	Principe de Delesse.	116
3.19	Stéréologie.	118
3.20	Effet Holmes, sur-projection.	119
4.1	Montage de culture cellulaire sous flux.	124
4.2	Effet de l'application du flux sur les cellules HCAECs.	125
4.3	Modification morphologique du cytosquelette d'actine après exposition à un stress de cisaillement.	126
4.4	Morphologie des cellules au quatrième jour de culture en conditions statiques, coupes transversales MET.	127
4.5	Morphologie des cellules au quatrième jour de culture après 24 heures de flux, coupes transversales MET.	127
4.6	Distribution cellulaire de la cavéoline 1 par immuno-fluorescence en absence et en présence d'exposition au flux.	128
4.7	Comparaison en MET de cellules en présence et en absence de flux.	129
4.8	Distribution cellulaire de CD36 par immuno-fluorescence en absence de pré-conditionnement sous flux.	130
4.9	Distribution cellulaire de CD36 par immuno-fluorescence en présence de pré-conditionnement sous flux.	131
4.10	Distribution cellulaire de CD36 par immuno-fluorescence après exposition au flux pendant 24 heures, microscopie confocale.	132
4.11	Colocalisation de CD36 et des filaments d'actine par immuno-fluorescence après exposition au flux pendant 24 heures, microscopie confocale.	133
4.12	Galerie d'images MET montrant la distribution cellulaire de CD36 après exposition au flux pendant 24 heures.	133
A.1	Approches étudiées pour la détection du LDL intracellulaire par MET.	168
B.1	Agrandissement - Transcytose 15 nm	170
B.2	Agrandissement - Transcytose 50 nm	171
B.3	Agrandissement - Transcytose 100 nm	172

Liste des tableaux

1.1	Caractéristiques morphologiques et moléculaires des voies principales d'endocytose.	9
1.2	Exemples d'utilisation de NPs en nanomédecine et en biologie	33
1.3	Études récentes sur l'interaction entre NPs de silice et cellules endothéliales <i>in-vitro</i>	42
2.1	Diamètres hydrodynamiques et potentiels ζ des NPs dans différents milieux.	47
2.2	Concentrations des NPs dans l'étude.	50
2.3	Inhibiteurs utilisés dans les expériences d'inhibition de l'internalisation des NPs de silice dans les cellules HPAECs.	74
2.4	Concentrations des inhibiteurs de la figure 2.27.	75
4.1	Tableau récapitulatif des anticorps primaires utilisés dans l'étude.	137

Liste des abréviations

- ◇ **ADN** : Acide désoxyribonucléique
- ◇ **AFM** : Microscopie à Force Atomique (*Atomic Force Microscopy*)
- ◇ **ANSES** : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
- ◇ **AP2** : Complexe adaptateur AP2
- ◇ **ApoB** : Apolipoprotéine B
- ◇ **ApoB100** : Apolipoprotéine B100
- ◇ **ApoE** : Apolipoprotéine E
- ◇ **APS** : Aminopropyltriméthoxysilane
- ◇ **Arf1** : *ADP-ribosylation factor 1*
- ◇ **Arf6** : *ADP-ribosylation factor 6*
- ◇ **Au** : Or
- ◇ **BSA** : Albumine de sérum bovin (*Bovine Serum Albumin*)
- ◇ **CAV1** : Cavéoline 1
- ◇ **CAV2** : Cavéoline 2
- ◇ **CAV3** : Cavéoline 3
- ◇ **CD36** : Récepteur *scavenger* CD36
- ◇ **CD44** : Glycoprotéine CD44
- ◇ **CDc42** : *Cell Division Control Protein 42*
- ◇ **Cds** : Cadmium
- ◇ **CEMOVIS** : *Cryo-electron microscopy of vitreous sections*
- ◇ **CLICs** : Voies d'endocytoses indépendantes de la clathrine et de la cavéoline
- ◇ **CML** : Corps multi-lamellaires
- ◇ **CNRS** : Centre National de la Recherche Scientifique
- ◇ **CTxB** : Choléra Toxine B
- ◇ **DLS** : Diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic Light Scattering*)
- ◇ **DLVO** : Théorie DLVO, Derjaguin, Landeau, Verwey et Overbeek
- ◇ **Dyn** : Dyne
- ◇ **ECBM** : Milieu minimal (*Endothelial Cell Basal Medium*)
- ◇ **ECGM** : Milieu complet (*Endothelial Cell Growth Medium*)
- ◇ **FITC** : Fluorescéine isothiocyanate
- ◇ **GEEC** : *GPI-enriched early endosomal compartments*
- ◇ **GM1** : Ganglioside Monosialique 1
- ◇ **GM2** : Ganglioside Monosialique 2
- ◇ **GP60** : Protéine GP60
- ◇ **GPI** : Glycosylphosphatidylinositol
- ◇ **Graf** : *GTPase Regulator Associated with Focal Adhesion Kinase*

- ◇ **H** : Hydrogène
- ◇ **HDL** : Lipoprotéine de haute densité (*High Density Lipoprotein*)
- ◇ **HCAEC** : Cellules endothéliales coronaires artérielles humaines (*Human Coronary Arterial Endothelial Cells*)
- ◇ **HDLEC** : Cellules endothéliales dermales lymphatiques humaines (*Human Dermal Lymphatic Endothelial Cells*)
- ◇ **HPAEC** : Cellules endothéliales pulmonaires artérielles humaines (*Human Pulmonary Artery Endothelial Cells*)
- ◇ **HRP** : Peroxydase de raifort (*Horseradish Peroxidase*)
- ◇ **ICAM-1** : *Intercellular Adhesion Molecule 1*
- ◇ **ICMCB** : Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux
- ◇ **ICP-OES** : *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*
- ◇ **IF** : Immuno-fluorescence
- ◇ **IgA** : Immunoglobuline A
- ◇ **IgG** : Immunoglobuline G
- ◇ **IL8** : Interleukine 8
- ◇ **kDa** : Kilo-Dalton
- ◇ **LDL** : Lipoprotéine de basse densité (*Low-density lipoprotein*)
- ◇ **LDLr** : Récepteur au LDL
- ◇ **LED** : Diode électroluminescente (*Light-Emitting Diode*)
- ◇ **Lox-1** : *Lectin-type Oxidized LDL receptor 1*
- ◇ **LY** : *Lucifer Yellow*
- ◇ **MEB** : Microscopie Électronique à Balayage
- ◇ **MET** : Microscopie Électronique à Transmission
- ◇ **MOE** : Microscopie Optique à Épifluorescence
- ◇ **MVB** : *CML Multi-vesicular Body*
- ◇ **Na** : Sodium
- ◇ **NPs** : Nanoparticules
- ◇ **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- ◇ **OsO₄** : Tétraoxyde d'osmium
- ◇ **PDMS** : Polydiméthylsiloxane
- ◇ **PET** : Polytéréphtalate d'éthylène
- ◇ **PI3K** : Phosphoinositide 3-kinase
- ◇ **PV1** : *Plasmalemma Vesicle associated protein 1*
- ◇ **Rac1** : *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*
- ◇ **RETE** : Résistance Électrique Trans-Endothéliale
- ◇ **ROS** : Espèces réactives à l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*)
- ◇ **SBF** : Sérum Bovin Foetal
- ◇ **SREC** : Protéine SREC
- ◇ **SV40** : Virus simien 40 (*Simian vacuolating virus 40*)
- ◇ **SIDA** : Syndrome d'immunodéficience acquise
- ◇ **TEOS** : Tétraoéthoxysilane

- ◇ **Thy1** : CD90 (*Cluster of Differentiation 90*)
- ◇ **TRITC** : Tétraméthylrhodamine isothiocyanate
- ◇ **UMR** : Unité mixte de recherche
- ◇ **UPR** : Unité propre de recherche
- ◇ **VCAM1** : *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*
- ◇ **VEGF** : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*Vascular Endothelial Growth Factor*)
- ◇ **VLDL** : Lipoprotéine de très basse densité (*Very Low-density Lipoprotein*)
- ◇ **WST-1** : *Water soluble Tetrazolium salts 1*

Avant-propos

Durant ces vingt dernières années, le développement rapide du secteur des nanomédecines a révolutionné l'industrie pharmaceutiques et la biologie. Le développement de nouveaux nano-objets pour des applications de bio-imagerie, de vectorisation d'agents thérapeutiques ou d'ingénierie tissulaire, pose de nouvelles questions sur leurs mécanismes de franchissements des barrières biologiques. Afin de développer des nano-objets toujours plus efficaces et plus spécifiques, il est donc nécessaire de comprendre les mécanismes régissant leur transport aux interfaces biologiques. La simplification, par l'utilisation de modèles basés sur des nano-objets synthétiques, ouvre de nouvelles possibilités dans l'étude de phénomènes complexes tels que le transport trans-cellulaire de macromolécules. L'étude des interactions à l'échelle nanométrique, de l'internalisation et du transport de nano-objets synthétiques permet de mettre au point les modèles et protocoles applicables ensuite à des nano-objets biologiques similaires.

Les études présentées dans ce travail de thèse ont été réalisées grâce au partage de compétences entre l'Institut de Chimie et de Biologie des Membranes et des Nano-objets et la société Cordouan Technologies de Pessac, experts en caractérisation de nano-objets. Leur volonté de s'ouvrir aux techniques d'analyse d'échantillons biologiques en microscopie électronique à transmission est à l'origine de cette collaboration.

Cette étude a été réalisée, pour partie, dans le cadre du projet Tisitrans cherchant à déterminer la capacité de transport au travers de l'épithélium et de l'endothélium pulmonaire humain de nanoparticules (NPs) de silice fluorescentes de tailles variables. Nous nous sommes focalisés sur l'étude du transport trans-endothélial des NPs et la mise en place d'outils techniques permettant le suivi des NPs à une résolution nanométrique. Ces approches méthodologiques et techniques pourront ensuite être appliquées à l'étude des phases initiales de l'athérosclérose et plus particulièrement du transport du LDL (*Low-density lipoprotein*) dans l'endothélium vasculaire.

Ce manuscrit est organisé en cinq parties principales. L'introduction générale, présente l'endothélium et son rôle dans le transport de macro-molécules dans l'organisme, en détaillant l'exemple d'une pathologie du transport dans l'endothélium : l'athérosclérose. Un tour d'horizon des connaissances actuelles sur les NPs et plus particulièrement sur les NPs de silice et leurs interactions avec l'endothélium est ensuite réalisé. Le premier chapitre expérimental, traite de l'étude de l'internalisation des NPs de silice dans l'endothélium pulmonaire humain *in-vitro*. Le lien entre la taille des particules et les voies d'internalisation empruntées y est étudié. Le second chapitre expérimental décrit les expériences de caractérisation et de quantification du transport trans-endothélial des NPs en fonction de leur taille. Le dernier chapitre expérimental présente les travaux préliminaires réalisés afin d'adapter les modèles cellulaires à l'étude du transport trans-endothélial du LDL. La conclusion générale fait la synthèse de l'ensemble des résultats obtenus pendant la thèse et définit les perspectives futures de ce travail.

Introduction générale

Sommaire

1.1 Endothelium et transcytose	2
1.1.1 Quelques généralités sur l'endothélium	2
1.1.2 Endocytose	6
1.1.3 Transcytose	16
1.2 Pathologie de l'endothélium, l'athérosclérose	21
1.2.1 Athérosclérose	21
1.2.2 Phase initiale de l'athérosclérose : rôle du transport des lipoprotéines	24
1.2.3 Contexte physiologique de l'endothélium pathologique	27
1.3 NPs synthétiques, interactions cellulaires complexes	30
1.3.1 NPs et nano-médecine	30
1.3.2 Applications des NPs en biologie	32
1.3.3 NPs de silice et barrières cellulaires	38

1.1 Endothelium et transcytose

1.1.1 Quelques généralités sur l'endothélium

L'activité normale d'une cellule est basée sur un équilibre continu entre un apport d'éléments nutritifs et un export de déchets et de produits cellulaires. Si les organismes uni-cellulaires sont capables d'échanger ces éléments directement avec le milieu extra-cellulaire, les organismes multi-cellulaires, eux, sont dépendants de divers mécanismes de transport.

Les vertébrés, dont font partie les humains, disposent de divers fluides dont une fraction transporte ces éléments dans leurs organismes. On distinguera ici quatre groupes de fluides séparés par des barrières semi-perméables : le plasma sanguin, la lymphe, les fluides interstitiels et les fluides intra-cellulaires. La lymphe et le plasma sanguin circulent de manière uni-directionnelle, respectivement dans les systèmes circulatoires lymphatique et vasculaire.

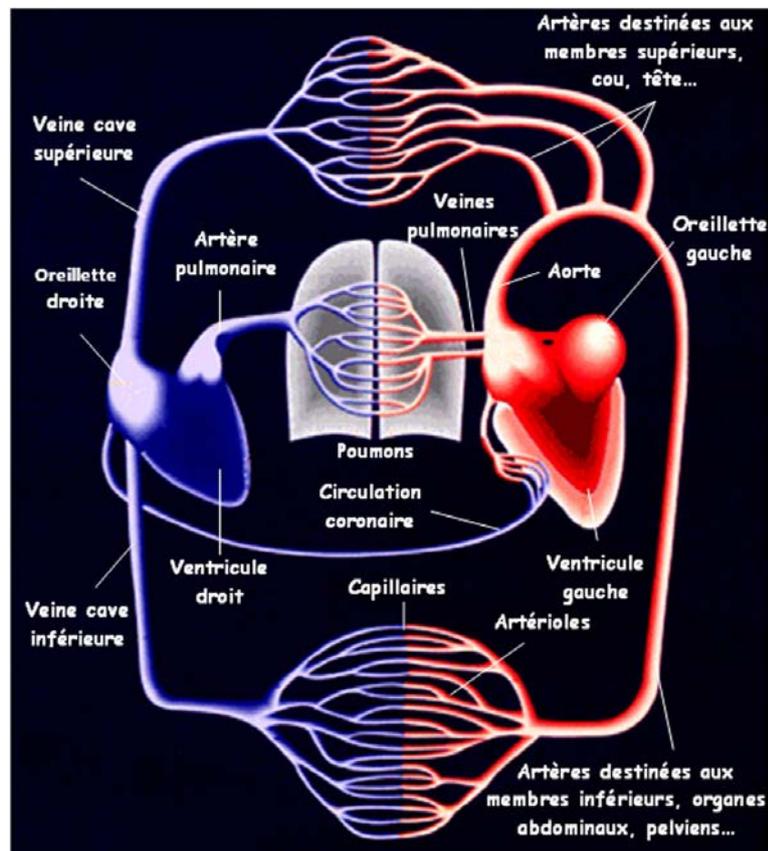


FIGURE 1.1 – Appareil cardio-vasculaire figure adaptée de [Chung 1990]

Le **système circulatoire lymphatique** transporte les fluides depuis les tissus interstitiels jusqu'aux veines situées à la base du cou via un réseau de capillaires et vaisseaux de tailles variables.

Le **système circulatoire sanguin** ou **système cardiovasculaire** inclut une pompe musculaire, le cœur et un réseau de vaisseaux sanguins (voir figure 1.1). Le cœur est un vaisseau sanguin modifié qui va recevoir le sang de tout l'organisme par son côté droit et le pomper vers les poumons pour

oxygénation. Il s'agit de la circulation pulmonaire. Son côté gauche va permettre le pompage du sang des poumons vers le reste de l'organisme, il s'agit de la circulation systémique.

1.1.1.1 Le système cardio-vasculaire : organisation et composants

Trois composants basiques forment le système cardio-vasculaire :

- ◇ **L'endothélium.** Fine couche de cellules épithéliales recouvrant l'intérieur de tous les vaisseaux sanguins, l'endothélium peut être continu (dans le coeur et la majorité des vaisseaux) ou fenestré (dans les capillaires viscéraux ou hématopoïétiques). L'endothélium repose sur une couche de lame basale qui peut varier en épaisseur et en continuité. L'endothélium et sa lame basale représentent la principale barrière semi-perméable du vaisseau. Leur densité et leur intégrité vont déterminer la perméabilité locale d'un vaisseau.
- ◇ **Les tissus musculaires.** Intercalés avec d'autres structures de la paroi vasculaire, ils sont composés de cellules musculaires lisses.
- ◇ **Les tissus conjonctifs.** Composés de cellules fixes et migratoires, de collagène, fibronectine et autres substances, les tissus conjonctifs vont remplir différents rôles complexes. Les tissus conjonctifs accueillent également les vaisseaux microvasculaires sanguins et lymphatiques mais aussi les nerfs du myocarde.

À ces composants s'ajoutent des éléments élastiques : les fibres élastiques dispersées à l'intérieur de la paroi vasculaire et les feuillets élastiques présents dans la paroi artérielle.

Ces constituants s'organisent sous la forme d'une structure, en couches ou tuniques, commune à l'ensemble du système cardiovasculaire. Ces tuniques sont organisées en trois couches, partant de la lumière du vaisseau vers l'extérieur :

- ◇ **Tunique *intima*.** Composée de l'endothélium et de sa lame basale reposant sur une fine couche de tissus conjonctifs, l'intima contient également quelques cellules musculaires lisses capables de contraction et de synthèse de collagène. Ces cellules, dites myo-intimales, jouent notamment un rôle dans la formation de la plaque d'athérome.
- ◇ **Tunique *media*.** Particulièrement développée dans les artères, elle est bien moins distincte dans les veines et absente du système microvasculaire. Dans les vaisseaux les plus proches du coeur, où la poussée de l'onde de pression systolique est la plus importante, elle est enrichie en éléments élastiques.
- ◇ **Tunique *adventice*.** Constituée majoritairement de collagène, elle peut également contenir des cellules musculaires notamment dans les veines. L'adventice des vaisseaux plus épais est irriguée par de petits vaisseaux sanguins, les *vasa vasorum* qui plongent dans la *media*.

Cette organisation en strates subit des différenciations selon la localisation du vaisseau dans l'arbre vasculaire dépendant de deux facteurs principaux :

- ◇ **Facteurs mécaniques.** La pression sanguine et les forces hémodynamiques s'appliquant sur la paroi du vaisseau vont déterminer l'arrangement de l'endothélium et des tissus musculaires et élastiques.
- ◇ **Facteurs métaboliques.** Les besoins locaux des tissus, particulièrement pour la microvasculature, vont impacter la différenciation des vaisseaux.

1.1.1.2 L'endothélium et la cellule endothéliale

L'endothélium vasculaire est une barrière sélective à la diffusion entre deux compartiments du milieu interne : le plasma et le fluide interstitiel. Il est hautement différencié pour contrôler les échanges bidirectionnels de petites molécules et le transport des macro-molécules. Trois formes d'endothélium peuvent être identifiées :

- ◇ **Endothélium fenestré.** Caractérisé par la présence de nombreuses ouvertures trans-cellulaires appelées *fenestrae*.
- ◇ **Endothélium continu.** Dépourvu de *fenestrae* et caractérisé par des jonctions intercellulaires serrées.
- ◇ **Endothélium discontinu ou sinusoïdal.** Caractérisé par la présence de larges gaps comme par exemple dans les tissus hématopoïétiques.

La cellule endothéliale est une unité répétée quasiment uniformément dans l'endothélium. D'une dimension de 10 à 15 microns de large par 20 à 25 microns de long, elles sont orientées dans la longueur en fonction du flux sanguin. Pour l'ensemble de l'appareil vasculaire, une quantité de 6×10^{13} cellules endothéliales a été estimée pour une surface totale de 4000 - 7000 m² et un poids total de 1 kg [Wolinsky 1980].

En plus du noyau, les cellules endothéliales contiennent un jeu classique d'organelles : réticulum endoplasmique lisse et strié, ribosomes, appareil de Golgi, mitochondries, lysosomes (plus fréquents dans les artères) et vésicules multi-lamellaires. À cela s'ajoutent, des structures en bâtonnets granulaires incluses dans une matrice dense, identifiées par Weibel et Palade [Weibel 1964]. Elles sont le site de synthèse du facteur de Von Villerbrand (rôles divers dans l'adhésion à la matrice extra-cellulaire). Les corps de Weibel-Palade sont un élément caractéristique des cellules endothéliales.

L'une des caractéristiques, que l'on associe au transport intense réalisé par les cellules endothéliales, est leur grande densité en vésicules (environ 5 000 à 10 000 par cellule) pour une épaisseur très fine de l'ordre de 0,2 - 0,4 microns pour les zones les plus fines et 5 microns pour les zones les plus épaisses. Ces invaginations lisses et uniformes (60 - 70 nm) de la membrane (voir figure 1.2) furent nommées **vésicules plasmalemmales** par Palade [Palade 1953] puis *caveolae* ou **cavéoles** ("petites caves") de part leur forme caractéristique en oméga [Yamada 1955]. Ces vésicules, qui possèdent une ouverture, d'environ 35 nm de diamètre, fermée par un fin diaphragme [Bruns 1968], voient leur fréquence varier largement selon leur tissu d'origine. On citera ici l'exemple d'un endothélium de muscle squelettique dans lequel, le volume estimé en cavéoles par cellule est de environ 1200/ μm^3 , contre environ 130/ μm^3 dans les capillaires pulmonaires [Simionescu 1983].

Une autre caractéristique importante des cellules endothéliales est l'organisation de leurs jonctions. Comme dans d'autres épithéliums, les jonctions serrées vont jouer un rôle dans la perméabilité de l'endothélium en régulant les liens mécaniques entre les cellules avoisinantes. Ces liens représentent l'une des principales barrières à la diffusion para-cellulaire [Heiskala 2001]. Chaque segment vasculaire possède des jonctions cellulaires dont l'organisation est caractéristique et reflète les différents degrés de densité et de couplage intercellulaire. Généralement, les jonctions cellulaires sont composées de plus de jonctions serrées au niveau des artères et artérioles, que dans les capillaires, et enfin, que dans les veines et veinules [Mehta 2006].

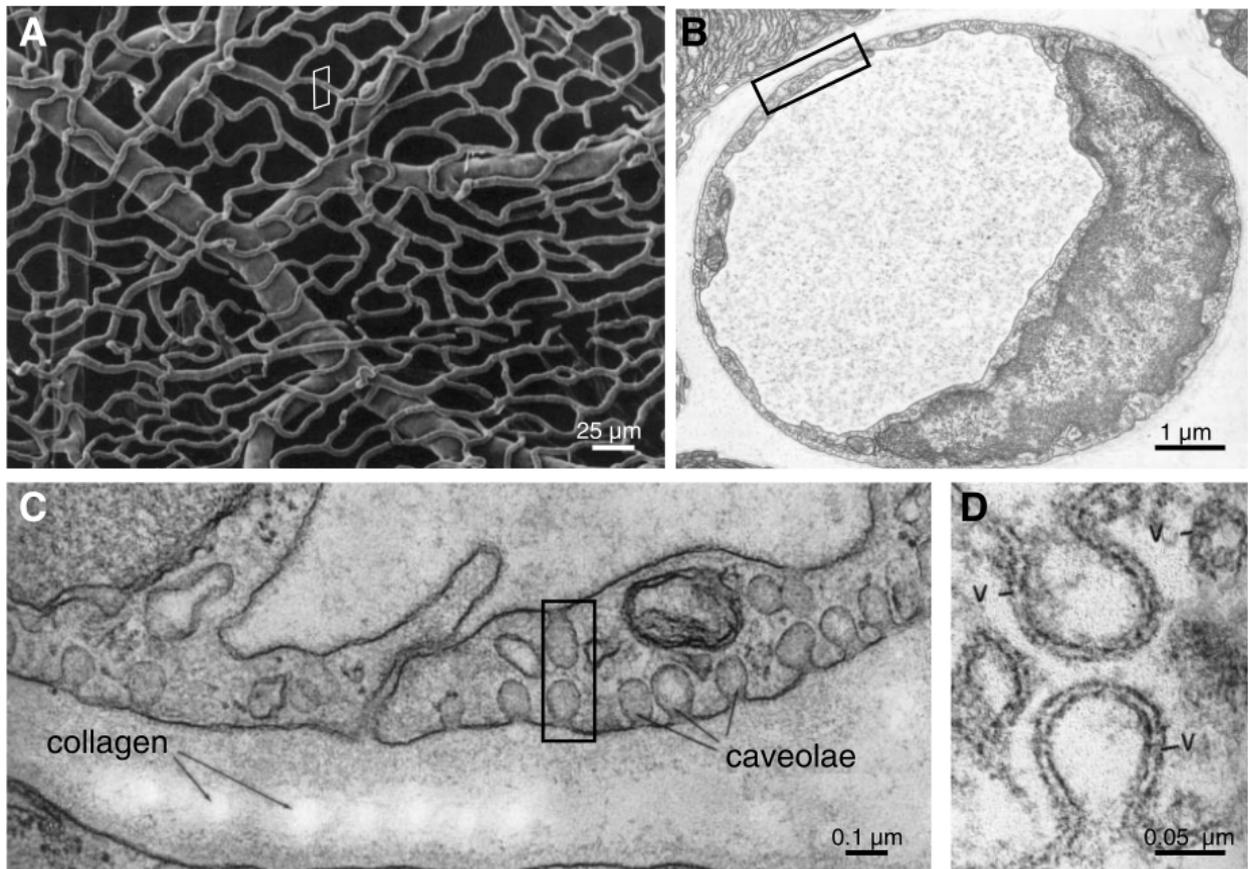


FIGURE 1.2 – Ultra-structure d'un réseau de capillaires sanguins, cellule endothéliale et cavéoles. **a** - Ultra-structure d'un réseau de capillaires d'estomac : réplique visualisée en microscopie électronique à balayage. Les vaisseaux sous-muqueux sont visualisés sous la matrice de capillaires de la muqueuse [Imada 1987]. **b** - Section transversale montrant une cellule tapissant la lumière du capillaire observée en MET (correspondant à la zone délimitée en **a**) [Bolender 1974]. **c** - Grossissement supérieur d'une région semblable à la zone identifiée sur l'image **b**. Les vésicules plasmalemmales ou cavéoles sont ouvertes sur la région luminale comme basale [Fawcett 1965]. **d** - Cavéoles (vésicules notées d'un *v*), ouvertes sur l'extérieur ou isolées [Bruns 1968]

L'endothélium agit comme une barrière contrôlant le trafic des macromolécules et des solutés entre le fluide sanguin et le fluide interstitiel. Pour franchir cette barrière, les macromolécules vont pouvoir emprunter deux voies, entre ou au travers des cellules. Le transport paracellulaire dans un endothélium sain est limité aux molécules d'une taille inférieure à 6 nm en absence d'ouverture des jonctions intracellulaires [von Eckardstein 2009]. Le transport trans-cellulaire, sujet de cette étude, met en jeu des voies de trafic membranaire communes aux mécanismes d'endocytose [Simionescu 1988]. Une fois endocyté, un cargo pourra ainsi être dirigé vers la transcytose ou les voies de dégradations cellulaires. Nous nous focaliserons donc, dans la partie suivante, sur l'étude des mécanismes d'endocytose.

1.1.2 Endocytose

L'endocytose est le premier mécanisme permettant la création de nouvelles membranes intracellulaires à partir de la membrane plasmique. La cellule va intégrer les lipides de la membrane plasmique, les protéines associées et du milieu extra-cellulaire, qu'elle va ensuite pouvoir rediriger vers ses voies de dégradation pour utilisation (figure 1.3). Ce processus s'oppose à l'exocytose, c'est à dire, la fusion de membranes intracellulaires à la membrane plasmique, permettant l'expulsion de matériel cellulaire dans l'environnement.

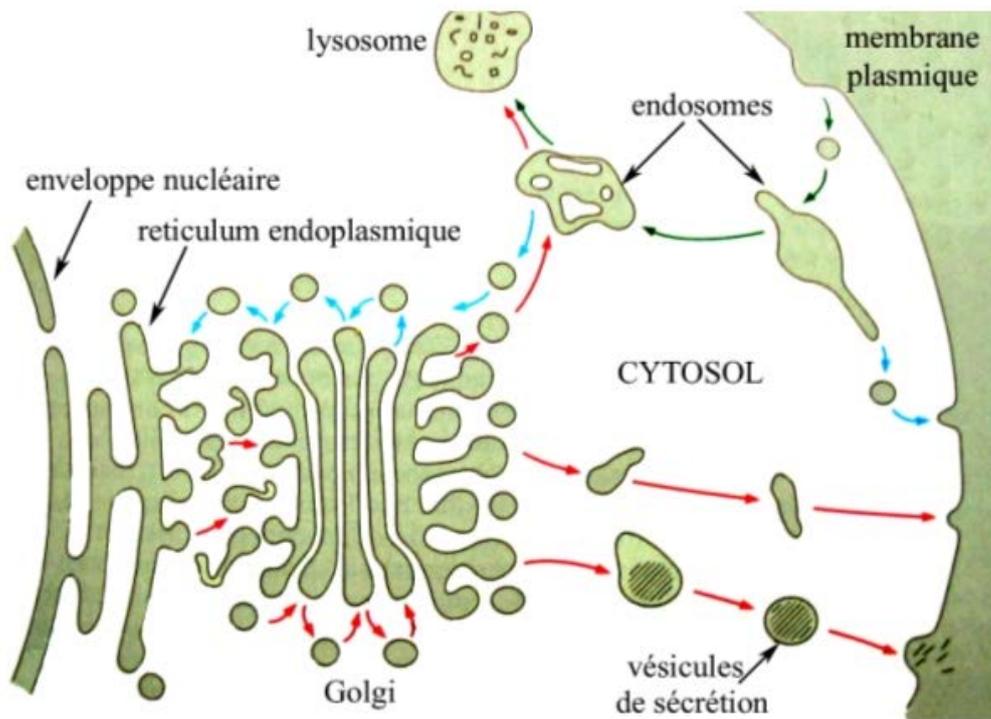


FIGURE 1.3 – Schéma simplifié des mécanismes d'endocytose, de la compartimentation cellulaire, l'exocytose et de la dégradation. Les vésicules de transport permettent la communication des différents compartiments cellulaires. Dans la voie endocytique (flèches vertes), les cargos sont dirigés, après internalisation à la membrane plasmique, vers les endosomes précoces puis tardifs, puis vers les lysosomes pour dégradation. Une partie des éléments endocytés va également être recyclée vers la membrane plasmique (flèches bleues), l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique, pour réutilisation. En rouge, sont figurés les mécanismes d'exocytose et de sécrétion. Adapté de [Alberts 2013]

C'est l'endocytose qui va réguler la sensibilité de la cellule à son environnement par le jeu de l'internalisation de ses récepteurs membranaires. Les processus d'endocytose jouent également un rôle dans la régulation de mécanismes aussi variés que la mitose cellulaire [Schweitzer 2005] [Boucrot 2007], la migration cellulaire [Caswell 2008], le recrutement membranaire d'antigènes [Mahnke 2000], la régulation positive de signaux intra-cellulaires [Hoeller 2005] et l'internalisation de pathogènes [Mercer 2009].

Il existe de nombreuses voies d'endocytoses de cargos divers. Si une bonne connaissance de ces cargos est actuellement disponible, les mécanismes d'internalisation restent à préciser. Un mécanisme

d'internalisation contrôlant l'endocytose d'un cargo donné va, tout d'abord, nécessiter un jeu de mécanismes de sélection à la membrane plasmique. Nous ferons ici la différence entre des mécanismes non-spécifiques d'endocytose et des mécanismes basés sur la reconnaissance du cargo, également appelés endocytose récepteur dépendante [Simionescu 1990].

Endocytose non-spécifique. Également appelée endocytose en phase-fluide, ce processus va permettre l'internalisation non-sélective en masse de molécules. Ce processus va permettre d'acheminer ces cargos aux endosomes et lysosomes en vue de dégradation. Un exemple de ce processus est présenté sur la figure 1.4. Le processus va dépendre de la concentration dans le plasma du cargo à transporter mais également de la capacité du cargo à se lier électrostatiquement à la membrane plasmique et à certains de ses micro-domaines. Cela est démontré par l'utilisation de marqueurs de l'internalisation en phase fluide tels que la ferritine ou des dextrans [Simionescu 2002].

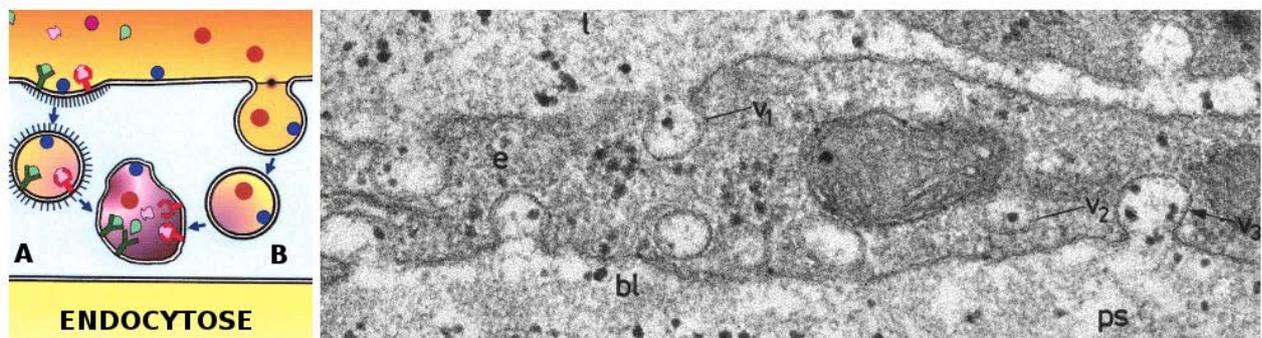


FIGURE 1.4 – Différences entre endocytose sélective (A) et endocytose en phase fluide (B) [Simionescu 2002]. Exemple d'internalisation en phase fluide dans l'endothélium du glycogène conjugué à des billes d'or colloïdal.

Endocytose dépendante d'un récepteur ou endocytose spécifique. Elle implique une reconnaissance du cargo à transporter par un récepteur situé à la membrane plasmique ou dans un micro-domaine. On citera ici les exemples de transport spécifique de différents constituants du plasma sanguins : le LDL, l'insuline, l'albumine, la transferrine [Simionescu 1990]. Nous citerons également l'exemple des récepteurs *scavenger* tels que SREC et LOX-1, qui participent au retrait de la circulation systémique des formes oxydées du LDL dans l'endothélium [Steinbrecher 1999].

Après sélection du cargo, la zone de la membrane plasmique qui effectuera le transport devra s'invaginer et se séparer. Des mécanismes, permettant le transport de la vésicule ainsi formée jusqu'à sa destination, puis sa fusion avec la membrane cible, devront être mis en place. Il s'agit d'un transport vésiculaire spécifique.

1.1.2.1 Critères morphologiques et moléculaires des voies d'endocytose

Chaque voie d'internalisation va comporter son lot de critères morphologiques et moléculaires permettant son identification. Sur la figure 1.5, les voies d'internalisation les plus communes sont schématisées.

En raison de la prépondérance des travaux basés sur l'endocytose par voie clathrine, au début des années 1990, l'existence de voies d'internalisation ne dépendant pas des vésicules clathrine faisait

débat. Les premières études sur l'internalisation de toxines bactériennes en présence de perturbateurs pharmacologiques, documentés pour ne pas perturber la voie d'endocytose clathrine dépendante, ont montré une diminution de l'internalisation indiquant l'existence potentielle d'autres voies d'endocytose [Sandvig 1990]. Avec l'arrivée des outils génétiques, en 1995, il a été possible de montrer le maintien de l'internalisation de l'HRP en phase fluide après blocage de la voie clathrine par expression d'une forme négative dominante de la dynamine [Damke 1995], du récepteur du facteur de croissance épidermal EPS15 [Benmerah 1998] et de la protéine adaptatrice AP180 [Ford 2001].

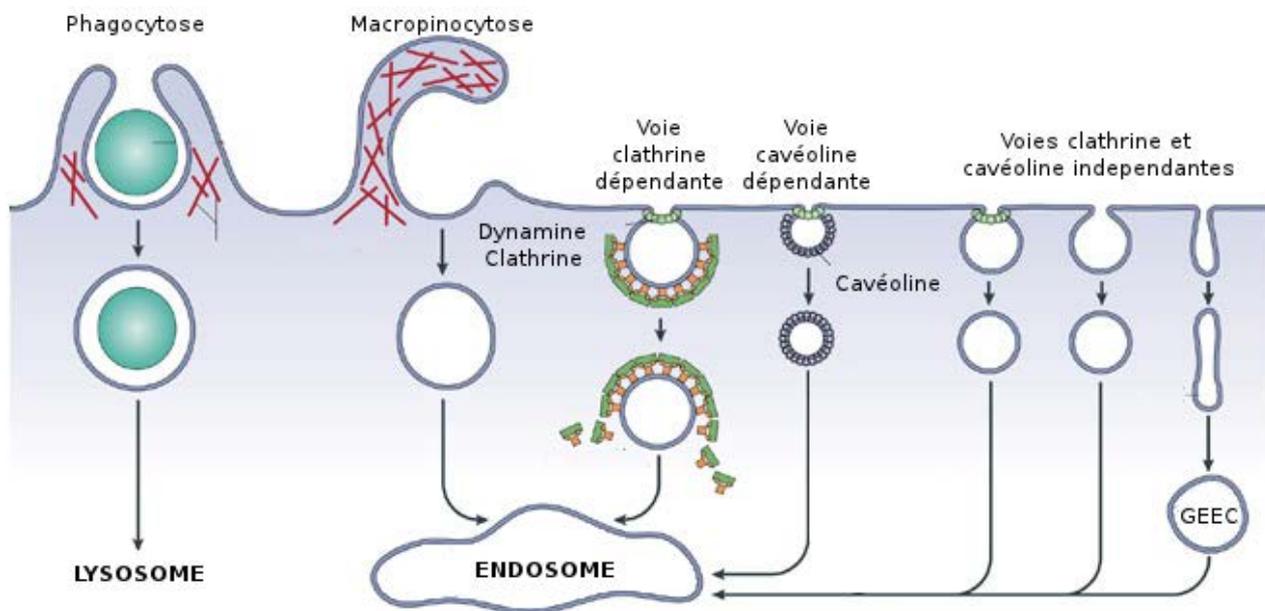


FIGURE 1.5 – Voies d'internalisation dans les cellules. L'internalisation des particules et macromolécules les plus larges passe par la phagocytose lorsque l'objet est reconnu et par macropinocytose pour des mécanismes en phase fluide. Ces deux procédés dépendent d'une modification morphologique de la membrane plasmique par le réseau d'actine (en rouge). Les autres voies d'endocytoses comprennent les voies clathrine et cavéole dépendantes et indépendantes. [Mayor 2007]

Il est possible de différencier les voies d'endocytose sur des critères morphologiques. Les puits clathrines se distinguent par leur manteau protéique caractéristique en microscopie électronique à transmission. Les cavéoles sont, quant à elles, dépourvues de ce manteau dense mais peuvent se retrouver organisées sous forme de grappes de cavéoles. On distinguera ensuite les voies d'endocytoses indépendantes de la clathrine et de la cavéole (*CLICs*) caractéristiques par leurs formes tubulaires et enfin les voies de macropinocytose et phagocytose. Les caractéristiques morphologiques et moléculaires principales des voies d'endocytoses citées ici sont regroupées dans le tableau 1.1 et développées dans les parties suivantes. Nous commencerons par la phagocytose, la macropinocytose, puis par la voie d'endocytose clathrine dépendante, la voie cavéoline dépendante et les voies clathrines et cavéolines indépendantes.

Mécanismes d'endocytose	Morphologie	Exemples de cargos	Protéines impliquées
Phagocytose	Forme du cargo	Pathogènes et résidus apoptotiques	Actine, dynamine, rac1, protéines d'adhésion, Rho kinase, cdc42
Macropinocytose	Larges vésicules	Macro-molécules de tailles importantes, fluides	Actine, Rac1, cdc42
Clathrine dépendants	Vésicules 80-100 nm	Toxine anthrax, CTxB, récepteur de la transferrine	Dynamine, clathrine, actine, epsine,...
Cavéoline dépendants	Vésicules 60-80 nm	CTxB, SV40	Cavéolines, cavines, actine, dynamine,...
CLIC/EECG	Tubulaire ou annulaire	CTxB, HPR, fluides	Actine, cdc42, arf1, graf, ...

TABLE 1.1 – Caractéristiques morphologiques et moléculaires des voies principales d'endocytose.

1.1.2.2 Phagocytose

Chez les organismes supérieurs, la phagocytose est principalement utilisée pour l'élimination des pathogènes de tailles importantes et des débris cellulaires. Cette voie est mise en place dans des cellules hautement spécialisées comme les macrophages, les neutrophiles ou les monocytes. Il s'agit d'un processus actif, hautement régulé par des récepteurs spécifiques situés à la membrane plasmique. Parmi ces récepteurs on peut trouver ceux qui vont reconnaître directement les pathogènes, comme le récepteur au mannose (reconnaissance des chaînes oligosaccharides branchées présentes en surface de bactéries et champignons) ou les récepteurs des intégrines [Aderem 1999]. Cette reconnaissance par les récepteurs membranaires induit, via une cascade de signalisation, le remodelage du réseau d'actine pour former des pseudopodes. Le cargo va ainsi être enveloppé dans un phagosome qui sera acheminé vers les lysosomes pour dégradation. Chez les macrophages, certains peptides bactériens seront ensuite recyclés à la membrane pour induire une réponse immune.

1.1.2.3 Macropinocytose

La macropinocytose est une forme régulée d'endocytose qui permet l'internalisation de macromolécules en phase fluide. En 1931, Warren Lewis est le premier à décrire morphologiquement ce processus par micro-cinématographie en accélérant une prise de vue de macrophages de rat [Lewis 1931]. Lewis nomme ce processus pinocytose ce qui évoluera ensuite en macropinocytose, afin de mieux différencier cette voie d'internalisation de l'ensemble des processus de transport par de petites vésicules.

La macropinocytose est l'une des voies permettant à la cellule d'internaliser de larges quantités de fluide extra-cellulaire. Jusqu'à peu, elle était l'unique candidat permettant l'internalisation massive d'éléments fluides par la cellule. Cette place est remise en cause depuis la découverte de l'importance de la voie CLIC/GEEC pour l'internalisation de l'HRP [Howes 2010] qui sera discuté par la suite.

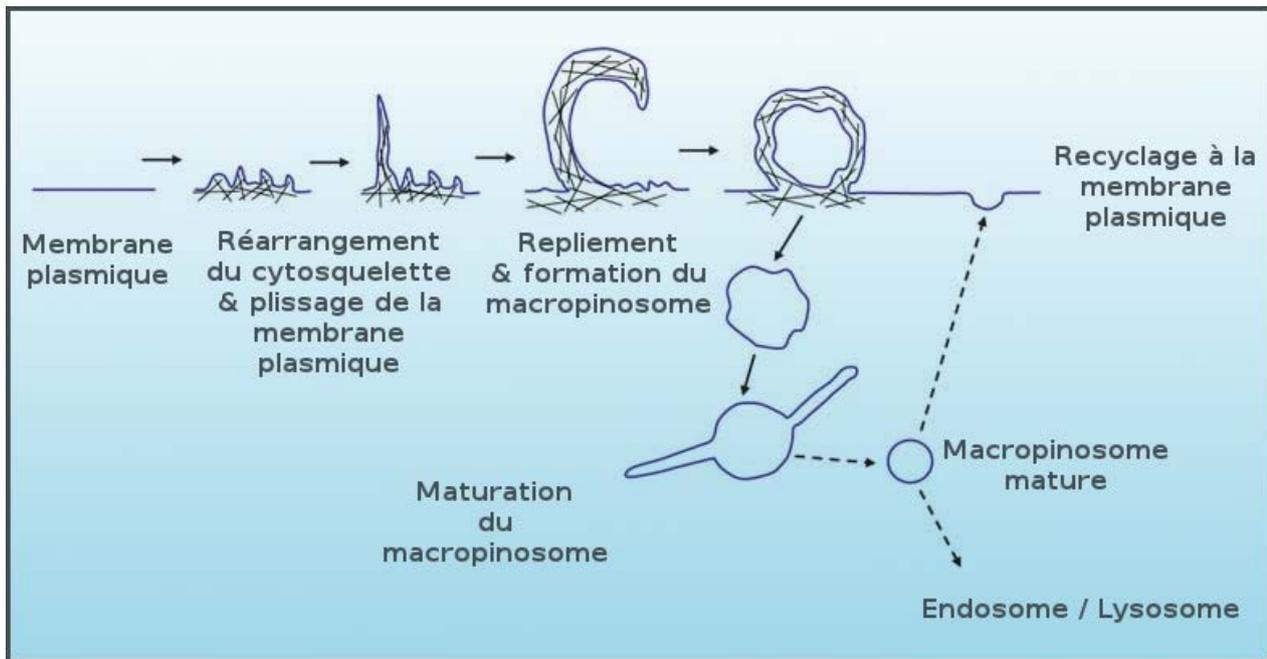


FIGURE 1.6 – Voie d'endocytose : macropinocytose. La macropinocytose dépend d'une réorganisation de la membrane plasmique par l'actine amenant à la formation de plis membranaires. Ces plis peuvent se replier sur eux-mêmes et former une vésicule en fusionnant avec la membrane plasmique. Ces macropinosomes piègent ainsi les fluides. Après maturation, les macropinosomes prennent une forme sphérique et sont dirigés vers les voies de dégradation ou recyclés à la membrane plasmique. [Lim 2011]

La macropinocytose est basée sur le repliement de la membrane plasmique via l'actine [Gottlieb 1993]. Comme on peut le voir sur la figure 1.6, une partie de ces plis va entraîner la formation de vésicules irrégulières, les macropinosomes. Ces macropinosomes se distinguent notamment des autres types de vésicules endocytiques par leur taille importante (inférieure à 0,2 micron en moyenne mais pouvant atteindre jusqu'à 5 microns de diamètre [Hewlett 1994]) et leur absence de revêtement de surface. Leur taille caractéristique les différencie des vésicules de micropinocytose (clathrines dépendante et cavéoline dépendante) et leur permet d'internaliser de larges quantités de matériel. Leur identification est possible via l'utilisation de marqueurs de phase fluide comme l'*HRP* et le dextran.

Les mécanismes moléculaires exacts impliqués dans la macropinocytose ne sont pas encore totalement connus. Néanmoins, le remodelage du cytosquelette nécessaire requiert l'activité de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) à la membrane plasmique. Les Rho GTPases Rac1 [West 2000] et cdc42 [Garrett 2000] jouent également un rôle dans la polymérisation de l'actine. L'activation de PI3K et l'action des GTPases Rho sont communes à divers processus dépendants de l'actine tels que la phagocytose (voir table 1.1). Des traitements bloquant ces processus, tels que l'utilisation de la worthmannine sont connus et fonctionnent sur la macropinocytose (même s'il ne lui sont pas spécifiques). De manière intéressante, la formation des macropinosomes est sensible à l'inhibition des échanges Na^+ / H^+ par l'amiloride et ses analogues [Meier 2002].

1.1.2.4 Endocytose clathrine dépendante

Longtemps considérée comme la seule voie de micropinocytose médiée par récepteur, la voie d'endocytose clathrine dépendante est la voie d'internalisation la mieux caractérisée. Lors de l'endocytose, une large variété de récepteurs trans-membranaires et leurs ligands sont empaquetés et transportés dans des vésicules mantelées par des clathrines. Ces vésicules sont utilisées dans l'endocytose mais peuvent également faire le lien entre différents compartiments intra-cellulaires. Dans les fibroblastes, l'endocytose clathrine dépendante est considérée capable d'internaliser presque l'équivalent de la membrane plasmique d'une cellule en une heure [Bretscher 1982].

La clathrine, composée d'une chaîne lourde (190 kDa) et d'une chaîne légère (25 kDa) s'associe spontanément sous forme de trimères. La formation des puits mantelés commence à la membrane plasmique avec le recrutement de ces triskélions par des complexes protéiques d'adaptation (le plus connu étant AP2 [Sorkin 2004]) qui font le lien entre le domaine cytoplasmique des récepteurs à internaliser et le domaine de liaison à la clathrine. Ce processus va induire la formation d'un réseau de clathrines de forme polygonale induisant une courbure progressive de la membrane plasmique. La formation de cette "cage" au cours du temps, a pu être visualisée en 1980 (voir figure 1.7).

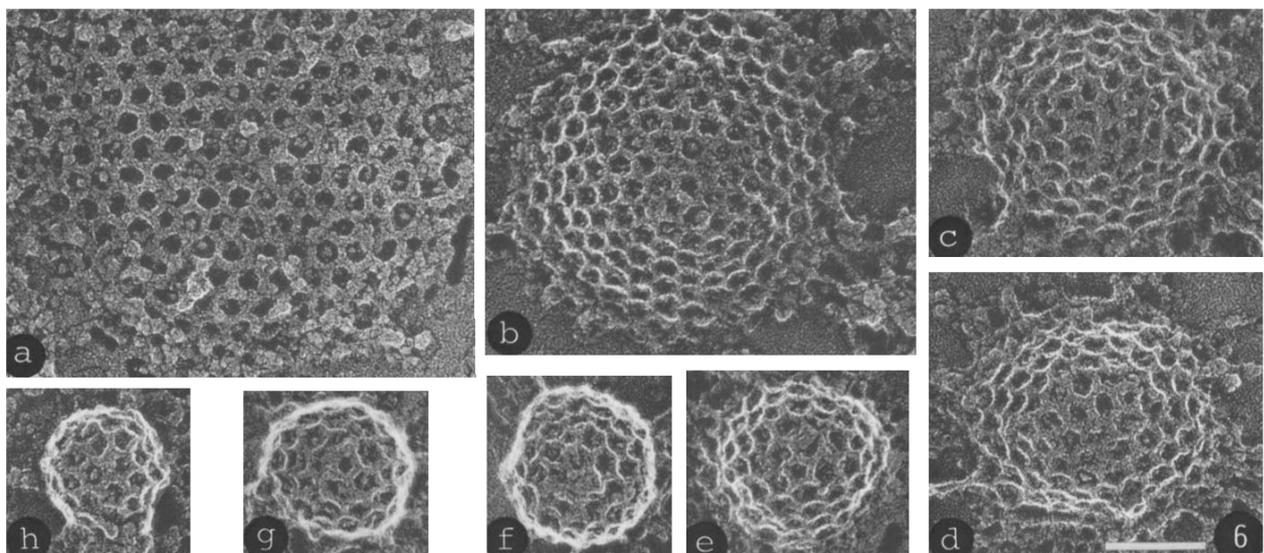


FIGURE 1.7 – Vues en microscopie électronique après cryo-fracture du bourgeonnement d'une vésicule clathrine à différents stades : de la formation de patches de 10 à 500 nm de diamètre (a) à la formation d'une vésicule fermée (h). [Heuser 1980]

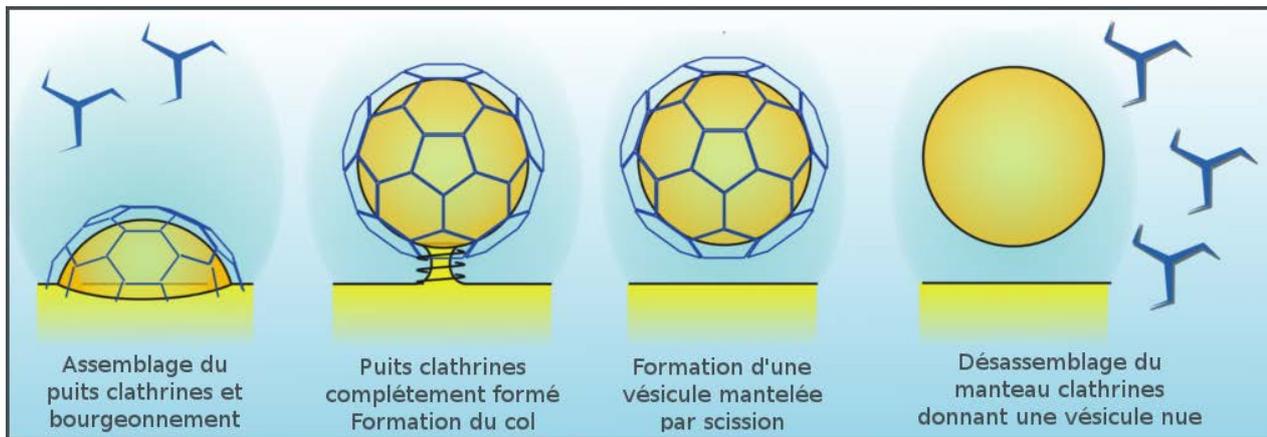


FIGURE 1.8 – Diagramme schématisant des différents stades de bourgeonnement et de scission des puits mantelés clathrine. Après le bourgeonnement, le réseau de clathrines est éliminé donnant une vésicule nue d'une taille d'environ 100 nm. Figure adaptée de [Doherty 2009].

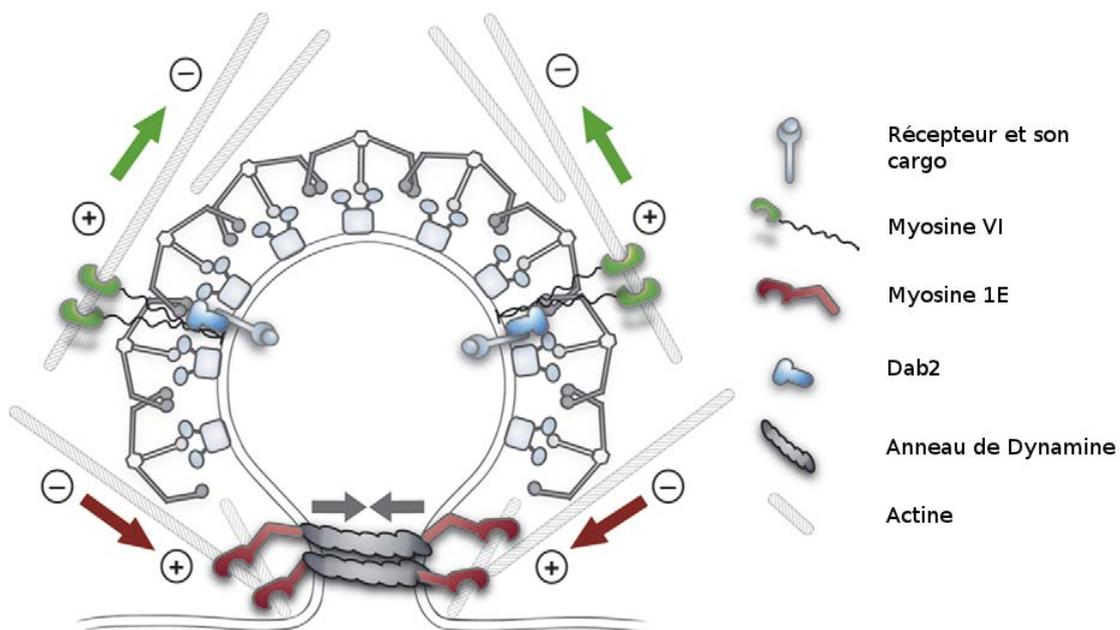


FIGURE 1.9 – Mécanismes de scission d'une vésicule mantelée clathrine. La constriction du col de la vésicule par la dynamine n'est probablement pas suffisante pour permettre la fission de la vésicule mantelée [Roux 2006]. Une traction par des protéines motrices de myosine permettrait le détachement de la vésicule [Spudich 2006] [Krendel 2007]. Cette figure présente le modèle spéculatif suivant : la partie positive du moteur myosine 1E tire l'anneau de dynamine dans la direction de la membrane plasmique pendant que le moteur myosine VI tire le bourgeon vésiculaire vers le cytosol. La tension résultante permettrait alors la séparation au niveau du col. Figure adaptée de [Ungewickell 2007].

Ces puits mantelés ont une durée de vie très courte dans la cellule. Le processus de bourgeonnement (figure 1.8) prend place sur un laps de temps de l'ordre de la minute. La fission de la vésicule, étape finale permettant la libération dans le cytoplasme de la vésicule mantelée, est médiée par l'action de la dynamine, une GTPase venant s'auto-assembler en forme de spirale autour du col de la vésicule. Le mécanisme de fission nécessiterait également l'action de deux moteurs de myosine et du cytosquelette d'actine pour décrocher la vésicule de la membrane plasmique (voir figure 1.9).

La vésicule d'endocytose va ensuite se départir de son manteau protéique et fusionner avec les endosomes précoces (ou autre compartiment cible). Les ligands et les récepteurs vont ensuite se dissocier. Les récepteurs pourront être recyclés à la membrane plasmique par transport rétrograde. Le contenu des endosomes pourra continuer son trajet vers la dégradation dans les lysosomes.

La classe de molécules pharmaceutiques des cations amphiphiles, tels que la chlorpromazine, provoque par l'inhibition de l'accrochage à la membrane plasmique d'AP-2, la disparition des puits clathrines à la membrane plasmique et la relocalisation de la clathrine et de l'assemblage AP-2 dans les endosomes [Wang 1993]. Il s'agit ici d'un outil simple pour étudier les phénomènes d'endocytose en l'absence d'internalisation par les vésicules de clathrine.

1.1.2.5 Endocytose cavéole dépendante

La surabondance de cavéoles dans certaines cellules de l'organisme telles que les cellules endothéliales, mais également les fibroblastes ou encore les adipocytes a longtemps questionné les chercheurs vis à vis de leurs rôles. Les cavéoles ont été impliquées dans les fonctions d'endocytose, de transcytose et de transduction des signaux calciques et de nombreux autres événements de signalisation [Lisanti 1995] [Williams 2005]. Elles sont également utilisées par des pathogènes comme porte d'entrée pour l'endocytose (exemple de SV40 [Pelkmans 2001]) et ce, même dans le cas de pathogènes de plus fortes tailles que les cavéoles [Shin 2000]. Il a également été montré que la liaison de l'albumine à son récepteur, la glycoprotéine gp60, localisée au niveau des cavéoles, induit la phosphorylation de ce dernier. Ceci activerait alors son internalisation par les cavéoles [Tiruppathi 1997]. La voie cavéole serait donc capable d'endocytose médiée par un récepteur et d'endocytose en phase fluide.

Les cavéoles (figure 1.2), sont des invaginations de la membrane pourvues d'un fin manteau protéique difficilement observable en microscopie électronique [Peters 1985]. Elles sont décrites comme un micro-domaine spécialisé, morphologiquement distinct de la membrane plasmique par sa taille de l'ordre de 60 à 80 nm de diamètre, sa forme en oméga et sa structure spécialisée au niveau du col, le diaphragme stomatique (généralisé par la protéine trans-membranaire PV1) [Stan 2004].

Différentes études ont montré l'importance d'une famille de protéines, les cavéolines, dans la formation et la stabilité des cavéoles [Rothberg 1992] [Fra 1995]. Il existe trois isoformes de cavéolines, exprimées en fonction du type cellulaire : la cavéoline 1 (CAV1) et la cavéoline 2 (CAV2) sont abondantes dans les cellules non-musculaires (cellules endothéliales, adipocytes, *etc.*), alors que la cavéoline 3 (CAV3) est exprimée dans les cellules musculaires uniquement [Tang 1996]. La délétion génétique de CAV1 et de CAV3 cause la perte des cavéoles dans les cellules des types correspondants [Drab 2001] [Galbiati 2001]. La perte de CAV2 n'entraîne pas une disparition des cavéoles *in vivo* [Razani 2002], mais certaines études montrent un effet contributeur sur la formation des cavéoles dans certains types cellulaires [Sowa 2003]. La présence d'environ 144 molécules de cavéolines par cavéole, sous forme d'oligomères les stabilise et leur donne leur forme caractéristique [Pelkmans 2005] (voir figure 1.10).

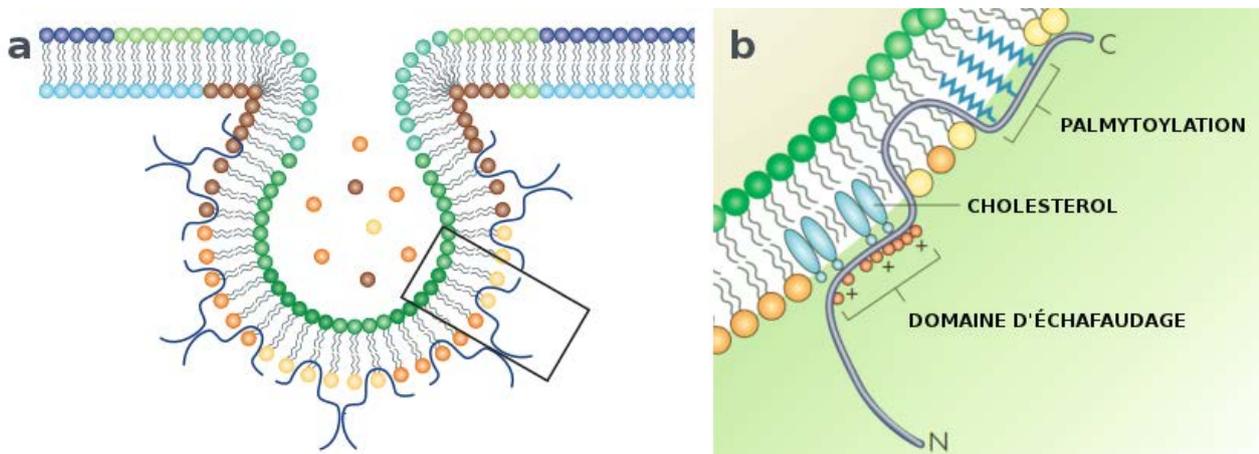


FIGURE 1.10 – Représentation schématique de l'insertion des cavéolines dans la membrane plasmique (a). Insertion d'une cavéoline dans la membrane (b), avec les côtés N- et C- terminaux du côté du cytosol et le domaine intra-membranaire structuré en épingle à cheveux. Le domaine d'échafaudage, une région hautement conservée dans les cavéolines, aurait un rôle dans les interactions avec le cholestérol. La région C-terminale est modifiée par des groupes palmitoyls s'insérant dans la double membrane. [Parton 2007]

Les cavéoles ont été montrées comme étant hautement enrichies en lipides par rapport à la membrane plasmique ordinaire [Örtegren 2004]. Elle sont également enrichies en glycosphingolipides (GM1, GM3), en sphingomyéline et en cholestérol (environ 20000 molécules estimées dans des cavéoles isolées [Örtegren 2004]).

Contrairement à l'endocytose clathrine dépendante, aucune protéine adaptatrice permettant la reconnaissance et le recrutement de récepteurs transmembranaires n'a été identifiée dans l'endocytose cavéoles dépendante. Les cavéoles sont également des structures beaucoup plus stables à la membrane plasmique que les puits mantelés clathrines avec un temps de demi-vie de 20 minutes [Conner 2003]. La fission de la cavéole lors de l'endocytose est, par contre, dépendante de la dynamine [Oh 1998], comme pour l'endocytose clathrine dépendante (voir figure 1.11).

Après la fission, les cavéoles conservent leur forme lors de l'endocytose [Pelkmans 2004]. Les cavéoles décrochées de la membrane plasmique furent longtemps considérées comme capables de se lier à un compartiment original de la cellule, le cavéosome [Pelkmans 2001]; compartiment au pH neutre et séparé de la voie clathrine et de la voie endo-lysosomiale. De manière étonnante, un certain nombre d'autres études font le lien entre les cavéoles et les autres voies d'endocytose. Des marqueurs internalisés par voie cavéole ont, par exemple, été colocalisés avec des ligands endocytés par la voie clathrine, au niveau des endosomes précoces [Tran 1987] [Pol 2000]. De la cavéoline endogène a également été localisée dans les endosomes de recyclage [Gagescu 2000]. La polémique s'arrêta finalement en 2010, avec un travail, provenant de l'équipe même ayant suggéré l'existence du cavéosome, ne montrant aucune évidence de l'existence d'un tel compartiment et proposant, faute de preuves suffisantes, d'abandonner le terme cavéosome [Hayer 2010].

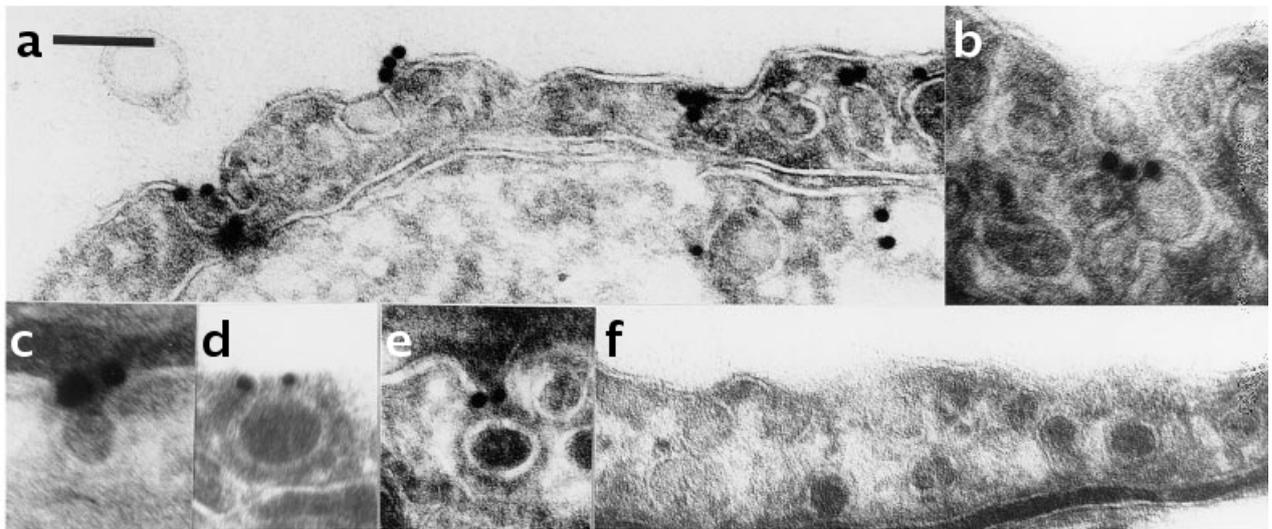


FIGURE 1.11 – Localisation de la dynamine au niveau du col de cavéoles dans l'endothélium *in-vivo*. Immuno-marquage en microscopie électronique à transmission sur coupes ultra-fines d'endothélium pulmonaire de rat (or colloïdal 15 nm). (a-e) anticorps anti-dynamine; (f) anticorps monoclonal contrôle. Échelles : 150 nm (a, b, d-f); 72 nm (c). [Oh 1998]

1.1.2.6 Endocytose clathrine et cavéole indépendantes

En complément des voies d'endocytose clathrine et cavéoline dépendantes, il existe potentiellement trois voies supplémentaires [Mayor 2007] que l'on peut définir en fonction de leur régulation par de petites GTPases : RhoA [Lamaze 2001], ARF6 [Radhakrishna 1997] et CDC42 [Sabharanjak 2002] et de leur dépendance ou indépendance à la dynamine pour la fission membranaire. Cette classification repose sur des expériences de mutation de ces GTPases qui peuvent affecter différents processus cellulaires et ne représentent donc pas une preuve directe de leur rôle dans l'endocytose. Néanmoins, cette terminologie est représentative de l'influence des modifications de ces GTPases sur l'endocytose d'un jeu de marqueurs des voies clathrines et caveoles indépendantes.

Processus dynamine-indépendant, l'endocytose CDC42 dépendante est identifiable par la morphologie caractéristique de ses vésicules de transport principales dites CLICS (*clathrin-independent carriers*, voir figure 1.12).

Cette voie est identifiée comme l'une des voies principales d'endocytose en phase-fluide dans les fibroblastes. Elle jouerait également un rôle dans la motricité cellulaire, les processus d'adhésion cellulaire et de réparation membranaire. Les CLICs peuvent être polarisés lors du déplacement permettant le *turn-over* de composants de l'adhésion cellulaire tels que Thy-1 et CD44 dans le sens de déplacement [Howes 2010].

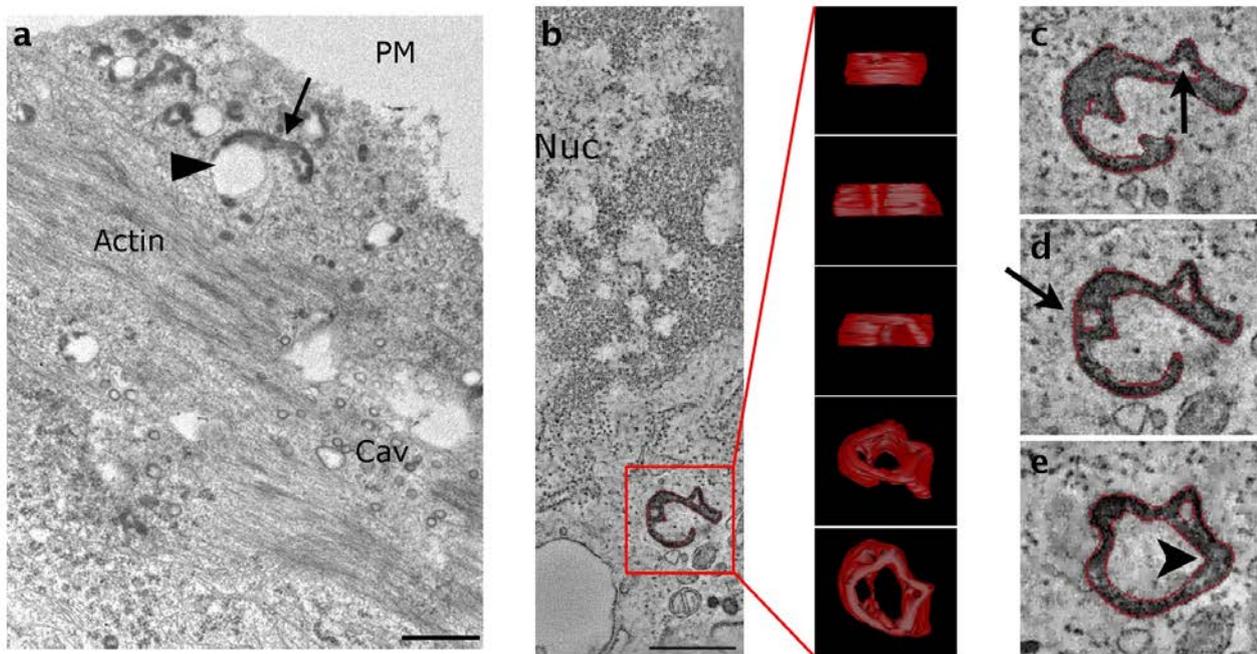


FIGURE 1.12 – Morphologie 3D des CLICs en microscopie électronique. Incubation de CTxB-HRP montrant la localisation des CLICs après congélation haute pression. **a** - des extensions tubulaires (flèche) se détachent de vésicules (tête de flèche) dans une forme en anneau caractéristique des CLICs. **b** - tomogramme d'une coupe en microscopie électronique. Plusieurs contourages de la zone du CLICs sont visualisés sous des angles différents et des agrandissements du tomogramme sont présentés en **c**, **d** et **e**. Des vésicules internes au CLICs sont visualisées par les flèches et la connexion complète de la structure est montrée en **e**. Échelles : 200 nm. [Howes 2010]

Les caractéristiques principales de ces structures sont : une scission de la membrane plasmique dynamine-indépendante, un enrichissement en protéines ancrées GPI et une dépendance à l'activité de ARF1 [Sabharanjak 2002] ; une sensibilité à la déplétion en cholestérol et une contribution importante à l'internalisation de la CTxB [Kirkham 2005] et à l'endocytose en phase fluide [Howes 2010]. Ces structures se détachent de la membrane et mûrissent en endosomes précoces enrichis en GPI pour rejoindre les voies de recyclage et de dégradation [Kalia 2006].

Afin d'assurer sa fonction de barrière, l'endothélium est capable de sélectionner les éléments nécessaires à l'alimentation des tissus sous-jacents. Un transport trans-endothélial, sans dégradation des cargos par les cellules endothéliales, est donc nécessaire. Ces mécanismes de transcytose sont développés dans la partie suivante.

1.1.3 Transcytose

La transcytose est le transport de macromolécules d'une face à l'autre d'une cellule par un système vésiculaire, historiquement mise en évidence pour la BSA dans l'endothélium pulmonaire [Simionescu 1981b]. Il s'agit d'une stratégie mise en place par les organismes multi-cellulaires pour transporter le matériel biologique entre différents environnements, sans perturbation. Les cellules ont

d'autres stratégies pour permettre un passage sélectif de cargos de plus petites tailles au travers de barrières cellulaires.

Le rôle de la transcytose dans l'homéostasie des micro-nutriments provenant de l'alimentation (vitamines, minéraux, et autres éléments) est marginal avec une dépendance principale vers les voies de transport paracellulaire [Bronner 1998] et par transport passif. On citera néanmoins ici l'exception de la vitamine B12, utilisant en partie un transport vésiculaire clathrine dépendant pour traverser les cellules intestinales [Russell-Jones 1998].

La transcytose joue également un rôle dans le transport nécessaire aux mécanismes de réponse immunitaire. On citera ici trois exemples : l'échantillonnage d'antigènes par les cellules épithéliales M dans les tissus lymphoïdes des appareils gastro-intestinal et urogénital [Neutra 1996] ; la libération d'IgA dans l'estomac, après passage au travers de l'épithélium digestif [Hunziker 1998] ; et enfin le transport des IgG maternels au niveau du placenta ou de l'intestin [Ghetie 1997].

1.1.3.1 Transcytose dans le système vasculaire *in-vivo*

La transcytose dans l'endothélium est la somme de différents types de transport basés pour majorité sur les cavéoles. L'endocytose et la transcytose dans l'endothélium partagent une grande partie des voies de transport intracellulaire.

Le transport non-spécifique va s'effectuer en phase fluide ou par des mécanismes d'absorption à la membrane apicale. Ces procédés ont été identifiés par l'utilisation de différents marqueurs de la phase fluide (glycogène, ferritine, dextran) [Simionescu 2002]. La transcytose par absorption à la membrane apicale implique un attachement électrostatique des macro-molécules à transporter à la membrane plasmique.

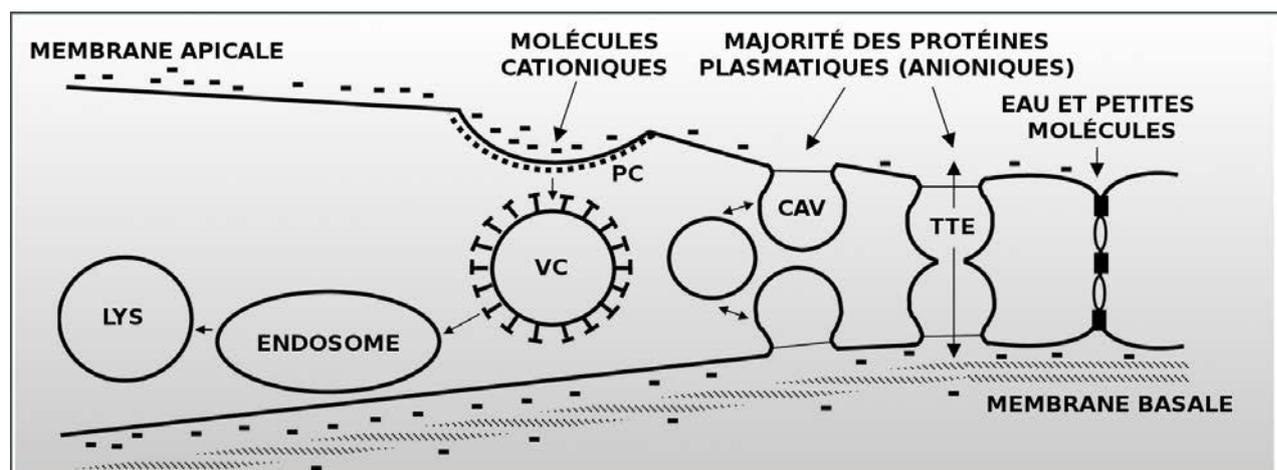


FIGURE 1.13 – Transport trans-endothélial. Lien entre la distribution des sites anioniques au niveau de la membrane plasmique et types de cargo pris en charge. (VC - vésicule clathrine ; LYS - lysosome ; CAV - cavéole ; TTE - tunnel trans-endothélial ; PC - puits clathrine). [Tuma 2003]

L'interface entre le sang et l'endothélium est complexe et dynamique (voir figure 1.13). La membrane plasmique en contact avec la lumière du vaisseau sanguin est classiquement chargée négativement ce qui lui permet de repousser les cellules sanguines également chargées négativement [Simionescu 1981c]. Les puits clathrines répartis le long de la membrane des cellules endothéliales sont également chargés négativement. Les molécules cationiques contenues dans le plasma sanguin auront donc une affinité supérieure pour ces micro-domaines, ce qui permettra leur endocytose vers les voies de dégradation cellulaire [Simionescu 1981a]. Les molécules anioniques, quant à elles, sont exclues de cette voie d'endocytose et vont être prises en charge au niveau des cavéoles ou des tunnels trans-endothéliaux pour effectuer la transcytose. Une répartition des vésicules de transport dans la cellule endothéliale est présentée en figure 1.14. On remarquera une grande densité de vésicules au niveau des jonctions intracellulaires et des zones périphériques des cellules de l'endothélium.

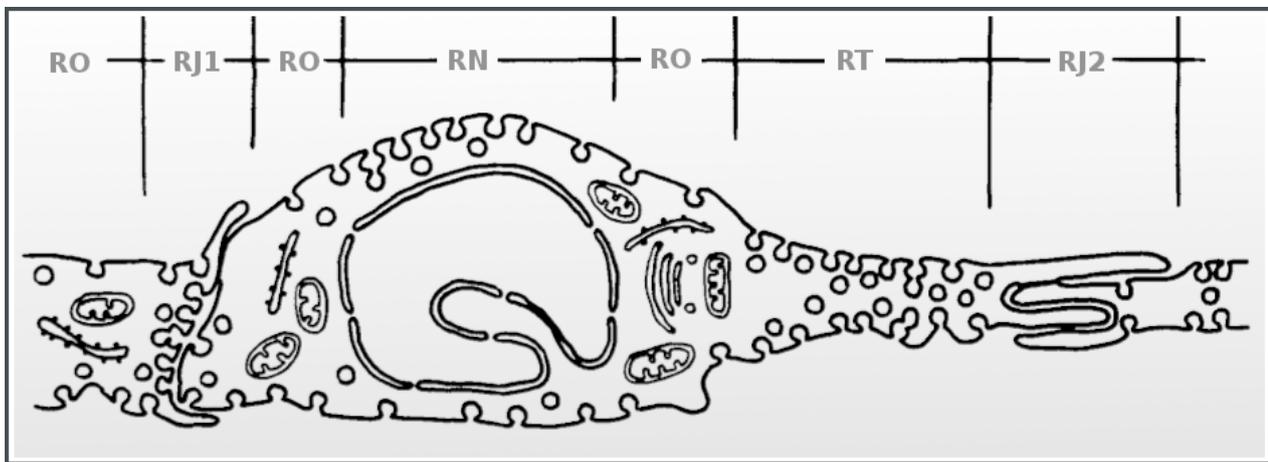


FIGURE 1.14 – Répartition vésiculaire dans la cellule endothéliale. On séparera quatre régions morphologiquement différentes dans l'endothélium aortique de rat : RO - régions riches en organelles ; RJ - régions proches des jonction inter-cellulaires caractérisées par un nombre important de vésicules et de possibles tunnels ; RN - région nucléaire avec quelques organelles et RT - région affinée de la cellule riche en vésicules permettant un transport efficace. [Ogawa 1993]

Même si la plupart des macro-molécules transportées dans l'endothélium sont en phase fluide, deux des mécanismes de transport les mieux étudiés dépendent d'un récepteur : l'albumine et les oroscomucoïdes. Tout commence par l'observation directe par microscopie électronique à transmission du transport de l'accumulation dans les cavéoles et du passage trans-endothélial de l'albumine de la lumière du vaisseau sanguin à la face basale (voir figure 1.15). Les principales protéines se liant à l'albumine furent par la suite identifiées (P18 et P31, des récepteurs *scavengers* [Ghinea 1989] et le récepteur à l'albumine GP60 [Schnitzer 1988]). Le lien de l'albumine à GP60 active le transport trans-endothélial de l'albumine par les cavéoles *in-vitro* et *in-vivo* [Vogel 2001]. Cette transcytose a également été montrée comme tyrosine-kinase dépendante (par inhibition à la génistéine) [Tirupathi 1997].

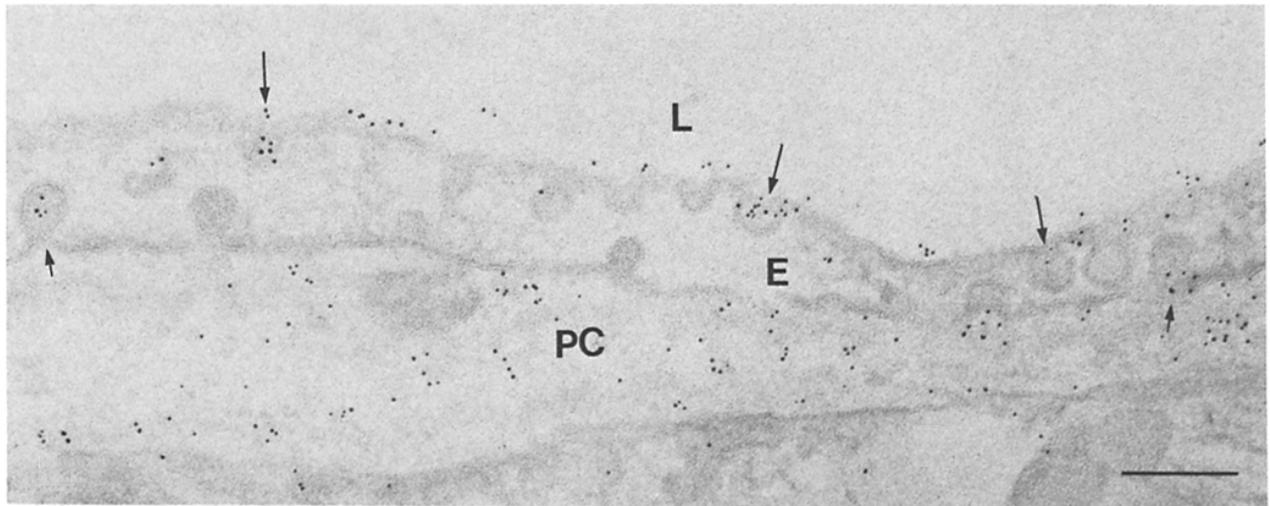


FIGURE 1.15 – Transcytose de la BSA conjuguée à de l'or colloïdal dans l'endothélium micro-capillaire cardiaque de rat. Après perfusion d'une minute, on retrouve l'albumine marquée dans les cavéoles (flèches) de l'endothélium (E) à la lumière du vaisseau (L) et du côté basal sortant des cavéoles (PC). Échelle : 350 nm. [Milici 1987]

1.1.3.2 Transcytose *in-vitro*

Les modèles de culture cellulaire *in-vitro* représentent des systèmes avantageux pour étudier la transcytose. L'un des principaux problèmes des études de transport chez l'animal provient de la variation entre les animaux et de la variabilité d'accès du cargo étudié à la zone d'intérêt (internalisation par d'autres types cellulaires, piégeage dans l'organisme à différents niveaux, dégradation rapide). De plus les systèmes *in-vitro* ont également l'avantage de pouvoir être manipulés de diverses manières par l'expérimentateur. Néanmoins, la perte du contexte (influence du tissu, d'autres types cellulaires ou de signaux diverses) prive le système d'un niveau de régulation important l'éloignant ainsi de la réalité physiologique.

Les cellules endothéliales vont subir un nombre important de changements après isolation dont, par exemple, une augmentation de la perméabilité [Craig 1998] ou un glissement d'un phénotype continu à un phénotype fenestré [Roberts 1995]. Les cellules endothéliales sont sensibles non seulement à l'effet du tissu sur leur différenciation [Lacorre 2004] mais également aux facteurs physiques caractéristiques de l'endothélium, à savoir les forces hémodynamiques [Ando 2009].

Un modèle cellulaire *in-vitro* adapté à l'étude de la transcytose devrait idéalement comporter les éléments suivants :

- ◇ **Un substrat de culture poreux.** L'utilisation de supports de culture suspendus formés d'une membrane percée de pores de tailles variables a été montrée comme un moyen d'améliorer le degré de différenciation des cellules épithéliales et endothéliales cultivées [Villars 1996]. La taille des pores sélectionnés dépendra de la taille du cargo à transporter et de la capacité des cellules à migrer au travers. Plusieurs types de membranes supportées existent dans le commerce, chacune ayant des caractéristiques de porosité, de transparence et de traitement divers [Hughson 1996].

- ◇ **Des conditions d'ensemencement assurant la polarisation des cellules et l'organisation du tapis cellulaire.** L'ensemencement des cellules sur membranes supportées est de première importance pour la formation d'une mono-couche dense et imperméable. La confluence peut avoir un effet important sur l'état de différenciation des cellules.
- ◇ **L'intégrité de la mono-couche cellulaire.** Par différentes mesures dont la résistance électrique de la mono-couche cellulaire [Hughson 1996], il est également possible de déterminer la perméabilité de la barrière [Garcia 2011]. Des études de transport paracellulaire de macromolécules peuvent également être utilisées dans ce cas.
- ◇ **Des conditions de culture prenant en compte l'environnement de l'endothélium.** Les approches de co-culture permettent par exemple de tenir compte des signaux issus de l'environnement des cellules dans le tissu. Les forces hémodynamiques auxquelles sont soumises les cellules peuvent également influencer sur le développement de l'endothélium.

La barrière endothéliale séparant la phase tissulaire du vaisseau de la phase liquide circulante du sang, contrôle le transport trans-endothélial des macromolécules. Dans la partie suivante, l'athérosclérose, un exemple de pathologie de l'endothélium tirant une partie de ses causes d'un dysfonctionnement du transport trans-endothélial est étudiée.

1.2 Pathologie de l'endothélium, l'athérosclérose

L'endothélium joue un rôle primordial dans le maintien de la physiologie du vaisseau. Il est responsable de l'homéostasie vasculaire et a une action de vasoprotection par la régulation de la vasodilatation, la suppression de la croissance des cellules musculaires lisses, et l'inhibition des réponses inflammatoires.

L'athérosclérose est une maladie représentant un problème de santé publique de première importance au niveau international et dont la cause initiale est un dysfonctionnement de l'endothélium. L'athérosclérose sera tout d'abord présentée d'un point de vue global. Les étapes majeures de la progression de la maladie seront décrites succinctement et l'accent sera mis sur les phases initiales de la maladie en rapport à divers facteurs de risque. Le lien sera ensuite fait entre la fonction de transport de l'endothélium (et particulièrement la transcytose cavéole dépendante du LDL) et le déclenchement de la maladie. Ces mécanismes de transport et les candidats potentiels impliqués dans ces mécanismes seront présentés. Le lien entre contexte physiologique de l'endothélium pathologique et déclenchement de la maladie sera enfin abordé.

1.2.1 Athérosclérose

L'athérosclérose est une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre, consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôts calciques, le tout s'accompagnant de modifications de la média. [OMS 1958]

L'athérosclérose (du grec *athere* : bouillie et *scleros* : dur) est l'une des causes majeures des maladies cardio-vasculaires et cérébro-vasculaires actuelles, se plaçant ainsi comme l'une des principales causes de mortalité actuelle dans le monde (les complications généralement associées à l'athérosclérose se plaçant aux deux premières places dans les causes de mortalité dans le monde).

L'endothélium, de par sa localisation à l'interface entre les tissus et le milieu sanguin, est sensible aussi bien aux signaux généraux s'appliquant à l'ensemble de la circulation systémique qu'aux signaux locaux (forces hémodynamiques locales par exemple). L'athérosclérose comme l'hypertension est une maladie dont la caractéristique principale est la ré-organisation locale de l'endothélium.

Les plaques d'athérome sont des régions du système artériel caractérisées par un épaissement de l'intima couplé à une accumulation anormale de lipoprotéines et en particulier de *low-density lipoproteins* sous leurs formes oxydées. Ces phénomènes s'accompagnent d'une inflammation des tissus et de l'infiltration de cellules inflammatoires dans la paroi du vaisseau. Ces plaques vont se développer, formant de larges zones apoptotiques puis nécrotiques, recouvertes d'un fin revêtement fibreux. Ce développement va finir par causer la rupture de la plaque d'athérome qui est responsable de la majorité des accidents vasculaires [Falk 1995].

Le déclenchement de l'athérosclérose fut historiquement attribué à la rétention massive de lipoprotéines contenant la protéine apoB (comme le LDL) dans la paroi vasculaire [Tabas 2007] selon l'hypothèse de "réponse à la rétention".

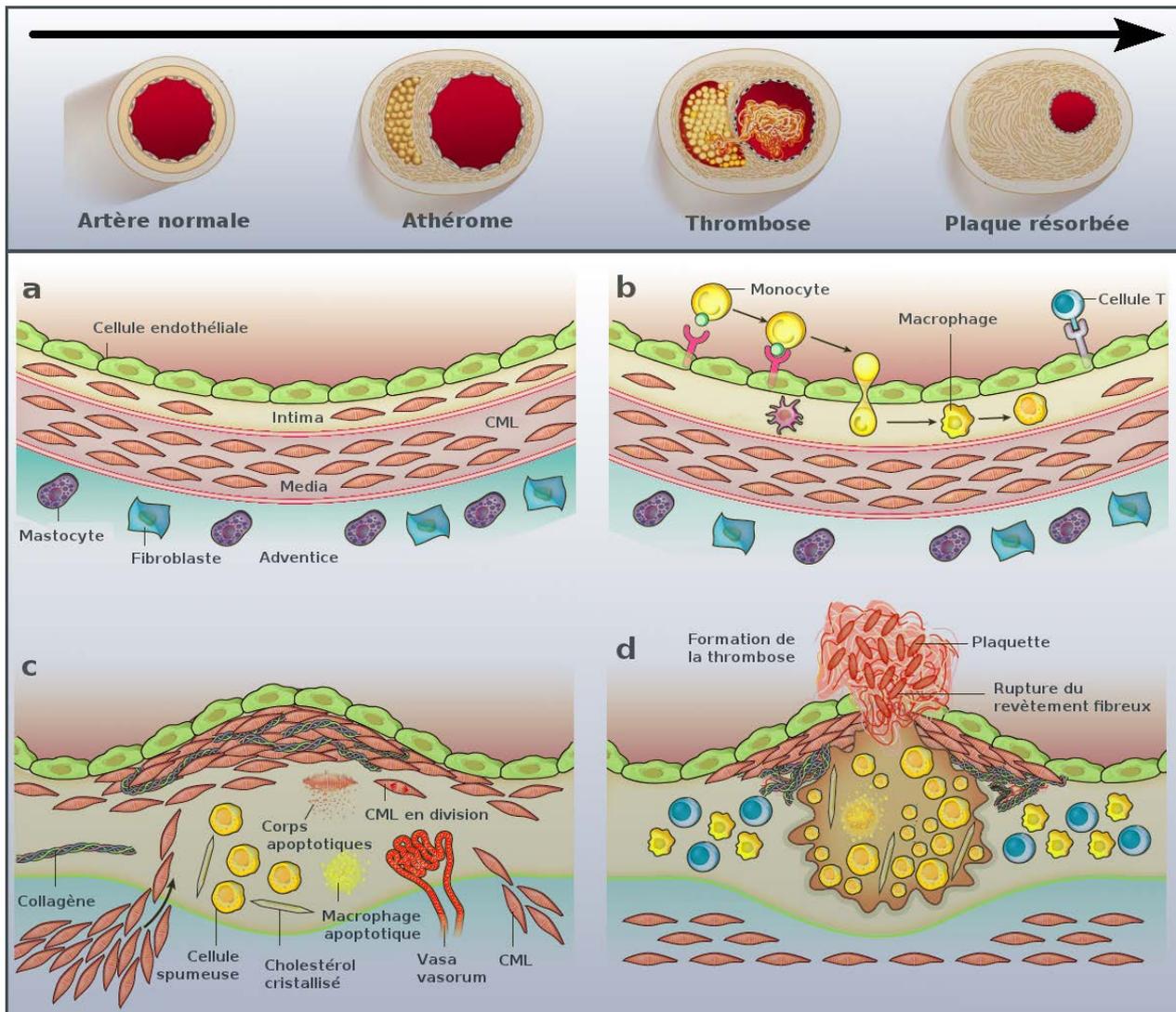


FIGURE 1.16 – Étapes principales du développement d'une plaque d'athérome. **a** - les trois couches d'une artère élastique normale. Une mono-couche de cellules endothéliales forme le revêtement extérieur de la paroi; l'intima et la média contiennent des cellules musculaires lisses (CML). **b** - Étapes initiales de l'athérosclérose : liaison préférentielle des leucocytes (cellules T et monocytes) qui vont traverser l'endothélium. Différenciation des monocytes en macrophages dans l'intima. Les macrophages vont stocker le LDL oxydé et évoluer en cellules spumeuses. **c** - L'évolution de la lésion dépend de la migration massive des CML dans la média et l'augmentation de la synthèse des macromolécules de la matrice extracellulaire comme le collagène. Cette accumulation amène à la formation du corps fibreux au niveau de la lésion. Les macrophages et CML peuvent entrer en apoptose dans l'intima. L'accumulation de corps lipidiques au centre de la lésion va former le centre nécrotique de la lésion dans lequel on pourra retrouver des cristaux de cholestérol et des micro-vaisseaux. **d** - La thrombose est la rupture de la plaque athérosclérotique. Les éléments assurant la coagulation sanguine rentrent alors en contact avec l'intérieur de la plaque causant la thrombose. Celle-ci s'étend dans la lumière du vaisseau et peut gêner le flux sanguin et se décrocher. Figure adaptée de [Libby 2011] et [Libby 2002].

1.2.1.1 Étapes majeures de l'athérosclérose

La figure 1.16 présente les étapes majeures du développement d'une plaque d'athérome jusqu'à la thrombose et la potentielle réparation de la paroi du vaisseau amenant à une diminution de son diamètre. Le panneau supérieur présente le déroulement de l'athérosclérose au niveau du vaisseau et le panneau inférieur présente la situation au niveau de la paroi du vaisseau et les acteurs principaux.

Passage trans-endothélial des lipoprotéines. Les lipoprotéines peuvent migrer au travers de l'endothélium sain et s'accumuler dans l'espace sub-endothélial. La taille d'une particule de LDL (20-30 nm) ne lui permet pas de traverser cette barrière par une voie paracellulaire en absence de lésions (les jonctions inter-cellulaires limitent l'accessibilité à l'espace sub-cellulaire à des molécules d'une taille comprise entre 3 et 6 nm maximum). Le seul chemin d'accès à la paroi du vaisseau pour le LDL est donc la voie transcellulaire. La capacité du LDL à être transporté par transcytose dans l'endothélium artériel *in-vivo* a été très tôt mise en avant [Vasile 1983] et sera discutée plus en détail dans la suite de ce chapitre.

Rétention des lipoprotéines dans la paroi du vaisseau. L'hypothèse de "réponse à la rétention" développée pour expliquer l'apparition de l'athérosclérose est apparue dans les années 1990 après des années de controverse [Steinberg 1989]. Le lien entre hypercholestérolémie et déclenchement de l'athérosclérose est depuis bien établi. Les traitements médicamenteux existant à l'heure actuelle se focalisent d'ailleurs, en majorité, sur la diminution des lipides circulants dans l'organisme. Il apparaît maintenant que le transport trans-endothélial du LDL est également influencé par plusieurs facteurs pro-inflammatoires [Bian 2014] [Zhang 2014]. Ces facteurs pro-inflammatoires vont agir sur le transport du LDL en stimulant l'expression de protéines impliquées dans la transcytose (cavéolines par exemple).

Lors de leur migration, les lipoprotéines peuvent demeurer prisonnières de protéoglycanes sécrétés par les cellules endothéliales au niveau de l'intima des artères. L'apo B de ces lipoprotéines s'associe alors aux protéoglycanes et les particules sont emprisonnées dans la paroi du vaisseau. Cette accumulation se produit principalement à des sites privilégiés où l'on retrouve des conditions hémodynamiques et mécaniques particulières (pression et turbulences menant à l'érosion de la paroi du vaisseau sanguin) [Jongstra-Bilen 2006]. Les LDL ainsi piégés dans l'espace sub-endothélial vont subir une oxydation causant leur reconnaissance par les macrophages.

La rétention à long terme des lipoprotéines dans la paroi du vaisseau, intervient par la migration massive des monocytes au niveau de la future zone de la plaque (voir figure 1.16). La différenciation des monocytes en macrophages va permettre l'immobilisation des lipoprotéines oxydées dans cette zone. Les macrophages évoluant finalement en cellules spumeuses vont finir par former un coeur lipidique amenant à l'épaississement de la paroi du vaisseau et à la formation de la plaque d'athérome. Le développement de la plaque est donc permis par le transport sélectif des monocytes dans la paroi du vaisseau. Les facteurs déclencheurs du développement de la plaque vont donc être de deux origines différentes : les facteurs favorisant l'enrichissement lipidique de la zone et les facteurs favorisant l'arrivée des monocytes et l'immobilisation des lipoprotéines.

Inflammation. Les cellules endothéliales peuvent être activées par un grand nombre de stimuli associés à des facteurs de risque de l'athérosclérose comme : l'hyperlipidémie, l'hypertension, le tabagisme, l'obésité, la résistance à l'insuline ou encore l'inflammation due à des pathogènes. Cette activation se traduit par une sur-expression de molécules d'adhésion dans l'endothélium dysfonctionnant, permettant la liaison des monocytes et leur recrutement dans la paroi endothéliale. C'est potentiellement ce dysfonctionnement de l'endothélium qui pourrait former le début de l'athérosclérose [Libby 2002]. Une molécule d'adhésion des leucocytes exprimée pour la diapédèse leucocytaire est la protéine *vascular cell adhesion molecule 1* VCAM-1, permettant la liaison des deux types de leucocytes, les monocytes et les lymphocytes T, jouant un rôle dans l'athérome précoce. Cette molécule est sur-exprimée en présence de cytokines pro-inflammatoires [Collins 2001] et favorise le déclenchement de lésions athérosclérotiques [Li 1993] [Cybulsky 2001].

Différents facteurs vont contrôler l'apparition de l'athérosclérose. Rétention de lipoprotéines dans la paroi du vaisseau et inflammation sont reconnues comme ayant un rôle majeur dans le déclenchement de l'athérome. L'hypothèse de "réponse à la rétention" supporte le déclenchement de l'athérosclérose dû à la présence massive de LDL dans la paroi artérielle alors que l'hypothèse inflammatoire défend une origine inflammatoire de cette accumulation. Des études montrent que dans la population avant le déclenchement de l'athérosclérose, une accumulation lipidique peut être présente dans la paroi des vaisseaux avant même le début de l'infiltration par les macrophages [Nakashima 2007]. Cela confirme l'hypothèse de la réponse à la rétention du LDL comme facteur déclencheur. Néanmoins, il est maintenant bien documenté que l'inflammation a également un rôle dans l'accumulation des lipoprotéines dans l'espace sub-endothélial [Zhang 2014].

Il n'y a pas ici de réponse simple à l'origine de l'athérosclérose. L'apparition de la maladie est dépendante de la transcytose du LDL au travers de l'endothélium, même si d'autres paramètres vont déclencher ou amplifier ce transport ou la réponse qui va suivre. Dans la suite, nous nous focaliserons sur les mécanismes responsables des étapes précoces de la maladie par le transport du LDL dans la paroi vasculaire. Le lien entre les paramètres physiques appliqués à l'endothélium et ses capacités de transport sera ensuite exploré.

1.2.2 Phase initiale de l'athérosclérose : rôle du transport des lipoprotéines

Le principal type de lipoprotéine responsable de la formation d'une plaque d'athérome est le LDL. La figure 1.17 présente la structure générale d'une molécule de LDL. Une molécule de LDL est composée d'un coeur hydrophobe contenant des esters de cholestérol recouverts par une monocouche de phospholipides. Sa taille est d'environ 22 nm de diamètre [Firestone 1994] [Krauss 1982]. Cette structure est stabilisée par la présence d'une apolipoprotéine (ApoB100) par particule de LDL enrobant environ la moitié de sa surface [Segrest 2001]. L'ApoB100 est insoluble, non-échangeable et responsable de la reconnaissance des LDL par leur récepteur caractéristique (LDLr). Le LDL joue un rôle important dans l'approvisionnement en cholestérol des tissus périphériques [Corbin 2006] et la maintenance des membranes cellulaires [Brown 1979].

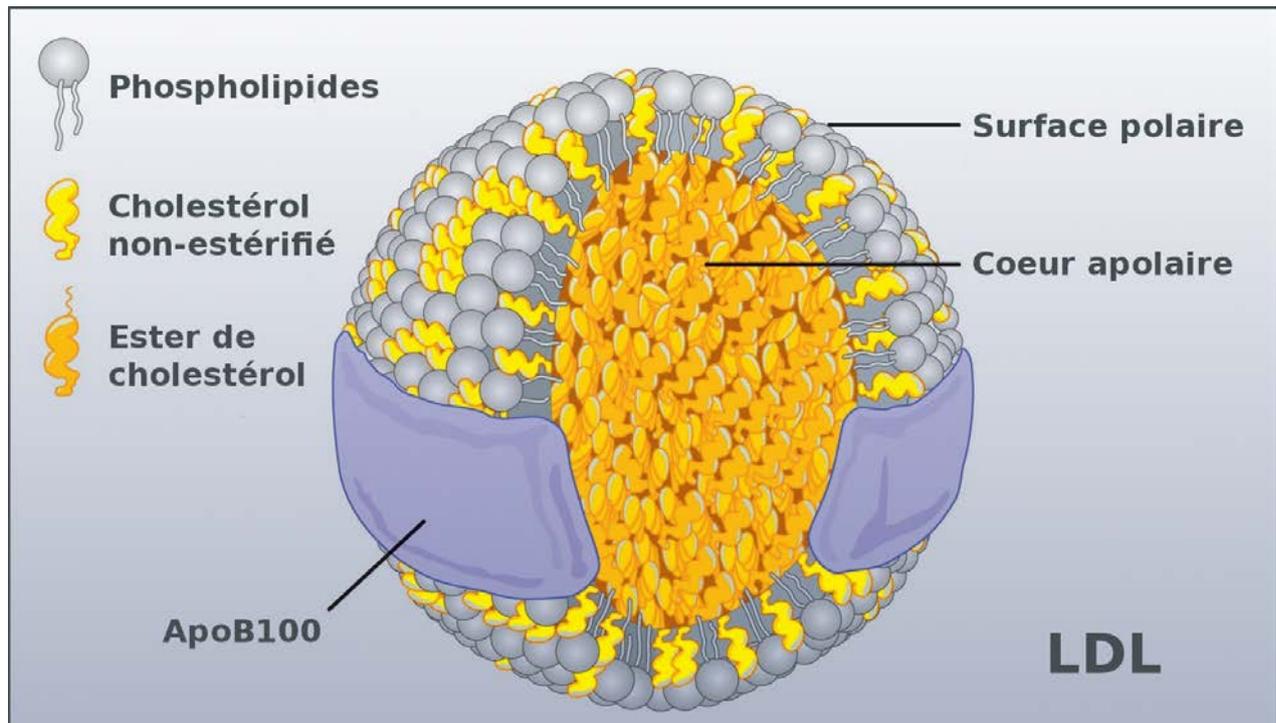


FIGURE 1.17 – *Low-density lipoprotein - LDL.*

Lors de la formation de la plaque d'athérome, les LDL natifs sont transportés dans la paroi artérielle où ils vont subir une oxydation [Palinski 1989]. Cette oxydation est associée avec la formation d'un large nombre de sous-produits causant une toxicité locale et le développement de réactions inflammatoires [Chisolm 2000]. De plus en plus d'études mettent en avant l'impact de l'état d'oxydation du LDL sur l'athérogénèse et ce *in-vitro* [Yla-Herttuala 1989] et chez l'humain [Goncalves 2009]. Il est important ici de recentrer l'étude des phénomènes de transport au travers de l'endothélium au LDL non-oxydé, l'étape d'oxydation ayant lieu majoritairement dans la paroi du vaisseau, et donc après l'étape de transport.

1.2.2.1 Transport trans-endothélial du LDL : piste d'un transport cavéoles dépendant

La transcytose par la voie cavéole a été étudiée depuis plus de trois décades. De la même manière que pour le transport de l'albumine, des expériences *in-vivo* ont retracé le parcours du LDL dans l'endothélium depuis la lumière du vaisseau jusqu'à l'espace sub-endothélial (voir figure 1.18). La spécificité de ce transport est toujours soumise à discussion, l'absence d'un récepteur spécifique et unique pour le transport trans-cellulaire défini et la présence d'informations divergentes, compliquant la situation. Plusieurs candidats existent néanmoins et seront discutés plus en détail dans la section suivante. Le transport transcellulaire du LDL dans un modèle de cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique a été suggéré comme étant susceptible à l'inhibition de la voie cavéole par des molécules pharmaceutiques [Dehouck 1997].

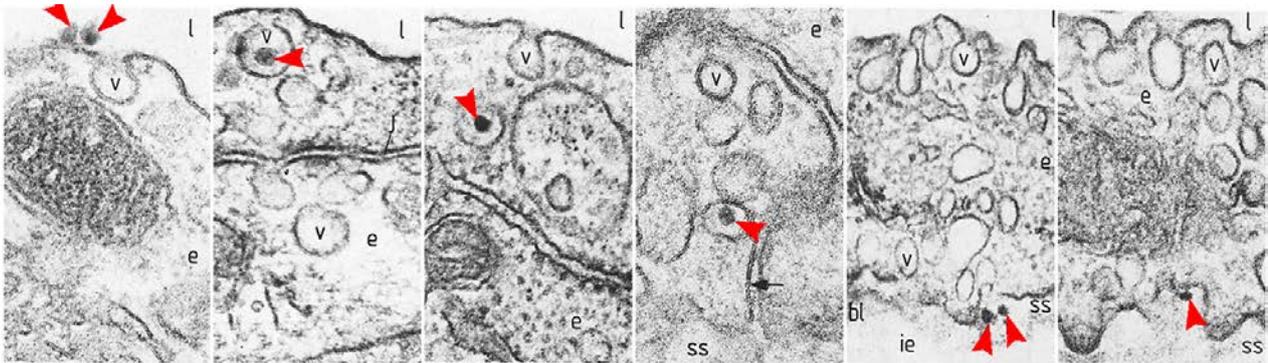


FIGURE 1.18 – Transport trans-endothélial du LDL dans l'endothélium aortique de rat à des temps croissants (de gauche à droite) après perfusion (2 images par temps : 30 secondes - 5 minutes - 10 minutes). Les flèches rouges indiquent le LDL. Les images sont toutes orientées de la même manière : lumière du vaisseau (l) en haut et espace sub-cellulaire (SS) en bas. La flèche noire indique une jonction cellulaire. Les vésicules plasmalemmales sont notées v, l'endothélium e. Figure adaptée de [Vasile 1983]

Suivant l'exemple des travaux réalisés sur le transport de l'albumine par les cavéoles, où, un modèle de souris déficientes en cavéoline 1 ($cav1^{-/-}$) a été utilisé pour montrer qu'en absence de cavéoline 1, une absence des cavéoles dans l'endothélium entraînait un défaut du transport de l'albumine [Schubert 2001]. Un modèle de souris $cav1^{-/-}$ et $apoE^{-/-}$ a été utilisé pour tester la dépendance aux cavéoles du transport du LDL. La déficience en ApoE permet l'obtention de lignées de souris prônes au développement d'athéromes quand soumises à une diète enrichie en lipoprotéines (*western diet*). La délétion génétique de la cavéoline 1 chez ces souris leur confère une protection contre le développement d'athérome de l'ordre de 70% chez les souris $cav1^{-/-}$ $apoE^{-/-}$ par rapport aux souris $apoE^{-/-}$ [Frank 2004]. La ré-expression de $cav1$ dans l'endothélium de souris $cav1^{-/-}$ $apoE^{-/-}$ provoque le développement des lésions athérosclérotiques et l'entrée du LDL dans la paroi artérielle, confortant l'hypothèse d'un rôle potentiel des cavéoles dans le transport du LDL [Fernandez-Hernando].

1.2.2.2 Récepteurs potentiels impliqués dans le transport des lipoprotéines

Quelques candidats potentiels au transport du LDL au travers des cellules endothéliales sont ici passés en revue. L'accent sera plus particulièrement mis sur le récepteur *scavenger* CD36, candidat potentiel pour la reconnaissance et le transport trans-endothélial du LDL dans les cavéoles (axe de recherche développé au laboratoire).

Récepteur au LDL *LDLr*. Les mécanismes d'endocytose du LDL natif par le récepteur au LDL, LDLr par Goldstein et Brown leur a valu le prix nobel en 1985. Jouant un rôle dans l'homéostasie du LDL, le LDLr, localisé dans les puits clathrine va permettre l'endocytose du LDL et sa direction vers les voies de dégradation. Le LDLr sera ensuite recyclé à la membrane plasmique. Dans ce mécanisme, les LDL sont complètement dégradés dans les lysosomes [Brown 1986].

LOX-1. Membre de la famille des lectines de type C, ce récepteur présent dans les cellules endothéliales est documenté pour pouvoir prendre en charge les formes oxydées et acétylées du

LDL [Moriwaki 1998]. Il est sur-exprimé en présence de LDL oxydé mais pas en présence de LDL natif [Mehta 1998]; il est également sur-exprimé en présence de stress de cisaillement *in-vitro* [Murase 1998]. Sa spécificité pour les formes oxydées du LDL en fait ici un candidat peu probable pour le transport du LDL natif (l'oxydation du LDL intervenant majoritairement après le passage de la barrière endothéliale).

Récepteur *scavenger* CD36. Récepteur *scavenger* de classe B, CD36 est documenté comme pouvant se lier aux formes natives du LDL, du VLDL et du HDL [Calvo 1998] mais également aux formes acétylées et oxydées du LDL [Knowles 1984].

CD36 est une glyco-protéine trans-membranaire présente dans différents types cellulaires (monocytes, macrophages, endothélium vasculaire, adipocytes et plaquettes) de 88 kDa. Les travaux de Lisanti sur les modèles de souris *cav1*^{-/-} *apoE*^{-/-} ont également montré un impact de la délétion génétique de *cav1* sur l'expression de CD36. CD36 en collaboration avec la cavéoline 1 a été suggéré comme un candidat potentiel pour le transport de lipoprotéines dans l'endothélium [Frank 2008]. L'ablation génétique de CD36 dans un modèle murin a par exemple évité l'impact négatif d'une diète riche en cholestérol sur des souris *apoE*^{-/-} [Kincer 2002]. Le traitement de souris *apoE*^{-/-} par un ligand du CD36 en présence d'une diète pro-athérosclérotique a également permis une diminution de la taille des lésions observées de l'ordre de 50% [Marleau 2005]. Plusieurs études ont également mis en avant un potentiel rôle de CD36 dans l'endothélium dans la régulation de la pression sanguine via la sécrétion d'oxydes nitriques.

Le rôle de CD36 dans l'athérosclérose est multiple, il a été initialement identifié comme l'un des récepteurs *scavengers* mis en jeu dans l'endocytose du LDL oxydé dans les macrophages [Endemann 1993]. CD36 contribue pour une part de 60-70% dans l'accumulation des esters de cholestérol dans les macrophages exposés à du LDL oxydé [Febbraio 2000]. En plus de ce rôle dans l'endocytose du LDL oxydé dans les macrophages, la liaison de différents ligands à CD36 a été rapportée comme déclenchant une cascade de signalisation amenant à la génération de cytokines pro-inflammatoires retrouvées également dans les tissus athérosclérotiques [Moore 2006]. Enfin, CD36 a également été rapporté comme étant l'un des récepteurs principaux permettant le lien des plaquettes au LDL oxydé, jouant ainsi un rôle dans la création de la thrombose [Podrez 2007].

1.2.3 Contexte physiologique de l'endothélium pathologique

L'un des facteurs définissant les zones sensibles au développement de lésions athérosclérotiques est l'intensité et la régularité du stress de cisaillement appliqué par les forces hémodynamiques sur l'endothélium. L'hétérogénéité de l'endothélium est en partie fonction des stimuli bio-mécaniques provenant de l'environnement sanguin [Garcia-Cardena 2006]. Les contraintes de cisaillements subies par l'endothélium peuvent être séparées en deux groupes : les forces de cisaillement pro-athérosclérotiques et les formes anti-athérosclérotiques.

1.2.3.1 Forces hémodynamiques : contraintes de cisaillement

Les contraintes de cisaillement subies par l'endothélium sont des forces tangentielles aux vaisseaux dues à la friction du sang sur la surface des cellules endothéliales de la paroi artérielle (voir figure 1.19). Ces contraintes sont exprimées en unité de force par cm², la plupart du temps en dynes. La

direction et l'intensité des forces de cisaillement sont directement déterminées par les différents flux sanguins s'entremêlant dans le vaisseau. Le flux sanguin peut ainsi être laminaire et homogène ou hétérogène. Un flux hétérogène sera caractérisé par des zones d'inversion et de tourbillons, voir de séparation en de multiples sous-courants et des contraintes de cisaillement plus faibles (voir figure 1.19).

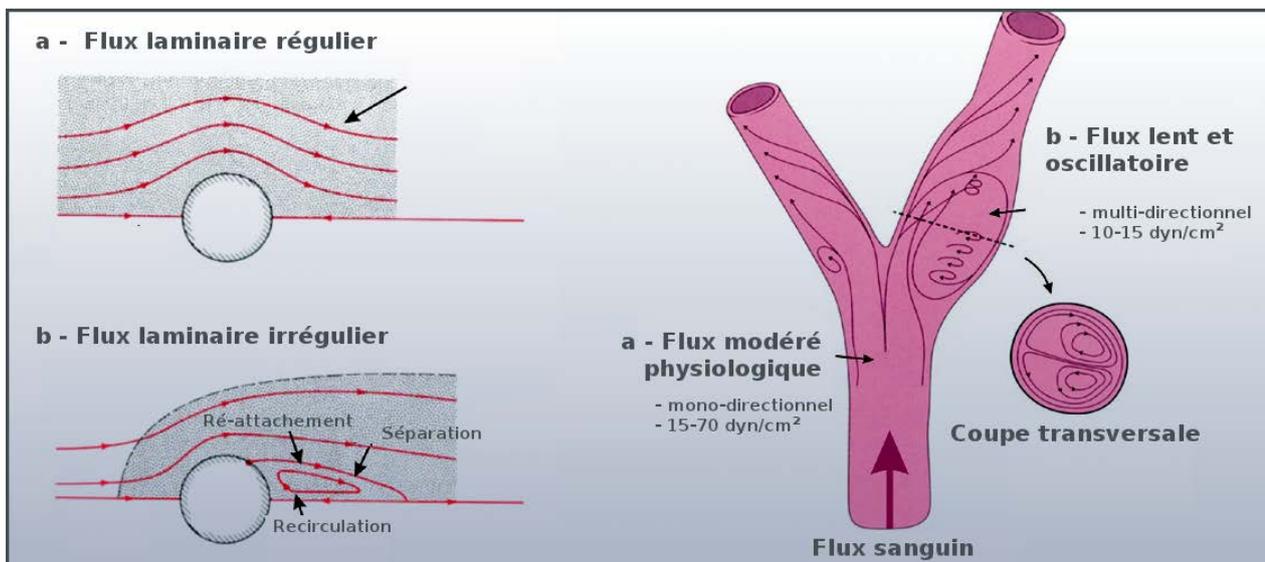


FIGURE 1.19 – Organisation du flux dans les vaisseaux sanguins. Relation entre localisation dans le vaisseau, intensité du flux et contraintes de cisaillement appliquées sur l'endothélium. Figure adaptée de [Chatzizisis 2007].

Les contraintes de cisaillement appliquées à l'endothélium sont dynamiques et variables, changeant de direction et d'intensité en fonction de la géométrie des vaisseaux. Ces contraintes peuvent prendre des valeurs variables allant d'intensités de stress faibles à des intensités fortes selon la localisation du tissu dans l'arborescence vasculaire [Cheng 2007]. Même au sein d'une zone fixe de l'endothélium, l'effet de facteurs locaux et globaux (par exemple une hypercholestérolémie) peut entraîner une variation de la répartition des forces hémodynamiques.

1.2.3.2 Contraintes hémodynamiques et phases initiales de l'athérosclérose

Comme décrit précédemment, la topographie de la région de l'arbre vasculaire va conditionner l'apparition de lésions athérosclérotiques. Dans les régions droites, l'endothélium va être soumis à des forces hémodynamiques régulières appliquant un stress de cisaillement de forte intensité et dépourvu de turbulences. Leurs cellules expriment alors différents gènes athéro-protecteurs et diminuent l'expression des gènes pro-athérosclérotiques [Chatzizisis 2007]. À contrario, dans les zones de bifurcation, caractérisées par de faibles intensités de stress de cisaillement multi-directionnel, les gènes athéro-protecteurs vont être sous-exprimés, alors que les gènes pro-athérosclérotiques vont être sur-exprimés. Les cellules endothéliales sont donc capables de sentir l'intensité locale de la contrainte de cisaillement qui leur est appliquée via les mécano-récepteurs situés à leurs surfaces [Traub 1998].

Les faibles contraintes de cisaillement dans les zones sensibles à l'athérosclérose induisent ainsi divers dysfonctionnements de l'endothélium : réduction de la sécrétion d'oxyde nitrique [Ziegler 1998], induction de l'apoptose cellulaire [Tricot 2000], induction de changements conformationnels dans les cellules endothéliales [Malek 1999], induction de l'accumulation sub-endothéliale du LDL [Liu 2002], augmentation de l'oxydation locale du LDL par induction de la production d'espèces réactives à l'oxygène par l'endothélium [McNally 2003], sur-expression de divers molécules d'adhésion des monocytes et génération de cytokines pro-inflammatoires [Orr 2005].

L'étude des mécanismes moléculaires de transcytose du LDL dans l'endothélium humain nécessite la mise au point d'approches *in-vitro*. L'apparition d'outils commerciaux pour le développement de modèles cellulaires dans des conditions tenant compte des facteurs liés à l'environnement cellulaire, laisse entrevoir d'importants progrès dans les années à venir. L'étude des phénomènes de transports passe également dans la simplification des objets transportés. Ainsi, l'observation à l'échelle nanométrique du transport du LDL pose un certain nombre de problèmes (contrôle de l'état d'oxydation, visualisation en MET des LDL, mise au point de protocoles spécialement développés pour tenir compte des spécificités de l'endothélium etc.). Le passage par une étape d'étude de phénomènes de transport semblables d'objets simplifiés, facilement manipulables et dont on maîtrise plus facilement les caractéristiques physico-chimique est nécessaire. Le secteur des nano-technologies nous livre actuellement des objets de tailles et de caractéristiques proches des LDL, formant un modèle d'étude idéal pour la mise au point des outils cellulaires et techniques qui nous permettront d'étudier par la suite la transcytose de particules biologiques telles que les LDL.

1.3 NPs synthétiques, interactions cellulaires complexes

Cette section porte sur la définition des concepts liés aux NPs et leurs applications en biologie et notamment en nanomédecine. Un inventaire non-exhaustif des applications des NPs y sera donné ainsi que les principales problématiques liées à leur utilisation *in-vivo*. Cela amènera à la problématique principale de cette étude, à savoir les interactions entre NPs (et plus particulièrement la sous-famille des NPs de silice) et cellules en terme de transport et d'internalisation. Un état de l'art sur les connaissances des interaction cellulaires des NPs de silice avec les barrières biologiques *in-vitro* sera dressé en partant des modèles les plus simples. L'impact toxique de ces NPs sera également succinctement exploré dans ces systèmes.

1.3.1 NPs et nano-médecine

1.3.1.1 Définitions

Les nanomatériaux sont des matériaux possédant au moins une dimension et/ou une structure interne de taille nanométrique. L'échelle de taille nanométrique est usuellement admise comme inférieure ou égale à 100 nm. La Commission Européenne a publié une recommandation sur la définition des nanomatériaux en 2011 formulée de la manière suivante :

Les "nanomatériaux" sont des matériaux naturels, accidentels ou manufacturés contenant des particules libres, agrégées ou agglomérées dont, 50 % ou plus des particules en nombre possèdent une ou plusieurs dimensions dans l'échelle de taille de 1 à 100 nm.

Recommandation de la Commission Européenne du 18 Octobre 2011 - [Bleeker 2013]

Parmi les nanomatériaux on va pouvoir retrouver les nanoparticules (NPs), présentant deux dimensions à l'échelle nanométrique. Ces nanoparticules pourront être issues des nanotechnologies, c'est à dire des techniques permettant la conception, la production et l'exploitation de systèmes de tailles nanométriques, mais également issues de l'activité humaine (polluants) et naturelle (particules volcaniques).

La compréhension des risques induits par les nanomatériaux est l'un des moteurs actuels de la recherche sur ces structures comme en témoigne l'intérêt de la Commission Européenne sur cette question. Ces matériaux font néanmoins l'objet, depuis des années déjà, de l'intérêt de la communauté scientifique et industrielle. Les propriétés physiques et chimiques de surface des nanomatériaux diffèrent largement de celles des matériaux correspondant à l'échelle supérieure ce qui présente un intérêt majeur pour un grand nombre d'applications, notamment en biologie et en médecine.

1.3.1.2 Principales caractéristiques des NPs

Les caractéristiques des NPs découlent de leur caractère nanométrique, de leur composition chimique et de leur préparation. Elles peuvent exister sous différentes formes :

- ◇ **Aérosol.** Dispersées sous forme liquide ou solide en phase gazeuse.
- ◇ **En suspension.** Sous forme solide, dispersées en phase liquide.
- ◇ **En émulsion.** Sous forme liquide, dispersées en phase liquide.

Nous nous focaliserons ici sur l'étude des NPs en suspension. En effet, l'étude de l'interaction entre NPs et systèmes biologiques se fera principalement dans un milieu physiologique en voie liquide. De plus, les NPs interagissant avec des systèmes biologiques sont majoritairement de type solide.

Les principales propriétés physiques des NPs découlent de leur faible rapport masse/taille et de leur surface spécifique (rapport surface/ masse) très importante. Le faible rapport masse/taille des NPs leur confère une probabilité de rencontre et de collision entre elles ou avec d'autres entités assez élevée, de par leurs mouvements browniens importants. De par leur masse infime, elles sont également très peu sensibles aux effets de la gravité par rapport à des particules de tailles micrométriques.

Leur surface spécifique importante leur fournit, quant à elle, des propriétés physiques et chimiques plus proches de celles d'une surface que d'un matériau. Plus la taille des NPs va diminuer et plus la surface d'interaction avec son environnement va augmenter. Dans ces conditions, les forces attractives de Van der Waals s'exerçant entre NPs ne sont plus négligeables et peuvent même avoir une contribution plus importante que la gravité. De par l'existence de ces forces attractives et en l'absence d'autres forces, la tendance générale des NPs est à l'agrégation.

La stabilisation de ces objets également appelés colloïdes peut être réalisée de différentes manières : par répulsion électrostatique des NPs (théorie DLVO [Derjaguin 1941] [Verwey 1948]) ou par stabilisation stérique [Napper 1977] (recouvrement par un polymère par exemple). Le recouvrement des NPs va également pouvoir leur conférer de nouvelles caractéristiques (reconnaissance active par l'organisme par exemple).

1.3.1.3 Apparition des nanomédecines

Le développement récent des nanotechnologies a permis l'extension de leur application à la médecine. Les nanomatériaux, dont font partie les NPs, commencent à trouver une place dans le diagnostic, le suivi, le contrôle et le traitement de problèmes biologiques. Ce type d'applications a été nommé "nanomédecine" par les autorités sanitaires et gouvernementales internationales dans le courant de la dernière décennie [Boisseau 2011].

Les débuts de la nanomédecine prennent racine dans les années 1950, en Allemagne, avec l'idée originale de Paul Ehrlich d'utiliser les nano-objets comme vecteurs pour le transport de drogues dans l'espoir d'améliorer la spécificité des traitements [Kreuter 2007]. Les premiers travaux menés dans ce domaine par Peter Paul Speiser visaient, au début, à mettre au point des nano-transporteurs pour les traitements oraux et aboutirent finalement aux premiers modèles de nanoparticules circulantes pour la vectorisation de drogues et la vaccination [Birrenbach 1976]. Près de quarante ans après ces travaux, les premières nanoparticules commerciales vecteurs de drogues apparurent sur le commerce (AbraxaneTM - 2005).

Cette évolution s'explique par la nouveauté apportée par les NPs et leur capacités potentielles d'adressage et de passage au travers des barrières biologiques. Dans la suite de ce document, un panel récent d'applications des nanomatériaux en biologie allant de la vectorisation de drogues dans des problématiques pathologiques à la mise en place d'outils de bio-imagerie pour le suivi de mécanismes cellulaires complexes sera présenté. L'accent sur des travaux portant sur la capacité des NPs à interagir, pénétrer et potentiellement traverser les barrières biologiques et notamment l'endothélium, sera ensuite développé. Le devenir à long terme et l'impact toxique des NPs sur l'environnement physiologique seront également abordés.

1.3.2 Applications des NPs en biologie

En plus des caractéristiques découlant de leur faible taille décrite dans la partie précédente, les caractéristiques optiques et magnétiques des nanomatériaux sont de premiers intérêts pour la biologie. Une liste non-exhaustive des applications des nanomatériaux en biologie est donnée ci-dessous.

Différents types de NPs synthétiques sont présentés en figure 1.20 et dans la table 1.2. Les NPs utilisées dans les approches biologiques peuvent être synthétiques ou organiques, chaque type possédant ses avantages pour certaines applications. Les NPs métalliques vont par exemple posséder des propriétés optiques et magnétiques utilisables pour la bio-imagerie (marqueurs biologiques fluorescents [Wolcott 2006], agents de contrastes pour l'imagerie de résonance magnétique [Weissleder 1990]); mais également des applications dans les domaines thérapeutiques et notamment dans le traitement de tumeurs par hyperthermie [Guardia 2014]. Leurs propriétés magnétiques sont également couramment utilisées dans les approches de purification et de séparation de molécules biologiques [Molday 1982].

Les NPs organiques possèdent, quant à elles, de bonnes capacités de dégradation dans l'organisme et une toxicité potentielle moindre. Leurs applications principales vont aller de vectorisation dans le cadre de traitements médicamenteux ou de thérapie génique [Mah 2000] à des applications de bio-imagerie, en passant par de l'ingénierie tissulaire [Antunes 2014].

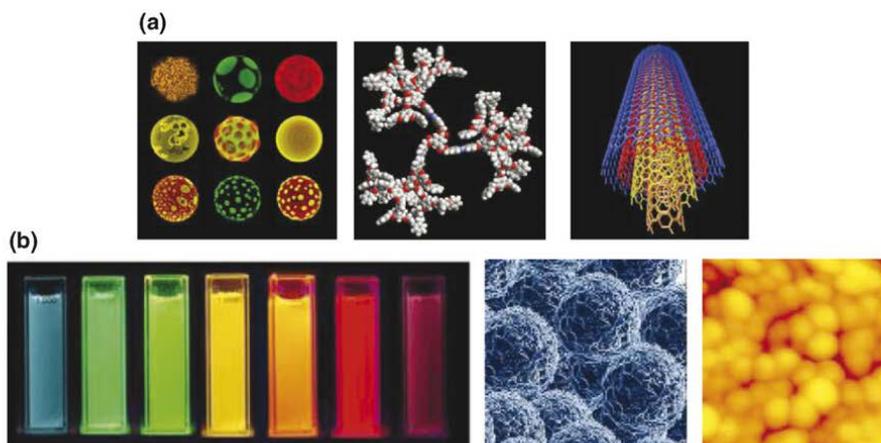


FIGURE 1.20 – Exemples de NPs. **a** - NPs organiques. De gauche à droite : liposomes, dendrimères et nanotubes de carbone. **b** - NPs synthétiques. De gauche à droite : quantum dots, NPs magnétiques, NPs d'or. [Sanvicens 2008]

1.3.2.1 Interactions entre biomolécules et NPs

L'accrochage de biomolécules en surface de NPs de tailles et de compositions variables (voir figure 1.2) ouvre de nombreuses possibilités pour le contrôle de processus cellulaires et extra-cellulaires dans des applications telles que la vectorisation ou l'imagerie. La NP est une plateforme adaptable permettant le développement d'outils modulables basés sur l'interaction avec les biomolécules telles que les protéines ou l'ADN. Ces approches sont majoritairement réservées à des particules de type métallique (Au, ZnS et CdS).

Type de nanoparticules		Applications	Exemples de cibles	Caractéristiques
Organiques	Liposomes	Vectorisation	Cancer, vaccination	Excellentes propriétés de circulation, pénétration et diffusion
	Dendrimères	Vectorisation Thérapie	SIDA, cancer, ophtalmologie et inflammation	Constructions chimiques modulables, échafaudage
	Nanotubes de carbone	Diagnostic Bio-imagerie Thérapie	Fonction respiratoire, sondes AFM	Bio-compatibles par modification de surface, échafaudage, résistance et propriétés électriques
Synthétiques	Quantum dots	Diagnostic Bio-imagerie	Bio-marqueurs	Fluorescence, photostables
	Or	Diagnostic Bio-imagerie Thérapie	SIDA, bio-marqueurs, cancer	Stabilité, absorption optique, plasmonique, fluorescence et bio-compatibilité
	Magnétiques	Diagnostic Bio-imagerie Thérapie	Cancer, maladies cardio-vasculaires	Excellents agents de contraste, bio-compatibles,
	Autres métalliques	Diagnostic Bio-imagerie	Bio-marqueurs	Propriétés diverses (catalytiques, luminescence, photo-stabilité...)
	Silice	Diagnostic Bio-imagerie Thérapie	Bio-marqueurs, cancer	Bio-compatibles par modification de surface

TABLE 1.2 – Exemples d'utilisation de NPs en nanomédecine et en biologie

Ces interactions se basent sur différentes approches allant de la liaison covalente directe à des interactions non-covalentes entre NPs et biomolécules. L'adsorption chimique de la biomolécule sur la NPs peut se faire par exemple par accrochage direct des résidus cystéines présents en surface des protéines (albumine) [Naka 2003] ou par utilisation du réactif de Traut [Ghosh 1990]. Il est également possible de rajouter un ligand entre la NP et la biomolécule d'intérêt via des stratégies de couplages traditionnelles comme l'amidation et l'estérification [Wang 2003]. Les assemblages non-covalents, via liaisons électrostatiques, représentent une plateforme hautement modulaire pour l'étude des assemblages d'ADN et de leurs mécanismes d'interaction à différents ligands [Lakowicz 2000].

En s'appuyant sur les propriétés intrinsèques des NPs, il est possible de développer des outils avancés pour la biologie, la bio-imagerie et la détection pour le diagnostic. Mais ces objets peuvent également être utilisés pour la manipulation de substrats biologiques à très faibles concentrations (exemple de tri de protéines recombinantes marquées par une étiquette poly-histidine dans de très faibles volumes de travail) [Abad 2005].

1.3.2.2 Biodétection, diagnostic et bio-imagerie

Les NPs issues des dernières avancées en biotechnologie laissent entrevoir un futur prometteur pour la détection précoce des maladies et des dysfonctionnements cellulaires. Prenons ici l'exemple d'un problème de santé publique répandu, le cancer du sein. La détection par mammographie est une

technique répandue en raison de sa facilité de mise en place à l'échelle d'une population. Néanmoins, elle ne permet de détecter le cancer du sein chez les personnes asymptomatiques, qu'avec une efficacité variant entre 80 et 90% des cas. Le second désavantage de cette technique est l'impossibilité de détecter un cancer en dessous d'une certaine masse ou densité critique de la tumeur.

La seconde possibilité pour la détection d'un cancer est la visualisation directe de la présence de cellules cancéreuses. Pour se faire des marqueurs circulants de la présence du cancer pourraient par exemple être identifiés dans l'organisme [Corchero 2009]. L'avènement des outils nanotechnologiques fournit des méthodes de détection rapides et efficaces qui permettent la diminution de la période séparant l'apparition du traitement et augmentent de par la même l'efficacité du traitement. Des NPs paramagnétiques d'oxyde de fer ont déjà été utilisées pour la détection de tumeurs non-palpables dans le cadre d'opérations chirurgicales [Ahmed 2013].

1.3.2.3 Vectorisation et approches thérapeutiques

L'avenir des nanomédecines dans le domaine de la vectorisation de drogues et de gènes pour la thérapie génique passe actuellement par le développement de nouvelles nano-constructions multifonctionnelles mêlant les approches de bio-imagerie et de thérapie. Ces constructions complexes permettent ainsi un fin contrôle de leur action. On citera ici l'exemple de nano-cristaux magnétiques pour l'IRM combinés à des anticorps thérapeutiques pour une délivrance contrôlée et à une molécule pharmaceutique (chimiothérapie), dans une construction unique [Yang 2007]. Des constructions permettant l'adressage dans des tumeurs de siRNA thérapeutiques et dans le même temps une localisation par IRM et par fluorescence doublés d'une pénétration facilitée dans le cytoplasme ont également été développées pour des applications *in-vivo* [Medarova 2007]. Même si elles représentent un espoir pour des traitements ciblés et efficaces, ces nano-constructions, se heurtent toujours à de nombreuses difficultés d'application *in-vivo*.

1.3.2.4 Problèmes principaux des approches *in-vivo*

Un nombre important de problèmes restent à résoudre pour permettre l'utilisation des systèmes basés sur les nanomatériaux *in-vivo*. On citera ici les problèmes d'opsonisation ("pollution" de la surface des NPs circulant dans l'organisme par adsorption de protéines non spécifiques à leur surface) [Owens III 2006], la rétention par le système réticuloendothélial (le foie et la rate par exemple) [Jain 2001], la faible capacité de pénétration dans les tumeurs solides [Dreher 2006] et le devenir à long terme des NPs dans l'organisme [Stern 2008].

Opsonisation des NPs et phagocytose. Le recouvrement des NPs par les protéines endogènes à l'organisme va augmenter leur visibilité auprès des cellules phagocytaires (monocytes, macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques). En fonction des propriétés de surface de la particule telles que la charge ou l'hydrophobicité, celle-ci va être recouverte d'une couronne protéique en quelques minutes après exposition au sang [Cedervall 2007] (voir figure 1.21). La présence de cette couronne va alors être reconnue par les cellules phagocytaires de manière spécifique ou non. S'en suivra la liaison puis la phagocytose de la particule qui rejoindra les phagosomes et les voies de dégradation cellulaire [Frank 1991]. La conclusion de ce phénomène amène à l'élimination rapide des NPs de l'organisme par les systèmes phagocytaires mononucléaires et polymorphonucléaires.

La solution pour contourner ce problème peut être, par exemple, de créer des NPs présentant des propriétés de surface ne permettant pas l'adhérence des protéines opsonines. Il existe ici différentes méthodes. La première consiste à diminuer le diamètre hydrodynamique des NPs (les interactions non-spécifiques entre les NPs et les protéines sanguines deviennent négligeables pour des diamètres hydrodynamiques de l'ordre de 4-8 nm) [Smith 2008]. La seconde consiste à utiliser des NPs dont la charge de surface est proche de la neutralité, ces NPs affichant une vitesse d'opsonisation plus lente que des NPs chargées [Roser 1998]. Et enfin, il est toujours possible de modifier la surface des NPs par des groupes bloquant les interactions électrostatiques et hydrophobes (dextranes, PEGs...) [Gref 1994].

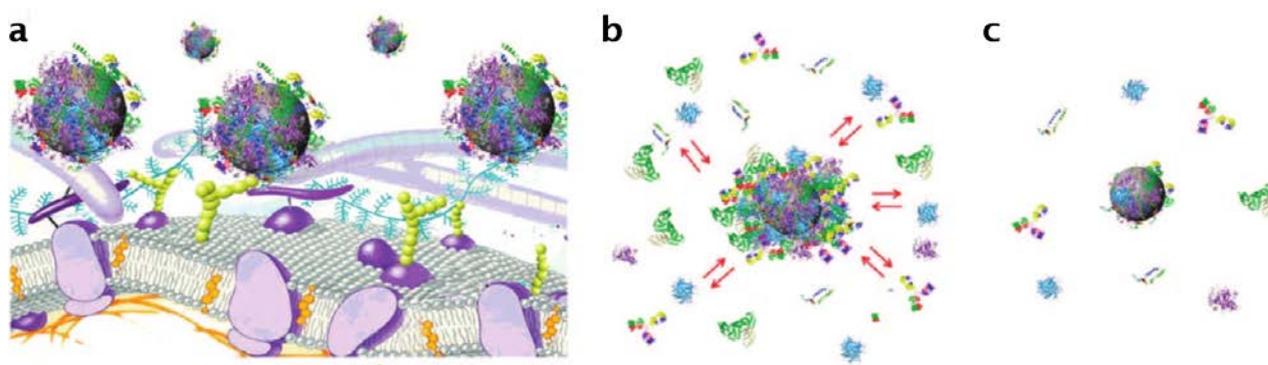


FIGURE 1.21 – Opsonisation protéique des NPs. **a** - représentation schématique des scénarios d'échanges et d'interactions envisageables à la membrane plasmique. **b-c** - représentation schématique des complexes entre NPs et protéines plasmatiques : le cœur de la NP est entouré d'une couronne protéique composée de deux feuillets : un feuillet extérieur de protéines en échange constant avec les protéines du milieu (**b**, flèches rouges) et une couronne protéique stable entourant le cœur de la NP (**c**). [Walczyk 2010]

Rétention par le système réticuloendothélial. Les NPs circulantes sont piégées dans le système réticuloendothélial par les nombreuses cellules phagocytaires qui le composent. Les NPs hydrophobes vont avoir tendance à l'accumulation dans le foie puis dans la rate et les poumons [Brannon-Peppas 2012]. Les nanoparticules hydrophiles et de taille inférieure à 35 nm sont par contre beaucoup moins stockées par le foie et la rate. Les travaux de Li et Huang présente un type de NPs lipidiques PEG capable d'éviter en partie le système réticuloendothélial, permettant une meilleure délivrance des NPs au niveau des tumeurs [Li 2009]. Cette stratégie se base sur la modification de surface des NPs afin de les rendre "invisibles" pour l'organisme.

Délivrance et pénétration dans la zone d'intérêt. Dans l'exemple des tumeurs, la pénétration des NPs au delà des premières couches de cellules endothéliales vasculaires est un challenge important. La pénétration des NPs dans les tumeurs solides est basée sur deux mécanismes principaux.

Le premier est l'accumulation au niveau du site de la tumeur par des mécanismes passifs. L'augmentation de la perméabilité de l'endothélium au niveau des tumeurs va permettre la "fuite" des NPs par transport paracellulaire et leur rétention. Il est connu que les tumeurs possèdent une vascularisation prompte aux fuites et un système lymphatique déficient ne permettant pas une élimination

efficace des NPs. La conséquence est que plus longtemps les NPs vont être circulantes dans l'organisme et plus l'accumulation au niveau du site de la tumeur va être important par rapport aux autres tissus [Matsumura 1986].

Le second se base sur des processus actifs de reconnaissance des NPs largement discutés dans les parties précédentes. Néanmoins, de nombreuses études s'opposent sur le sujet [Pirollo 2008]. Certaines montrant un effet limité de la fonctionnalisation des NPs sur leur accumulation au niveau des tissus cancéreux [Bartlett 2007]; alors que d'autres mettent en avant une augmentation de l'internalisation cellulaire et de l'accumulation dans les tumeurs [Dass 2006]. Ces différences sont explicables par les différences même entre les NPs utilisées, les modifications de surface apportées, les cibles de liaison visées et les types de tumeurs étudiées. Il est important de noter que la fonctionnalisation des NPs n'a probablement qu'un impact léger sur leur répartition au niveau de l'organisme mais que son rôle va se jouer au niveau cellulaire dans la tumeur [Kirpotin 2006].

L'amélioration de ces étapes d'accumulation spécifique nécessite maintenant d'ajouter une strate de complexité supplémentaire. Il est important de développer des NPs capables non seulement d'éviter au maximum le piégeage systématique dans l'organisme, mais également capables d'accéder en profondeur aux tissus cibles. Cette tâche va nécessiter l'utilisation par les NPs de mécanismes cellulaires actifs tels que la transcytose (par exemple par la voie cavéole dépendante [Oh 2007]) et l'endocytose récepteurs dépendante pour franchir les barrières biologiques telles que la barrière endothéliale.

Toxicité des NPs. Les mêmes propriétés qui confèrent aux NPs leurs caractéristiques d'intérêts pour les nanomédecines sont également en partie responsables de leurs effets néfastes pour la santé. Plusieurs études rapportent une relation inverse entre tailles, concentrations et toxicité [Zhang 2007]. Cet effet toxique taille dépendant est reporté pour une grande majorité des NPs et ce, quelque soit leur composition. Comme décrit précédemment, de nombreux paramètres vont, une fois de plus influencer sur la toxicité cellulaire des NPs (couronne protéique [Connor 2005], composition [Nel 2006], taille [Lovric 2005a], forme [Malugin 2010], mais également agrégation et concentration [Zhang 2007]). Les risques liés à l'exposition aux NPs sont encore mal définis. Par exemple, il a été suggéré que les NPs pourraient induire la mort cellulaire via la destruction de la membrane plasmique, de la mitochondrie et du noyau [Lovric 2005b]. Un grand nombre d'études montre un lien entre une augmentation de la génération des espèces réactives à l'oxygène (ROS) dans les cellules traitées avec certains types de NPs [Lovric 2005b] [Sayes 2005]. L'effet cyto-toxique des NPs de silice est détaillé sur la figure 1.22.

L'avènement des NPs comme outils de détection et de thérapie pose de nouvelles questions : comment les rendre suffisamment spécifiques et durables tout en limitant leur toxicité? Cette question implique l'étude approfondie au niveau moléculaire de leurs interactions avec la cellule et de leurs capacités de transport.

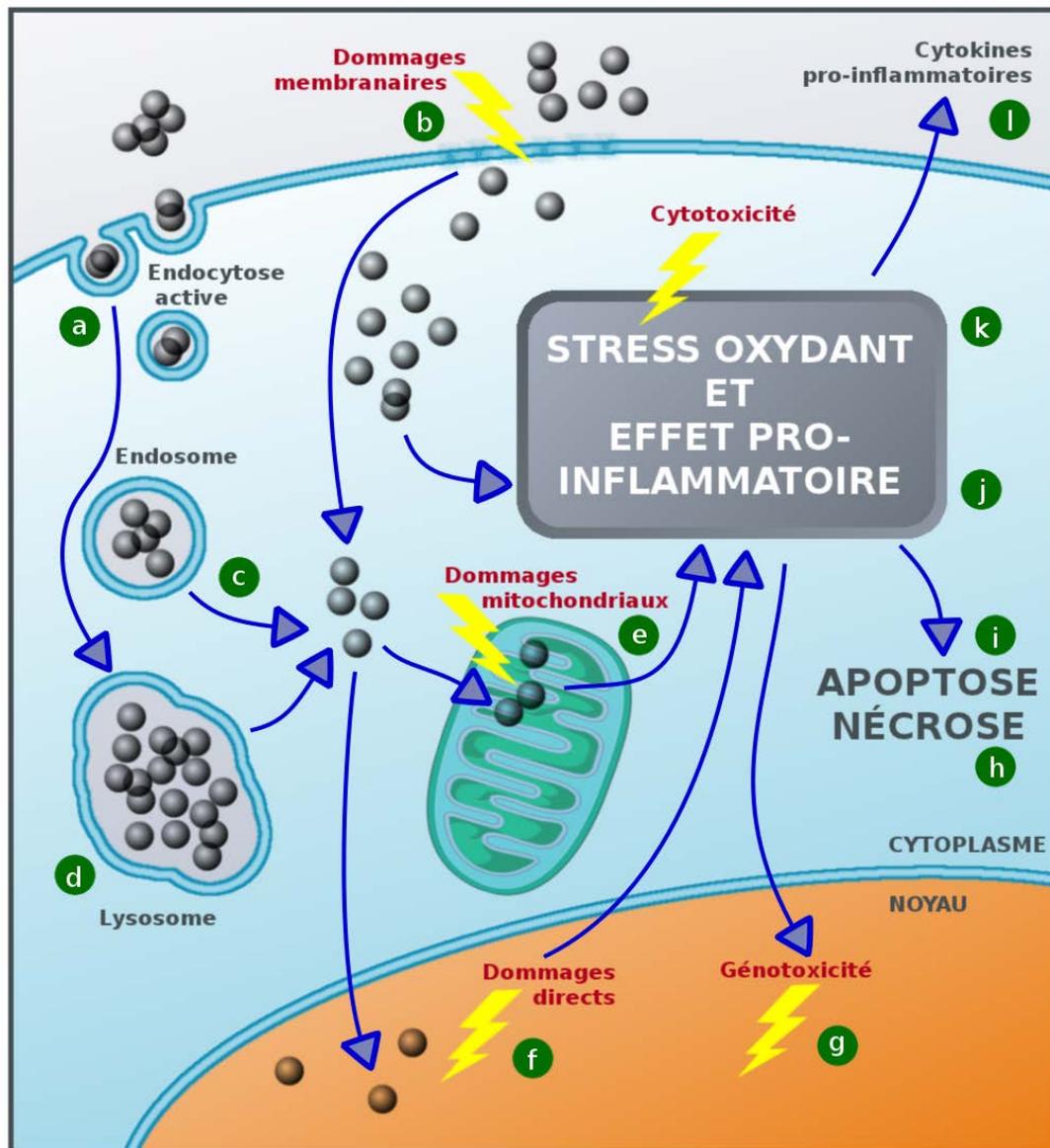


FIGURE 1.22 – Schéma des principaux dysfonctionnements cellulaires induits par les NPs. **a** - endocytose active des NPs [Chung 2007]; **b** - entrée des NPs par destruction de la membrane plasmique, phénomène observé pour des NPs de faible taille, perturbation des canaux calciques [Corbalan 2012] et de la fluidité membranaire [Yang 2009]; **c** - échappement endosomal pouvant amener à la libération de NPs dans le cytoplasme [Faklaris 2009]; **d** - accumulation dans les lysosomes et potentielle dégradation pouvant entraîner un effet toxique [He 2009]; **e** - localisation intra-mitochondriale de NPs, toxicité mitochondriale [Pandey 2013] et impact sur la chaîne respiratoire [Tao 2008]; **f** - entrée de NPs dans le noyau pouvant perturber l'activité locale et induire de la génotoxicité [Chen 2005]; **g** - génotoxicité induite par des dommages oxydatifs sur l'ADN [Gerloff 2009], perturbation de la mitose pour des concentrations en NPs infra-toxiques [Gonzalez 2010]; **h** - nécrose cellulaire [Napierska 2009]; **i** - apoptose taille dépendante liée à la génération d'espèces réactives à l'oxygène [Ye 2010]; **j** - réponses pro-inflammatoires [Srivastava 2012]; **k** - génération d'espèces réactives à l'oxygène [Park 2009]; **l** - augmentation de l'expression de cytokines suite à l'exposition de NPs [Kermanizadeh 2011], induction de mécanismes pro-inflammatoires dans de nombreux types cellulaires [Horie 2013].

1.3.3 NPs de silice et barrières cellulaires

Comme décrit dans la partie précédente, l'un des problèmes principaux dans la compréhension des interactions entre les NPs et les structures biologiques se situe à l'échelle de taille des NPs. Que le cadre biologique soit dans un but de thérapie, de développement de nouveaux nano-outils ou encore plus largement de compréhension des risques toxicologiques des NPs, l'étude des interactions NPs - cellules doit commencer au niveau moléculaire. Dans cette partie nous évoquerons le comportement de NPs au niveau de la cellule *in-vitro*. En raison de la quantité importante de données portant sur les NPs, il a été choisi de restreindre l'étude aux NPs de silice.

L'étude de ces processus commence avec un modèle simplifié au maximum : l'interaction entre nano-objets et membranes lipidiques modèles. Nous nous focaliserons par la suite sur le transport cellulaire des NPs de silice et ce plus particulièrement dans la barrière endothéliale.

1.3.3.1 Interactions de NPs avec des membranes modèles

La mise en évidence de transport de NPs dans des cellules ne possédant pas la capacité d'endocytose active telles que les érythrocytes (voir figure 1.24) pose la question de la capacité des NPs à franchir les membranes plasmiques de manière passive. Néanmoins l'étude du transport transmembranaire de NPs d'or sur des liposomes modélisant la membrane plasmique a montré qu'en l'absence d'interaction entre les particules et la membrane aucune diffusion n'était possible [Banerji 2007]. L'étude de l'adhésion de NPs colloïdaux sur des vésicules géantes par interactions électrostatiques a mis en avant un enrobage des NPs par la membrane lipidique. Cet enrobage ne se limitait pas aux zones de contact entre vésicule et membrane lipidique, mais s'étendait sur l'ensemble de la vésicule [Fery 2003]. D'après différents modèles théoriques, ce processus d'enrobage est possible dans le cas d'une vésicule de taille importante par rapport à la particule [Deserno 2002]. Malgré l'enrobage des particules, une complète pénétration n'est possible qu'en présence d'un mécanisme permettant la fission entre la particule enrobée et la vésicule d'enrobage [Smith 2007].

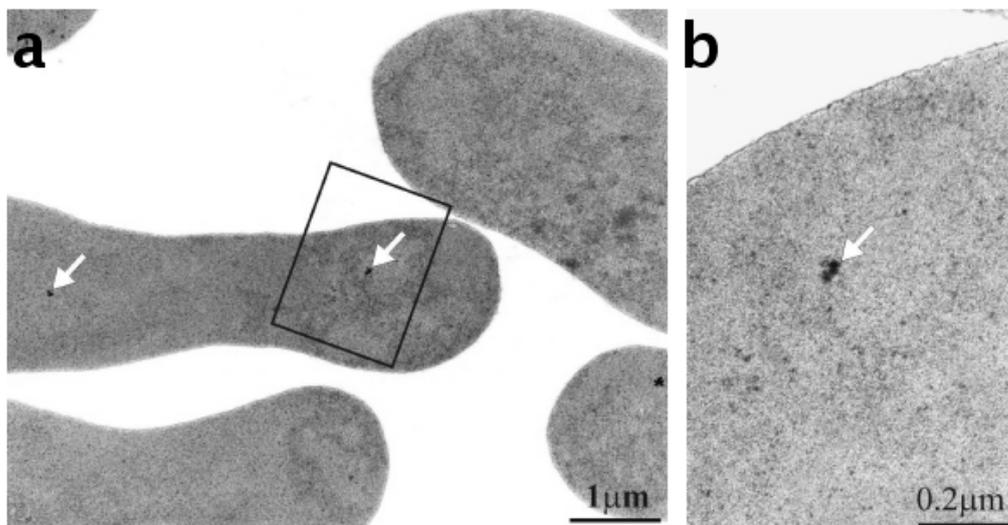


FIGURE 1.23 – Internalisation de NPs d'or dans des cellules démunies de voies d'endocytose actives. **a** - Exemple des érythrocytes ; **b** - Aggrandissement du cadre noir en **a**. [Rothen-Rutishauser 2006]

Les interactions entre membranes lipidiques et NPs ont également été étudiées par déposition de vésicules lipidiques sur des NPs de silice au laboratoire. Cette approche a permis de montrer que les bicouches lipidiques recouvrent complètement les NPs et ce peu importe leur topographie [Mornet 2005]. L'étude de l'interaction de NPs de silice avec de larges liposomes uni-lamellaires par cryo-tomographie électronique montre bien une internalisation complète des particules dans les liposomes pour des tailles de NPs supérieures à 15 nm (voir figure 1.24).

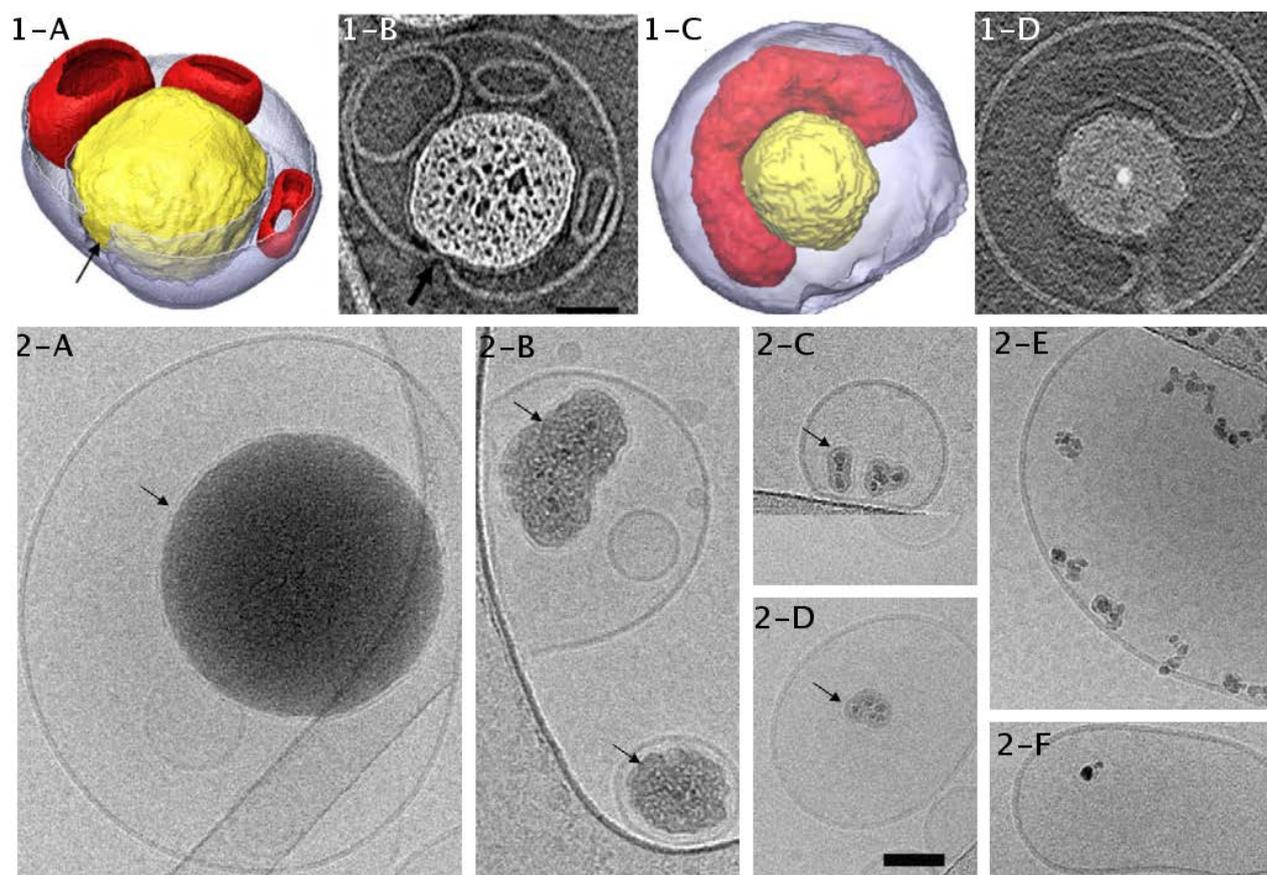


FIGURE 1.24 – Internalisation de NPs de silice dans de larges liposomes uni-lamellaires. **1** - Iso-surfaces et coupes du tomogrammes correspondantes (**A-B**; **C-D**) montrant l'architecture de particules de silice (jaune) enrobées partiellement (**A-B**) et entièrement (**C-D**) par le liposome (bleu). Présence de petits liposomes dans la vésicule (rouge). Échelle : 50 nm. **2** - Lien entre tailles des NPs et internalisation : **A** - 190 nm; **B** - 65 nm; **C-D** - 30 nm; **E-F** - 15 nm. Les NPs de 15 nm restent attachées à la surface extérieure du liposome. Échelle : 50nm. [Le Bihan 2009]

En conclusion, les NPs d'une taille importante, une fois entrées en interaction avec des membranes lipidiques modèles, sont capables de les traverser spontanément. Quelques travaux renforcent cette information en montrant une localisation intracellulaire des NPs dans des types cellulaires dépourvus de processus actifs d'endocytose. Cependant, la capacité des NPs à traverser les membranes pour se retrouver dans le cytoplasme reste peu documentée.

1.3.3.2 Transport cellulaire de nanoparticules de silice

L'internalisation et le transport de NPs de silice ont été étudiés dans différents types cellulaires. La plupart des études se focalisent sur la localisation intracellulaire des NPs par l'utilisation d'outils permettant leur visualisation directe ou indirecte. La microscopie électronique à transmission est le premier de ces outils. La capacité de visualiser directement, à l'échelle nanométrique, les NPs dans le milieu cellulaire, permet une identification rapide de leur localisation, et ce, sur des critères morphologiques. Le développement de NPs possédant des propriétés optiques, telles que la fluorescence, permet également le suivi de l'internalisation par diverses méthodes de microscopie optique à fluorescence et de cytométrie en flux.

Le développement d'approches multi-modales pour l'étude des mécanismes d'interaction NPs-cellules est nécessaire de par les limitations de chacune de ces techniques d'observation. La microscopie électronique par exemple, même si elle permet une observation directe et résolutive des NPs requiert des étapes de préparation, potentiellement perturbantes pour l'échantillon biologique. De plus, une image ne représente pas forcément une situation et la grande capacité résolutive de la MET sacrifie souvent la vision globale et quantitative de l'échantillon.

Une grande majorité des études existant sur l'interaction des NPs de silice ou d'autres matières se focalisent actuellement sur leur effet cytotoxique [Napierska 2010]. Néanmoins la plupart de ces études tentent de caractériser la localisation des NPs dans les cellules par microscopie électronique et optique. La figure 1.25 présente les différentes localisation intra-cellulaires les plus couramment retrouvées dans ces études. On remarquera que à long terme les NPs sont connues pour être colocalisées avec les lysosomes.

Jusqu'à maintenant la plupart des études se sont focalisées sur l'internalisation de NPs dans des cellules non-polarisées (comme par exemple l'étude présentée en figure 1.25). Il a pourtant été montré que les cellules polarisées comme les cellules endothéliales et épithéliales possèdent des mécanismes d'endocytose différents entre leur face basale et leur face apicale [Sandvig 2005].

La plupart des études mettent en évidence, l'internalisation des NPs par les voies d'endocytose majoritaires et mieux connues développées précédemment : macropinocytose, phagocytose, clathrine et cavéoline dépendantes. L'étude du lien entre voie et internalisation des NPs peut se faire grâce à plusieurs outils : des inhibiteurs pharmaceutiques des voies d'internalisation, l'utilisation de lignées cellulaires exprimant des mutations sur les protéines mises en jeu par ces voies d'internalisation, l'utilisation de siRNA ou encore la caractérisation directe sur des critères morphologiques ou de colocalisation avec des marqueurs des voies d'endocytose [Iversen 2011].

Taille, charge et couronne protéique sont des paramètres importants lors de l'internalisation des NPs dans les cellules. Selon les propriétés physico-chimique de surface des NPs, les voies d'endocytoses utilisées vont varier. Dans la plupart des approches *in-vitro*, et ce particulièrement pour les modèles de barrières biologiques, une attention particulière doit être apportée à la représentativité du modèle. Les outils pharmacologiques et techniques utilisés pour suivre le devenir intracellulaire des NPs ne permettent qu'une vision partielle au mieux de la situation. Il est donc nécessaire d'aller vers des approches multi-modales et de tenter de suivre ces événements de la manière la plus directe et complète possible dans des systèmes représentatifs d'une condition physiologique.

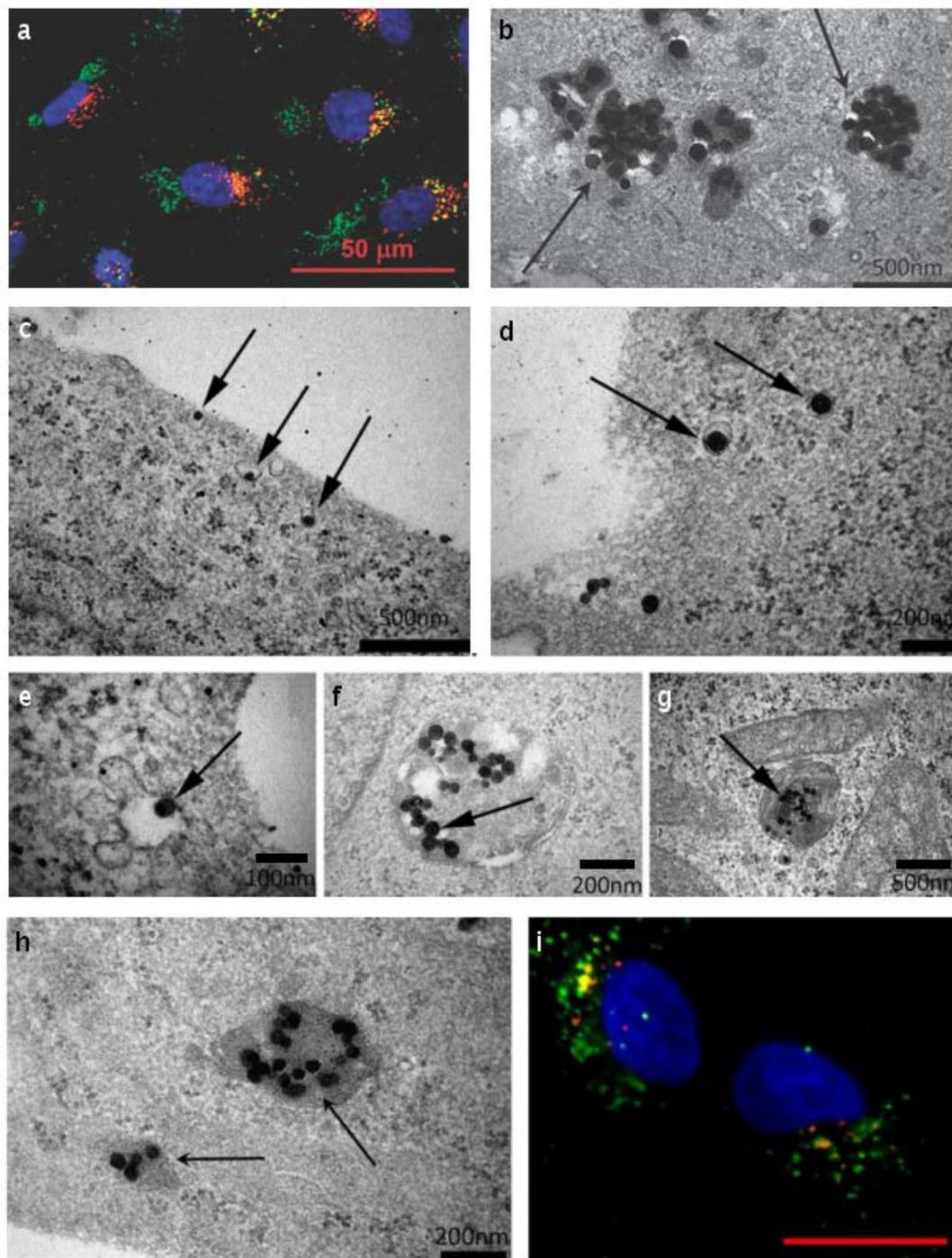


FIGURE 1.25 – Localisations intra-cellulaires de NPs de silice fluorescentes dans des cellules A549. **a** - co-localisation des NPs (vert) avec les lysosomes (rouge) 24h après exposition, noyaux en bleu. **b** - Image correspondante de **a** en MET. **c-d** - Internalisation des NPs en MET, évènements précoces. **e** - **f** - **g** - localisation des NPs dans les endosomes précoces et vésicules multi-lamellaires. **h** exemple de localisation dans les lysosomes. **i** - Image de microscopie confocale à fluorescence de cellules en cours de division, les NPs sont divisées entre les deux cellules filles (vert), noyaux en bleu. [Shapero 2011]

1.3.3.3 Nanoparticules de silice et endothélium

La table 1.3 présente un résumé des études récentes portant sur l'endothélium *in-vitro* et les NPs de silice.

Caractéristiques des NPs	Type cellulaire	Informations apportées par l'étude	Références
Silice amorphe 16, 19, 60, 104, 335 nm	EAHY926	Mort cellulaire par nécrose, concentration et taille dépendante. NPs de faibles tailles plus toxiques que les grosses.	[Napierska 2009]
Silice amorphe 2, 16, 60, 104 nm	EAHY926 co-cultures	Cytotoxicité taille dépendante. Sécrétion de cytokines inversement proportionnelle à la taille des NPs. Approches de co-culture mettant en avant une activation des cellules endothéliales par le contexte.	[Napierska 2012]
Silice amorphe 18, 54, 185 nm	EAHY926 HPAEC co-cultures	Augmentation des propriétés d'adhésion des cellules en fonction de la présence de co-cultures et de la taille des NPs. (sur-expression d'ICAM-1 et VCAM-1) Localisation intra-cytoplasmique et membranaire en agrégats des NPs	[Napierska 2013]
Silice amorphe 4 - 40 nm	HDMEC	Effet pro-inflammatoire des NPs (augmentation de la quantité d'IL-8 relarguée dans le milieu de culture et apparition de fibres de stress dans le cytoplasme)	[Peters 2004]
Silice amorphe 10, 50, 150, 500 nm	HUVEC	Augmentation du stress oxydant après pénétration des NPs corrélée à des processus d'inflammation et de la nécrose cellulaire (inversement fonction de la taille des NPs) NPs localisées dans le cytoplasme en vésicules ou libres	[Corbalan 2011]
Silice mésoporeuse	HUVEC	Dégradation des NPs dans le cytoplasme et dans les lysosomes dès 2 jours. Excrétion de la silice dans le milieu de culture.	[Zhai 2012]
Silice amorphe 50, 100, 200 nm	HCMEC D3	Transcytose potentielle mais faible (4 % maximum pour 50 nm) Accumulation massive dans les cellules au niveau des lysosomes, entrée dépendant des condition d'agrégation des NPs (larges groupes)	[Ye 2013]
Silice amorphe 57 nm	HMREC	Inhibition de l'angiogenèse VEGF dépendante de cultures cellulaires sur Matrigel	[Jo 2012]
Silice amorphe 25, 60, 115 nm chargées +/-	HUVEC	Charge des NPs influe sur leur stabilité colloïdale et par conséquent, leur état d'agrégation. Cet état d'agrégation cadre leur accumulation par les cellules. Aucun effet anti-angiogenèse n'a été détecté pour les NPs de 25 nm par opposition au NPs de plus forte tailles.	[Guarnieri 2014]
Silice amorphe 50 nm	HCMEC D3	Transcytose des NPs difficilement quantifiable pour cause de rétention partielle des NPs dans la membrane. MET montrant les NPs localisées au niveau des lysosomes. Influence des NPs sur la perméabilité de la barrière.	[Ragnail 2011]
Silice amorphe 50 nm	HUVEC	Les cellules sont soumises à un pré-conditionnement sous-flux à des intensités variables. Lien entre l'intensité du stress de cisaillement apporté et la quantité de NPs internalisées.	[Samuel 2012]
Silice amorphe 62 nm	HUVEC	Cytotoxicité des NPs par dommages membranaires. Induction de l'apoptose. Effet négatif sur l'angiogenèse.	[Duan 2013]
Silice amorphe 30 et 100 nm	HUVEC	Bonne bio-compatibilité des NPs et endocytose "excellente" particulièrement pour les 100 nm. Localisation dans les endosomes puis libération dans le cytoplasme. Bonne photo-durabilité des fluorophores liés aux NPs par rapport à des fluorophores libres.	[Veerana 2012]
Composites Fe - Si 355 nm	HUVEC	NPs magnétiques et fluorescentes adressées vers des cellules endothéliales exprimant VCAM-1. Expériences sous-flux montrant un effet positif sur l'internalisation de l'expression de VCAM-1.	[Yang 2013]

TABLE 1.3 – Études récentes sur l'interaction entre NPs de silice et cellules endothéliales *in-vitro*.

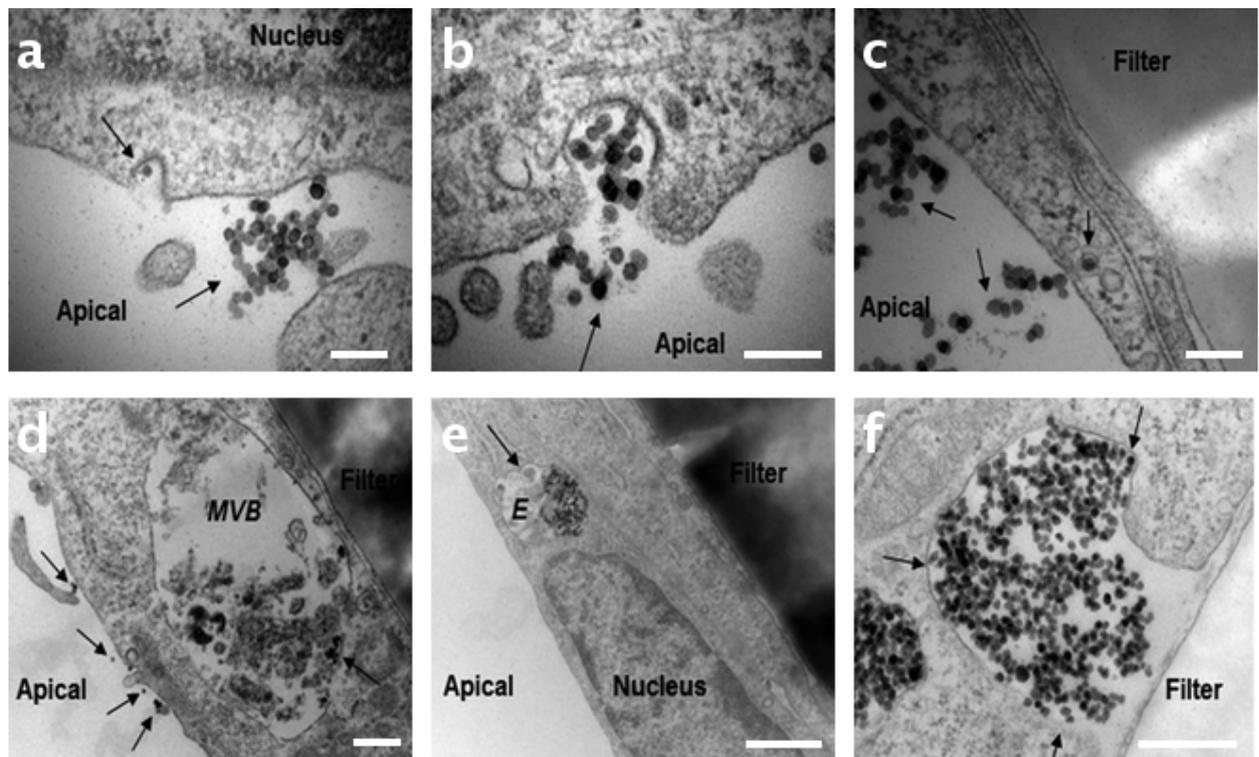


FIGURE 1.26 – Transport de NPs de silice de 50 nm dans la barrière hémato-encéphalique *in-vitro* en présence de SFV 2 %. Les flèches indiquent les NPs. **a** - NP isolée en cours d'internalisation par la cellule (potentiellement par une vésicule clathrine). **b** - groupe de NPs en cours d'internalisation. **c** - NP internalisée dans une vésicule endosomale et groupes de NPs à l'extérieur des cellules. **d** - NPs contenues dans une vésicule (MVB). **e** - NPs contenues dans un endosome. **f** - large groupe de NPs observées entre la membrane supportée et la face basale de la cellule. Échelles : 200 nm (**a-c**), 500 nm (**d - f**), 1 μm (**e**). Adapté de [Ye 2013].

Les NPs de silice ont particulièrement été étudiées dans l'endothélium en vue de comprendre leurs potentiels mécanismes toxiques (cytotoxicité par génération d'espèces réactives à l'oxygène, impact sur l'expression de protéines d'adhésion, inhibition de l'angiogenèse, augmentation de la perméabilité de la barrière endothéliale, dommages membranaires, sécrétion de cytokines dans le milieu extra-cellulaire). Néanmoins quelques études ont tentées de quantifier le transport au travers de la barrière endothéliale de ces NPs, montrant une tendance majoritaire à la rétention (voir figure 1.26).

Étude de l'internalisation de nanoparticules de silice dans la barrière endothéliale pulmonaire humaine

Sommaire

2.1	Objectifs de l'étude	46
2.2	Résultats	47
2.2.1	Caractérisation des NPs et de leur effet sur la toxicité cellulaire	47
2.2.2	Internalisation des nanoparticules dans les cellules endothéliales humaines	50
2.2.3	Étude de l'internalisation des NPs à 4°C	56
2.2.4	Identification des voies d'endocytose	57
2.2.5	Cryo-microscopie électronique - méthode CEMOVIS, exemple des NPs de 15 nm	61
2.2.6	Effet des NPs sur l'adhérence cellulaire	64
2.3	Discussion	66
2.4	Partie expérimentale	70
2.4.1	Préparation des NPs fluorescentes	70
2.4.2	Caractérisation de NPs en solution	71
2.4.3	Culture cellulaire	72
2.4.4	Expériences d'inhibition des voies d'endocytose	74
2.4.5	Cytométrie en flux	76
2.4.6	Microscopie électronique	77
2.4.7	Préparation d'échantillons biologiques pour la microscopie électronique à transmission	79
2.4.8	Préparation d'échantillons biologiques pour la cryo-microscopie électronique à transmission	85
2.4.9	Microscopie corrélative <i>in-situ</i>	87
2.4.10	Caractérisation de l'adhérence cellulaire après exposition aux NPs	88

2.1 Objectifs de l'étude

Le transport des NPs au travers de l'endothélium est conditionné par leur interaction avec les cellules. Ces interactions, comme décrit dans le chapitre précédent, sont contrôlées par les caractéristiques physico-chimiques des NPs. L'objectif est ici l'étude de l'internalisation de NPs de silice en fonction de leur taille dans l'endothélium pulmonaire humain *in-vitro*. Avant de pouvoir étudier un potentiel transport trans-endothélial des NPs, il est nécessaire de caractériser leur internalisation.

Les NPs utilisées dans cette étude sont des NPs de silice fluorescentes négatives de trois tailles définies par mesure directe en MET : **15**, **50** et **100 nm** (voir figure 2.1).

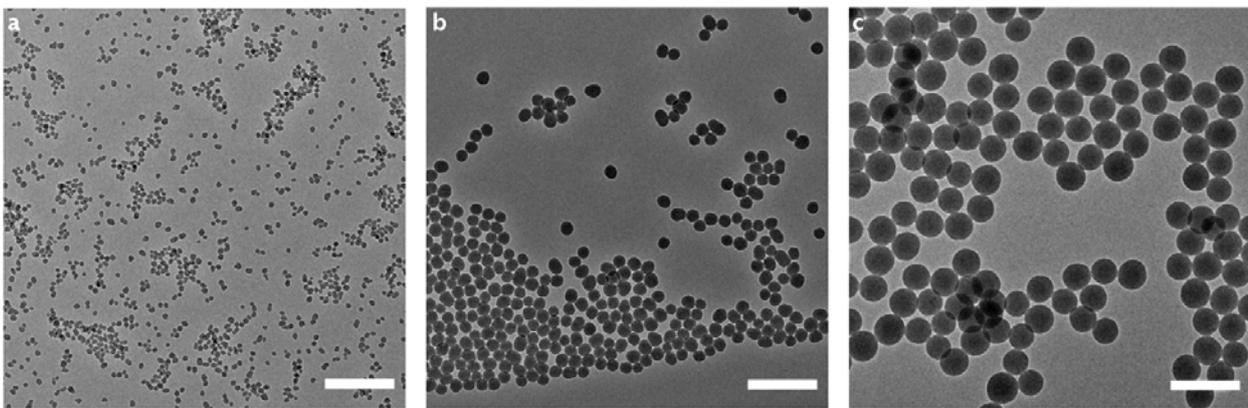


FIGURE 2.1 – Micrographes des 3 types de NPs synthétisées dans l'eau, 15 (a), 50 (b) et 100 nm (c). Échelle 250 nm.

Le modèle cellulaire utilisé est composé de cellules primaires **HPAECs** (*Human Pulmonary Arterial Endothelial Cells* - cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines) cultivées à un nombre minimal de passages après isolation. L'internalisation des NPs a été suivie de manière qualitative par des techniques de microscopie optique à épifluorescence (MOE) et de microscopie électronique à transmission (MET) et de manière quantitative par cytométrie en flux.

La **première** partie de cette étude se focalise sur la **caractérisation des NPs** dans les différents milieux de culture cellulaire, ainsi que sur l'**effet toxique** des NPs envers les cellules HPAECs. Cela permet la mise en place des protocoles d'exposition aux NPs utilisés dans la suite de cette étude.

La **seconde** partie de cette étude cherche à évaluer **qualitativement** la **localisation intracellulaire** au cours du temps des trois types de NPs par les techniques de microscopies.

La **troisième** partie de cette étude évalue le lien entre les **voies d'endocytose** empruntées et la taille des NPs. La cytométrie en flux permet la **quantification** de l'internalisation en présence de différents inhibiteurs pharmaceutiques des voies principales d'endocytose. La MET offre une **caractérisation qualitative** des localisations des NPs dans les cellules dans ces mêmes conditions.

2.2 Résultats

2.2.1 Caractérisation des NPs et de leur effet sur la toxicité cellulaire

2.2.1.1 Caractérisation des NPs en solution

Afin de suivre l'état d'agglomération, synonyme de déstabilisation des systèmes colloïdes, différentes solutions de NPs ont été préparées dans les milieux physiologiques utilisés dans cette étude. Les NPs préparées dans un milieu pauvre en sérum (ECBM), présentent un diamètre hydrodynamique correspondant aux tailles observées dans l'eau (voir table 2.1). Les valeurs de potentiel ζ indiquent que les NPs en solution sont relativement stables dans ces conditions. On note, tout de même, une augmentation marquée du potentiel ζ pour les NPs de 15 nm dans le milieu minimal (ECBM).

Taille MET	Diamètre hydrodynamique (nm)			Potentiel Zeta (mV)		
	15 nm	50 nm	100 nm	15 nm	50 nm	100 nm
Eau	28	86	141	-32.4 ± 3.2	-36.0 ± 3.6	-33.5 ± 3.8
ECBM	26	87	145	-19.5 ± 5.7	-25.4 ± 4.9	-29.6 ± 5.2
ECGM	141	169	504	NA	-4.1 ± 8.1	-5.6 ± 6.09

TABLE 2.1 – Diamètres hydrodynamiques et potentiels ζ des NPs dans différents milieux.

Dans le milieu ECBM, les NPs observées en MET, après déposition sur un film mince de carbone, semblent peu agglomérées (figure 2.2) avec un grand nombre de particules isolées pour les trois types. Occasionnellement des groupes de deux à trois NPs sont visibles (figure 2.2 b flèche). Ces particules peuvent s'être rassemblées lors du séchage de la grille. On note également la présence de cristaux de sels et de rouge de phénol apportés par le milieu de culture.

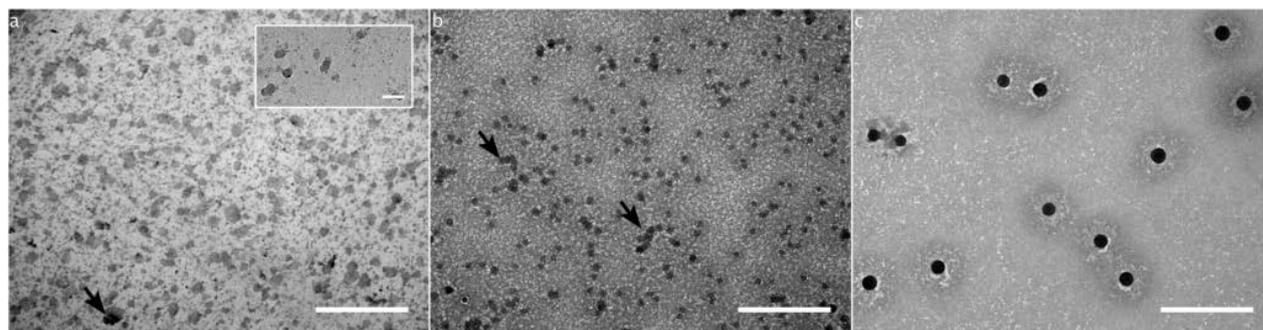


FIGURE 2.2 – NPs de 15 nm (a), 50 nm (b) et 100 nm (c) dans du milieu minimal (ECBM) déposées sur un film de carbone et observées en MET (échelle 1 μm).

Dans un milieu complet, c'est-à-dire, riche en protéines de sérum et facteurs de croissance, la stabilité des NPs se dégrade. Le diamètre hydrodynamique des particules augmente drastiquement en présence de milieu complet. Le potentiel ζ indique une diminution de la charge des NPs les déstabilisant (voir table 2.1). Il n'a pas été possible de détecter les NPs de 15 nm dans le milieu complet par zétamétrie.

La MET confirme le résultat obtenu en DLS (voir figure 2.3). Les nanoparticules de 15 nm s'organisent en groupes de tailles variables se différenciant du milieu de culture par leur densité et le contraste de la silice (2.3 a flèches). Les NPs de 50 nm (2.3 b), se retrouvent sous la forme de larges agglomérats (flèche) et plus rarement isolées (pointe de flèche). On notera en 2.3 c, un large groupe de NPs de 100 nm dont on peut clairement visualiser la couronne protéique (flèche) formant une couche supplémentaire autour de l'agglomérat.

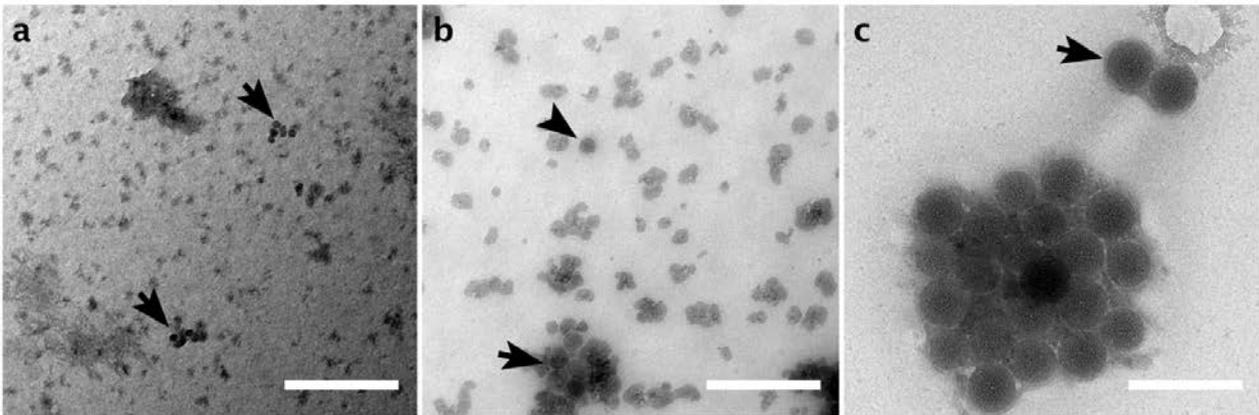


FIGURE 2.3 – NPs de 15 nm (a), 50 nm (b) et 100 nm (c) dans du milieu complet (ECGM) déposées sur un film de carbone et observées en MET (échelle 250 nm).

- ◇ Dans le milieu minimal, les NPs conservent une distribution semblable à celle observée dans l'eau.
- ◇ Les protéines du milieu complet s'organisent autour des NPs, formant une couronne protéique et provoquent l'agglomération des NPs entre elles.

2.2.1.2 Toxicité cellulaire des NPs

La cytotoxicité des NPs dépend de deux paramètres : leur taille et leur concentration. Afin de s'affranchir du problème de la comparaison entre différentes tailles de particules, les concentrations ont été exprimées en terme de rapports entre la surface totale d'interaction de NPs en cm^2 par cm^2 de cellules en culture. La toxicité des NPs a été analysée en présence et en absence de sérum par le test WST1, 24 heures après exposition aux NPs (figures 2.4 et 2.5). Les résultats représentent la moyenne de trois réplicats.

En présence de sérum, aucun effet cytotoxique a été noté, même à des concentrations extrêmes (voir figure 2.4).

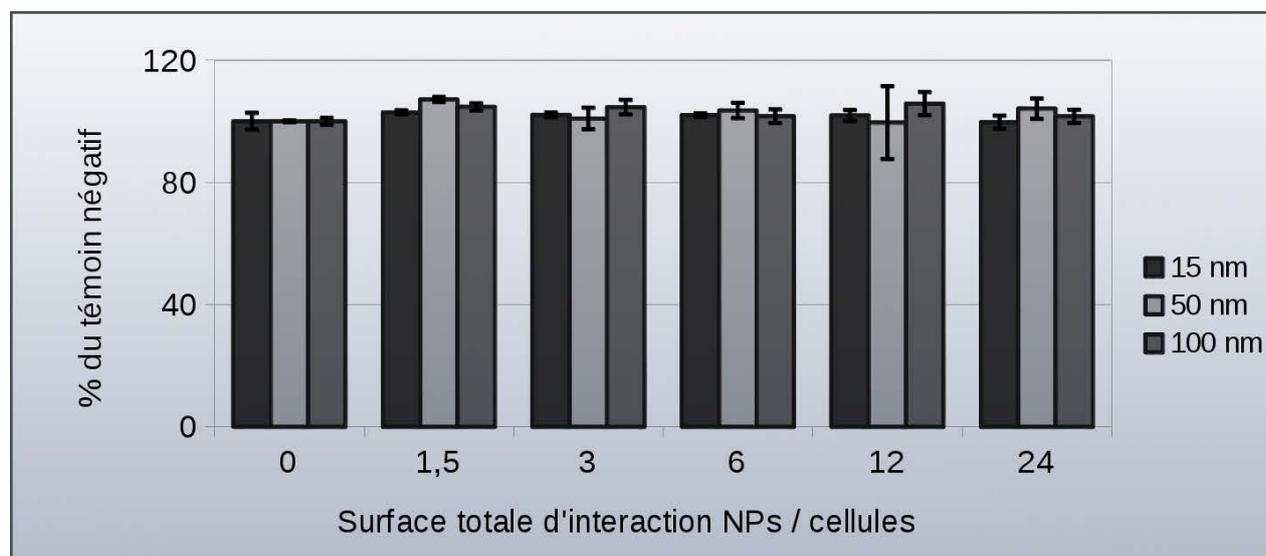


FIGURE 2.4 – Cyto-toxicité des NPs après 24 heures en milieu complet.

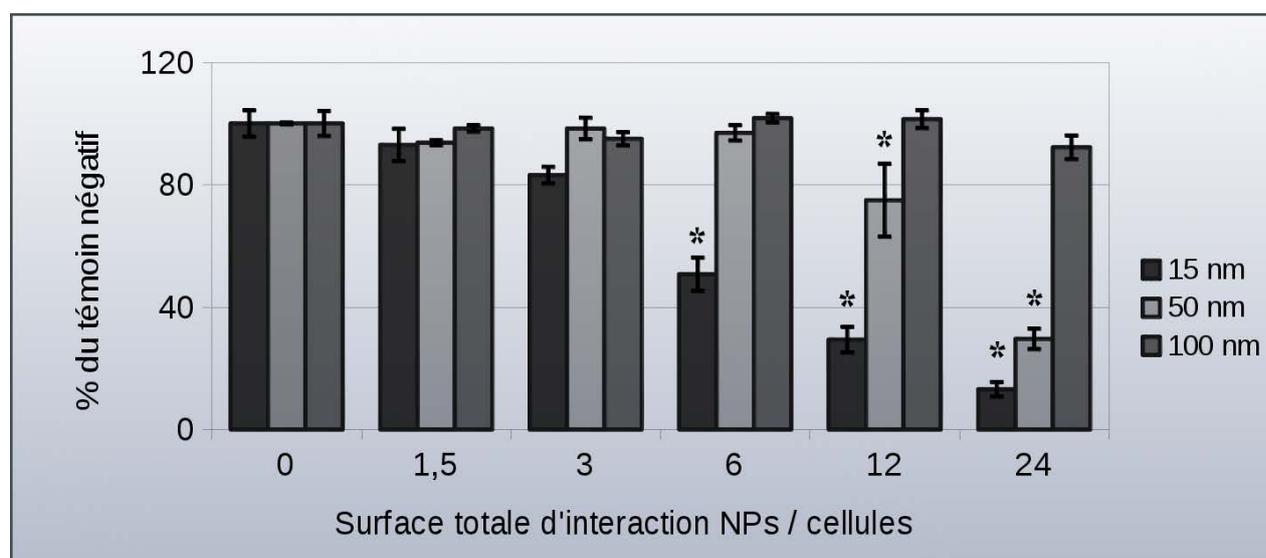


FIGURE 2.5 – Cyto-toxicité des NPs après 24 heures en milieu dépourvu de sérum. Les astérisques indiquent une différence significative ($p < 0,05$).

En absence de sérum (voir figure 2.5), les cellules montrent une sensibilité plus forte aux NPs de 15 nm, avec un effet toxique de l'ordre de 50% dès une surface d'interaction de 6. Les NPs de 50 nm ont également un effet toxique à partir d'une surface d'interaction de 12 alors que les NPs de 100 nm n'ont quasiment pas d'impact sur la viabilité cellulaire même à 24. La surface d'interaction infra-toxique retenue pour la suite des expériences est de 3.

Les concentrations en NPs mises au contact des cellules endothéliales pour l'ensemble de l'étude en μg de NPs par cm^2 de surface de culture sont regroupées dans la table 2.2. Les concentrations de travail ont été fixées et conservées pour l'ensemble des expériences sauf indication contraire. La surface d'interaction entre NPs et surface de culture a été fixée à 3 pour toutes les tailles afin de faciliter la comparaison.

Diamètre (nm)	Concentration stock (g/L)	Concentration stock (NPs/L)	Concentration utilisée (NPs/ cm^2)	Concentration utilisée ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
15	7,4	$2,1 \cdot 10^{18}$	$4,244 \cdot 10^{11}$	1,5
50	19	$1,53 \cdot 10^{17}$	$3,82 \cdot 10^{10}$	5
100	19,4	$1,8 \cdot 10^{16}$	$9,55 \cdot 10^9$	10

TABLE 2.2 – Concentrations des NPs dans l'étude.

- ◇ Les NPs mises au contact des cellules en présence de milieu complet n'entraînent pas d'effet cytotoxique visible aux concentrations étudiées.
- ◇ En présence de milieu minimal, un effet cytotoxique inversement proportionnel à la taille des NPs et à la concentration est observé.
- ◇ Les concentrations de NPs mises au contact des cellules dans la suite de l'étude sont :
 - $1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de cellules pour les 15 nm ;
 - $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de cellules pour les 50 nm ;
 - $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de cellules pour les 100 nm.

2.2.2 Internalisation des nanoparticules dans les cellules endothéliales humaines

Le temps d'exposition des cellules aux NPs a été fixé à une heure. L'internalisation des trois types de NPs a été suivie par MET à une heure et 24 heures après exposition et à concentrations infra-toxiques.

2.2.2.1 Analyse par MET et MOE de l'internalisation de NPs après une heure

Les NPs sont mises au contact des cellules pendant une heure dans un milieu minimal selon le protocole développé dans la partie expérimentale de ce chapitre.

Le contrôle de l'interaction entre cellules et NPs est réalisé pour chaque condition par MOE. Les NPs agglomérées apparaissent principalement sur les images de MOE, le signal d'une particule n'étant pas suffisamment intense. Les NPs sont localisées adsorbées à la membrane apicale des cellules et internalisées. Il n'est pas possible de déterminer sur l'image d'épifluorescence si les NPs sont présentes uniquement en surface ou internalisées dans les cellules. Bien que la MOE fournisse une première information, une localisation plus détaillée des NPs est possible en MET.

NPs de 15 nm. La majorité des NPs de 15 nm sont localisées en MOE dans les régions les plus épaisses des cellules, dans la périphérie du noyau (voir figure 2.6 a). En MET, il apparaît qu'il y a plus de NPs que de signal fluorescent visible sur l'image de MOE. Les NPs de 15 nm sont localisées libres dans le cytoplasme cellulaire sous forme de petits groupes de 3 - 6 NPs libres, ou dans de petites vésicules, dans l'ensemble de la cellule (voir figure 2.6 b et d). Les NPs sont également localisées dans de larges vésicules contenant des fragments membranaires (voir figure 2.8 c, pointe de flèche) et plus rarement en larges amas libres dans le cytoplasme, souvent localisés à la proximité de vésicules (voir figure 2.6 e, pointe de flèche). Enfin, les NPs sont localisées à la membrane apicale des cellules, plupart du temps sous forme de groupes de NPs (voir figure 2.6 c, flèche).

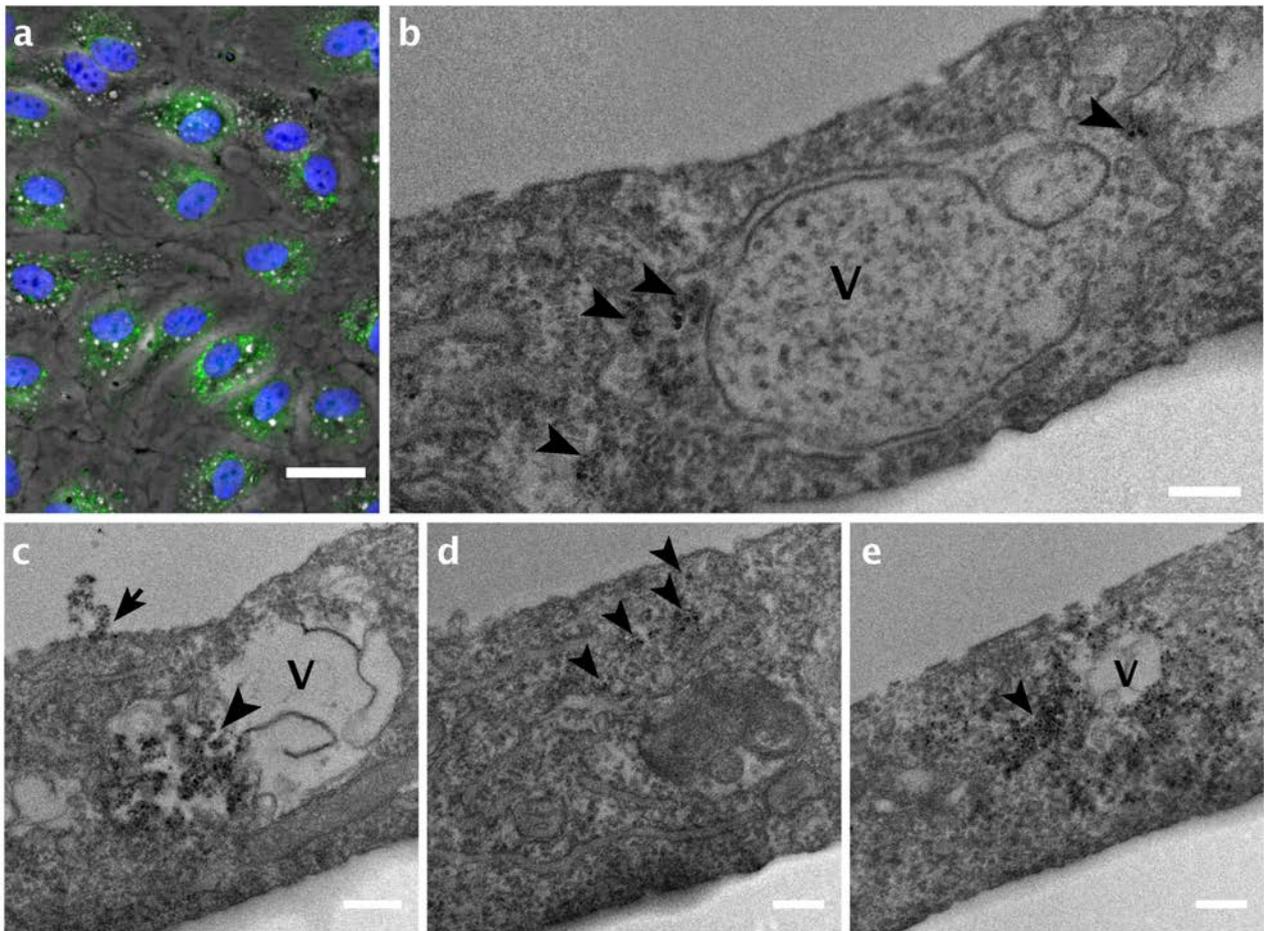


FIGURE 2.6 – NPs de 15 nm après une heure d'incubation. **a** - Tapis cellulaire observé par MOE (noyaux en bleu, NPs en vert), les NPs apparaissent regroupées dans les parties épaisses des cellules ; **b-e** - galerie d'images de microscopie électronique à transmission. **b** - NPs libres dans le cytoplasme en petits groupes (pointes de flèches) ; **c** - NPs rassemblées dans une vésicule avec des débris membranaires (pointe de flèche) et NPs au contact de la membrane apicale de la cellule (flèche) ; **d** - Petits groupes de NPs internalisés et retrouvés libres dans le cytoplasme (pointes de flèches) ; **e** - Grandes concentrations de NPs libres dans le cytoplasme (pointe de flèche) en bordure d'une vésicule. V - vésicules. Échelles : MOE 25 μm et MET 300 nm.

NPs de 50 nm. Les NPs de 50 nm sont localisées sur l'ensemble du tapis cellulaire sous forme d'agglomérats en MOE (voir figure 2.7 a). En MET, les NPs de 50 nm sont distribuées libres dans le cytoplasme isolées ou en groupes (voir figure 2.7 b flèche) et dans de larges vésicules denses en NPs (voir figure 2.7 b noté V). Les NPs sont également au contact de la membrane apicale, sous forme d'agglomérats en cours d'internalisation. La figure 2.7 c montre des groupes de NPs en cours d'internalisation potentiellement par macropinocytose, à différents stades.

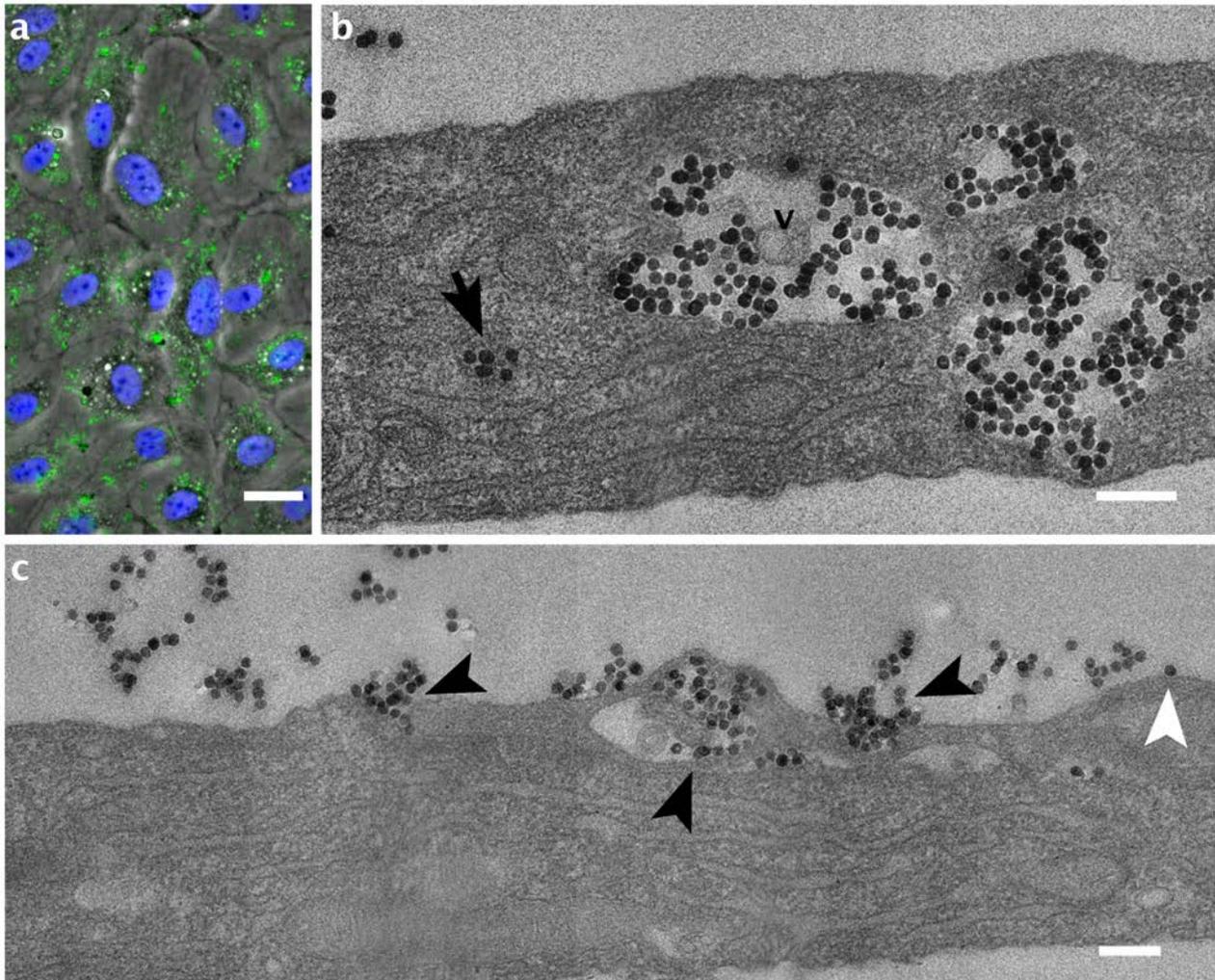


FIGURE 2.7 – NPs de 50 nm après une heure d'incubation. **a** - Tapis cellulaire observé par MOE (noyaux en bleu, NPs en vert), les NPs sont réparties sur l'ensemble du tapis de manière homogène. L'intensité et la répartition du signal des NPs montrent une agglomération partielle. **b-c** - galerie d'images de microscopie électronique à transmission. **b** - NPs libres dans le cytoplasme (flèche). De larges vésicules (V) contiennent les NPs. **c** - groupes de NPs en cours d'internalisation à la membrane apicale (pointes de flèches). Un regroupement des NPs et un plissage de la membrane plasmique préparent leur enveloppement par macropinocytose. Certaines NPs isolées sont également retrouvées en contact avec la membrane apicale (pointe de flèche blanche). Échelles : MOE 25 μm et MET 300 nm.

NPs de 100 nm. Les NPs de 100 nm sont localisées sur l'ensemble du tapis cellulaire de manière homogène (voir figure 2.8 a). En MET, on observe une distribution des NPs semblable aux NPs de 50 nm avec une tendance moindre à l'agglomération en surface des cellules. Les NPs de 100 nm sont localisées à la membrane apicale par petits groupes (voir figure 2.8 b flèche noire).

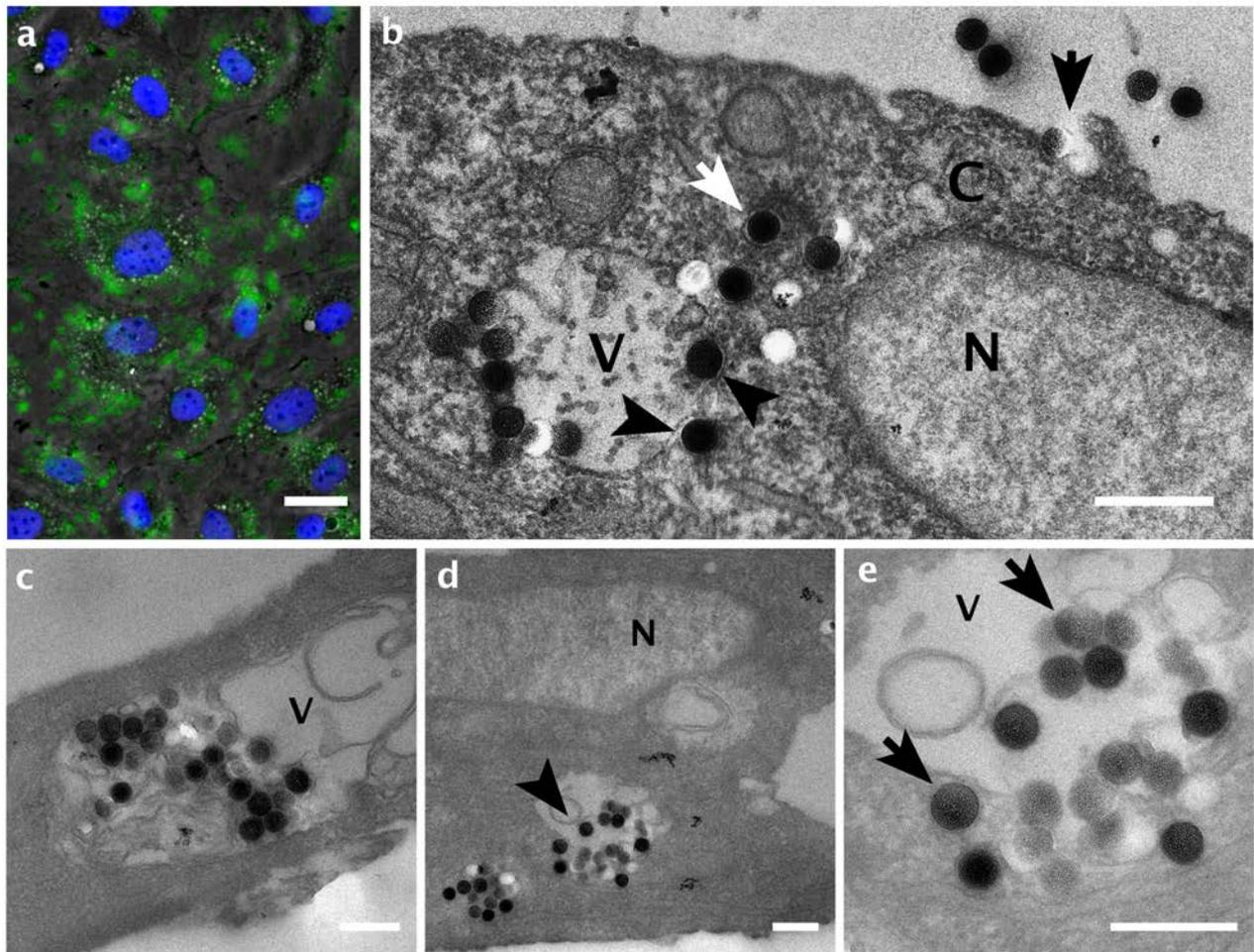


FIGURE 2.8 – NPs de 100 nm après une heure d'incubation. **a** - Tapis cellulaire observé par MOE (noyaux en bleu, NPs en vert), les NPs sont réparties sur l'ensemble du tapis de manière homogène. **b-e** - galerie d'images de MET. **b** - NPs en cours d'internalisation, on retrouve des NPs au niveau d'une vésicule contenant des débris cellulaires. Les NPs sont au contact de la membrane de la vésicule de chaque côté de celle-ci (pointes de flèche). Les NPs isolées dans le cytoplasme sont entourées d'une membrane (flèche blanche). Des NPs sont en cours d'internalisation à la membrane apicale (groupe de deux NPs en cours d'enrobage par la cellule - flèche noire). Les trous blancs correspondent à des NPs arrachées lors de la coupe. **c** - NPs regroupées dans des vésicules contenant des fragments membranaires (V). **d** - NPs dans une vésicule et libres dans le cytoplasme, en contact avec cette vésicule. **e** - Grossissement de la zone présentée en **d**. On notera que les NPs à l'extérieur de la vésicule semblent être entourées d'une membrane alors que celles à l'intérieur en apparaissent dépourvues (flèches). V - vésicules; N - noyau; C - cytoplasme. Échelles : MOE 25 μ m et MET 350 nm.

Les NPs de 100 nm sont majoritairement isolées dans le cytoplasme, une membrane lipidique entourant certaines (voir figure 2.8 *b* et *e*). Les NPs cytoplasmiques se rassemblent aux alentours des vésicules contenant des fragments membranaires (voir figure 2.8 *b-d*). On notera l'absence de la membrane une fois à l'intérieur des vésicules (voir figure 2.8 *e*).

- ◇ **15 nm** : majoritairement libres dans le cytoplasme en groupes de tailles variables, rassemblées dans des vésicules et plus rarement à la membrane apicale.
- ◇ **50 nm** : majoritairement à la membrane apicale en cours d'internalisation par groupes et rassemblées dans des vésicules, plus rarement libres dans le cytoplasme.
- ◇ **100 nm** : majoritairement dans, ou à proximité de vésicules contenant des fragments membranaires et débris cellulaires. Les 100 nm sont également en contact avec la membrane apicale en petits groupes en cours d'internalisation et libres dans le cytoplasme, isolées et parfois entourées d'une membrane.

Les NPs internalisées se dirigent vers les voies endo-lysosomiales en accord avec de précédentes études [Shapero 2011]. Pour les trois types de NPs, aucun transport trans-endothélial n'a pu être visualisé sur l'ensemble des échantillons. Les NPs ne semblent pas accéder à l'espace sous cellulaire.

2.2.2.2 Accumulation intra-cellulaire des NPs 24, heures après exposition

Après remise en culture des cellules exposées une heure aux NPs, la localisation intra-cellulaire change. Pour illustrer ce phénomène, une observation des NPs de 50 nm en MOE à 4 heures, 24 heures et 48 heures après remise en culture est présentée (voir figure 2.9). Les NPs s'organisent autour des noyaux. 48 heures après exposition, la totalité du signal de fluorescence correspondant aux NPs de 50 nm est localisée dans la région péri-nucléaire (2.9 *c*, pointes de flèches).

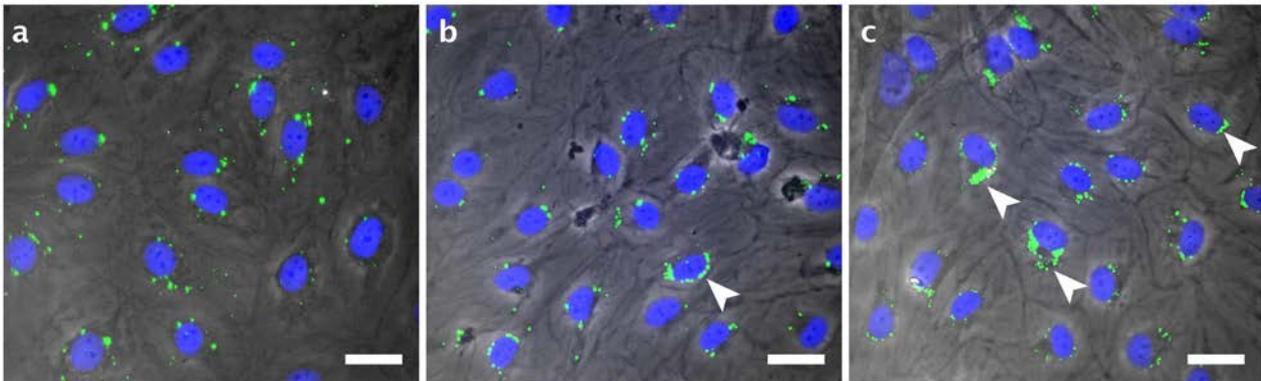


FIGURE 2.9 – NPs de 50 nm observées en MOE. Noyaux en bleu, NPs en vert. **a** - 4 heures après exposition aux NPs. Début de réorganisation des NPs dans les cellules. **b** - 24 heures après exposition aux NPs. Début d'organisation péri-nucléaire des NPs (pointe de flèche). **c** - 48 heures après exposition. La majorité des NPs est rassemblée en périphérie des noyaux (pointes de flèche). Échelles : 25 μm .

En MET, après 24 heures, on observe une redistribution des NPs (15, 50 et 100 nm) par rapport à une heure (voir figure 2.10). Les NPs de 50 nm sont regroupées avec des débris cellulaires dans

de larges vésicules localisées à la proximité des noyaux (voir figure 2.10 a et b). Il est très rare de trouver des NPs en dehors de ces vésicules. On notera ici l'absence de NPs au niveau de la face basale des cellules. Les NPs de 100 nm sont également regroupées dans de larges vésicules localisées à la proximité des noyaux (voir figure 2.10 c). Les NPs de 15 nm sont, elles aussi, localisées dans ces vésicules mais peuvent également être retrouvées libres dans le cytoplasme (voir figure 2.10 d zone contenant les NPs entourée par les pointes de flèches).

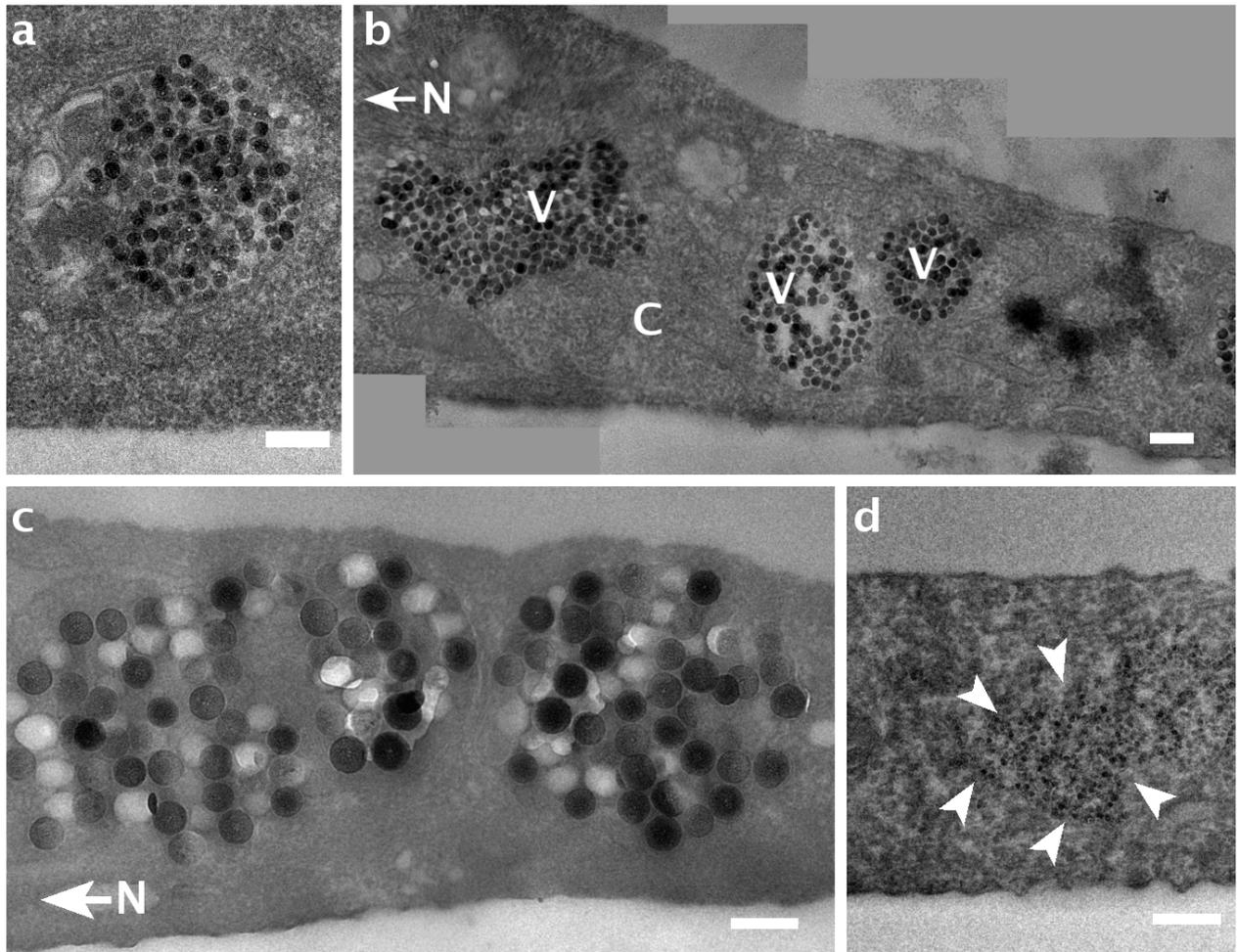


FIGURE 2.10 – Réorganisation intra-cellulaire des NPs de 50, 100 et 15 nm en MET, 24 heures après exposition. **a** - NPs de 50 nm contenues dans une vésicule cytoplasmique. On notera la présence de débris cellulaires dans la vésicule. **b** - NPs de 50 nm, rassemblées dans des vésicules (V) dans le cytoplasme cellulaire (C) à proximité du noyau (direction du noyau indiquée par N). **c** - NPs de 100 nm, rassemblées dans des vésicules cytoplasmiques à proximité du noyau (direction indiquée par N). **d** - NPs de 15 nm, potentiellement libres dans le cytoplasme en larges amas (pointes de flèches). Échelles : 200 nm.

- ◇ Les trois tailles de NPs sont rassemblées dans des vésicules correspondant à la voie endo-lysosomiale après 24 heures. Les NPs de 15 nm semblent être regroupées

moins efficacement et sont toujours observées en partie libres dans le cytoplasme.

2.2.3 Étude de l'internalisation des NPs à 4°C

Afin d'évaluer la capacité des NPs à traverser de manière passive la membrane cellulaire, des expériences à 4°C, bloquant toutes les voies d'internalisation cellulaire actives, ont été réalisées. Les NPs sont mises au contact des cellules HPAECs pendant une heure à 4°C puis observées en MOE et en MET. À 4°C, l'intensité du signal de fluorescence des NPs est plus faible qu'à 37°C (voir figure 2.11 *a-c*). Les NPs ne sont plus agglomérées en surface des cellules.

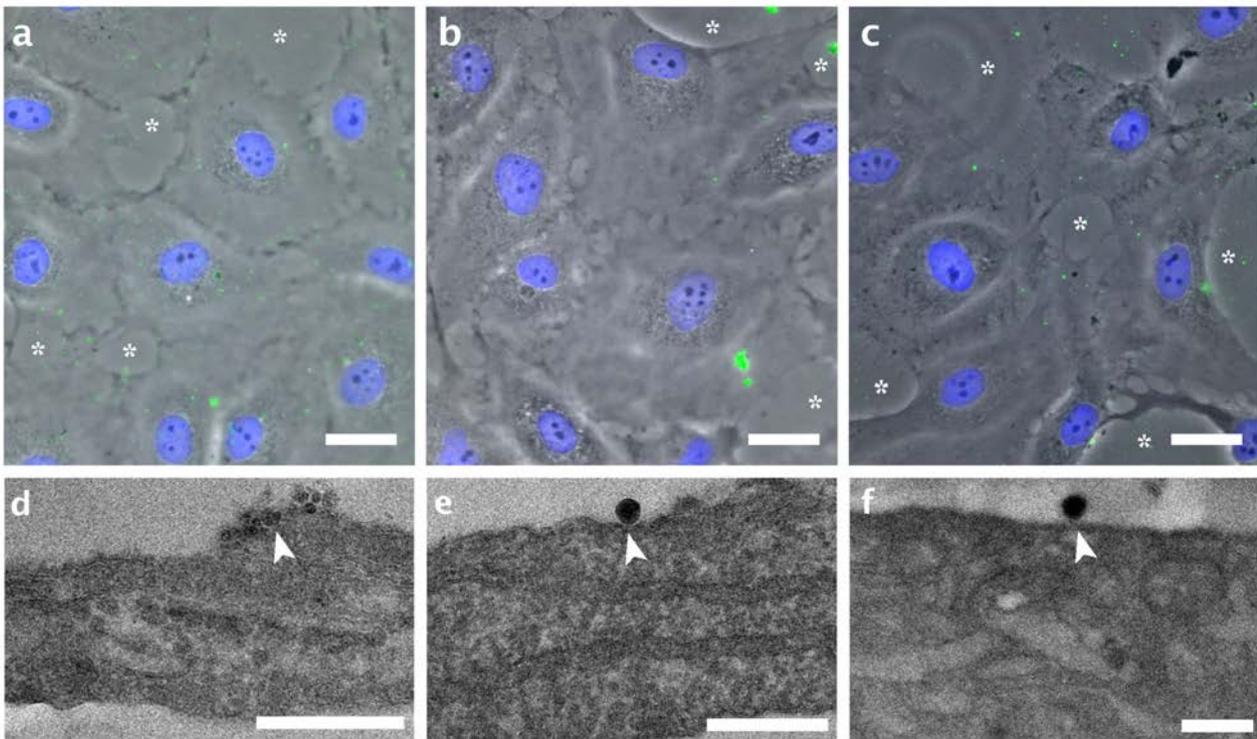


FIGURE 2.11 – Cellules incubées avec les NPs de 15, 50 et 100 nm à 4°C pendant 1 heure. **a-c** - MOE, faible concentration en NPs de 15 (**a**), 50 (**b**) et 100 nm (**c**) sur les cellules. Les astérisques marquent les zones dépourvues de cellules où les NPs se sont déposées sur la lamelle de verre. **d-f** - images MET, les NPs de 15 (**d**), 50 (**e**) et 100 nm (**f**), en contact avec la membrane apicale sont marquées d'une flèche blanche. Échelles : 25 μm (MOE) et 250 nm (MET).

En MET, on observe une ségrégation des NPs à la membrane apicale (voir figure 2.11 *d-f*). Aucune internalisation n'a été observée dans ces conditions pour les trois types de NPs. De même, la présence d'agglomérats en surface des cellules est nettement diminuée.

- ◇ À 4°C, les trois types de NPs montrent une faible affinité pour les cellules par rapport au conditions d'exposition à 37°C.
- ◇ Aucune internalisation n'a été observée pour les trois types de NPs.

2.2.4 Identification des voies d'endocytose

L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques des voies d'endocytose les plus courantes (macropinocytose, voie cavéole dépendante et voie clathrine dépendante) nous a permis d'analyser les mécanismes d'entrée des trois types de NPs. La privation des cellules en énergie complète la vision de ces mécanismes par l'inhibition de toutes les voies d'endocytose actives.

Le panel d'inhibiteurs utilisés comprend les molécules suivantes :

- ◇ **Amiloride** et **cytochalasine D** : inhibiteurs de la voie macropinocytose (la cytochalasine D, peu spécifique, a été remplacée par l'amiloride).
- ◇ **Génistéine** : inhibiteur de la voie cavéole dépendante
- ◇ **Chlorpromazine** : inhibiteur de la voie clathrine dépendante
- ◇ **2-Déoxy-D-glucose** : inhibition des voies d'endocytose énergie dépendantes

Les mécanismes d'actions des inhibiteurs sont détaillés dans la partie expérimentale de ce chapitre.

Après pré-incubation avec les inhibiteurs, les cellules ont été exposées aux NPs, toujours en présence d'inhibiteurs. L'internalisation des NPs a ensuite été comparée par cytométrie en flux en présence et absence d'inhibiteurs (voir figure 2.12).

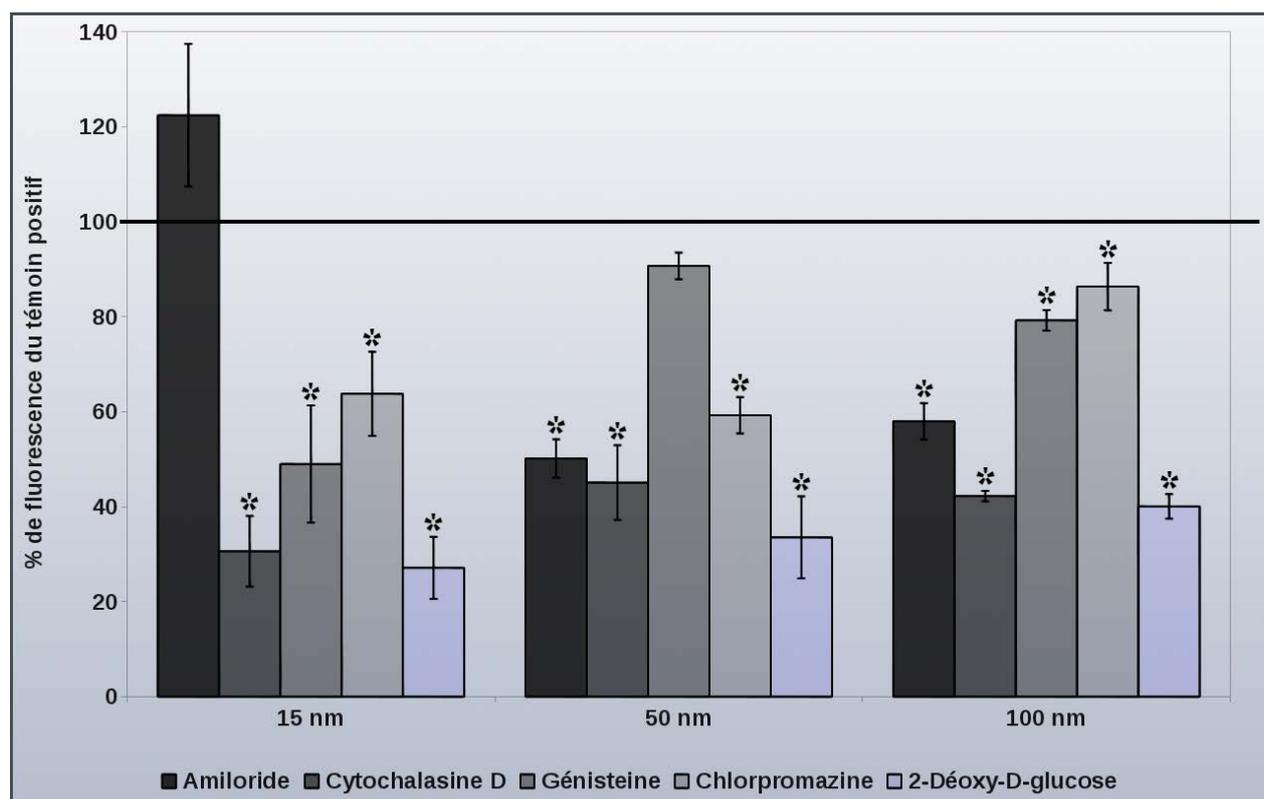


FIGURE 2.12 – Effet des inhibiteurs sur l'internalisation des trois types de NPs à une heure. Les résultats présentent la moyenne de trois réplicats. Les * signifient que les valeurs de fluorescence mesurées sont significativement différentes des conditions non-traitées avec les inhibiteurs ($p < 0,05$).

Voie macropinocytose : En présence d'amiloride, l'internalisation des NPs de 15 nm n'est pas significativement modifiée. Pour les tailles supérieures, on observe une diminution de la fluorescence moyenne de l'échantillon de $50\pm 4\%$ pour les 50 nm et de $42\pm 4\%$ pour les NPs de 100 nm par rapport aux témoins positifs. Les effets des inhibiteurs sont également observables par MET et se traduisent par une distribution modifiée des NPs (voir figure 2.13).

On retrouve les NPs de 15 nm à l'intérieur des cellules en de petits groupes de NPs libres ou dans de petites vésicules, dans le cytoplasme. Cependant, les vésicules contenant des NPs de 15 nm ont totalement disparu (voir figure 2.13 a).

Les NPs de 50 nm se retrouvent majoritairement à la membrane apicale et pour certaines, isolées, libres dans le cytoplasme (voir figure 2.13 b).

Les NPs de 100 nm sont totalement absentes de l'intérieur de la cellule et sont regroupées à la membrane apicale (voir figure 2.13 c). La fluorescence enregistrée par cytométrie en flux pour les NPs de 50 et 100 nm peut s'expliquer par une extinction partielle de la fluorescence des NPs piégées au niveau de la membrane apicale par le Bleu Trypan.

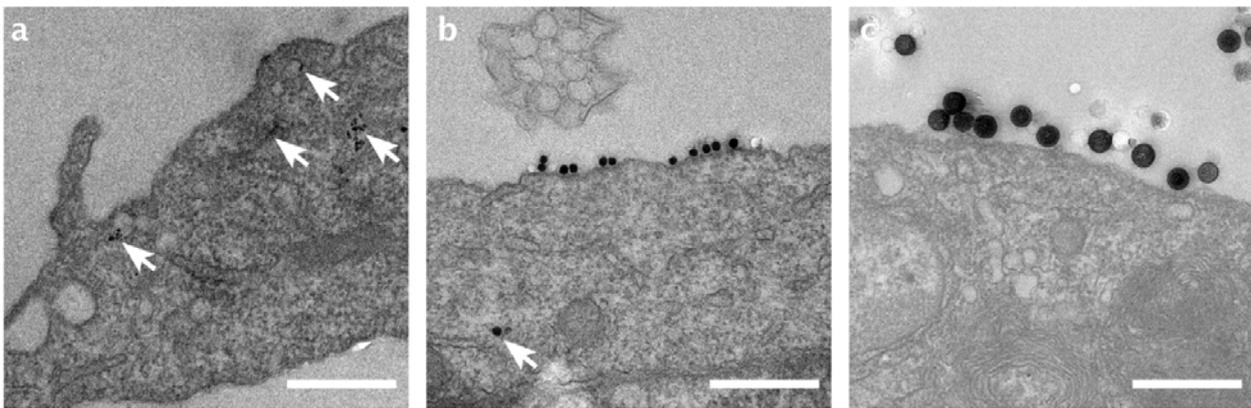


FIGURE 2.13 – Effet de l'amiloride, inhibiteur de la voie macropinocytose, sur l'internalisation des NPs de 15, 50 et 100 nm. **a** - Les NPs de 15 nm sont dans le cytoplasme sous forme de petits groupes (flèches blanches). **b** - NPs de 50 nm, la majorité des NPs est bloquée à la membrane apicale. Quelques NPs sont internalisées libres dans le cytoplasme (flèche). **c** - La totalité des NPs de 100 nm est à la membrane apicale. Aucune n'est internalisée en présence d'amiloride. Échelles : 500 nm.

La cytochalasine D inhibe de manière comparable l'entrée des NPs de toutes tailles (figure 2.12). L'endocytose des NPs de 50 nm et de 100 nm est inhibée en présence de cytochalasine D de respectivement $55\pm 8\%$ et de $58\pm 1\%$. L'internalisation des NPs de 15 nm est diminuée de $70\pm 7,5\%$ par rapport au témoin positif. La différence avec l'amiloride vient de l'effet de la Cytochalasine D sur le cytosquelette d'actine. L'observation en MET a permis de vérifier que les trois types de NPs étaient localisés au niveau de la membrane apicale. La dégradation du cytosquelette par la cytochalasine D modifie les mécanismes de la macropinocytose mais également ceux des deux autres voies étudiées. La cytochalasine D serait donc à considérer comme un inhibiteur de toutes les voies d'internalisation actine dépendantes.

- ◇ Internalisation de petits groupes de NPs de 15 nm retrouvées libres dans le cytoplasme ou dans de petites vésicules, en présence d'amiloride.
- ◇ Inhibition importante de l'internalisation des NPs de 50 et de 100 nm. Disparition des NPs internalisées en MET sauf pour quelques NPs de 50 nm isolées dans le cytoplasme.

Voie cavéole dépendante : En présence de génistéine, l'internalisation des NPs de 50 nm ne varie pas de manière significative par rapport au témoin positif (voir figure 2.12). De même, l'endocytose des NPs de 100 nm ne diminue que de $21\pm 2\%$. Par contre, les NPs de 15 nm enregistrent une diminution de la fluorescence intracellulaire de $51\pm 12\%$.

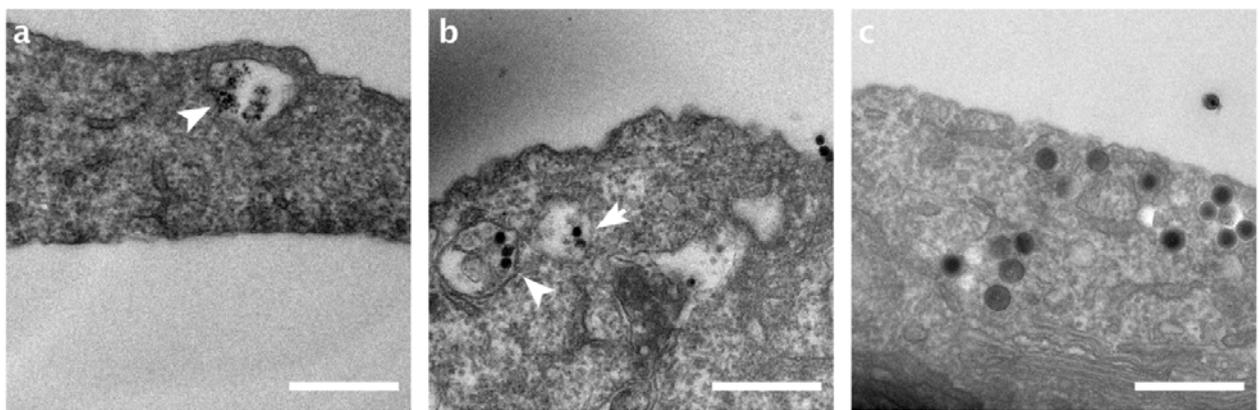


FIGURE 2.14 – Effet de la génistéine, inhibiteur de la voie cavéole dépendante, sur l'internalisation des NPs de 15, 50 et 100 nm. **a** - Les NPs de 15 nm sont localisées uniquement dans des vésicules de grandes tailles. On observe une disparition totale des NPs libres dans le cytoplasme ou dans de petites vésicules. **b-c** - Les NPs de 50 nm (**b**) et de 100 nm (**c**) sont internalisées dans les mêmes conditions qu'en absence de traitement. Échelles : 500 nm.

L'observation en MET montre l'absence de NPs de 15 nm libres dans le cytoplasme ou dans de petites vésicules dans les cellules. Celles-ci sont uniquement en groupes au sein de vésicules de grandes tailles (voir figure 2.14 a). Cela n'a pas été observé pour les deux autres tailles de NPs. Les 50 et 100 nm sont toujours observées libres dans le cytoplasme et dans des vésicules (voir figure 2.14 b-c).

- ◇ La génistéine a uniquement un effet d'inhibition significatif sur l'internalisation des NPs de 15 nm. Les NPs de 50 et de 100 nm ne sont, par contre, pas touchés.
- ◇ La génistéine entraîne la disparition des NPs isolées dans le cytoplasme et dans de petites vésicules, pour les NPs de 15 nm en MET.

Voie clathrine dépendante : La chlorpromazine inhibe l'internalisation des NPs de 15 nm ($36\pm 9\%$) et de 50 nm ($41\pm 4\%$). L'endocytose des NPs de 100 nm est très faiblement inhibée ($14\pm 5\%$, voir figure 2.12).

L'observation en MET (figure 2.15) montre quelques NPs de 15 nm libres dans le cytoplasme mais toujours un grand nombre dans des vésicules de grandes tailles (flèches blanches). Le constat est le même pour les NPs de 50 nm, avec une diminution de la quantité de NPs libres dans le cytoplasme (voir figure 2.15 b, flèches blanches). La distribution des NPs de 100 nm est comparable à l'observation en absence de traitement (voir figure 2.15 c) : avec des NPs libres dans le cytoplasme (pointes de flèches blanches), à la membrane apicale (pointes de flèche noire) et dans de larges vésicules cytoplasmiques (flèche blanche).

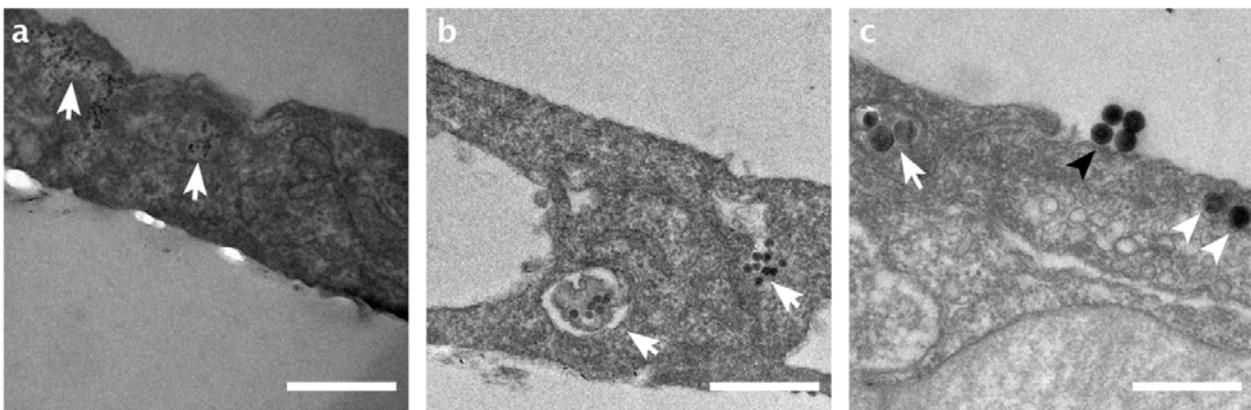


FIGURE 2.15 – Effet de la chlorpromazine, inhibiteur de la voie clathrine dépendante, sur l'internalisation des NPs de 15, 50 et 100 nm. **a** - les NPs de 15 nm sont dans des vésicules cytoplasmiques (flèche blanches). **b** - les NPs de 50 nm sont majoritairement dans des vésicules (flèche blanche). **c** - les NPs de 100 nm sont à la membrane apicale (pointe de flèche noire), libres dans le cytoplasme (pointes de flèches blanches) et dans des vésicules (flèche blanche). Échelle 500 nm.

- ◇ La chlorpromazine inhibe l'entrée des deux plus petites tailles de NPs.
- ◇ Les NPs de 15 et 50 nm libres dans le cytoplasme ou dans de petites vésicules sont plus rares.
- ◇ Le traitement ne modifie pas l'internalisation des NPs de 100 nm.

Inhibition de toutes les voies énergie dépendante par le 2-déoxy-D-glucose : En absence d'énergie, l'inhibition de l'endocytose est maximale pour les NPs de 15, 50 et 100 nm (voir figure 2.12). L'internalisation des NPs de 15 nm en absence d'énergie est diminuée de $73\pm 7\%$; l'internalisation des NPs de 50 nm de $67\pm 9\%$; et l'internalisation des NPs de 100 nm de $60\pm 3\%$. L'extinction de la fluorescence extra-cellulaire par le bleu trypan n'est certainement pas totale.

En MET, l'ensemble des trois types de NPs est bloqué à la membrane apicale. Les NPs de 15 et 50 nm sont isolées ou en groupes à la membrane apicale (voir figure 2.16 a - b flèche noires). On observe régulièrement dans les zones où les NPs sont isolées à la membrane, un début de déformation de la membrane au contact de la NP (voir figure 2.16 b-c, flèches blanches).

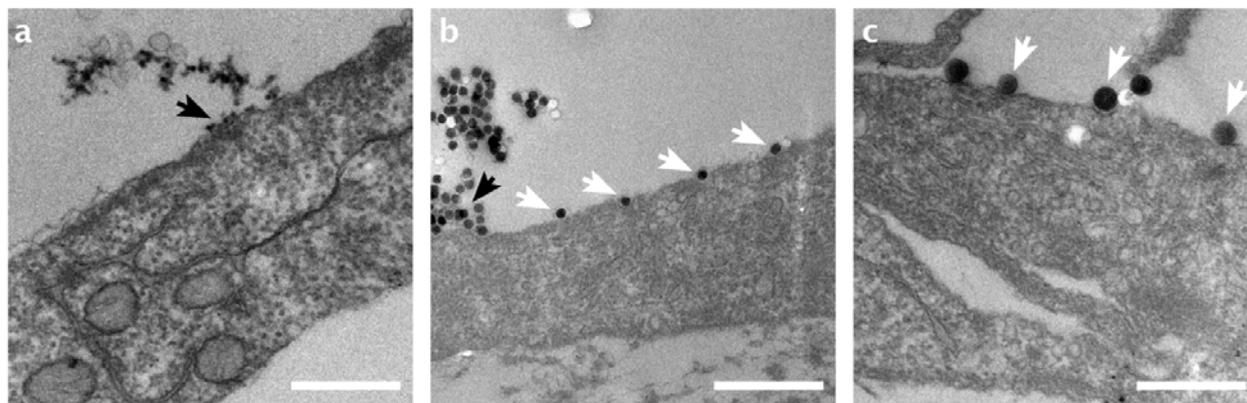


FIGURE 2.16 – *Effet du 2-déoxy-D-glucose, sur l’internalisation des NPs de 15, 50 et 100 nm. a* - Les NPs de 15 nm sont bloquées à la membrane apicale isolées ou en groupes (flèche noire). Aucune internalisation n’est observée. *b* - les NPs de 50 nm sont bloquées à la membrane apicale, en groupes (flèche noire) ou isolées (flèches blanches). On voit apparaître un début d’invagination des membranes autour des NPs. *c* - les NPs de 100 nm sont au niveau de la membrane apicale (flèches blanches). Une déformation de la membrane au contact de la NP est visible.

- ◇ Les NPs sont piégées à la membrane apicale des cellules en absence d’énergie. On remarque un début d’invagination de la membrane apicale autour de la NP.

2.2.5 Cryo-microscopie électronique - méthode CEMOVIS, exemple des NPs de 15 nm

La cryo-microscopie électronique et plus particulièrement la technique CEMOVIS (voir partie expérimentale du chapitre) permettent une investigation fine et dénuée d’artefacts dus à la fixation chimique de l’échantillon. L’échantillon congelé en glace vitreuse est coupé par cryo-ultramicrotomie afin d’obtenir des sections ultra-fine observées par cryo-MET. Cette technique, grâce à l’utilisation d’une cryo-fixation sous haute pression, permet l’obtention d’un arrêt sur image, au moment de la congélation de l’échantillon, de l’ordre de la milliseconde. La particularité est ici due à l’utilisation d’un support de culture cellulaire développé au laboratoire permettant la congélation directe de mono-couches de cellules adhérentes. Ces supports de culture cellulaires permettent de maintenir l’orientation des cellules lors de la congélation.

Les résultats présentés dans cette partie portent sur l’internalisation des NPs de silice de 15 nm dans des cellules HPAECs cultivées sur les supports de culture cellulaire destinés à la congélation sous haute pression. Cette méthode de préparation d’échantillon pour la cryo-MET est longue et complexe. Il a été choisi de tester la faisabilité de l’étude en utilisant un matériel bien connu : les NPs de silice de 15 nm. Leur taille proche des particules de LDL et leur faible densité aux électrons nous fournissant un système d’étude permettant de tester la méthode avec des particules plus simples à manipuler.

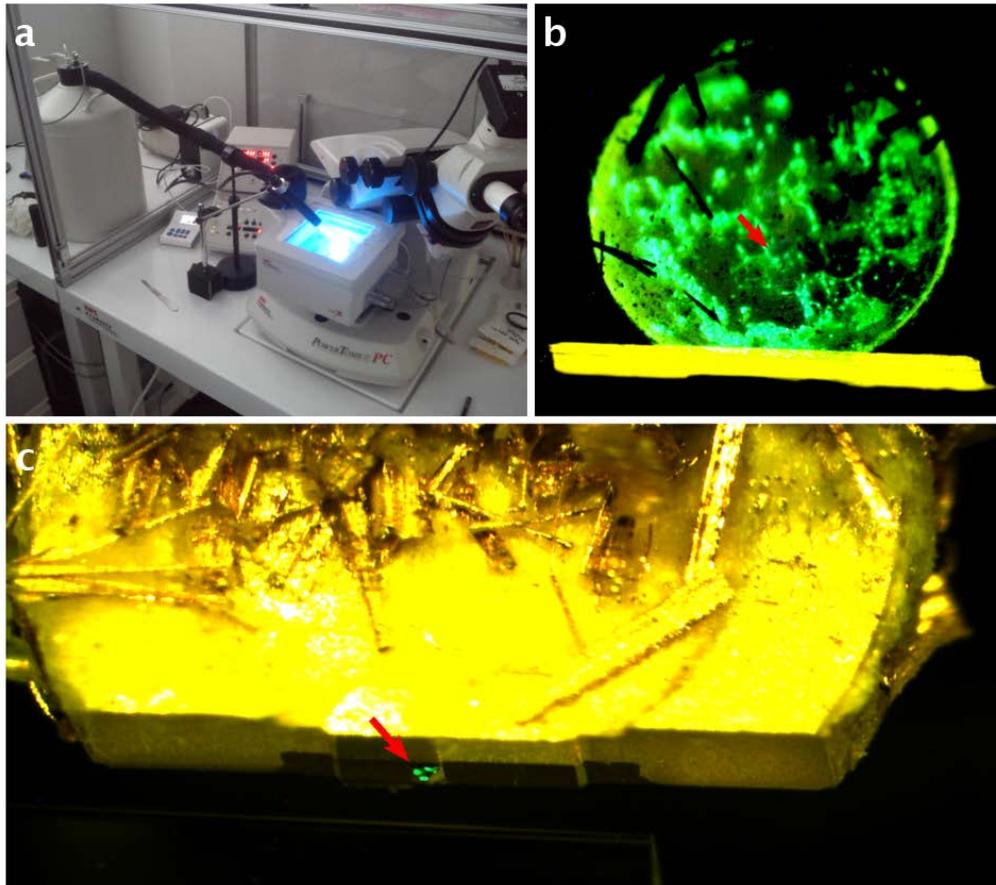


FIGURE 2.17 – *a* - Installation du dispositif multi-lambda de Cordouan Technologies sur l'ultramicrotome RMC; *b* - vue du support de culture congelé sous haute pression : les cellules sont marquées à la calcéine pour permettre leur localisation lors des étapes de coupe; *c* - vue de la pyramide portant les trois cellules d'intérêt juste avant la coupe.

Les particularités et améliorations apportées à la technique sont présentées dans la partie expérimentale de ce chapitre. Sur la figure 2.17, il est possible de suivre le signal de fluorescence correspondant aux cellules, directement dans l'ultramicrotome, sur le support de culture cellulaire pour congélation sous haute-pression en utilisant le module de fluorescence déporté, développé avec Cordouan Technologies pour cette application. Trois cellules d'intérêt vont être sélectionnées sur l'échantillon. Après les étapes de *trimming* de la cupule permettant de former une pyramide autour de la zone d'intérêt, un ruban de sections a été récupéré et déposé sur une grille de MET portant un film de carbone ajouré.

On notera sur l'image de cryo-MET correspondante, une très bonne conservation de l'ensemble de la cellule (voir figure 2.18 *a*) et la présence de différentes organites dans le cytoplasme (appareil de Golgi (flèches noires), mitochondries (pointes de flèches noires), gouttelettes lipidiques (pointes de flèches blanches)). Il est possible ici d'observer l'internalisation des NPs de manière instantanée. La figure 2.18 *b* présente une vésicule en cours d'invagination avec une grappe de NPs allant être endocytée. On remarquera également la formation d'une crevasse au niveau de la membrane dans

laquelle semblent s'engouffrer les NPs.

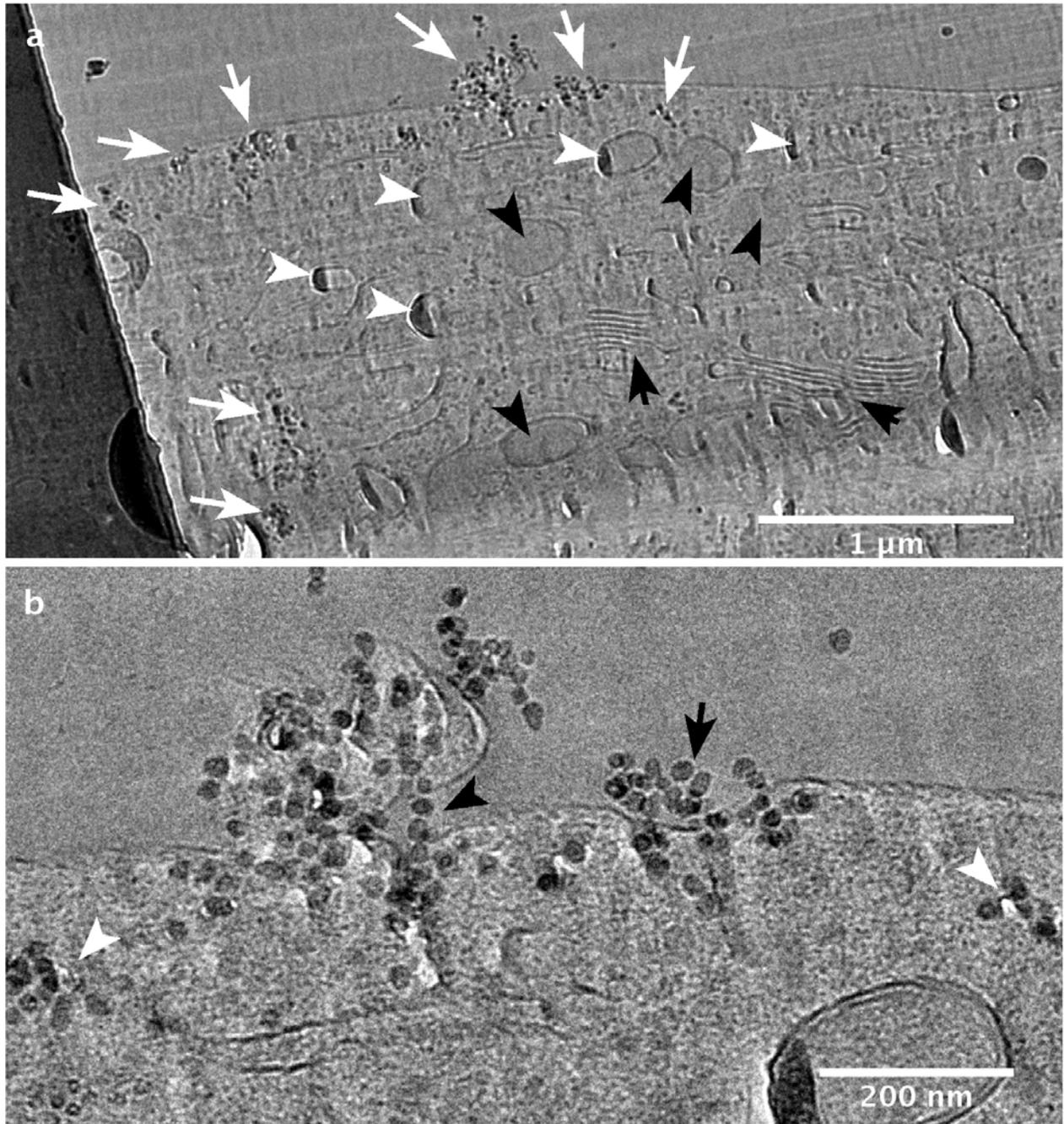


FIGURE 2.18 – Image d'une des trois cellules localisées par fluorescence dans le microtome sur la figure 2.17 par cryo-MET. **a** - fort grossissement, NPs de 15 nm (flèches blanches), gouttelettes lipidiques (pointes de flèches blanches), mitochondries (pointes de flèches noires), appareil de Golgi (flèches noires); **b** - agrandissement de la zone d'interaction entre NPs et membrane apicale.

◇ La cryo-MET confirme la distribution observée en résine.

2.2.6 Effet des NPs sur l'adhérence cellulaire

Suite aux premières observations de MET, il est apparu que les cellules traitées en absence de milieu complet à des concentrations non toxiques avec les NPs de 100 nm semblaient plus sensibles au décollement lors de la fixation chimique et de l'inclusion en résine. La perte du matériel cellulaire ne correspondant pas aux informations de cytotoxicité, un effet des NPs sur l'adhérence cellulaire a été envisagé.

Notre hypothèse est que l'exposition des cellules aux NPs à des concentrations infra-toxiques modifie leurs capacités d'adhésion au support. La caractérisation de l'adhérence cellulaire au support est contrôlée par la quantification de la **résistance des cellules à une force de décrochement mécanique**. Cette résistance est dépendante de la capacité initiale d'adhésion de la cellule et de la mise en place des processus renforcés d'adhésion au support. L'adhésion initiale de la cellule au support dépend de chaque molécule d'adhésion séparément. L'adhésion renforcée au support dépend de l'activité cellulaire et du cytosquelette [Dembo 1987]. On peut ici faire l'analogie avec l'adhésion d'un morceau de scotch double-face sur une surface en présence ou non d'un renfort rigide sur sa face externe (voir figure 2.19).

La résistance **initiale** au décrochement a été quantifiée par l'application de forces de décrochement d'intensités croissantes sur des cellules placées à 4°C (voir partie expérimentale de ce chapitre). Un décrochement maximal des cellules en absence de processus actifs est observé pour une force de **200 g**. Les cellules traitées affichent une perte d'adhésion au support par rapport aux cellules non-traitées.

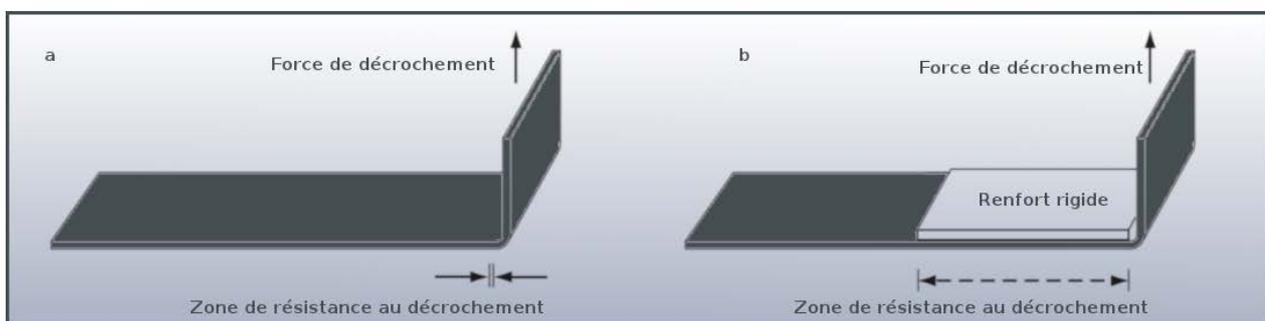


FIGURE 2.19 – Représentation schématique du rôle de l'adhésion active et du cytosquelette. Analogie au décrochement d'un scotch double-face. **a** - Décollement facilité car faible zone de résistance à la force de décrochement. **b** - La présence du renfort augmente la taille de la zone de résistance au décrochement; l'objet résiste mieux à la force de décrochement.

L'adhésion **renforcée** des cellules est quantifiée au cours du temps. Les cellules trypsinées sont plaquées sur leur support puis replacées à 37°C pour des temps croissants. Au cours du temps, la mise en place des processus d'adhésion cellulaire et l'organisation du cytosquelette renforcent la résistance des cellules à la force de décrochement de 200 g (force maximale déterminée par l'expérience de résistance initiale au décrochement). On observe une augmentation maximale de la quantité de cellules résistant au décrochement au cours du temps pour les cellules non-traitées (voir figure 2.20). Les cellules traitées avec les NPs de 15 et 50 nm adhèrent moins bien au support pour l'ensemble des temps testés. On observe une adhésion maximale des cellules traitées après une heure à 37°C, suivie d'une diminution à 24 heures. Les cellules exposées aux NPs de 100 nm adhèrent moins bien

au support à tous les temps. L'augmentation de la résistance au décrochement au cours du temps est faible pour les cellules traitées avec les NPs de 100 nm.

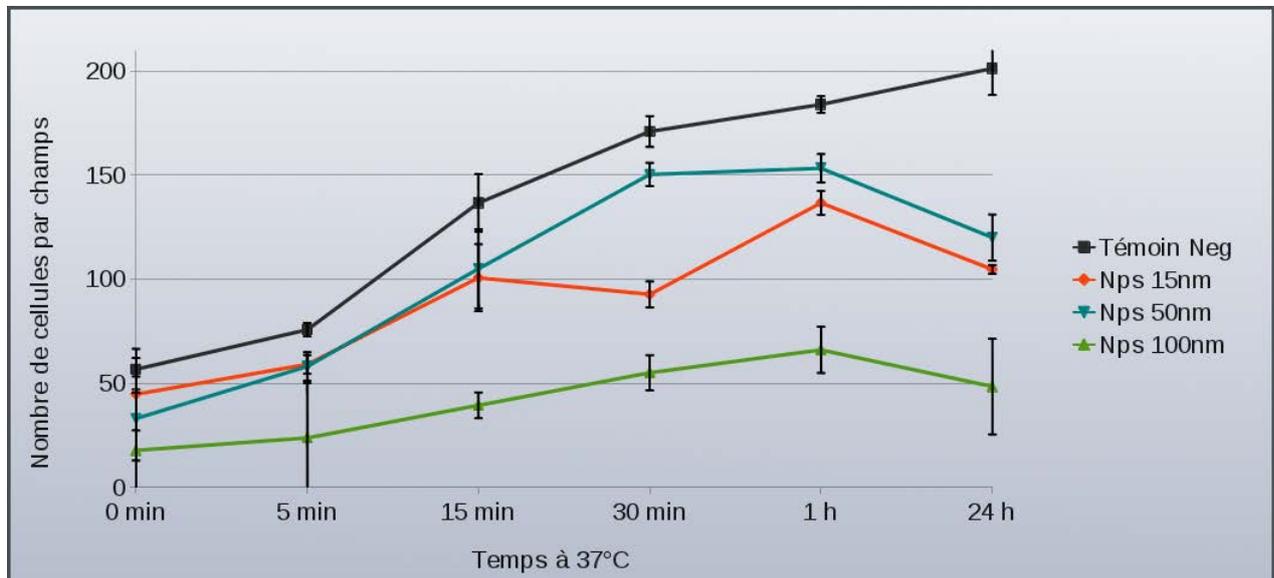


FIGURE 2.20 – Détachement cellulaire au cours du temps après exposition aux NPs et remise en culture pour différents temps et pour une vitesse de centrifugation fixe de 200 g.

En conclusion, il est important que les cellules soient manipulées soigneusement pour éviter leur détachement du support de culture lors de la préparation d'échantillon pour la MET. Une bonne viabilité cellulaire ne signifie pas forcément un état "normal" des cellules. Les conditions infra-toxiques utilisées offrent un bon compromis entre fréquence d'observation des événements en MET et "bon" état des cellules.

- ◇ L'exposition aux NPs de silice entraîne une perte d'adhésion au support des cellules.
- ◇ Cette perte est maximale pour les NPs de 100 nm.

2.3 Discussion

L'étude de l'internalisation des NPs avec la barrière endothéliale pulmonaire humaine *in-vitro* constituée de cellules HPAECs met en avant une relation entre la taille des NPs et les voies d'endocytose empruntées. La quantification de l'internalisation des NPs par cytométrie en flux complète la caractérisation par MET de la distribution intracellulaire des NPs. Les résultats de cette étude peuvent être résumés de la manière suivante :

- ◇ Les propriétés physico-chimiques des NPs dépendent de la composition de leur environnement.
- ◇ Les voies d'endocytose empruntées par les NPs dépendent de leur taille.
- ◇ La distribution intra-cellulaire des NPs est taille dépendante.
- ◇ Les NPs ne sont pas éliminées par les cellules au cours des temps étudiés et prennent la direction de la voie de dégradation endo-lysosomiale.
- ◇ Aucun transport trans-endothélial n'a pu être observé.

Les **méthodes de MET et de cytométrie en flux** se complètent efficacement pour le suivi intra-cellulaire des NPs. La cytométrie permet l'analyse d'une population entière de cellules. Sa faible capacité résolutive ne permet par contre pas de différencier les NPs adsorbées en surface des cellules des NPs internalisées. L'utilisation de Bleu Trypan pour l'extinction de la fluorescence des NPs extra-cellulaires (comme montré dans la littérature [Slowing 2006]) ne fournit, dans notre cas, qu'une extinction partielle de la fluorescence extra-cellulaire des NPs. Le recours à l'observation MET valide les résultats de cytométrie et ajoute une information sur la distribution intra-cellulaire des NPs et les mécanismes détaillés d'internalisation.

L'étude met en évidence le **rôle des conditions environnementales cellulaires dans le maintien des propriétés physico-chimiques des NPs**. Les études de DLS, zétamétrie et MET menées sur les NPs en solution, en présence de différents milieux physiologiques, montrent une déstabilisation des NPs en présence de protéines (apportées par le sérum). La sensibilité des NPs à l'agglomération et à l'agrégation est en partie dépendante de leur charge de surface. En présence de protéines, une couronne protéique se forme autour des NPs, modifiant cette charge et provoquant une agglomération des NPs visible en MET. La présence de sérum lors de l'exposition des cellules aux NPs va, par exemple, fortement modifier l'internalisation [Lesniak 2012].

Le suivi de l'internalisation des NPs dans les cellules HPAECs a été réalisé en absence de sérum. Les NPs nues sont moins soumises à la déstabilisation et permette l'étude des interaction NPs-cellules en fonction de la taille des particules uniquement. Nous avons ainsi pu montré que l'internalisation par les cellules HPAECs des NPs en présence de protéines de sérum est beaucoup plus faible pour les trois types de NPs (voir figure 2.21). En MOE, les NPs semblent moins interagir avec les cellules, s'agglomérant majoritairement sur les supports de cultures. La cytométrie en flux montre une diminution quasi-totale de l'internalisation de NPs de 15 nm en présence de sérum. Les NPs de 50 et 100 nm sont internalisées à hauteur de 40 et 20% par rapport aux conditions en absence de sérum. Cette diminution majeure a pu être caractérisée par MET (voir figure 2.22). Les NPs de 15 nm sont très rarement observées rassemblées dans des vésicules avec des morceaux de membranes (flèche). Les NPs de 50 nm sont uniquement rassemblées dans ces vésicules en bordure des noyaux (flèche). Quelques NPs 100 nm sont isolées dans le cytoplasme, également contenues dans des vésicules. On notera la présence d'une couronne protéique visible sur les NPs de 100 nm (flèche). La totalité des NPs de 15 et 50 nm est regroupée en larges groupes.

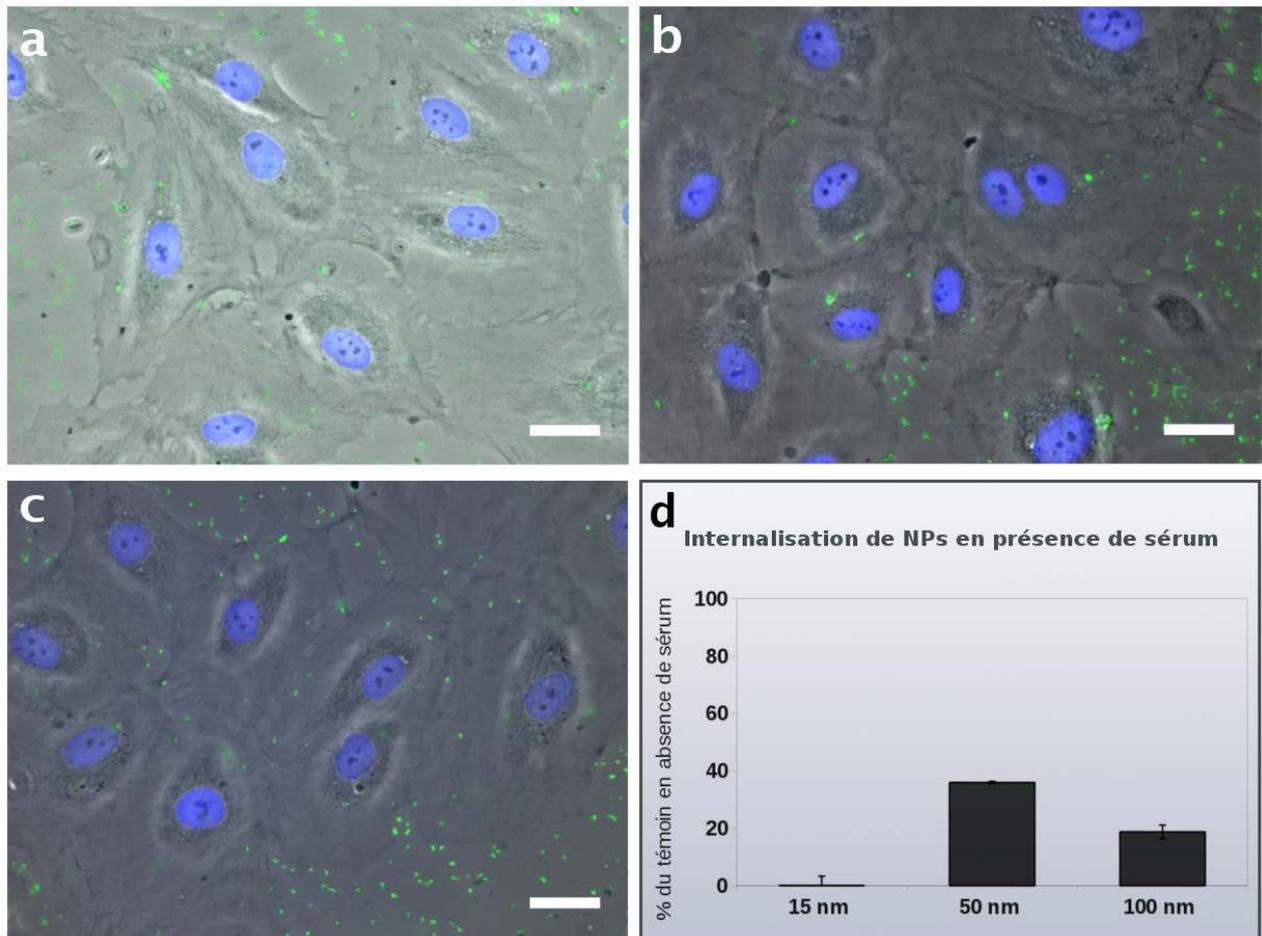


FIGURE 2.21 – Internalisation de NPs en présence de milieu complet. **a** - 15 nm ; **b** - 50 nm ; **c** - 100 nm ; **d** - quantité de fluorescence intra-cellulaire en présence de sérum pendant l'incubation par rapport au témoin en absence de sérum.

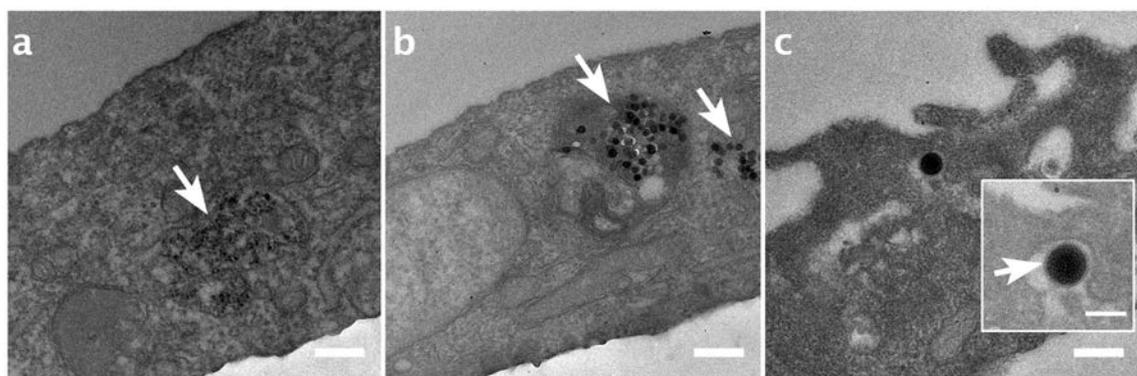


FIGURE 2.22 – Internalisation des NPs en présence de sérum observée par MET : 15 nm (**a**), 50 nm (**b**) et 100 nm (**c**). NPs contenues dans des vésicules.

La disparition des groupes de NPs de 15 et 50 nm isolés dans le cytoplasme en présence de sérum renforce l'hypothèse d'une agglomération des NPs dans la solution, avant même d'entrer au contact des cellules. La modification de surface à l'origine de cette agglomération peut également expliquer la diminution massive de l'internalisation de ces groupes de NPs. D'après la littérature, la présence d'une couronne protéique en surface inhibe l'adhésion membranaire des NPs [Lesniak 2012] comme observé sur les images de MOE de la figure 2.21. En absence d'interactions NPs-membranes, l'internalisation est fortement inhibée. Cette inhibition de l'internalisation de NPs en présence de protéines de sérum est couramment mentionnée dans la littérature pour différents types de NPs et pour différents modèles cellulaires : des nanotubes de carbone [Zhu 2009], des NPs d'or fonctionnalisées [Patel 2010], de NPs ferriques [Joseph Jerry 2009], de NPs de polystyrène [Guarnieri 2011] et des NPs de silice [Stayton 2009]. Cette diminution est directement corrélée à une diminution de l'effet cytotoxique des NPs dans notre étude et dans la littérature. La visualisation d'amas de NPs dans des vésicules correspondant à la voie de dégradation endo-lysosomiale par MET en présence de protéines de sérum renforce l'hypothèse d'une internalisation sous forme d'agglomérats uniquement des NPs.

L'étude de l'internalisation des NPs a donc été réalisée sur des **NPs nues**, les conditions expérimentales visant à limiter au maximum la formation d'une couronne protéique et la déstabilisation des NPs afin de **favoriser l'interaction entre NPs et cellules** et de mener une étude sur l'effet de la taille des NPs. Dans ces conditions, la **distribution intra-cellulaire à une heure** des trois types de NPs a été analysée par MET. Trois grandes localisations des NPs ont été déterminées : en groupes libres dans le cytoplasme (majoritairement pour les NPs de 15 et 50 nm), libres isolées dans le cytoplasme (pour les NPs de 50 et 100 nm) et enfin contenues dans des vésicules cytoplasmiques correspondant morphologiquement à des endosomes / lysosomes (pour les trois types de NPs).

L'étude de la **répartition intra-cellulaire des NPs à 24 heures** montre une accumulation dans les vésicules correspondant aux voies de dégradation cellulaire. L'exocytose des NPs n'a pas été observée dans nos conditions expérimentales. Même si certaines études montrent une exocytose de NPs de silice [Quignard 2012], d'autres mettent en avant une dilution des NPs intra-cellulaires au cours du cycle cellulaire [Kim 2012] [Shapero 2011]. L'accumulation des NPs dans la voie endo-lysosomiale est en accord avec d'autres études du devenir intra-cellulaire de NPs de silice au cours du temps [Shapero 2011]. La dégradation des NPs n'a pu être observée par MET aux temps étudiés. Cependant, Zhai et al [Zhai 2012] ont par exemple, montré une dégradation de NPs de silice mésoporeuses dans les lysosomes de cellules endothéliales. Enfin, aucune transcytose n'a pu être observée au niveau de la face basale des cellules sur l'ensemble des observations de MET.

L'étude des **voies d'endocytose des NPs nues** a ensuite souligné une relation directe entre la taille des NPs et la voie d'endocytose empruntée. L'étude par cytométrie en flux en présence d'inhibiteurs pharmaceutiques de l'internalisation des NPs (15, 50 et 100 nm) met en avant une dépendance des NPs de 100 nm à la macropinocytose pour l'internalisation. Les NPs de 50 nm sont internalisées par voies clathrine et macropinocytose alors que les NPs de 15 nm sont internalisées majoritairement par les voies cavéole et clathrine. Ce lien entre taille et voie d'endocytose est confirmé par l'analyse par MET de la distribution intra-cellulaire des NPs en présence des inhibiteurs. On observe une disparition totale des petits groupes cytoplasmiques de NPs de 15 nm lors de l'inhibition de la voie cavéole. De même l'inhibition de la voie macropinocytose entraîne, pour toutes les tailles, la disparition des vésicules cytoplasmiques de type endosomes de grandes tailles contenant les NPs.

En **conclusion**, la taille des NPs influence les voies d'endocytose empruntées lors de leur internalisation par les cellules HPAECs cultivées sur un support rigide. Les NPs de 15 nm sont majoritairement internalisées sous forme de petits groupes libres dans le cytoplasme cellulaire. La disparition totale de ces groupes lors de l'inhibition de la voie cavéole en MET les lie à une endocytose cavéole dépendante. La préparation des échantillon en MET peut gêner la visualisation de petites vésicules enrobant ces groupes de particules. Les différentes voies d'endocytose semblent amener à une internalisation des NPs de 15 50 et 100 nm dans des vésicules cytoplasmiques correspondant à la voie de dégradation cellulaire. La majorité des trois types de NPs est stockée par les cellules dans les lysosomes, sans transcytose apparente.

2.4 Partie expérimentale

2.4.1 Préparation des NPs fluorescentes

La synthèse des NPs utilisées dans cette étude a été réalisée par Stéphane Mornet, de l'Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux (ICMCB - CNRS UPR 9048) dans le cadre du partenariat sur le projet TiSiTrans financé par l'ANSES (*Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail*).

Trois tailles de NPs de silice fluorescentes ont été synthétisées selon une méthode dérivée du protocole de [Van Blaaderen 1992]; 15, 50 et 100 nm. Pour les rendre fluorescentes, le fluorochrome fluorescéine isothiocyanate (FITC) a été incorporé au coeur des NPs durant la synthèse par liaison covalente à l'agent de couplage aminé utilisé pour la croissance des particules : le aminopropyltriméthoxysilane (APS). Pour cette raison, les NPs sont caractérisées par une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et une longueur d'onde maximum d'émission de 521 nm, correspondant au FITC.

2.4.1.1 Production des NPs de 15 nm

La synthèse des NPs de silice de 15 nm se fait en une étape : on ajoute une solution d'organosilane fluorescente (APS-FITC) de 5 mL à un mélange de 240 mL d'éthanol et de 5 mL de tétraéthoxysilane (TEOS) dans une flasque à fond rond de 2L contenant 650 mL d'éthanol; 2,4 mL d'eau et 24,1 mL d'hydroxy-ammonium. La solution est laissée à réagir toute la nuit dans le noir à température ambiante. L'éthanol et l'ammonium seront ensuite retirés par évaporation rotative à 40° C.

La purification des NPs se fait ensuite par ultracentrifugation tangentielle dans de l'eau ultra-pure (18 M Ω) avec un système Amicon (*Millipore[®], Billerica, USA*) équipé d'une membrane d'une porosité de 100 kDa, jusqu'à l'absence totale de détection de fluorescence dans le filtrat. Les NPs fluorescentes sont rincées largement à l'eau ultrapure par centrifugations à 13000 g durant 15 minutes jusqu'à disparition de la fluorescence dans le surnageant. La concentration de la solution est enfin estimée par ICP-OES (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*) et gravimétrie.

2.4.1.2 Production des NPs de 50 et 100 nm

La synthèse des NPs de 50 et 100 nm commence par la dissolution de 5 mg de FITC dans 5 mL d'APS dilué à 42,7 mM dans de l'éthanol. Après agitation pendant 12 heures, le silane fluorescent est ajouté à une solution de 250 mL d'éthanol, 5mL de TEOS, 7,6 mL d'hydroxy-ammonium à 28 % et 10,9 mL d'eau ultra-pure maintenue à 50° C dans un bain d'huile. La réaction est faite pendant 12 heures dans le noir et sous agitation magnétique et permet l'obtention de NPs de silice fluorescentes d'un diamètre moyen de 30 nm.

Une deuxième étape de croissance de silice est ensuite effectuée afin d'obtenir la taille de NPs souhaitée et une surface des particules suffisamment lisse. Elle est faite en versant 1 L de préparation de NPs de 30 nm dans une flasque contenant 500 mL d'éthanol, 160 mL d'eau ultra-pure et 9,9 mL d'hydroxy-ammonium (28%). Afin d'empêcher une seconde nucléation dans le mélange, 18,2 mL de TEOS sont ajoutés par deux fois, le tout espacé de 12 heures. Les NPs ainsi obtenues ont un diamètre en observation MET de 50 nm. Le même procédé est utilisé pour les NPs de 100 nm. Comme pour les 15 nm, l'éthanol et l'ammoniac sont ensuite évaporés à 40° C et les NPs sont rincées abondamment à l'eau ultra-pure par centrifugations à 13000 g de 15 minutes jusqu'à disparition de la fluorescence

résiduelle du surnageant. L'estimation de la concentration des solutions de NPs se fait par ICP-OES et gravimétrie.

Les concentrations finales des solutions de NPs diluées dans de l'eau milliQ sont de : 7,4 mg/mL pour les NPs de 15 nm, 12,3 mg/mL pour les NPs de 50 nm et 19,3 mg/mL pour les NPs de 100 nm. Ces solutions sont conservées à l'obscurité et à température ambiante durant la durée de cette étude sans qu'une déstabilisation ait pu être observée (les solutions sont régulièrement déposées sur grille de MET afin de contrôler l'état des NPs). Les solutions sont vortexées 30 secondes avant chaque utilisation.

2.4.2 Caractérisation de NPs en solution

La caractérisation des NPs en solution a été faite par diffusion dynamique de la lumière (DLS - *Dynamic Light Scattering*), mesure du potentiel zéta et observation directe par MET, dans les différents milieux utilisés dans l'étude (ECGM et ECBM - voir partie expérimentale sur la culture cellulaire) et dans l'eau.



FIGURE 2.23 – Appareils pour la caractérisation de NPs. **a** - Granulomètre Vasco (Cordouan Technologies) pour la mesure du diamètre hydrodynamique de NPs en solution. **b** - Zetamètre Wallis (Cordouan Technologies) pour la mesure du potentiel zéta en solution. **c** - Système d'effluage pour grilles de MET Elmo (Cordouan Technologies). **d** - Effet d'un effluage sur le dépôt d'un échantillon liquide sur la grille de MET.

Mesure du diamètre hydrodynamique des NPs en solution. La mesure est effectuée 3 fois pour chaque taille de NPs et par type de milieu sur l'appareil Vasco (Cordouan Technologies - figure 2.23 a) à la concentration en NPs déterminée pour les expériences biologiques. Les solutions ont été préparées fraîchement avant chaque mesure et vortexées pendant 30 secondes. Le diamètre hydrodynamique retenu correspond au pic principal en nombre relevé dans l'échantillon.

Une mesure de l'évolution au cours du temps du diamètre hydrodynamique de NPs de 50 nm à concentrations biologiques dans du milieu de culture complet (enrichi en sérum et facteurs de croissances) a été réalisée en complément. Cette mesure met en avant une déstabilisation des NPs au cours du temps et une agrégation / agglomération massive par la présence du sérum (voir figure 2.24).

a. Intensité diffusée totale au cours du temps (intensité en Kcts/s vs temps en minute)

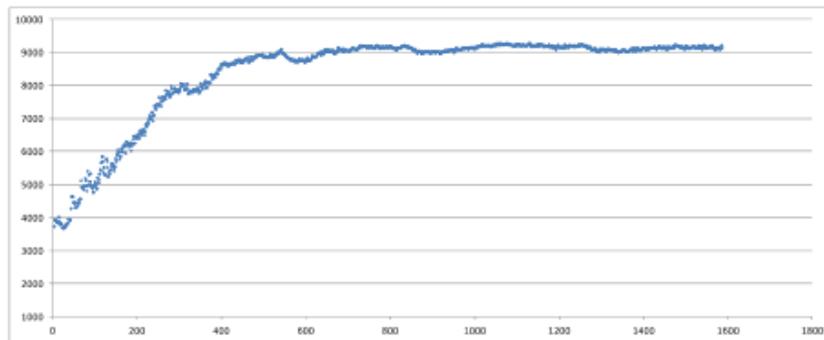


FIGURE 2.24 – Déstabilisation d'une solution de NPs 50 nm dans du milieu ECGM au cours du temps. Augmentation de l'intensité diffusée totale au cours du temps. On remarque une augmentation importante les premières heures puis une stabilisation après agrégation des NPs.

Mesure du potentiel zêta des NPs en solution. La mesure du potentiel zêta a été réalisée 3 fois par condition expérimentale sur l'appareil *Wallis* (Cordouan Technologies - figure 2.23 b). Chaque mesure est composée de 6 enregistrements qui sont ensuite moyennés.

Déposition sur grilles carbonées pour observation de MET. Après effluage pendant 40 secondes (*Elmo* Cordouan Technologies - figure 2.23 c) à 3 mA sous un vide de 0,3 mbar ; 5 μL de solutions fraîchement préparées de NPs aux concentrations utilisées sont déposées pendant 30 secondes sur des grilles carbonées tenues par des pinces anti-capillaires. L'excès de liquide sera ensuite épongé par la tranche avec un papier filtre de grammage 5. Les grilles sont laissées à l'air puis observées sur le microscope électronique FEI CM120 sans ajout d'agents contrastants.

2.4.3 Culture cellulaire

L'internalisation et le transport de NPs de silice dans l'endothélium *in-vitro* ont été réalisés sur le modèle cellulaire HPAECs (chapitres expérimentaux 2 et 3). L'étude rapportée dans le chapitre 4 de ce manuscrit porte sur un type cellulaire différent qui sera développé dans le chapitre expérimental correspondant. Toutes les étapes de cultures cellulaires sont réalisées dans un incubateur à 37° C, en atmosphère humide et à 5 % de CO₂.

2.4.3.1 Modèle cellulaire

Les cellules HPAECs (*Human Pulmonary Artery Endothelial Cells*), cellules endothéliales humaines pulmonaires artérielles sont achetées chez Promocell (Heidelberg, Allemagne) au passage 3 ainsi que tout milieu de culture sauf contre-indication. Elles sont amplifiées dans du milieu de culture complet (ECGM) jusqu'au passage 4 - 5, puis trypsinées et congelées en aliquots de 500 000 cellules en présence de 10% de FBS ; formant le stock.

Chaque cryo-tube stock est décongelé et amplifié sur 2 fioles plastiques (T25 ; Costar, Corning, New York, USA) jusqu'à confluence. Les cellules sont ensuite trypsinées et réensemencées selon les besoins de l'expérience. Classiquement, les cellules sontensemencées à une concentration de 50 000

cellules/cm² sur des lamelles de verres recouvertes de fibronectine (Sigma-Aldritch). Ces cellules sont cultivées jusqu'à confluence par un changement du milieu complet tout les deux jours.

2.4.3.2 Protocoles d'incubation des cellules avec les nanoparticules

L'exposition des cellules aux NPs est réalisée sur les cultures à confluences de cellules HPAECs. Les NPs sont mises au contact des cellules pendant 1 heure aux concentrations décrites dans la partie résultat de ce chapitre dans du milieu de culture basal (ECBM - Promocell) dépourvu de sérum, de facteurs de croissance et de rouge de phénol. La solution de NPs est toujours préparée fraîchement avant la mise au contact des cellules. Après 3 rinçages au PBS++, les cellules sont remises en culture pour une durée de 4 à 48 heures dans du milieu complet et fixées chimiquement pour la microscopie électronique ou photonique (voir figure 2.25).

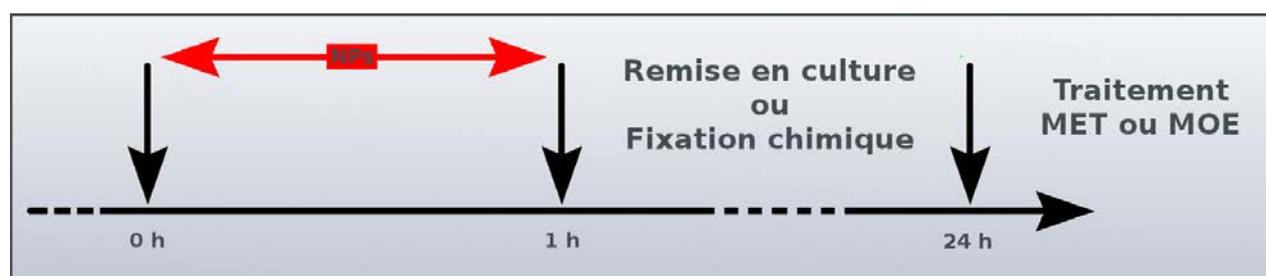


FIGURE 2.25 – Protocole d'application des NPs.

2.4.3.3 Toxicité cellulaire des NPs

Les cellules HPAEC sontensemencées sur des plaques 96 puits à une densité de 10 000 cellules/cm² dans du milieu de culture complet (ECGM) et laissées à adhérer pendant 48 heures avant traitement avec les NPs (et les inhibiteurs chimiques pour les expériences d'inhibition des voies d'endocytose). Le réactif WST-1 a été utilisé en accord avec les recommandations du fournisseur pour estimer la viabilité des cellules. 24h après le traitement, le réactif WST-1 a été ajouté aux puits pendant un temps d'incubation de 2 heures jusqu'à obtention d'une densité optique DO (évaluée par spectrophotométrie à 450 nm) suffisante pour la quantification de la métabolisation du réactif. Pour les expériences d'inhibition chimique des voies d'endocytose, la viabilité cellulaire a également été enregistrée 1 heure après le traitement et en présence des NPs.

2.4.4 Expériences d'inhibition des voies d'endocytose

Pour toutes les expériences d'inhibition chimique des voies d'endocytose, les inhibiteurs sont mis au contact des cellules dans du milieu de culture sans sérum (ECBM) pendant une heure (pré-incubation). L'incubation avec les NPs est ensuite réalisée également en présence des inhibiteurs dans du milieu ECBM. À la fin de l'incubation, les cellules sont rincées trois fois au PBS ++ et fixées pour l'observation en microscopies, ou décrochées pour la cytométrie en flux. Le protocole d'exposition est résumé dans la figure 2.26. Les caractéristiques principales et les références des inhibiteurs sont listées dans la table 2.3.

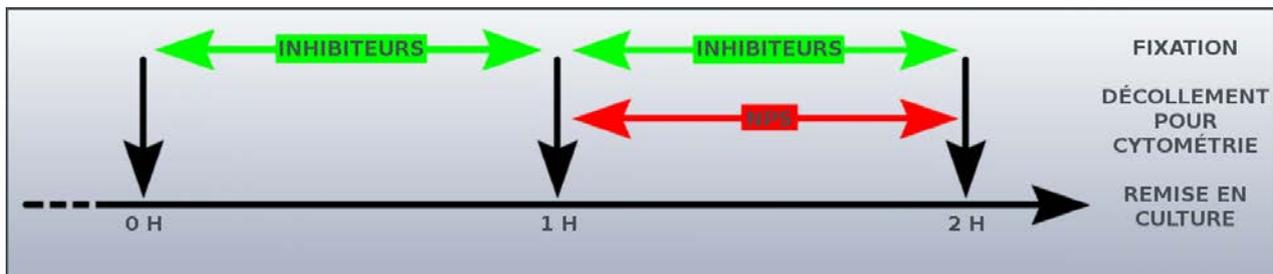


FIGURE 2.26 – Protocole d'application des NPs et inhibiteurs.

Voie d'endocytose inhibée	Inhibiteur	Concentration utilisée	Description	Bibliographie	Référence
Macro-pinocytose	Amloride	100 μ M	Agit par abaissement du pH sub-membranaire et bloque les signaux Rac-1 et cdc42	[Koivusalo 2010] [Thurn 2011]	SIGMA A3085
	Cytochalasine D	5 μ M	Inhibe la polymérisation de l'actine. Manque de spécificité pour la macropinocytose.	[Bawa 2012] [Partlow 2008]	MERCK 250255
Voie cavéole	Génistéine	200 μ M	Inhibiteur de tyrosine kinases. Séquestration des cavéoles à la membrane plasmique.	[Thurn 2011] [Puri 2001]	MERCK 345834
Voie clathrine	Chlorpromazine	15 μ M	Séquestration des puits clathrine dans les endosomes. Inhibition de la formation à la membrane plasmique.	[Bawa 2012] [Wang 1993]	MERCK 215921
Voies énergie dépendantes	2-déoxy-D-glucose \times NaN ₃	20 mM	Privation en énergie des cellules. Utilisé en complément d'un milieu pauvre en glucose.	[Partlow 2008] [Glenn 2009]	SIGMA D3179

TABLE 2.3 – Inhibiteurs utilisés dans les expériences d'inhibition de l'internalisation des NPs de silice dans les cellules HPAECs.

2.4.4.1 Cytotoxicité des inhibiteurs et impact sur le tapis cellulaire

La cytotoxicité des inhibiteurs a été analysée de la même manière que précédemment pour les NPs (voir figure 2.27 et table 2.4).

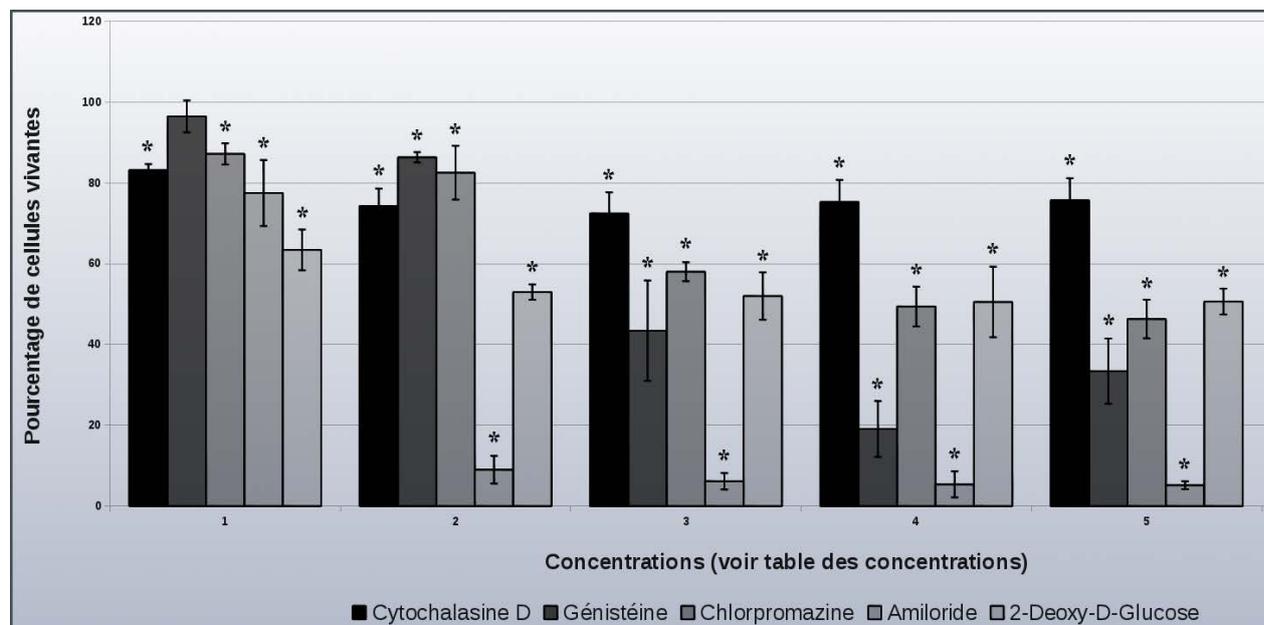


FIGURE 2.27 – Cytotoxicité des inhibiteurs après une heure d'exposition. Test WST-1, les concentrations correspondantes sont indiquées dans la table 2.4. Les * indiquent une différence significative par rapport au témoin ($p < 0,05$).

Les concentrations en inhibiteurs (en rouge dans la table 2.4) sont choisies afin de limiter au maximum l'effet cytotoxique des inhibiteurs sur les cellules tout en maintenant une bonne inhibition de l'endocytose de marqueurs des voies : macropinocytose (Dextran 70k), clathrine (Transferrine) et cavéoles (choléra toxine B).

Inhibiteur	1	2	3	4	5
Cytochalasine D (μM)	2,5	5	7,5	10	12,5
Génistéine (μM)	100	200	300	400	500
Chlorpromazine (μM)	5	10	15	20	25
Amiloride (μM)	100	200	300	400	500
2-Déoxy-D-Glucose (mM)	10	20	30	40	50

TABLE 2.4 – Concentrations des inhibiteurs de la figure 2.27. Les concentrations choisies pour les expériences d'inhibition sont mises en rouge.

Afin de visualiser l'impact des inhibiteurs après les deux heures d'exposition et combinés aux NPs, les cellules ont été fixées au paraformaldéhyde (PFA) 4 % pendant 20 minutes pour visualisation en microscopie optique à épifluorescence (microscope inversé LEICA DMI 6000 équipé d'une caméra LEICA DFC 350FX). Rapidement, les lamelles de verre portant les cellules ont été rincées trois fois au PBS après fixation et incubées 10 minutes avec une solution de Hoescht34580 (Invitrogen) dans du PBS à 5 ng/mL pour marquage des noyaux. Après rinçage rapide à l'eau milliQ, les lamelles ont été montées dans du milieu Dako sur lames et observées (voir figure 2.28).

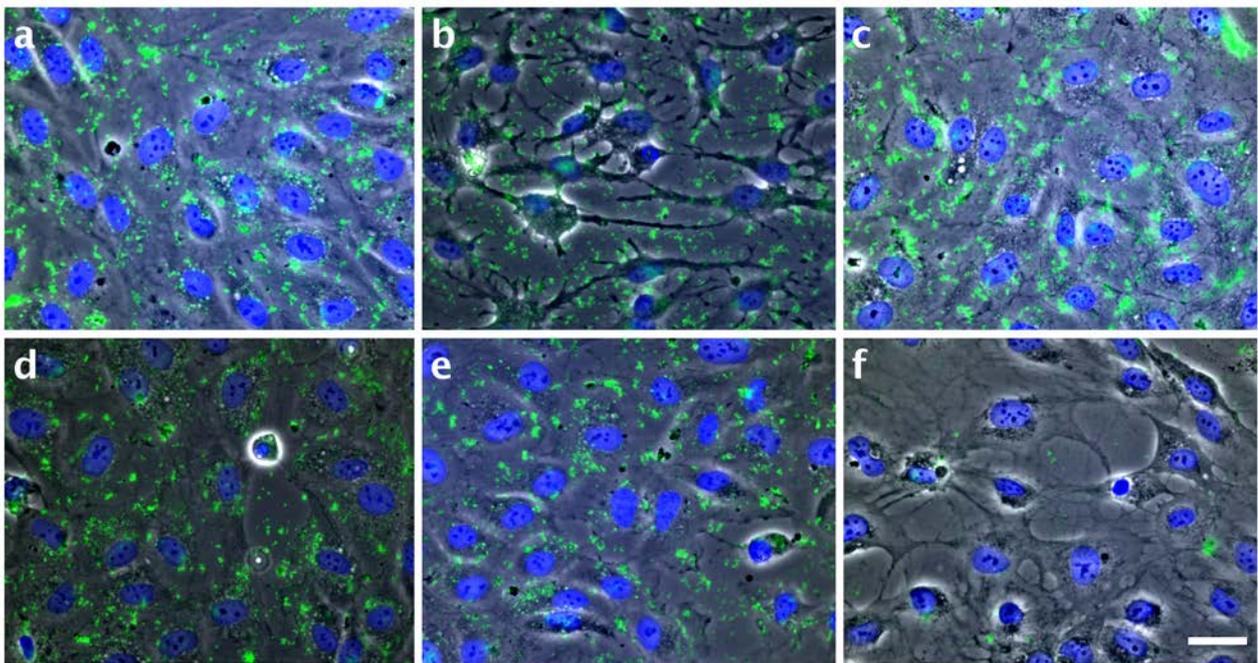


FIGURE 2.28 – *Effet des inhibiteurs chimiques sur l'aspect morphologique du tapis cellulaire après 1 heure de pré-incubation et une heure d'incubation en présence de NPs 50 nm. Concentrations choisies correspondant aux valeurs de la table 2.4. a - Témoin négatif; b - Cytochalasine D, perte de morphologie des cellules; c - Génistéine; d - Chlorpromazine; e - Amiloride; f - 2-Déoxy-D-Glucose, perte d'adhérence des cellules. Échelle 25 μ m.*

L'état du tapis cellulaire est maintenu pour l'ensemble des inhibiteurs en MOE à l'exception de la cytochalasine D qui provoque par son action sur le cytosquelette des modifications morphologiques importantes des cellules. La privation en énergie par le 2-déoxy-D-glucose fragilise également le tapis cellulaire et facilite le décollement des cellules (voir figure 2.28 f). Pour les autres conditions la distribution des NPs sur le tapis cellulaire en MOE est semblable au témoin.

2.4.5 Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une méthode efficace de caractérisation et de quantification statistique de particules en suspension. La cytométrie permet la quantification rapide des NPs internalisées dans les cellules HPAECs par la mesure de fluorescence.

2.4.5.1 Préparation des échantillons

Les cellules HPAECs sont cultivées comme décrit précédemment. Pour les expériences de cytométrie, les cellules sontensemencées à 40 000 cellules/cm² dans des plaques de 12 puits (4 cm²) et mises en culture pendant 48 heures. Les cellules sont ensuite pré-incubées pendant 1 heure en présence des inhibiteurs des voies d'endocytose dans du milieu dépourvu de sérum (ECBM). Les cellules sont ensuite exposées aux NPs en présence d'inhibiteurs pendant une heure. Après rinçage au PBS ++, les cellules sont trypsinées, reprises dans du milieu complet (ECGM) et stockées sur glace. Un volume de bleu trypan (0,25%) de 1,5 fois le volume de cellules est ajouté au dernier moment afin d'éteindre la fluorescence des NPs non-intériorisées au maximum [Van Amersfoort 1994].

2.4.5.2 Acquisition des données

Les échantillons sont analysés sur un cytomètre en flux (BD Biosciences FACS CANTO). Les NPs sont détectées par excitation avec un laser à 488 nm. Un nombre d'événements de 10 000 cellules dans une zone excluant les débris cellulaires sur les critères de diffusion axiale et de diffusion orthogonale de la population cellulaire est enregistré pour chaque condition. Pour chaque expérience, trois exemplaires par condition sont analysés.

2.4.5.3 Analyse des résultats

Les résultats sont exprimés en pourcentage des témoins positifs (NPs seules) de l'expérience. Des expériences séparées dans le temps vont ainsi pouvoir être comparées, l'étalonnage de la machine induisant une variation entre les expériences. Les données collectées de trois expériences séparées et exprimées en moyenne \pm l'écart-type. Les différences statistiques entre deux groupes ont été analysées par un test de Student. Pour l'analyse des différences statistiques entre trois ou plus groupes, une analyse de la variance uni-directionnelle (ANOVA) suivie d'un test de comparaison multiple de Bonferroni a été utilisé. Des valeurs de $p < 0,05$ sont considérées comme indiquant une différence statistiquement significative.

2.4.6 Microscopie électronique

La microscopie électronique a toujours joué un rôle prééminent dans le domaine de la biologie cellulaire. Jusqu'à récemment, cette approche a été utilisée majoritairement pour décrire des informations morphologiques. Le domaine de la microscopie électronique a néanmoins évolué vers une technique multi-modale, quantitative et intégrée permettant la visualisation d'événements cellulaires à l'échelle moléculaire.

La résolution sub-nanométrique des microscopes électroniques en font les outils de choix pour l'observation d'événements au niveau sub-cellulaire. Ces capacités d'observation, une fois combinées à l'utilisation de sondes développées pour leur grande spécificité, permettent la dissection fine de structures intracellulaires s'avérant impossible par d'autres techniques. En vingt ans, les techniques de préparation d'échantillon et particulièrement celles pour l'immunocytochimie et la stéréologie se sont grandement complexifiées, répondant à de nouveaux besoins d'analyse. Les progrès importants dans le développement de microscopes électroniques toujours plus puissants, l'acquisition de l'image

automatisée, les caméras de plus en plus résolutive, le traitement de l'image et l'instrumentation pour la préparation et l'analyse de matériel biologique ouvrent de nouvelles possibilités.

Il existe deux types de microscopes électroniques : le microscope électronique à **transmission** (MET) et le microscope électronique à **balayage** (MEB). Dans les MEB l'échantillon est scanné par un faisceau focalisé d'électrons qui produit des électrons secondaires en frappant l'échantillon. Ces électrons secondaires génèrent une image correspondant à la surface de l'échantillon. En MET les images résultent de la traversée du faisceau au travers de l'échantillon. L'image correspond alors à une projection de l'ensemble de l'échantillon et pas seulement l'image de sa surface.

2.4.6.1 Résolution en microscopie électronique et limitations en biologie

La résolution en microscopie électronique à transmission est déterminée par la longueur d'onde du faisceau d'électrons. On va pouvoir agir sur cette longueur d'onde en variant le voltage d'accélération. La résolution théorique d'un microscope électronique à une tension d'accélération de 100 kV est de 0,003 nm. Cette résolution est bien différente de ce que l'on peut espérer attendre en pratique et particulièrement pour des échantillons biologiques. En effet, la résolution maximale dans des conditions optimales d'observation se situe plus aux alentours de 0,1 nm. Cette limitation provient notamment des défauts optiques du système (aberrations au niveau des lentilles du microscope) et à des problèmes inhérents à la préparation des échantillons biologiques (problèmes d'épaisseur d'échantillons, de contraste, de dommages de l'échantillon dus à l'exposition au faisceau, etc.).

À titre de comparaison la résolution en MEB n'est pas limitée par les mêmes facteurs. Contrairement à la résolution en MET, la résolution en MEB n'est pas limitée par l'optique électronique mais est fonction du diamètre minimal du faisceau capable d'exciter suffisamment d'électrons secondaires du spécimen pour former une image. Plus le diamètre du faisceau sera fin et plus la résolution sera bonne. La résolution en MEB, en conditions optimales, sur les appareils récents est proche du nm.

L'observation d'échantillons biologiques requiert une préparation particulière. Les échantillons biologiques sont principalement composés d'eau, un élément incompatible avec les vides poussés requis pour l'observation en MET. Il est donc nécessaire d'éliminer l'eau des échantillons avant observation. Différents protocoles existent afin de préserver la structure de l'échantillon et de préserver son état au plus proche du vivant.

Le second obstacle pour l'observation d'échantillons biologiques en MET est la capacité limitée de pénétration du faisceau d'électron dans l'épaisseur de l'échantillon. Les échantillons observés en MET doivent être extrêmement fins pour permettre l'observation. Des protocoles permettent la découpe des échantillons pour arriver à des épaisseurs observables. En fonction des appareils, l'épaisseur de coupe observable varie entre 50 et 500 nm.

Le dernier critère principal pour l'observation en MET est le contraste de l'image. Le contraste en MET dépend du numéro atomique des atomes constituant l'échantillon. Plus le numéro atomique de l'atome est important, plus les électrons sont déviés et plus le contraste sera fort. Les molécules biologiques sont majoritairement composées d'atomes de faibles numéros atomiques (carbone, hydrogène, oxygène, azote, phosphore, soufre etc.), il est donc nécessaire d'augmenter le contraste des échantillons biologiques par l'utilisation de métaux lourds.

Ces problèmes sont détaillés dans les parties traitant de la préparation des échantillons biologiques pour la MET.

2.4.6.2 Cryo-microscopie électronique

Une autre possibilité pour contourner le problème de la présence d'eau dans l'échantillon biologique est d'avoir recours aux techniques de microscopie électronique en glace vitreuse. La cryo-microscopie permet d'immobiliser la phase aqueuse de l'échantillon sous forme vitreuse dans la colonne du microscope. En l'absence de cristaux de glace, l'échantillon est conservé dans l'état dans lequel il se trouvait au moment de la congélation. Le contraste est très faible car aucun agent contrastant n'est utilisé. Cette approche combinée à des approches de tomographie 3D permet d'obtenir une structure 3D sur des échantillons congelés hydratés.

2.4.6.3 Microscopes utilisés dans cette étude

Trois types de microscopes électroniques ont été utilisés au cours de cette étude : les deux microscopes électroniques à transmission de l'institut (FEI CM120, pour les coupes cellulaires en résine et FEI Tecnai F20 pour la cryo-microscopie) et le microscope électronique bas voltage LVEM5 (Delong America - Cordouan Technologies) pour l'imagerie MEB (voir figure 2.29).

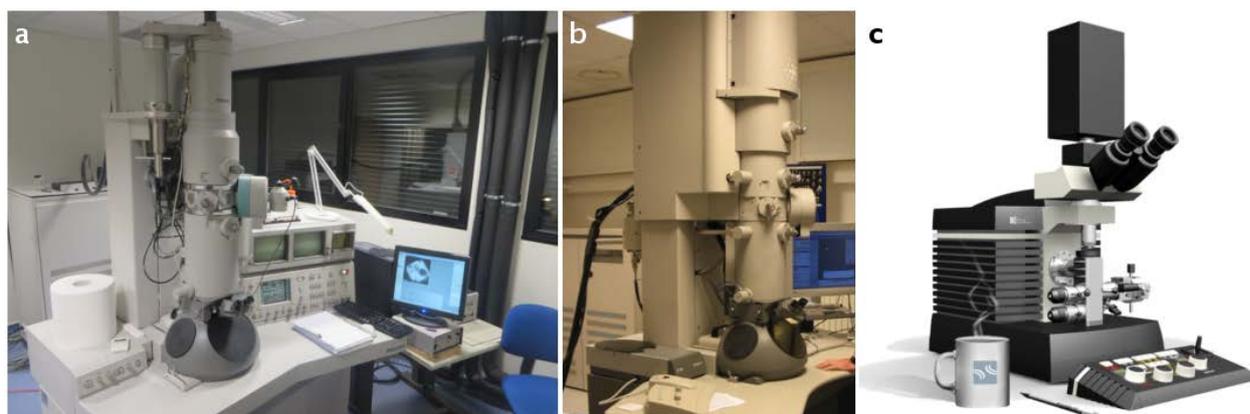


FIGURE 2.29 – Microscopes utilisés au cours de cette étude. **a** - FEI CM120, équipé d'une camera CCD Gatan $2K \times 2K$; **b** - FEI Tecnai F20, équipé d'une caméra CCD Gatan $2K \times 2K$; **c** - LVEM5, microscope électronique 5 kV de paillasse disposant des modes MEB, MET et STEM.

2.4.7 Préparation d'échantillons biologiques pour la microscopie électronique à transmission

La préparation d'échantillon biologiques pour la microscopie électronique en transmission va dépendre de l'échantillon. Plusieurs voies de traitement vont être disponibles (voir figure 2.30). Cette partie traitera des techniques classiques de préparation reposant sur l'inclusion plastique des échantillons. Les techniques cryo et particulièrement le CEMOVIS et les techniques immunocytochimiques seront développées dans la suite.

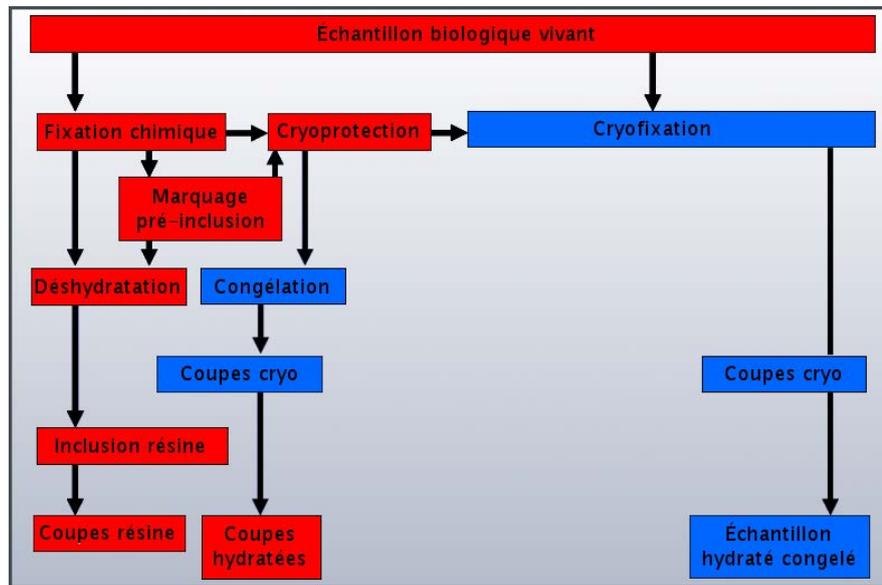


FIGURE 2.30 – Techniques de préparations d'échantillons cellulaires biologiques pour la MET développées au laboratoire. Les techniques reposant sur la fixation chimique et l'inclusion résine sont figurées en rouge et les techniques "cryo" en bleu.

2.4.7.1 Fixations chimiques d'échantillons cellulaires pour la MET

Le fixateur de choix pour la préservation des structures fines en MET conventionnelle est le glutaraldéhyde. L'introduction de ce fixateur par Sabatini et al. en 1963 [Sabatini 1963] a révolutionné la microscopie électronique pour la biologie cellulaire. Le glutaraldéhyde agit par pontage entre les groupes amines des protéines et des amino-lipides. Les solutions de qualité "microscopie électronique" contiennent une majorité de monomères et peu de formes oligomérisées du glutaraldéhyde ce qui permet une meilleure pénétration dans l'échantillon.

Le glutaraldéhyde agit rapidement mais pénètre lentement les tissus, permettant une fixation optimale des mono-couches cellulaires. Le maillage dense formé par le réseau protéique et le glutaraldéhyde va néanmoins gêner la reconnaissance des épitopes cellulaires diminuant largement l'efficacité des marquages immunocytochimiques.

Pour pallier à ce problème, on utilisera un mélange de paraformaldéhyde et de glutaraldéhyde (fixateur de Karnowski) pour la fixation des échantillons destinés à l'immunocytochimie. Plus le mélange sera riche en glutaraldéhyde et plus la conservation morphologique de l'échantillon sera bonne, souvent au dépend du marquage immunocytochimique. L'utilisation de glutaraldéhyde va également causer une légère auto-fluorescence de l'échantillon.

Les conditions classiques de fixation utilisées au cours de cette étude et les protocoles sont rassemblés ici.

Fixation morphologique. Les échantillons sont fixés au glutaraldéhyde 1,6% dans du tampon phosphate 0,1 M pendant une heure. La solution de fixateur est ajoutée à double concentration au milieu de culture de l'échantillon. Après une dizaine de minutes, une solution de fixateur fraîche est substituée au mélange. Après fixation, les échantillons sont rincés trois fois au PBS. Si les échantillons

sont destinés à être utilisés ultérieurement, le fixateur n'est rincé qu'une fois afin de maintenir une infime concentration de fixateur dans l'échantillon et d'éviter toute réversion pendant le stockage.

Fixation immunocytochimique. Afin de préserver les épitopes de l'échantillon tout en conservant une morphologie cellulaire optimale, les échantillons sont fixés de la même manière que précédemment par un mélange de PFA 4% et de glutaraldéhyde (entre 0 et 0,5% selon l'efficacité du marquage). Dans le cas de protocoles de marquages en pré-inclusion, une seconde étape de fixation dans du glutaraldéhyde 1% en post-marquage permet de stabiliser l'ensemble.

Post-fixation au tétraoxyde d'osmium. Pour des études ultra-structurales une seconde étape de fixation peut être utilisée. Pour cette étape dite de "post-fixation", l'échantillon fixé par les aldéhydes est incubé dans un bain de tétraoxyde d'osmium (OsO_4) à une concentration de 0,5-1% dans l'eau milliQ. Ce métal lourd, ponté les lipides et les protéines [Griffiths 1993] et apporte un contraste général à l'échantillon et particulièrement aux membranes (en raison de la forte affinité de l'osmium pour les lipides). L' OsO_4 pénètre les tissus très lentement et agit principalement par réaction avec les doubles liaisons et les groupes sulfohydriques des protéines.

Le protocole utilisé est le suivant : les échantillons conservés en tampon phosphate sont rincés à l'eau milliQ (en présence de phosphates l' OsO_4 précipite, polluant l'échantillon) et mis au contact d'une solution d' OsO_4 1 % pour une heure. Les échantillons sont ensuite rincés abondamment à l'eau. Dans le cas de préparations destinées à l'immuno-cytochimie, les temps de post-fixation à l' OsO_4 sont limités à une dizaine de minutes afin de ne pas perturber le marquage.

Un protocole particulier a également été utilisé pour les expériences d'internalisation des NPs de silice dans les cellules endothéliales. Ce protocole repose sur une post-fixation plus complexe en présence notamment d'acide tannique et est développé dans la partie contrastes de ce chapitre.

2.4.7.2 Déshydratation et inclusion en résine d'échantillons biologiques

Déshydratation alcoolique. Après la post-fixation, les échantillons sont déshydratés dans un gradient alcoolique croissant. Le protocole de déshydratation utilisé est développé ici :

- ◇ 5 minutes dans l'éthanol 50% ;
- ◇ 10 minutes dans l'éthanol 70% ;
- ◇ 10 minutes dans l'éthanol 96% ;
- ◇ 2 fois 10 minutes dans l'éthanol 100 % ultra-pur ;
- ◇ 2 fois 10 minutes dans l'oxyde de propylène ;

L'oxyde de propylène peut être remplacé par de l'éthanol 100% si l'échantillon comporte des plastiques qui seraient détruits. Au cours de la thèse, il est apparu que les étapes dans les concentrations les plus faibles d'éthanol causaient apparemment une extraction du matériel biologique.

Inclusion en résine des échantillons. L'inclusion en résine se fait par différents bains à concentrations croissantes en résine dans l'oxyde de propylène (ou l'éthanol absolu comme décrit précédemment). Les échantillons sont laissés une heure dans un mélange 1/3 ; 2/3 puis 2/3 ; 1/3 de résine épon (Inland Europe) et d'oxyde de propylène. Les échantillons sont ensuite laissés dans la résine pure sur la nuit. La résine est ensuite changée par de la résine fraîche pendant 3 heures juste avant l'inclusion.

L'inclusion se fait, selon les échantillons, dans des gélules de gélatine ou des moules en polymère spécialement dédiés. Les échantillons sont laissés deux jours dans une étuve à 65° C pour polymérisation. Les lamelles de verres sur lesquelles les échantillons ont polymérisé sont séparées de l'échantillon en résine par des chocs thermiques entre azote liquide et eau bouillante. Si l'échantillon doit être coupé dans le sens transversal, il est ré-inclus en résine épon.

2.4.7.3 Obtention de coupes ultra-fines pour la MET

La technique la plus répandue pour l'observation de spécimen biologique épais est la coupe en fines sections par ultramicrotomie. L'échantillon doit ici être stabilisé par fixation ou cryo-fixation. Il doit posséder des propriétés physiques permettant la réalisation des coupes (rigidité et résistance). L'échantillon rigide est ensuite placé sur un support adapté à l'ultra-microtomie. Les coupes se font avec des couteaux en diamant (Diatomes et RMC) pour les coupes ultra-fines et des couteaux en verre pour les semi-fines et les étapes de *trim* des échantillons. Les couteaux en verre sont réalisés au laboratoire à partir de barres de verre en utilisant la machine GKM2 (RMC).

Épaisseur et orientation des coupes. Quatre types de coupes d'échantillons inclus en résine sont réalisées classiquement : des coupes ultra-fine d'une épaisseur d'environ 50 nm pour les observations de routine en MET, des coupes ultra-fines d'une épaisseur la plus fine possible selon l'échantillon et la qualité de l'inclusion pour la microscopie en transmission à bas voltage, des coupes semi-fines d'une épaisseur d'environ 200 nm pour la microscopie électronique à balayage et des coupes semi-fines de 500 nm environ d'épaisseur pour la détection des cellules par microscopie optique avant observation MET. La majorité des échantillons traités dans cette étude est coupée dans le sens transversal au tapis cellulaire afin de visualiser la cellule adhérente par la tranche.

Ultra-microtomie. Les étapes d'ultra-microtomie sont succinctement décrites ci-après et sur la figure 2.35 : les échantillons sont installés sur le porte échantillon du microtome (2.35 a), une pyramide est taillée dans le bloc de résine encadrant la zone d'intérêt (2.35 b). Le porte-échantillon est ensuite installé sur le bras de l'ultra-microtome et une première surface est faite avec un couteau de verre. Une coupe semi-fine est réalisée et contrastée au bleu de toluidine afin de vérifier la présence des cellules d'intérêt (2.35 c). Un couteau en diamant est ensuite utilisé pour les coupes ultra-fines (2.35 d). Ces coupes sont récupérées sur les grilles de MET par flottation sur de l'eau contenue dans le réservoir du couteau en diamant (la résine étant hydrophobe, les coupes flottent en surface de l'eau). Un cil fin est utilisé pour guider les coupes sur la grille et les récupérer en les plaquant au mieux sur le film. Les grilles sont laissées à l'air pour sécher et stockées en attendant l'étape de contraste.

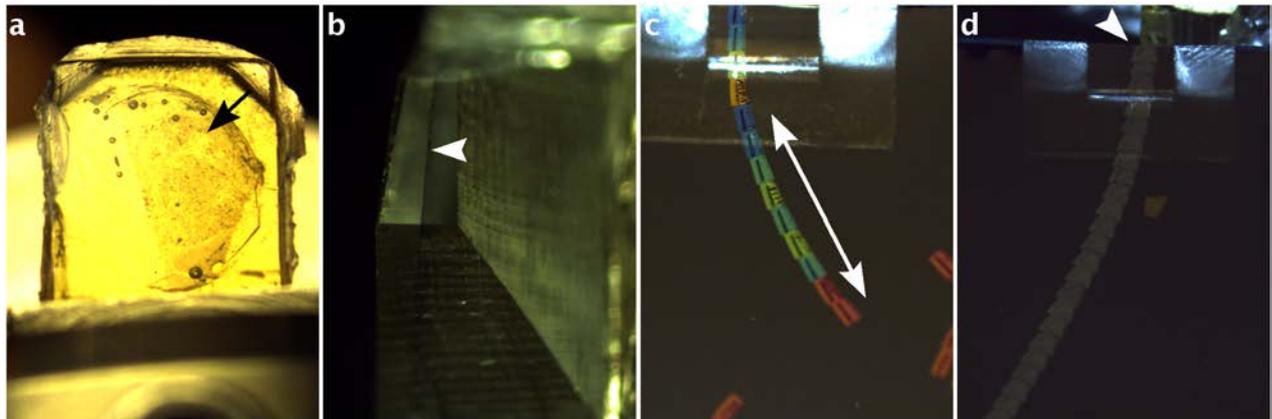


FIGURE 2.31 – Ultra-microtomie. **a** - Échantillon ré-inclus dans le sens transversal placé dans le porte-échantillon du microtome. La flèche noire indique l'emplacement du tapis cellulaire. **b** - Vue transversale de l'échantillon après réalisation de la pyramide. L'interface où se situe la mono-couche de cellules est visualisée par la pointe de flèche blanche. **c** - Coupes semi-fines d'épaisseurs variables. La couleur de la coupe reflète son épaisseur; de rouge (environ 100nm) à bleu (environ 200 nm). **d** - Ruban de coupes ultra-fines flottant sur le réservoir du couteau. La flèche blanche indique la lame du couteau diamant et le bloc de résine en cours de coupe. La couleur argentée-grise des coupes témoigne de leur épaisseur de l'ordre de 50 nm.

2.4.7.4 Préparation de grilles pour la MET

En MET, les échantillons biologiques sont déposés sur des grilles métalliques à barreaux ou pourvues d'un trou central. Afin de supporter l'échantillon un film fin de carbone et / ou de butvar va être déposé sur la grille. Ce film remplit deux rôles, il permet le soutien de l'échantillon et la dispersion des charges lors de l'exposition au faisceau.

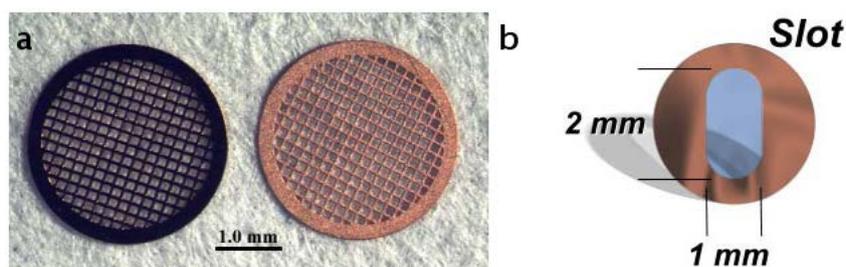


FIGURE 2.32 – Grilles de microscopie électronique à transmission. **a** - Grilles de cuivre à barreaux, type mesh. **b** - Grilles cuivre type slot.

La majorité des coupes plastiques observées dans cette étude ont été déposées sur des grilles de cuivre "slot" (voir figure 2.32 b), pourvues d'un trou ovale au centre de la grille sur laquelle on aura, au préalable, déposé un film de butvar. Le film est déposé à partir d'une solution de butvar 1% dans du chloroforme sur une lame de verre par écoulement dans une burette. Le film est ensuite décollé de la lame de verre par flottation sur de l'eau milliQ. Les grilles sont déposées sur le film directement

sur l'eau et le tout est "pêché" avec un morceau de parafilm. Les grilles sont conservées à l'obscurité et à l'abri de la poussière jusqu'à utilisation.

Les grilles dédiées au dépôt de coupes ultra-fines pour la microscopie bas-voltage sont dépourvues de film. Un fin grillage est utilisé permettant un support suffisant des coupes pendant l'observation (voir figure 2.32 a). Pour les approches de particules isolées un film de carbone (le plus fin possible) est évaporé sur des morceaux de mica lisses (via l'utilisation d'un évaporateur de carbone sous vide). Ce film est ensuite déposé sur des grilles de type 300 *mesh* par flottation.

Enfin, pour les expériences d'immunocytochimie qui nécessitent de laisser les grilles dans des liquides pouvant potentiellement les oxyder, des grilles de nickel recouvertes d'un film de carbone sont utilisées.

2.4.7.5 Contrastes des échantillons biologiques

Le contraste est l'une des étapes clés de la préparation d'échantillons biologiques pour la microscopie électronique. L'observation des échantillons passe donc généralement par l'ajout de contrastant selon deux méthodes :

- ◇ **Contraste positif.** L'objet est déposé sur un support, contrasté chimiquement avec des sels métalliques, séché et observé. L'échantillon va apparaître sombre sur un fond clair. Le contraste apporté aux coupes d'échantillons en résine est un contraste positif.
- ◇ **Contraste négatif.** L'objet est déposé sur un support et inclue dans un film de contrastant. L'échantillon va apparaître clair sur un fond sombre [Brenner 1959].

Contraste positif. Un grand nombre de protocoles de contraste positif existent, nous nous focaliserons ici sur les trois principaux protocoles utilisés dans cette étude pour la microscopie électronique à transmission classique.

- ◇ **Contraste classique : acétate d'uranyle et citrate de plomb.** Les coupes sont contrastées par une double coloration : 20-30 minutes dans l'acétate d'uranyle 2-4% sur goutte ; rincées 4 fois à l'eau milliQ sur gouttes puis contrastées en enceinte fermée (contenant des pastilles de soude) 2-3 minutes au citrate de plombs. Le citrate de plombs précipite en présence de CO₂, de l'eau dégazée est utilisée pour les rinçages suivants.
- ◇ **Contraste par imprégnation "mordant" acide tannique et OsO₄.** Ce contraste est fait pour faire apparaître un maximum de détails au niveau des membranes. Ce protocole se substitue à l'étape de post-fixation. Les échantillons sont incubés une heure à l'obscurité et sur glace avec une solution à 1% de tétraoxyde d'osmium et à 1,5 % de potassium ferrocyanide dans l'eau milliQ. Les cellules sont ensuite traitées 30 minutes à température ambiante avec une solution à 1% d'acide tannique après deux rinçages rapides à l'eau. Une dernière étape de 30 minutes dans une solution de tétraoxyde d'osmium à 1 % dans l'eau (sur glace et à l'obscurité) est ensuite nécessaire. Les échantillons sont soigneusement rincés à l'eau milliQ. Ce protocole est adapté de [Jiménez 2009]. L'acide tannique va se lier à l'OsO₄ et fait le lien entre les deux bains d'OsO₄. Les membranes sont donc contrastées par un "sandwich" d'OsO₄ et d'acide tannique. L'ajout du potassium ferrocyanide lors de la première étape limite le contraste non-spécifique au niveau du cytoplasme. Une autre méthode pour augmenter le contraste des membranes via l'utilisation de l'acide tannique est de l'ajouter au fixateur lors de la fixation des cellules (à 1%).

- ◇ **Contraste rouge de ruthénium et acétate d'uranyle - citrate de plomb.** Ce contraste est sensiblement semblable au protocole classique de contraste sur coupes. La seule différence est l'ajout de rouge de ruthénium (1%) lors de la fixation et de la post-fixation. L'affinité du rouge de ruthénium pour les membranes externes va renforcer le contraste, particulièrement au niveau des vésicules membranaires (comme par exemple les cavéoles [Thorn 2003]).

Coloration négative. Le protocole d'observation d'échantillons minces par coloration négative s'applique principalement à des échantillons liquides. Il est semblable au protocole d'observation des NPs en solution présenté précédemment. Les grilles de microscopie électronique recouvertes d'un film de carbone sont rendues hydrophiles par effluvage. 5 μ L d'échantillon liquide sont déposés sur la grille. L'excès de liquide est ensuite éliminé par la tranche. Si des traces de sels persistent dans l'échantillon, la grille sera rincée sur gouttes d'eau milliQ.

Le contraste en coloration négative va être apporté par la couche de contrastant enveloppant l'échantillon biologique. L'image de l'échantillon va donc apparaître en clair sur un fond sombre. Les agents de contrastes utilisés sont des métaux lourds. L'agent de contraste le plus couramment utilisé est l'acétate d'uranyle (2-4 %).

2.4.8 Préparation d'échantillons biologiques pour la cryo-microscopie électronique à transmission

La technique CEMOVIS (*Cryo-Electron Microscopy of Vitreous Sections* [Al-Amoudi 2004]) de préparation d'échantillon pour la cryo-microscopie électronique en transmission a fait l'objet d'un développement important au laboratoire avec le travail d'Olivier Le Bihan. L'objectif est ici d'adapter les supports de congélation haute pression permettant l'obtention d'une congélation des échantillons dans une glace vitreuse nécessaire à l'observation en cryo-MET à la congélation de cellules orientées cultivées directement sur les supports. Classiquement cette technique est réalisée sur des suspensions de cellules, ce qui ne permet pas de conserver l'information d'orientation des cellules et de travailler sur des cellules polarisées et jointives.

2.4.8.1 Fixation physique d'échantillons orientés

Les supports de congélation haute-pression sont soigneusement nettoyés sous agitation dans un mélange équivalent d'acide chlorhydrique et de peroxyde d'hydrogène pendant 2 heures. Les cupules sont ensuite rincées dans des bains d'eau milliQ successifs. Après séchage, un gel d'acrylamide est coulé dans les cupules. Un film plastique, combiné à un moule en acclar, sert à faire une empreinte dans la surface du gel d'acrylamide afin que les cellules ne se situent pas en surface lors de la congélation. Après polymérisation, l'excès d'acrylamide est éliminé sous une loupe binoculaire. La surface des gels est ensuite modifiée par adsorption de fibronectine afin de permettre la culture cellulaire.

Les cellules sontensemencées sur les cupules dans des plaques de culture cellulaire de 24 puits à la densité souhaitée et laissées deux jours en culture. Les traitements nécessaires tels que l'incubation en présence de NPs de silice ou avec des fluorophores permettant la détection *in-situ* dans le microtome (Calcéine par exemple) sont réalisés juste avant la congélation sous haute-pression (Leica HPM100).

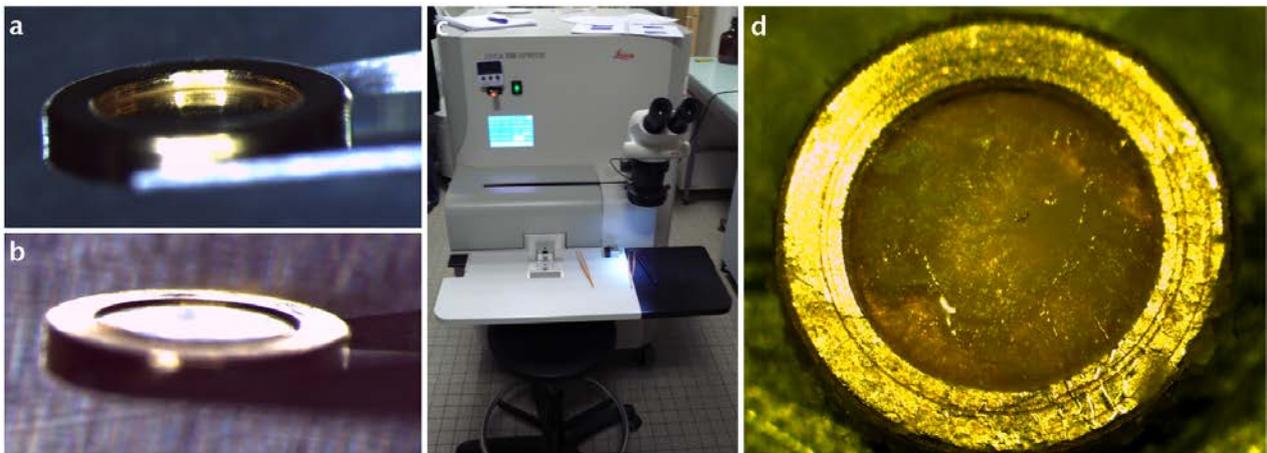


FIGURE 2.33 – Congélation sous haute pression d'échantillons cellulaires orientés. **a** - Cupule sans gel d'acrylamide. **b** - Cupule après ajout du gel. **c** - Congélateur sous haute pression Leica HPM100. **d** - Cupule après congélation.

2.4.8.2 Cryo-ultramicrotomie

Les échantillons sont ensuite transférés dans la chambre de cryo-ultramicrotome (Leica UC6) dont la température a été ajustée à -150°C . La cupule est fixée au porte-échantillon par un mélange d'éthanol et d'isopropanol qui va être rigide à ces températures. La figure 2.34 présente ensuite les étapes de préparation à la coupe. Les rubans de coupes sont récupérés sur des grilles de cuivre portant un film de carbone et stockés dans l'azote liquide pour observation au cryo-microscope.

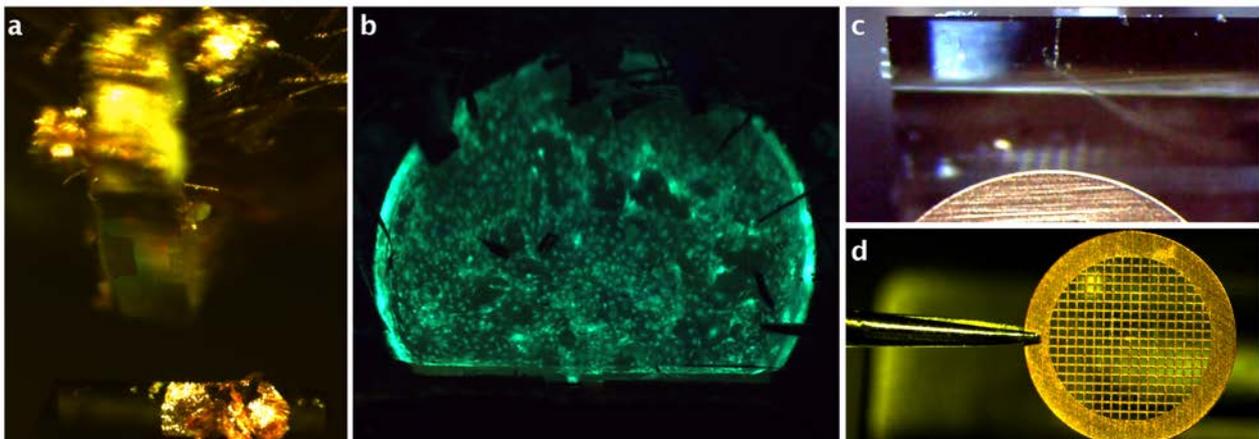


FIGURE 2.34 – Ultra-microtomie. **a** - Étape d'usure de la cupule métallique permettant d'accéder à l'échantillon. On voit nettement l'interface se dessiner. **b** - Visualisation du tapis cellulaire par la calcéine après une première étape de trimming. **c** - Récupération du ruban de coupes à l'aide d'un cil. Le ruban est tenu en suspension pendant la coupe et va être déposé sur la grille présentée en dessous. **d** - Rubans déposés sur une grille.

2.4.9 Microscopie corrélative *in-situ*

Plusieurs approches de microscopie corrélative peuvent être appliquées entre les microscopies électronique en transmission et optique à fluorescence. La corrélation entre les deux types d'observation peut être directe (sur le même échantillon) ou indirecte (sur deux coupes jointives par exemple). La microscopie corrélative a pour but d'apporter un surplus d'informations par l'utilisation de techniques multi-modales. L'un des avantages est ici de pouvoir faciliter la visualisation du contexte de nos échantillons aux échelles micrométrique et nanométrique.

Notre idée ici était de faciliter les étapes de préparation et de coupes en cryo-microtomie par une étape de détection des régions d'intérêt par fluorescence et ce directement dans la cuve du cryoultramicrotome. Cette démarche initiée par Olivier Le Bihan dans le laboratoire a permis la création d'un prototype de module fluorescent permettant la visualisation directe d'échantillons congelés dans la cuve du microtome. Ce prototype reposait sur une source laser monochromatique pour l'excitation de l'échantillon et un jeu de filtres *long-pass* placés sur le stéréo-microscope pour l'observation de la fluorescence émise par l'échantillon. L'expertise de Cordouan Technologies a ensuite été proposée pour le développement d'un module "multi-lambda" commercialisable.

Le module multi-lambda est composé d'une unité commerciale d'illumination à LED permettant une excitation des échantillons à trois longueurs d'ondes différentes : 365, 470 et 530 nm. Ces longueurs d'ondes correspondent aux fluorophores les plus communément utilisés en biologie. Un flexible en fibre optique permet de conduire la lumière vers l'échantillon. Un colimateur situé à l'extrémité de la fibre optique va permettre de faire le point sur l'échantillon à une distance pouvant aller jusqu'à une dizaine de centimètres. L'échantillon cryo va donc pouvoir être illuminé depuis l'extérieur de la chambre sans difficulté. La fibre optique rigide permet un positionnement facile de l'illumination ne gênant pas l'utilisateur pendant la coupe.

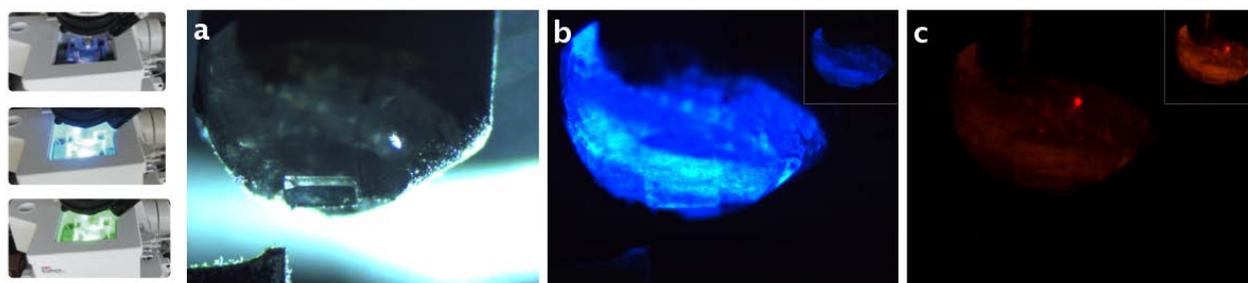


FIGURE 2.35 – Module multi-lambda. À gauche, vue de la chambre du cryoultramicrotome en présence des trois modes d'illumination du module. **a** - Pyramide contenant un culot de cellules incluses en agarose (méthode Tokuyasu), vue en lumière classique. **b** - Marquage Hoescht des noyaux permettant la visualisation du culot cellulaire. **c** - Marquage TRITC des filaments d'actine par la phalloïdine.

Un jeu de filtres correspondant à chaque longueur d'onde de travail vient s'adapter sur la base du stéréo-microscope et permet la visualisation du signal fluorescent. Un exemple de fonctionnement est présenté en figure 2.17. Les limitations de l'appareil ne se situent pas dans la capacité d'illumination mais plutôt dans la résolution maximale pouvant être atteinte par le stéréomicroscope.

2.4.10 Caractérisation de l'adhérence cellulaire après exposition aux NPs

La caractérisation de l'adhérence cellulaire après exposition aux NPs commence par l'étalonnage de l'intensité de la force de décrochement qui doit être appliquée aux cellules. Cette force est définie en absence de processus cellulaires et correspond à la résistance initiale des cellules au décrochement. Cette force est ensuite utilisée pour déterminer la récupération de la capacité d'adhérence des cellules au fur et à mesure du temps après un premier décollement. L'objectif est ici de quantifier l'effet des trois types de NPs sur la mise en place des processus d'adhérence cellulaire. Les protocoles utilisés ici ont été adaptés de [McClay 1998].

2.4.10.1 Résistance initiale au décrochement

Cette expérience mesure l'adhésion des cellules au support à 4°C. Un schéma simplifié de l'expérience est présenté en figure 2.36. Les cellules cultivées à confluence sur des flasques T25 sont exposées aux NPs aux concentrations infra-toxiques pendant une heure à 37°C. Après trois rinçages au PBS ++, les cellules sont trypsinées et culottées. Elles sont reprises dans du milieu complet (ECGM) et ensemencées sur des plaques 48 puits à 18 000 cellules/cm². Toutes les étapes se font à 4°C afin de bloquer les processus cellulaires. Les cellules sont ensuite plaquées au fond des puits par une première étape de centrifugation douce dans le sens normal à 35 g. Cette étape se fait dans une centrifugeuse réfrigérée pourvue d'un rotor permettant la centrifugation de plaques 48 puits. Les puits sont complétés afin d'être remplis au maximum avec du PBS++. Les plaques sont ensuite recouvertes d'un parafilm tendu et d'un couvercle afin de les sceller hermétiquement et de prévenir toute fuite. Les plaques sont ensuite centrifugées 5 min à différentes vitesses variant entre 0 et 200 g. L'objectif est ici de déterminer la vitesse nécessaire pour obtenir un décollement maximal en absence de processus actifs d'adhésion au support.

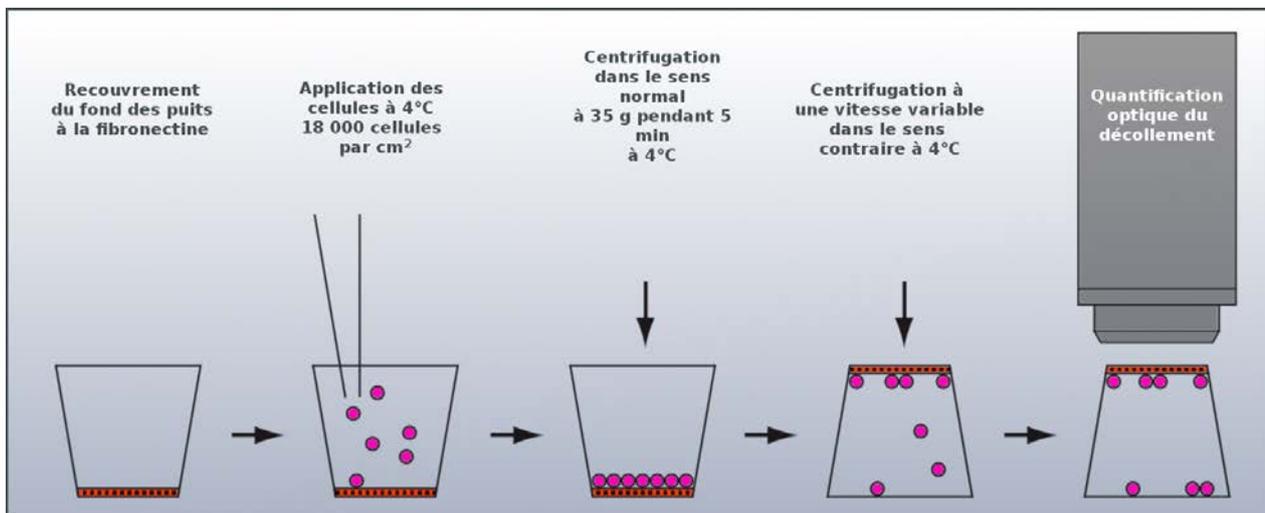


FIGURE 2.36 – Schéma simplifié de l'expérience d'adhésion cellulaire au support. Adapté de [McClay 1998].

La quantification se fait par sélection aléatoire de dix champs non-recouvrants sur un microscope optique droit. La quantité de cellules par champ est ensuite comptée par condition et comparée aux

témoins. L'intensité maximale de décrochement pour les cellules exposées aux NPs est atteinte pour 200 g (voir figure 2.37). On remarque une perte d'adhérence initiale des cellules incubées avec les NPs par rapport aux cellules non-traitées à partir de vitesses de centrifugation de 20 g.

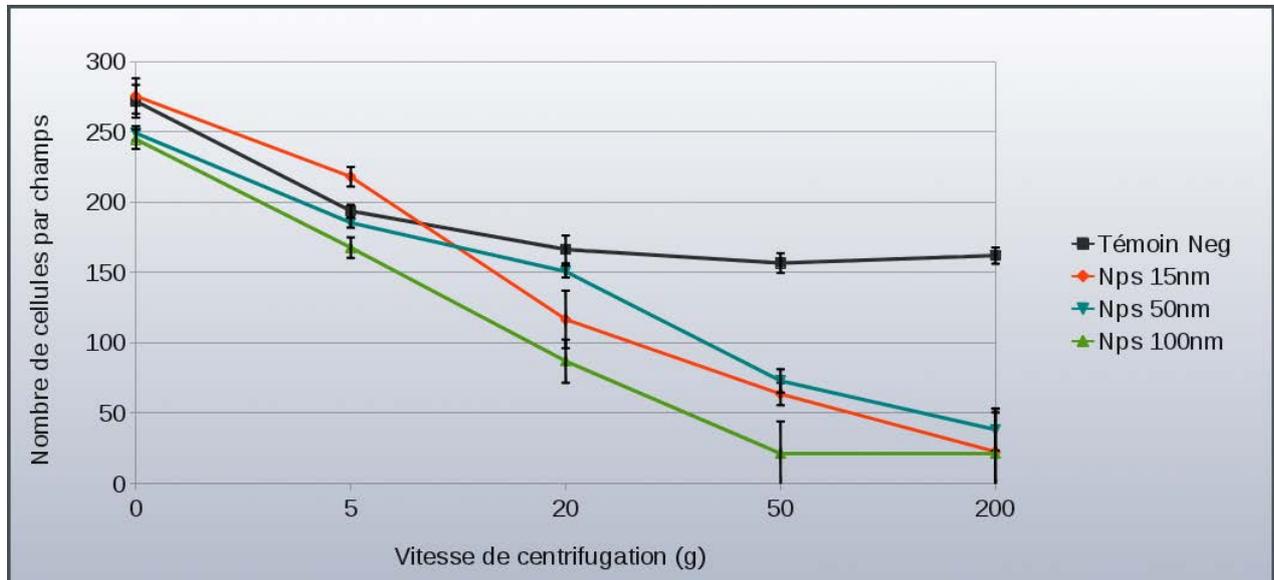


FIGURE 2.37 – Adhérence initiale des cellules exposées aux NPs. Les cellules sont maintenues à 4° C pendant la totalité de l'expérience.

2.4.10.2 Détachement cellulaire après remise en culture

Le protocole est assez semblable à l'expérience d'adhésion précédente. Les cellules sont mises au contact des NPs pendant une heure sur flasque T25. Trypsinées, elle sont reprises dans du milieu complet et conservées à 4° C avant ensemencement sur les plaques 48 puits recouvertes de fibronectine à 18 000 cellules/cm². Les cellules sont ensuite plaquées au fond du puits par centrifugation à 35 g et mises à 37° C pendant des temps croissants de 5, 15, 30 minutes, 1 et 24 heures. Les plaques sont ensuite rendues hermétiques comme précédemment et centrifugées le fond vers le haut pendant 5 minutes à 200 g. 200 g étant la vitesse pour laquelle une majorité des cellules témoins étaient décrochées dans l'expérience précédente. La quantification se fait de la même manière que dans l'expérience précédente.

Étude de la transcytose de nanoparticules de silice au travers de la barrière endothéliale pulmonaire humaine

Sommaire

3.1	Objectifs de l'étude	92
3.2	Résultats	93
3.2.1	Caractérisation de la barrière endothéliale reconstituée	93
3.2.2	Transcytose des NPs sur membranes supportées	97
3.2.3	Quantification stéréologique de la transcytose et de la distribution intracellulaire des NPs	100
3.3	Discussion	106
3.4	Partie expérimentale	110
3.4.1	Culture cellulaire sur membranes supportées	111
3.4.2	Mesure de l'imperméabilité de la mono-couche cellulaire	112
3.4.3	Protocole d'inclusion en résine des membranes supportées pour la microscopie électronique	114
3.4.4	Approche de quantification par stéréologie	115

3.1 Objectifs de l'étude

Les résultats présentés au chapitre précédent montrent un lien entre la taille des NPs et les voies d'endocytose : macropinocytose, clathrine et cavéole dépendantes. Malgré de nombreuses observations, aucune NP n'a pu être observée entre le support de culture et la membrane basale des cellules. La présence d'un support rigide au niveau de la face basale de la cellule serait potentiellement la cause de l'absence de transport trans-endothélial des NPs. Celles-ci prennent le chemin des voies de dégradation endo-lysosomiales et sont stockées dans les lysosomes.

L'objectif de cette partie de l'étude est d'utiliser un système de culture cellulaire spécialement développé pour l'étude du transport des NPs dans le but de mettre en évidence une traversée de la barrière endothéliale (voir figure 3.1). Les cellules sont cultivées sur un insert supporté composé d'une membrane poreuse permettant un échange entre les compartiments basaux et apicaux. Le tapis cellulaire forme l'interface entre ces deux compartiments.

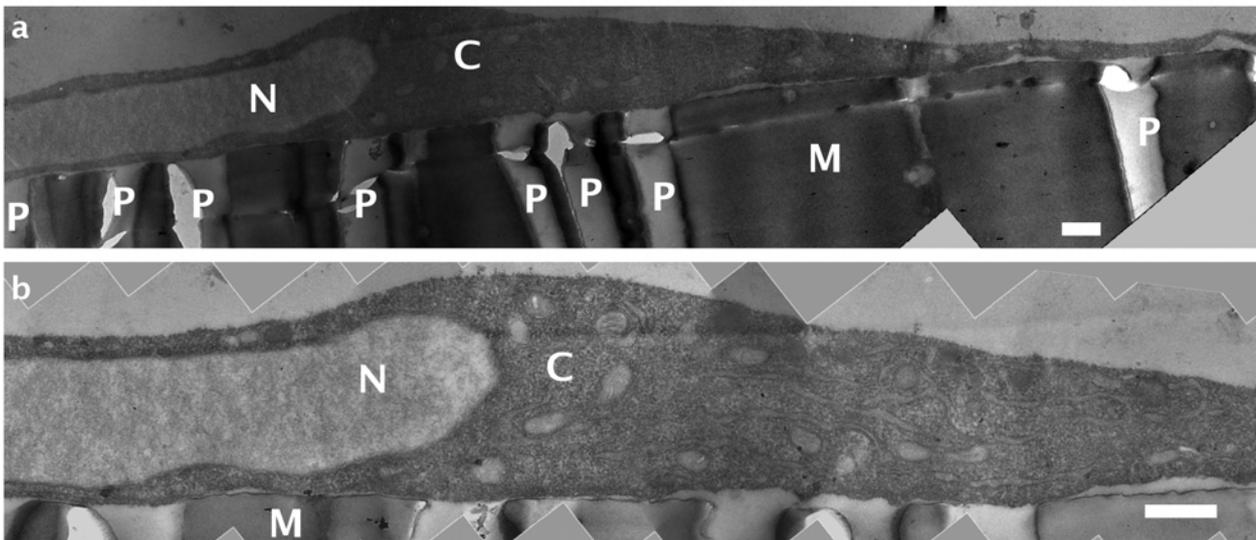


FIGURE 3.1 – Coupe transversale de cellule HPAEC cultivée sur membrane supportée observée en MET. N - noyau ; C - cytoplasme ; M - membrane supportée ; P - pore. Échelle 500 nm.

Cette étude se focalise sur le suivi du transport trans-cellulaire des NPs dans une mono-couche de cellules endothéliales HPAECs par MET.

La **première** partie de l'étude consiste à caractériser la barrière endothéliale cultivée sur les inserts supportés et à mesurer sa perméabilité. La construction d'un endothélium étanche nous permet de mieux suivre le passage trans-cellulaire des NPs en limitant le passage para-cellulaire (entre les cellules).

La **seconde** partie de l'étude analyse la distribution des NPs de manière qualitative dans l'échantillon par MET pour les trois types de NPs.

La **troisième** partie de l'étude apporte une information quantitative à l'observation de MET par l'utilisation d'outils stéréologiques pour l'étude du suivi intra-cellulaire et trans-cellulaire des NPs.

3.2 Résultats

3.2.1 Caractérisation de la barrière endothéliale reconstituée

Toutes les expériences présentées dans ce chapitre ont été réalisées sur des tapis cellulaires cultivés sur des membranes supportées de type Transwell® pourvues de pores de $0,4 \mu m$ de diamètre.

3.2.1.1 Perméabilité de la mono-couche cellulaire

Deux critères principaux permettent de définir la perméabilité d'un tapis cellulaire : sa résistance électrique, également appelée résistance trans-endothéliale (RETE), exprimée en ohm/cm^2 et son coefficient de perméabilité au passage du *Lucifer Yellow* exprimé en cm/sec . La figure 3.2 montre l'évolution de ces deux paramètres au cours du temps de culture.

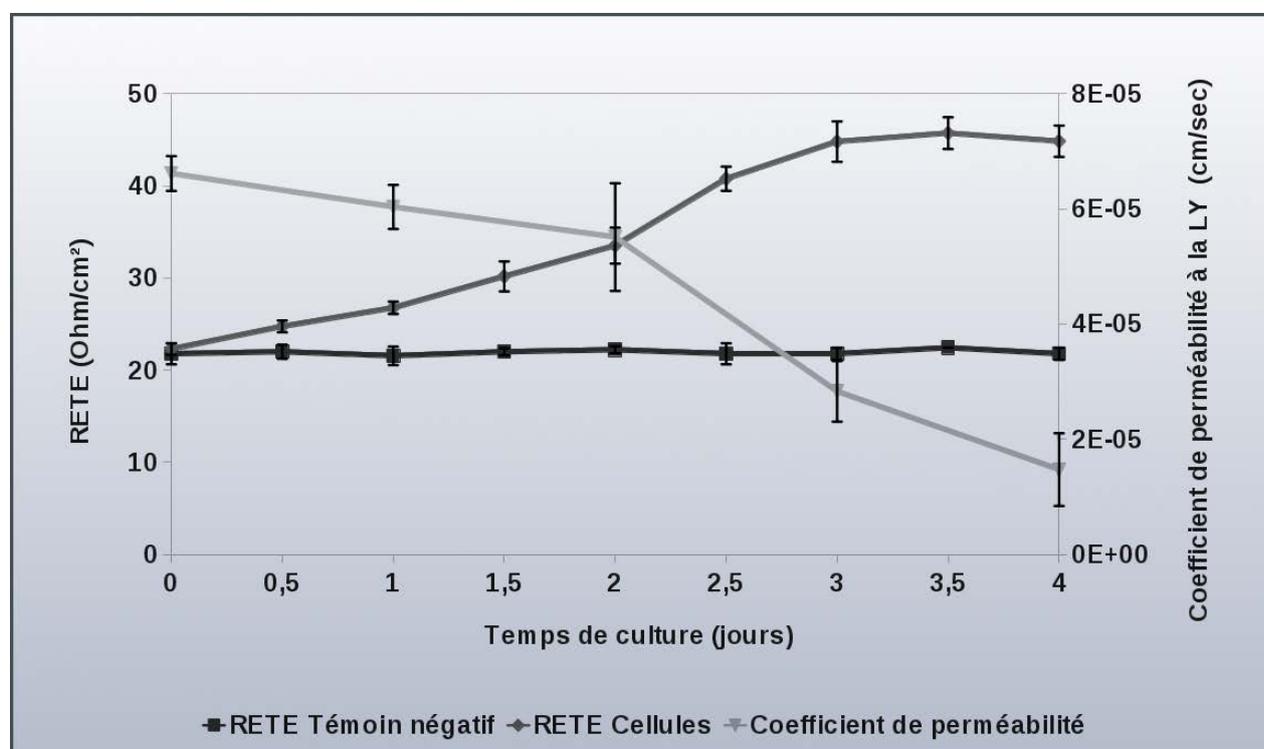


FIGURE 3.2 – Évolution temporelle du coefficient de perméabilité et de la résistance électrique de la mono-couche cellulaire.

L'évolution de la RETE au cours du temps est comparée au témoin négatif correspondant à une membrane Transwell dépourvue de cellules. On remarque une augmentation lente lors des deux premiers jours de culture après ensemencement, puis une augmentation rapide entre le deuxième et troisième jour et enfin un plateau à partir du troisième jour autour de $45 ohm/cm^2$.

Dans le même temps, le coefficient de perméabilité au passage du *Lucifer Yellow* décroît progressivement. Le tapis cellulaire est toujours très perméable jusqu'au deuxième jour puis diminue brutalement entre le deuxième et quatrième jour de culture. On considère que la mono-couche cellulaire est suffisamment imperméable après l'augmentation de la RETE et la diminution du transport du

Lucifer Yellow, ce qui est obtenu après le troisième jour après ensemencement. Toutes les expériences de transcytose, présentées dans ce chapitre, ont été réalisées au troisième jour après ensemencement.

- ◇ Diminution de la perméabilité de la mono-couche cellulaire au cours du temps de culture.

3.2.1.2 Influence des NPs sur la perméabilité de la mono-couche cellulaire

L'exposition des cellules aux NPs modifie la perméabilité de la mono-couche cellulaire. La RETE de la mono-couche cellulaire varie après exposition aux NPs (voir figure 3.3). Après une heure d'exposition aux NPs, on enregistre une très faible diminution de la RETE pour les trois types de NPs. Cette diminution est proportionnelle à la taille des particules avec un effet maximal pour les NPs de 100 nm. Néanmoins, la valeur de RTE reste suffisamment élevée ($RETE > 40 \text{ ohm/cm}^2$ pour les trois tailles) et correspond à la valeur mesurée pour un temps de culture de 3-4 jours (figure 3.2).

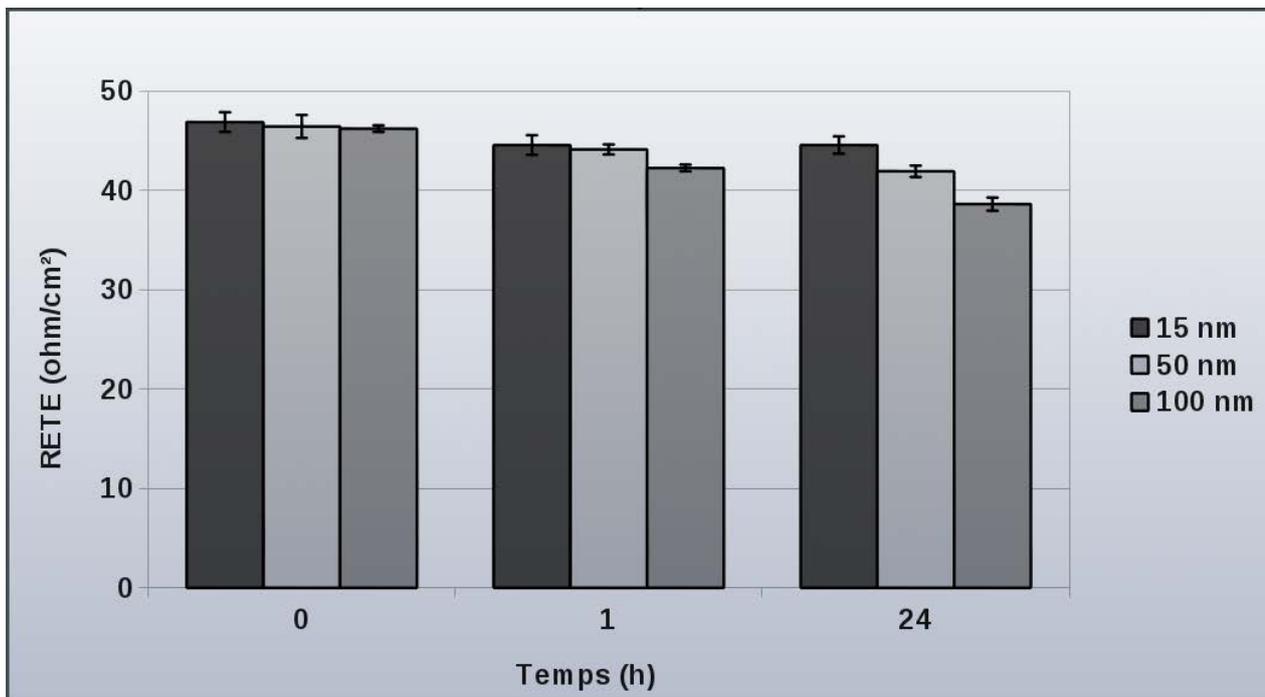


FIGURE 3.3 – Évolution de la RETE au cours du temps après exposition aux trois types de NPs.

24 heures après exposition, la RETE reste stable pour les NPs de 15 et 50 nm, indiquant ainsi un maintien de l'étanchéité de la mono-couche cellulaire ($RETE > 40 \text{ ohm/cm}^2$). Pour les NPs 100 nm, la RETE de la mono-couche cellulaire diminue ($RETE < 40 \text{ ohm/cm}^2$), montrant une augmentation de la perméabilité.

- ◇ La RETE de la mono-couche cellulaire est faiblement modifiée après une heure d'exposition aux NPs.

3.2.1.3 Caractérisation des jonctions intercellulaires après exposition aux NPs

Un immuno-marquage de ZO1 (protéine constituante des jonctions intercellulaires) a été réalisé (voir figure 3.4). Un marquage dense des jonctions intercellulaires est observé dans toutes les conditions testées. L'incubation des cellules avec les NPs de 15, 50 et 100 nm ne semble pas perturber l'organisation des jonctions intercellulaires après une heure d'incubation.

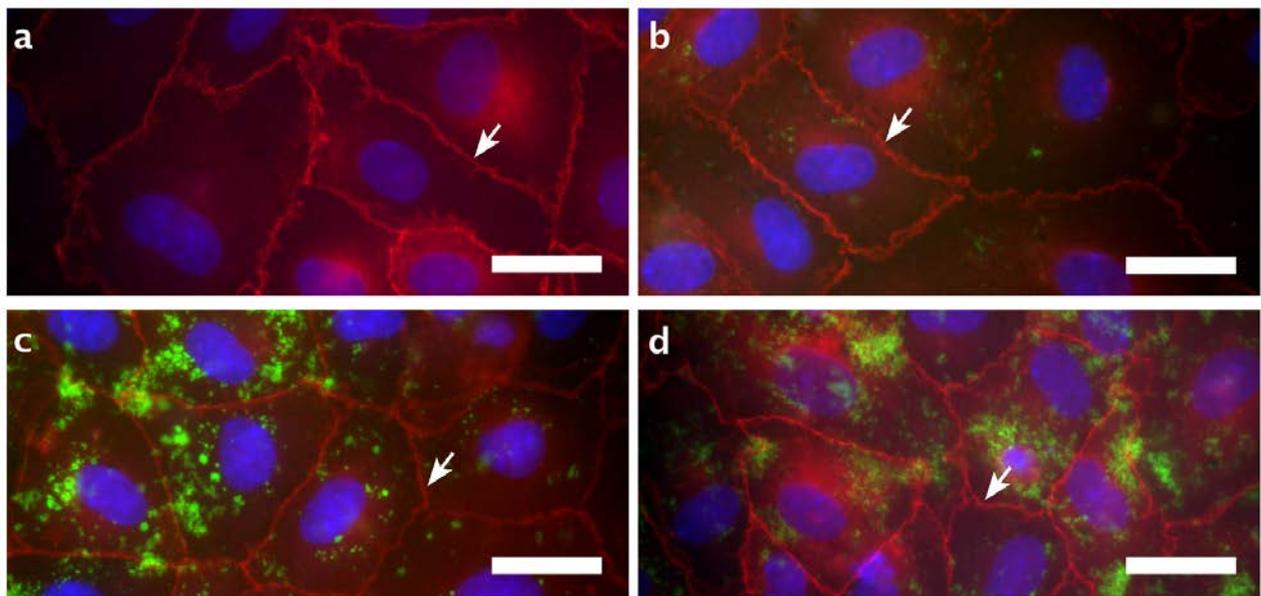


FIGURE 3.4 – Localisation de ZO1 par immuno-fluorescence après 1 h d'exposition aux trois types de NPs. En absence de traitement, on observe un marquage de ZO1 au niveau des jonctions intercellulaires (a, flèches blanches). Le marquage ZO1 est maintenu après une heure d'exposition aux NPs de 15nm (b), de NPs 50 nm (c) et de 100 nm (d). Noyaux en bleu, NPs en vert et marquage ZO1 en rouge. Échelle 25 µm.

La MET montre des jonctions intercellulaires bien établies confirmant le résultat d'immuno-fluorescence (voir figure 3.5, page suivante). Les jonctions présentent une morphologie en "doigts de gants" ou parallèle caractéristiques des tapis cellulaires endothéliaux (doubles flèches). Le tapis ne s'organise pas en couches superposées de plus de deux cellules. De plus, il est à noter qu'aucune NP n'a été observée au niveau des jonctions intercellulaires.

- ◇ La cohésion des jonctions cellulaires est maintenue après exposition d'une heure aux trois types de NPs.

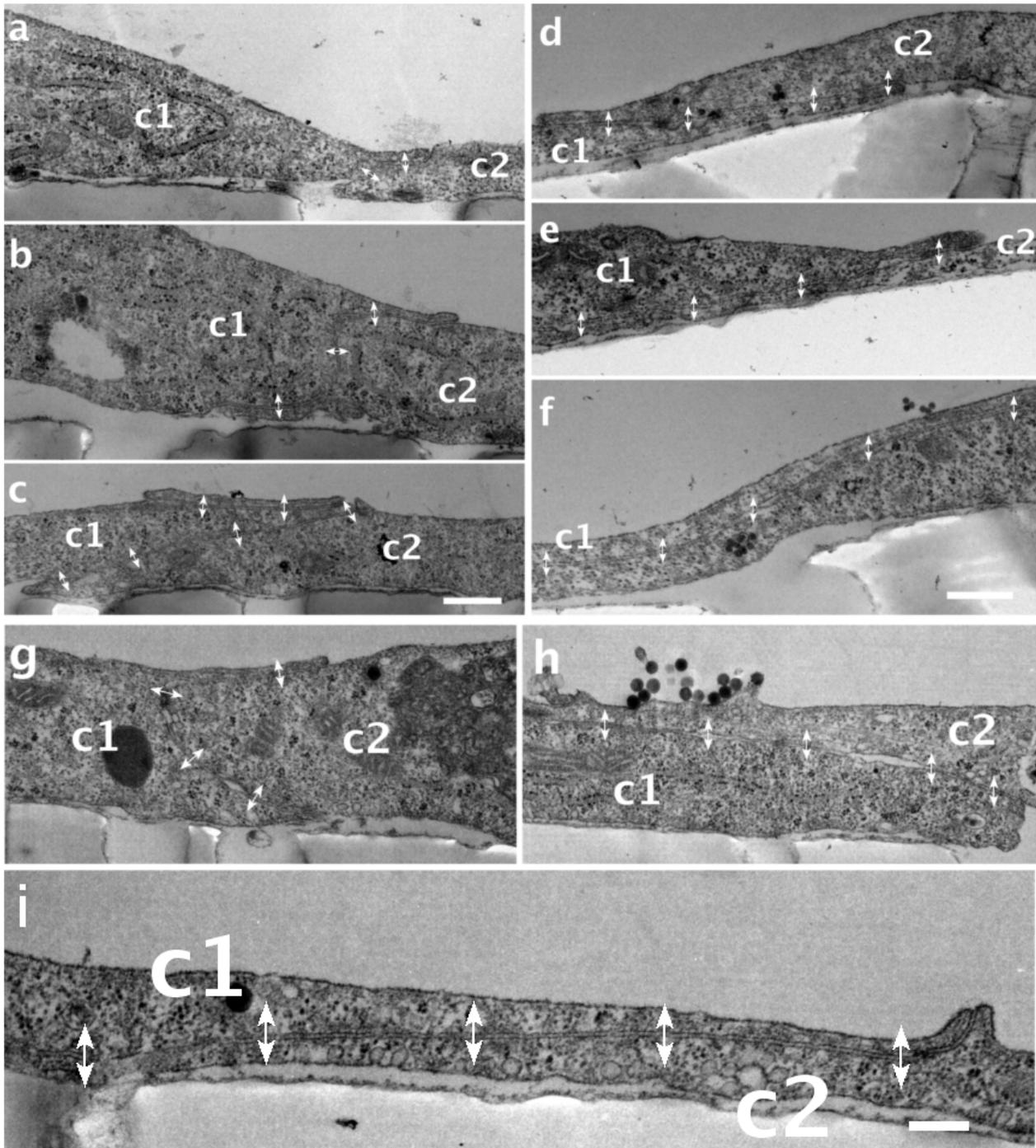


FIGURE 3.5 – Morphologie des jonctions cellulaires après exposition aux NPs : **a-c** - NPs 15 nm ; **d-f** - NPs 50 nm ; **g-i** - NPs 100 nm. Les jonctions cellulaires peuvent s'organiser entre deux cellules superposées (**d-f**, **h-i**) ou en "doigts de gants" (**b-c**, **g**). Les cellules sont indiquées par c1 et c2. Les flèches indiquent les zones de jonctions. Échelle 0,5 µm.

3.2.2 Transcytose des NPs sur membranes supportées

L'interaction NPs-cellules et le trafic intra-cellulaire sont analysés par MET. Les cellules cultivées sur membranes supportées sont coupées dans le sens transversal. Les figures 3.6, 3.7 et 3.8 présentent un exemple représentatif des cellules incubées avec les NPs de 15, 50 et 100 nm.

3.2.2.1 Transport trans-cellulaire des NPs de 15 nm

Les NPs de 15 nm sont observées aux surfaces apicale et basale des cellules, ainsi que internalisées dans le cytoplasme. Afin d'illustrer la distribution intracellulaire et la transcytose des NPs de 15 nm, trois zones cellulaires ont été agrandies (voir figure 3.6) :

- ◊ La zone *a* située au niveau de la jonction avec la cellule avoisinante, présente des NPs de 15 nm rassemblées en groupes importants à la membrane apicale en cours d'internalisation (flèches).
- ◊ La zone *b* présente de petits groupes de NPs internalisés libres dans le cytoplasme ou contenus dans de petites vésicules. Ces groupes peuvent accéder à l'espace sub-cellulaire (pointes de flèches, figure 3.6 *b*) au niveau de la membrane basale.
- ◊ La zone *c* montre un regroupement de NPs de 15 nm contenues dans une vésicule fermée (pointe de flèche). Un deuxième groupe de NPs en cours de sortie du côté basal de la cellule est visible au niveau de l'un des pores (flèche).

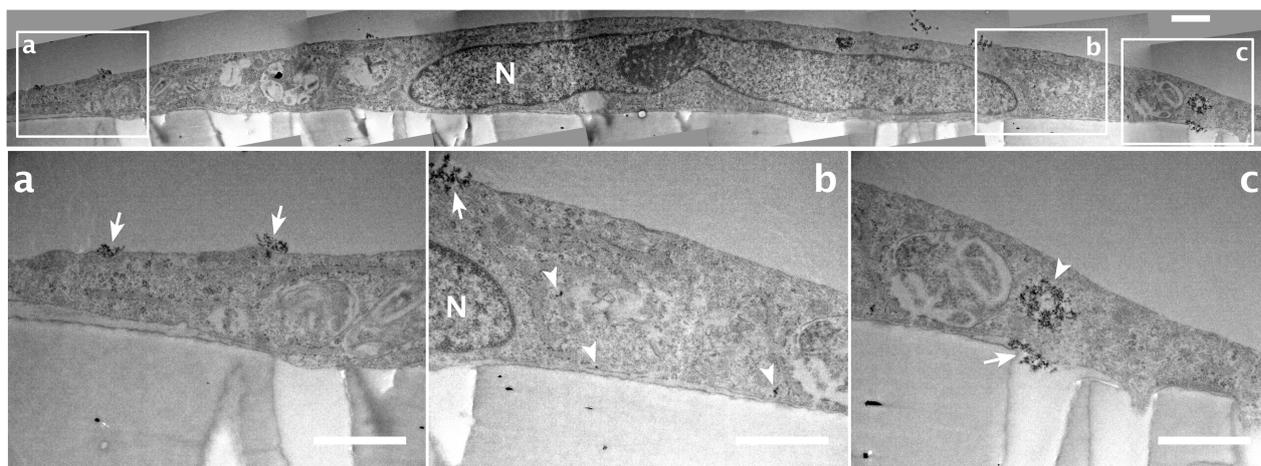


FIGURE 3.6 – Internalisation et transcytose de NPs de 15 nm dans des cellules HPAECs cultivées sur membranes supportées. Coupe transversale d'une cellule, dont trois zones ont été agrandies. **a** - NPs 15 nm en groupes à la membrane apicale (flèches). **b** - NPs libres dans le cytoplasme en petits groupes accédant à l'espace sub-cellulaire (pointes de flèches). **c** - NPs regroupées dans une vésicule (pointe de flèche), et groupe de NPs en cours de libération dans l'espace sub-cellulaire (flèche). N - noyau. Échelle 0,5 μ m. Un agrandissement de la figure est placé en annexes (B.1).

- ◊ Les NPs de 15 nm sont distribuées par petits groupes libres dans le cytoplasme ou dans de petites vésicules, à la membrane apicale et dans de larges vésicules cytoplasmiques.
- ◊ Les NPs 15 nm peuvent accéder à l'espace sous cellulaire par petits groupes ou par groupes plus importants.

3.2.2.2 Transport trans-cellulaire des NPs de 50 nm

Les NPs de 50 nm sont observées aux surfaces apicale et basale des cellules, ainsi que internalisées dans le cytoplasme (voir figure 3.7). La membrane Transwell[®] est arrachée sur la plupart de la longueur de la cellule. Néanmoins, un fin bandeau de résine reste présent du côté basal, permettant de visualiser les NPs de ce côté. Afin d'illustrer la distribution intracellulaire et la transcytose des NPs de 50 nm, trois zones ont été agrandies :

- ◇ La zone *a* montre des NPs en cours d'internalisation le long de la membrane apicale (flèche). On notera la présence de groupes de trois et plus NPs, représentant une taille supérieure à une centaine de nm (flèches blanches). Des NPs de 50 nm sont endocytées, isolées, au niveau de la membrane apicale (pointes de flèches blanches).
- ◇ La zone *b* présente les NPs libres dans le cytoplasme en petits groupes (pointes de flèche noires) et à l'intérieur d'un lysosome (flèche noire). On note la présence de NPs isolées dans le cytoplasme (pointes de flèches blanches).
- ◇ La zone *c* montre les NPs 50 nm regroupées dans de larges vésicules bien définies avec des débris membranaires correspondant à des endosomes / lysosomes (flèches). On notera également la présence de ces larges groupes au niveau de la membrane basale, en cours de libération dans le compartiment basal (pointe de flèche).

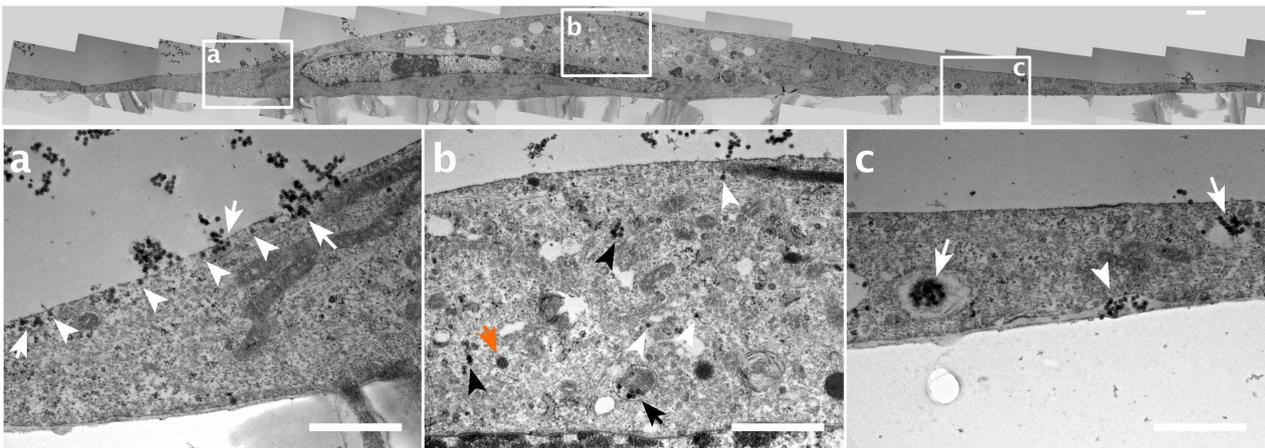


FIGURE 3.7 – Internalisation et transcytose de NPs de 50 nm dans des cellules HPAECs cultivées sur membranes supportées. Coupe transversale d'une cellule, dont trois zones ont été agrandies. **a** - Internalisation des NPs à la membrane apicale en groupes (flèches blanches) ou isolées (pointes de flèches blanches). **b** - NPs libres dans le cytoplasme isolées (pointes de flèches blanches) ou en groupes (pointes de flèches noires), dans une vésicule (flèche noire). Corps de weibel palade (flèche orange). **c** - NPs localisées en groupes dans des vésicules de types endosomes / lysosomes (flèches) et en cours de libération au niveau de la membrane basale (pointe de flèche). N - noyau. Échelle 0,5 μm . Un agrandissement de la figure est placé en annexes (B.2).

- ◇ Les NPs de 50 nm sont distribuées dans des vésicules fermées et libres dans le cytoplasmes. Les NPs dans le cytoplasme sont majoritairement isolées mais quelques petits groupes peuvent être observés.
- ◇ Les NPs de 50 nm accèdent à l'espace sous cellulaire en groupes.

3.2.2.3 Transport trans-cellulaire des NPs de 100 nm

Les NPs de 100 nm sont observées aux surfaces apicale et basale des cellules, ainsi que internalisées dans le cytoplasme (voir figure 3.8). Afin d'illustrer la distribution intra-cellulaire et la transcytose des NPs de 100 nm, trois zones ont été choisies sur une cellule cultivée sur membrane supportée :

- ◇ La zone *a* montre des NPs isolées dans le cytoplasme (flèches blanches). On note la présence de corps de Weibel-Palade, caractéristiques de la barrière endothéliale *in-vivo* (flèches orange).
- ◇ La zone *b* présente des NPs de 100 nm dans des vésicules fermées contenant également des fragments membranaires (flèche blanche).
- ◇ La zone *c* présente l'ensemble des distributions intracellulaires observables sur l'échantillon. Les NPs sont en cours d'internalisation à la membrane apicale (pointes de flèches blanches) et en cours de regroupement dans une large vésicule cytoplasmique (flèche blanche). On notera la présence de NPs libres dans le cytoplasme et la présence d'une vésicule cytoplasmique contenant des NPs ouvertes sur le compartiment basal (flèche noire).

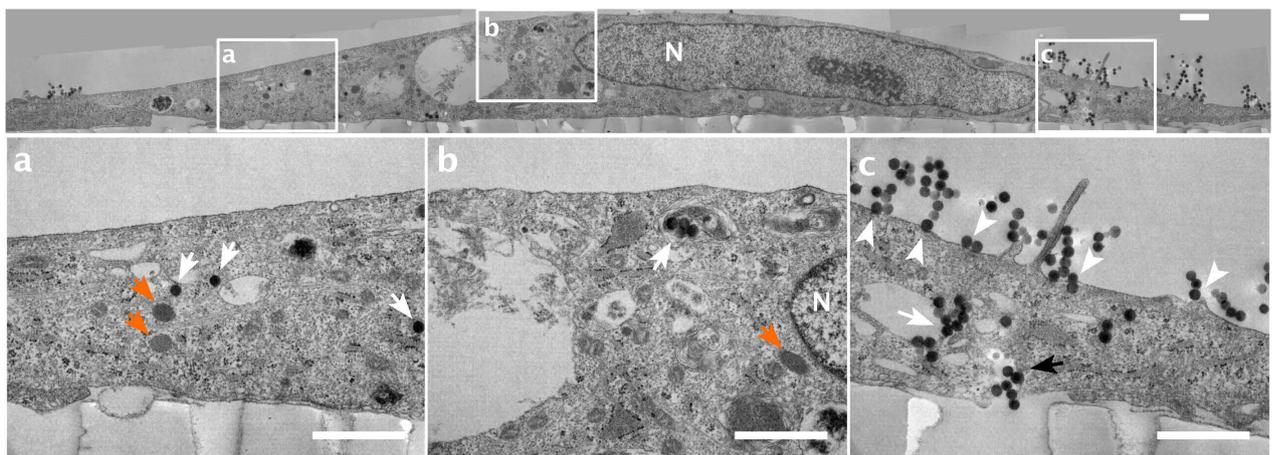


FIGURE 3.8 – Internalisation et transcytose de NPs de 100 nm dans des cellules HPAECs cultivées sur membranes supportées. Coupe transversale d'une cellule, dont trois zones ont été agrandies. Les flèches orange indiquent des corps de Weibel-Palade, reconnaissables à leur structure tubulaire. **a** - NPs isolées dans le cytoplasme (flèches blanches). **b** - NPs dans une vésicule contenant des débris membranaires et cellulaires (flèche blanche). **c** - NPs en cours d'internalisation (pointes de flèches blanches), distribuées dans de larges vésicules intracellulaires (flèche blanche) et pouvant être ouvertes sur le compartiment basal (flèche noire). N - noyau. Échelle 0,5 μ m. Un agrandissement de la figure est placé en annexes (B.3).

- ◇ Les NPs de 100 nm sont distribuées entre : NPs contenues dans des vésicules fermées et NPs libres dans le cytoplasme (semblant entourées d'une membrane).
- ◇ Les NPs de 100 nm accèdent à l'espace sous cellulaire en groupes provenant de vésicules.

3.2.3 Quantification stéréologique de la transcytose et de la distribution intracellulaire des NPs

La résolution de la MET permet de compter des NPs individuelles et de visualiser directement leur localisation intracellulaire. Il est possible de quantifier la transcytose des NPs dans les échantillons, ainsi que leur distribution intracellulaire sur les images de MET. L'objectif est de compter directement les NPs sur les images MET en utilisant la stéréologie. Les méthodes utilisées sont décrites dans la partie expérimentale de ce chapitre.

3.2.3.1 Quantification de la transcytose après une heure d'exposition aux NPs

Le passage des NPs du côté basal de la cellule a été observé pour les trois types de NPs (voir figure 3.9, flèches noires).

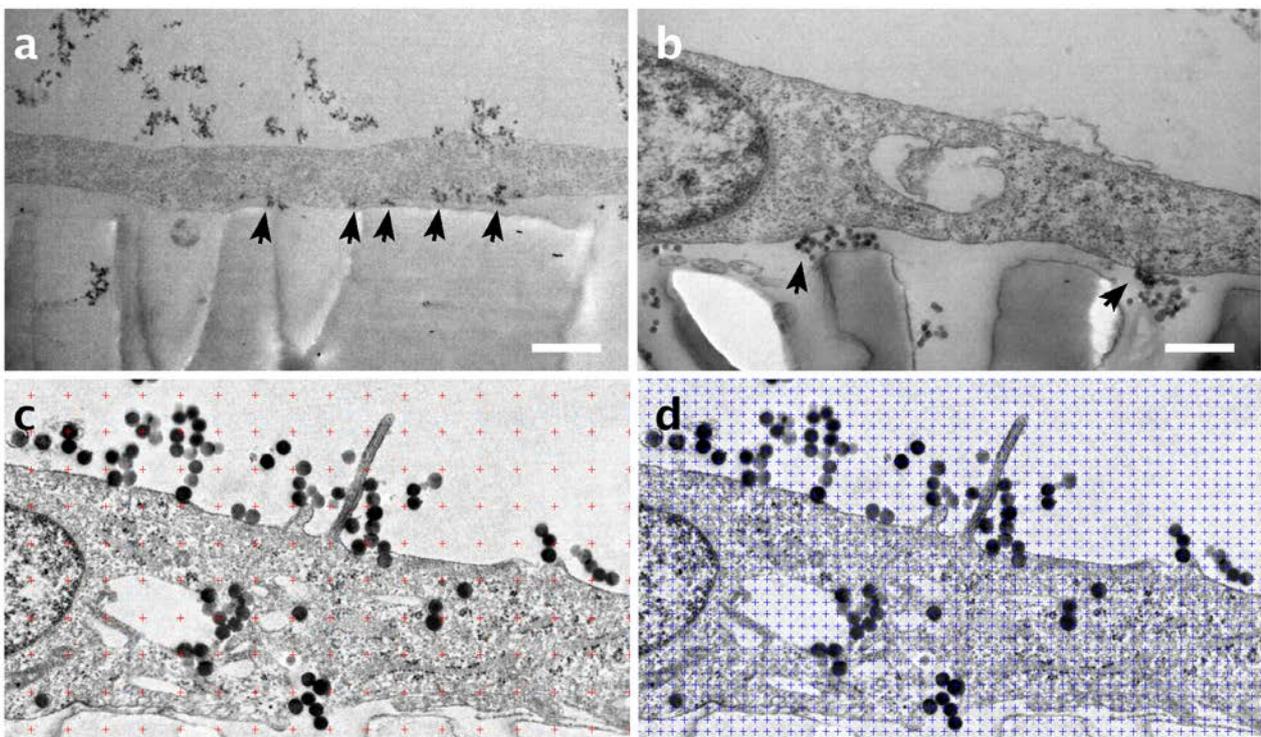


FIGURE 3.9 – Exemples de transcytose pour les trois tailles de NPs : 15 nm, 50 nm et 100 nm. **a** - Transcytose de NPs de 15 nm, de petits groupes de NPs accèdent au compartiment basal (flèches). **b** - De larges groupes de NPs de 50 nm accèdent à l'espace sub-cellulaire (flèches). **c** - Exemple de superposition d'une grille cycloïde de $0,08 \mu\text{m}^2$ pour le comptage du volume cytoplasmique. **d** - Exemple de superposition d'une grille cycloïde de $0,008 \mu\text{m}^2$ pour le comptage du volume de NPs de 100 nm.

Afin de quantifier ce transport, des méthodes systématiques d'échantillonnage en cascade sont utilisées afin d'assurer la représentativité des comptages statistiques : deux échantillons sont analysés par condition, quatre zones sont sélectionnées aléatoirement sur les tapis cellulaires et coupées,

quatre cellules consécutives sont ensuite observées sur chaque coupe. Un total de seize cellules est donc observé par condition sans sélection par l'observateur. Les principes de base de la stéréologie permettent alors d'évaluer la distribution des NPs dans l'échantillon. Les ratios volumiques de NPs par rapport au cytoplasme cellulaire sont calculés. Un exemple d'évaluation du volume de NPs à partir d'une image 2D par le comptage des intersections avec une grille cycloïde est présenté en figure 3.9 c-d. L'utilisation de grilles cycloïdes de tailles différentes permet la quantification des différents types de NPs.

La figure 3.10 présente la répartition des NPs au sein de l'échantillon après une heure de culture. Trois pseudo-compartiments ont ici été définis lors du comptage des NPs :

- ◇ **Membrane apicale.** Ce compartiment comprend toutes les NPs en contact direct avec la membrane apicale. Les NPs incluses dans la matrice de résine au-dessus de la mono-couche cellulaire sont exclues.
- ◇ **Internalisées.** Ce compartiment comprend toutes les NPs intra-cellulaires.
- ◇ **Membrane basale.** Comme pour la membrane apicale, ce compartiment comprend toutes les particules au contact de la membrane basale excluant celles associées au support de culture.

Les NPs qui ne sont pas en contact direct avec les membranes apicale et basale ne sont pas prises en compte car il serait alors difficile de fixer une limite à la zone à analyser.

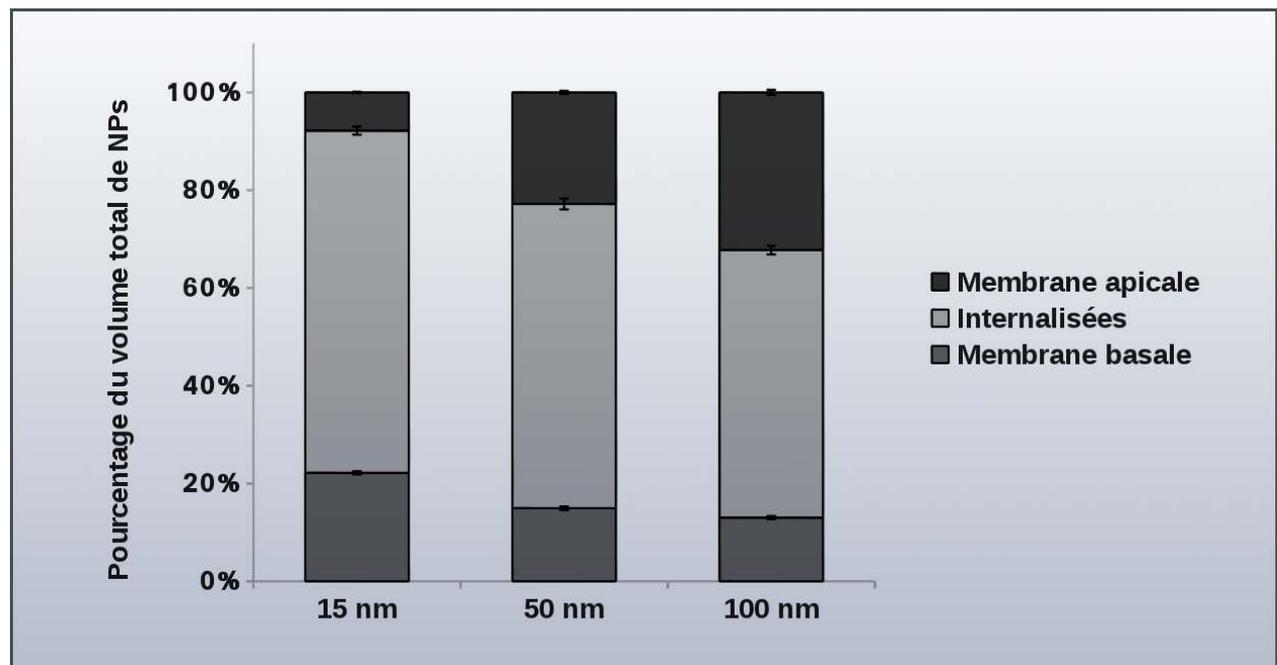


FIGURE 3.10 – Quantification par stéréologie de la localisation des trois types de NPs au contact des cellules. Pourcentage du volume de NPs comptées sur l'échantillon. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type de la moyenne (SEM).

On observe, sur la figure 3.10, une répartition des NPs au sein de l'échantillon dépendant de leurs tailles. La majorité des NPs de 15 nm sont localisées à l'intérieur des cellules. Cette part diminue pour les NPs de 50 et de 100 nm au profit des NPs localisées à la membrane apicale. Cela montre une prise en charge potentiellement plus lente de ces particules au niveau apical. Cette hypothèse

est renforcée par la quantité importante de NPs de 15 nm localisées à la membrane basale (22%) par rapport aux NPs de 50 (17%) et 100 nm (16%).

- ◇ Le volume de NPs retenu à la membrane apicale augmente avec la taille des NPs.
- ◇ Le volume de NPs internalisées et localisées à la membrane basale est supérieur pour les NPs de 15 nm.

3.2.3.2 Distribution intra-cellulaire des NPs

Une grande quantité de NPs sont à l'intérieur des cellules. Il est ici intéressant de chercher à analyser leur distribution en détail dans la cellule.

La figure 3.11 présente la localisation intra-cellulaire des NPs en termes quantitatifs dans la cellule. Le pourcentage de la population de NPs dans les échantillons est présenté selon trois catégories de localisations :

- ◇ NPs isolées libres dans le cytoplasme.
- ◇ NPs regroupées libres dans le cytoplasme ou dans de petites vésicules cytoplasmiques parfois difficilement identifiable.
- ◇ NPs regroupées dans de larges vésicules définies et fermées (types endosomes, lysosomes).

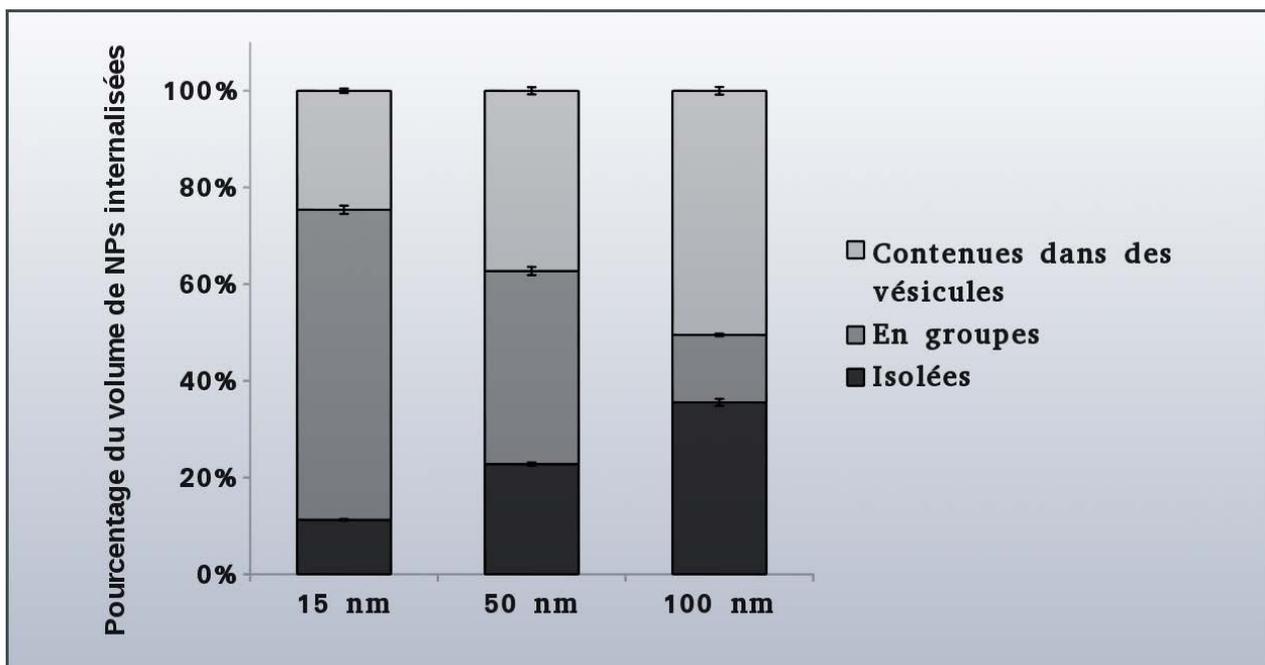


FIGURE 3.11 – Quantification par stéréologie de la localisation intracellulaire des trois types de NPs. Pourcentage du volume de NPs comptées sur l'échantillon. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type de la moyenne (SEM).

On note, ici, une répartition des NPs au sein de la cellule qui varie en fonction de la taille :

- ◇ Les NPs de 15 nm sont majoritairement dans le cytoplasme sous forme de petits groupes de NPs libres (64%). Une faible part de ces NPs est répartie de manière isolée dans la cellule (11%).

On remarque que 25% du volume de particules de 15 nm est localisé dans les endosomes et lysosomes.

- ◇ La part de NPs sous forme de groupes libres ou enfermées dans une petite vésicule dans le cytoplasme décroît avec la taille (64%, 40% et 14% pour les NPs de 15, 50 et 100 nm).
- ◇ Inversement, la quantité de NPs contenues dans de larges vésicules ou isolées dans le cytoplasme augmente avec la taille. Les NPs de 100 nm sont, pour une large majorité, soit dans les endosomes (50%), soit libres dans le cytoplasme (36%).

- ◇ **Les NPs de 15 nm sont majoritairement libres dans le cytoplasme sous forme de petits groupes.**
- ◇ **La quantité de NPs isolées dans le cytoplasme et regroupées dans de larges vésicules augmente avec la taille.**

3.2.3.3 Analyse par MET du devenir à long terme des NPs

Les résultats de l'effet des NPs sur la RETE au cours du temps montrent une augmentation de la perméabilité de la monocouche cellulaire 24 heures après exposition aux trois types de NPs. Un passage par paracytose des NPs est alors possible. La présence de NPs du côté basal n'est alors plus uniquement imputable à un transport trans-cellulaire. Il a donc été choisi de restreindre l'étude du devenir à long terme des NPs à l'évolution de leur répartition intracellulaire.

On observe les NPs (15, 50 et 100 nm) majoritairement regroupées dans de larges vésicules fermées (voir figure 3.12). On peut occasionnellement trouver des NPs isolées dans le cytoplasme pour les deux plus grandes tailles mais pas pour les 15 nm. Ces amas de NPs sont regroupés majoritairement dans les parties les plus épaisses des cellules en périphérie du noyau.

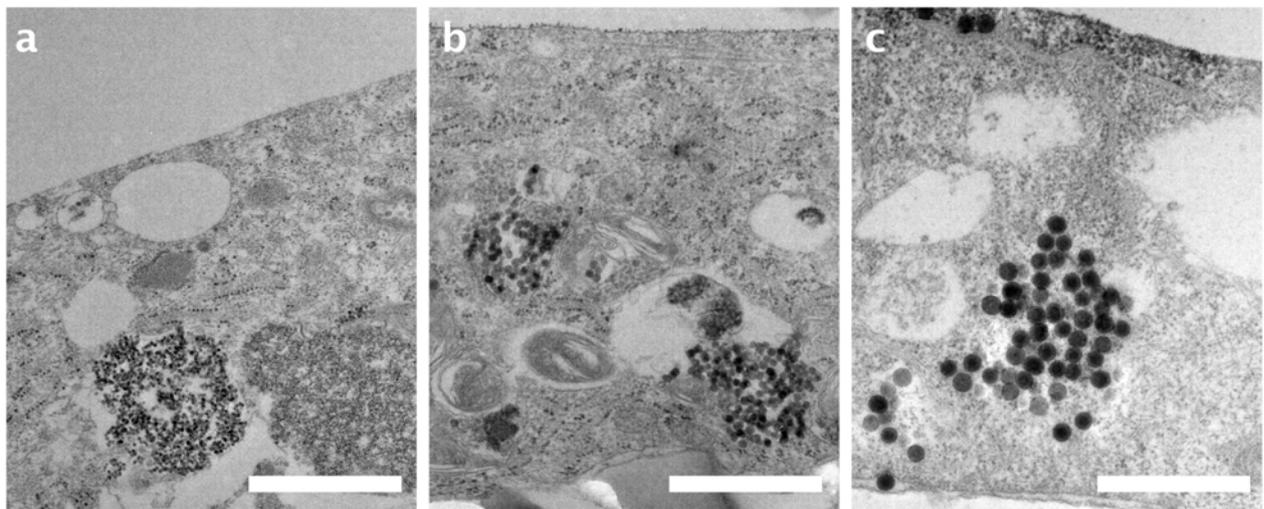


FIGURE 3.12 – Cellules HPAEC cultivées sur membranes supportées, exposées une heure aux NPs puis remises en culture 24 heures. **a** - 15 nm ; **b** - 50 nm ; **c** - 100 nm.

L'évolution de la répartition des NPs 24 heures après exposition a été quantifiée par stéréologie (voir figure 3.13). On observe ici un changement dans la distribution intracellulaire des NPs par

rapport à celle à une heure. La grande majorité des trois types de NPs est regroupée dans les endosomes et lysosomes (81%, 94% et 71% des NPs de 15, 50 et 100 nm sont distribués dans des vésicules). 21% des NPs de 100 nm sont toujours libres et isolées dans le cytoplasme cellulaire.

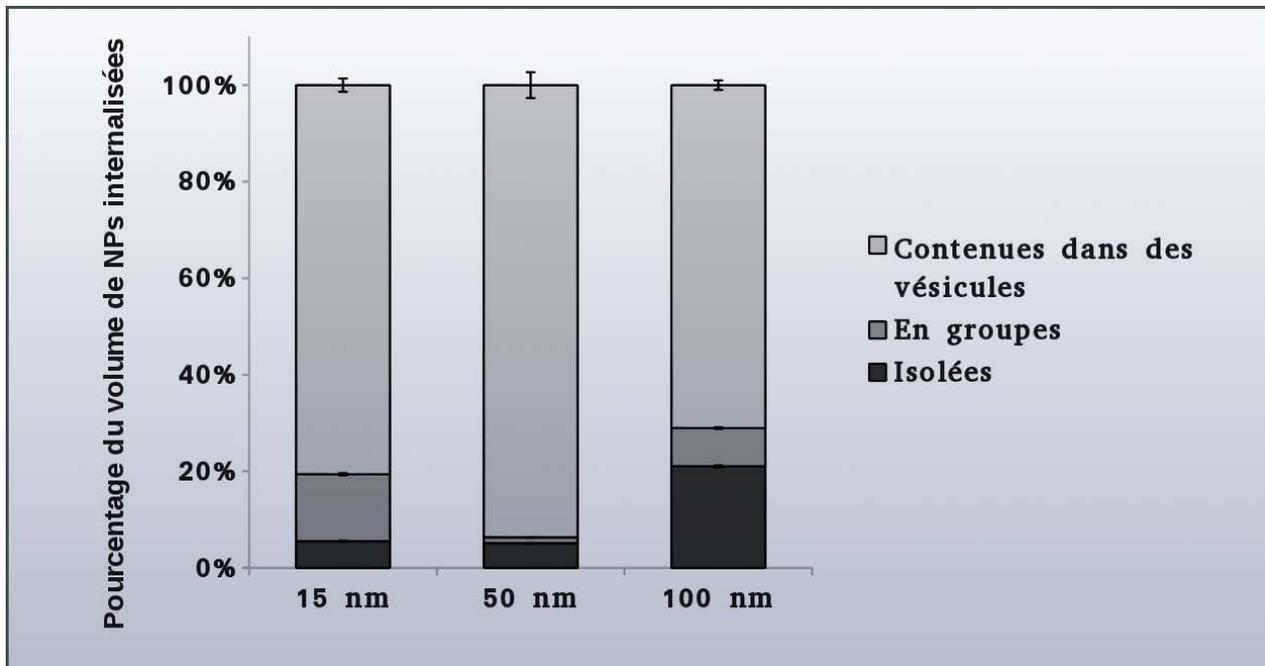


FIGURE 3.13 – Quantification par stéréologie de la répartition intra-cellulaire des trois types de NPs après exposition 1 heure et remise en culture pendant 24 heures. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type de la moyenne (SEM).

Les NPs semblent s'accumuler au cours du temps dans les endosomes (puis potentiellement dans les lysosomes). Une évaluation de l'intensité de cette accumulation est envisagée par comparaison directe des rapports volumiques de NPs à une heure et 24 heures (voir figure 3.14). Pour les NPs de 50 nm, le volume de NPs internalisées 24 heures après exposition est équivalent à 253% du volume quantifié à une heure. Pour les NPs de 100 nm on observe une augmentation de 260% du volume par rapport à une heure. Cette augmentation peut s'expliquer par la grande quantité de NPs présente à la membrane apicale des cellules. Malgré les étapes de rinçage avant remise en culture, il est difficile de décrocher les NPs. Ces dernières pourraient alors continuer leur processus d'internalisation. De plus, si une faible partie seulement des NPs internalisées est éliminée du côté basal, il est normal d'observer une accumulation dans les cellules.

A contrario, les NPs de 15 nm ne sont pas accumulées dans les cellules au cours du temps. On observe une diminution du ratio volumique des NPs de 15 nm de l'ordre de 60% entre une heure et 24 heures. Les NPs de 15 nm se distinguent des NPs de 50 et 100 nm par un comportement différent à long terme. S'internalisant plus rapidement que les NPs de 50 et 100 nm, elles seraient directement acheminées vers le compartiment basal sans passer par l'étape de stockage. De plus, une fois les NPs dans les endosomes, seule une faible part, peu importe la taille des NPs, sera libérée du côté basal. Le devenir principal de ces vésicules remplies de NPs est d'évoluer vers les voies de dégradation cellulaires. Aucune dégradation n'a été néanmoins observée à court terme.

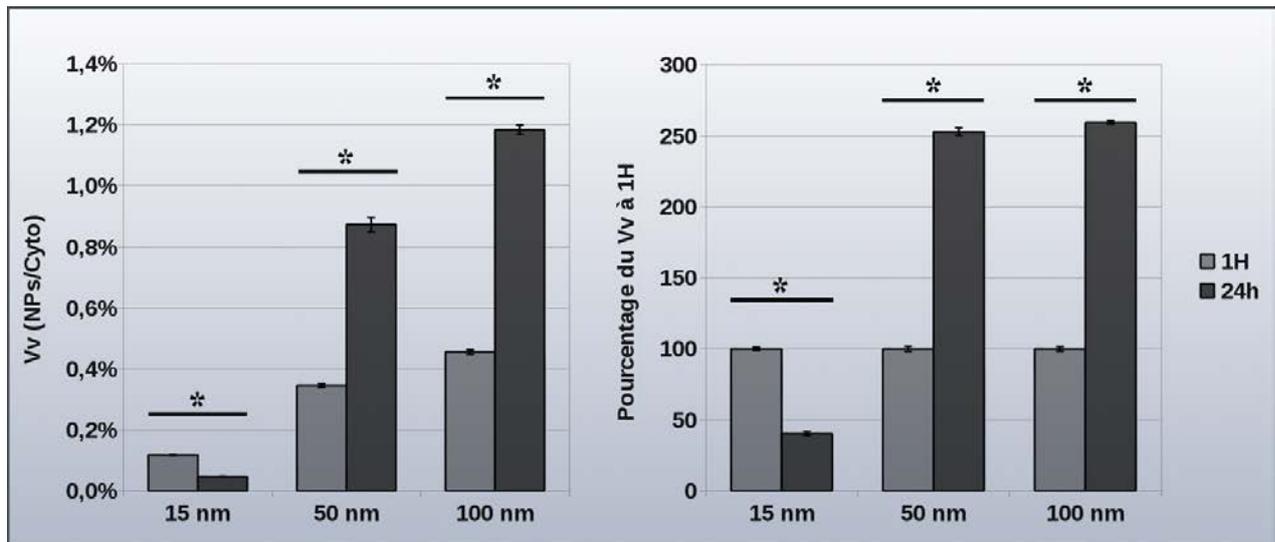


FIGURE 3.14 – Comparaison des ratios volumiques de NPs par rapport au cytoplasme cellulaire entre 1 heure et 24 heures pour les trois types de NPs. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type de la moyenne (SEM). Les astérisques signifient que les valeurs sont significativement différentes ($p < 0,05$).

- ◇ Accumulation intra-cellulaire des NPs de 50 et 100 nm dans la voie endo-lysosomiale.
- ◇ Transport des NPs de 15 nm au cours du temps vers le compartiment basal.

3.3 Discussion

L'étude de l'interaction des NPs de silice avec la barrière endothéliale pulmonaire *in-vitro*, cultivée sur membranes supportées permet la caractérisation et la quantification du **transport trans-endothélial**. En présence d'un support rigide, aucun transport trans-endothélial des NPs n'a pu être observé. Néanmoins, l'utilisation d'inserts de culture cellulaire supportés permet la mise en place d'un endothélium *in-vitro* remplissant le rôle d'interface entre deux compartiments bien définis. Il est ensuite possible de suivre le transport des NPs du compartiment supérieur au compartiment inférieur par MET. Les résultats de cette étude peuvent être résumés de la manière suivante :

- ◇ Les trois types de NPs sont transportés au travers des cellules, de la face apicale à la face basale.
- ◇ Deux types de libération des NPs du côté basal sont observés :
 - par les endosomes, pour les trois types de NPs ;
 - par transport direct des NPs de 15 nm sous forme de petits groupes de NPs libres dans le cytoplasme ou dans des vésicules difficilement identifiables.
- ◇ Les trois types de NPs sont accumulés dans les cellules au cours du temps. L'accumulation des NPs de 15 nm est beaucoup moins importante que pour les tailles supérieures.

La **caractérisation** et la **quantification du transport** des NPs de silice dans l'endothélium supporté *in-vitro* ont été réalisées par **MET**. L'observation directe des NPs dans les cellules permet l'analyse de leur distribution intracellulaire et la caractérisation directe de la transcytose. Dans cette étude, la mesure de la transcytose par la fluorescence des NPs retrouvées dans le compartiment basal n'a pas été possible. Les faibles concentrations en NPs, leur rétention importante par l'endothélium et leur tendance à l'agglomération empêchent la quantification de la fluorescence des NPs ayant traversé la mono-couche cellulaire. Lors de l'interaction avec les cellules, les NPs nues acquièrent une couronne protéique composée de protéines cellulaires [Lesniak 2012]. Cette couronne pourrait causer une déstabilisation et une agglomération des NPs à la sortie des cellules amenant à une perte des NPs, par exemple par association aux supports de culture. L'étude par Ye et al. [Ye 2013] sur le transport de NPs de silice fluorescentes dans un modèle cellulaire de la barrière hémato-encéphalique par dosage de la fluorescence, met en avant un transport trans-cellulaire de l'ordre de 3% de la quantité totale de NPs, après quatre heures. Les auteurs discutent notamment les différentes sources de biais de cette méthode : la perte de particules par adhésion aux supports de culture, la présence de résidus de fluorophores libres et les défauts de la mono-couche cellulaire. La détection de la fluorescence des NPs dans le compartiment basal, même si elle offre une alternative facile à mettre en place pour l'étude de la transcytose, souffre de défauts pouvant fausser l'étude.

La résolution supérieure de la MET permet la visualisation du transport des NPs directement au niveau des cellules de la mono-couche. Les techniques de stéréologie complètent la caractérisation qualitative du transport par une quantification s'affranchissant des biais développés précédemment. L'adhésion des NPs aux supports n'est plus un problème car la quantification se fait directement au niveau des cellules. De plus, l'intégrité des NPs comptées est directement observée sur l'image et la quantification tient compte de l'ensemble de la distribution des NPs au contact des cellules. Enfin, l'intégrité de la mono-couche cellulaire est directement observable sur l'image et est vérifiée par les mesures de perméabilité.

Les outils stéréologiques sont classiquement utilisés en MET pour étudier la spécificité des marquages immuno-cytochimiques et leur distribution. L'application de ces techniques à l'étude des NPs a déjà été documentée et répond à un besoin de quantification [Rothen-Rutishauser 2014] [Muhlfeld 2007]. Ici nous proposons une méthode simple à mettre en place permettant l'évaluation de la distribution des NPs dans la barrière endothéliale *in-vitro*. Cette méthode repose sur un échantillonnage aléatoire en cascade assurant la représentativité des échantillons et l'utilisation d'estimateurs stéréologiques des volumes permettant la quantification des NPs.

La mise en évidence du transport trans-endothélial des trois types de NPs est dépendante de la caractérisation de l'étanchéité de la mono-couche cellulaire. Il est important de vérifier l'étanchéité de l'endothélium par plusieurs techniques différentes. L'observation des jonctions inter-cellulaires par MET et MOE a été complétée par l'étude de l'évolution de la RETE et du passage transcellulaire du *Lucifer Yellow* afin de valider l'étanchéité des mono-couches cellulaires au passage paracellulaire des NPs. En absence de paracytose, les NPs ne peuvent accéder au compartiment basal qu'en traversant les cellules.

La caractérisation de la distribution des NPs au contact de l'endothélium montre une répartition intracellulaire des NPs semblable à ce qui a été observé dans le chapitre précédent. Les NPs sont distribuées entre quatre localisations principales : libres dans le cytoplasme (isolées ou en groupes), dans de larges vésicules cytoplasmique et aux membranes apicales et basales. Alors qu'en présence d'un support rigide, aucune transcytose n'était observée, les expériences sur cellules cultivées sur membranes supportées montrent un passage trans-cellulaire des NPs. Une part des NPs de 15, 50 et 100 nm contenue dans des vésicules cytoplasmiques correspondant à des endosomes est libérée dans l'espace sub-cellulaire. Une partie des endosomes contenant des NPs serait ainsi capables de fusionner avec la membrane basale, libérant leur contenu à l'extérieur de la cellule. Un mécanisme de transcytose dépendant de la voie endo-lysosomiale a déjà été documenté pour des NPs anioniques dans les cellules épithéliales [Harush-Frenkel 2008]. L'existence d'un mécanisme similaire dans l'endothélium est donc envisageable.

Les NPs de 15 nm sont capables de traverser directement l'endothélium cultivé sur membranes supportées sous forme de petits groupes de moins de 80 nm. Ces groupes correspondent, de par leur morphologie en MET, aux observations du chapitre précédent les reliant à une endocytose cavéole dépendante. Ils sont localisés libres dans le cytoplasme cellulaire ou dans de petites vésicules peu définies et au niveau de la membrane basale. Représentant la majorité des NPs de 15 nm internalisées dans les cellules, ils seraient responsables d'un transport direct des NPs de 15 nm ne passant pas par les endosomes. La voie cavéole est le candidat principal pour la transcytose dans l'endothélium. L'étude de Wang et al. met par exemple en avant une internalisation de NPs d'or recouvertes d'albumine par les cavéoles. Les NPs d'une taille inférieure au diamètre des cavéoles (20 - 40 nm) étant internalisées 5 à 10 fois plus que les NPs d'une taille de 100 nm [Wang 2009].

La **quantification de l'accumulation intra-cellulaire** des NPs au cours du temps montre une élimination supérieure des NPs de 15 nm par rapport aux deux autres tailles. Même si les trois types de NPs peuvent être transportés du côté basal, l'impact de la transcytose dépendant de la voie endo-lysosomiale reste marginal. Les NPs de 50 et 100 nm sont donc majoritairement accumulées dans la voie de dégradation cellulaire. Par contre, les NPs de 15 nm sont largement moins accumulées dans les cellules au cours du temps. La majorité de ces particules seraient ainsi prise en charge sous la forme de petits groupes de NPs et directement acheminées à la membrane basale, potentiellement via la voie cavéole dépendante, en évitant la voie de dégradation cellulaire.

En conclusion, le transport des NPs dans l'endothélium *in-vitro* cultivé sur membranes supportées est dépendant de la taille des particules. Les NPs de 15 nm étant beaucoup moins accumulées dans les cellules que les NPs de 50 et 100 nm. Les trois types de NPs sont internalisées par des voies d'endocytoses en fonction de leur taille (3.16 a, d, e). La majorité des NPs est alors dirigée vers la voie endo-lysosomiale (3.16 b, d, e, g). Une partie des NPs pourra alors être éliminée par fusion des endosomes avec la membrane basale (3.16 f). Néanmoins, cette voie d'élimination des NPs semble peu efficace, la majorité des NPs étant, à terme, stockée dans les lysosomes (3.16 g). Les NPs de 15 nm sont capables de transcytose directe, potentiellement via la voie d'endocytose cavéole (3.16 a, c). Ce transport direct intervient pour une large part des NPs de 15 nm internalisées sous forme de groupes d'une taille inférieure à 70-80 nm. L'accumulation inférieure des NPs de 15 nm au cours du temps par rapport aux NPs de plus grandes tailles peut ainsi être expliquée par leur transcytose directe. D'autres travaux ont également suggéré un lien entre les cavéoles et la transcytose de l'albumine conjuguée à une bille d'or dans l'endothélium pulmonaire [Schnitzer 1994a].

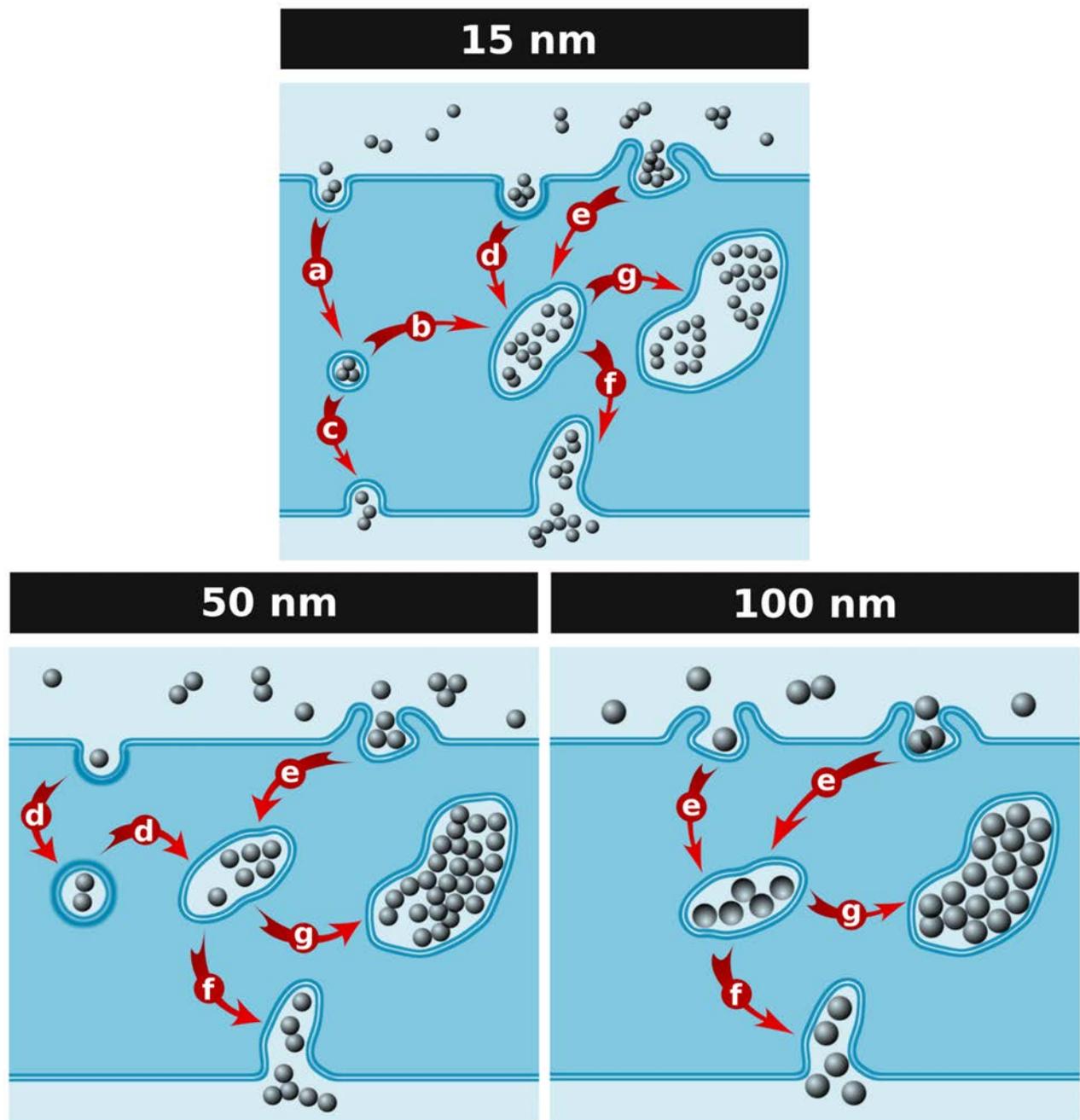


FIGURE 3.15 – Schéma du transport trans-endothélial et de l'accumulation des trois types de NPs. **a** - Endocytose cavéole dépendante des NPs de 15 nm retrouvées libres dans le cytoplasme ou dans de petites vésicules, en petits groupes. **b** - Potentiel rassemblement des NPs de 15 nm provenant de la voie cavéole dans les endosomes. **c** - Libération des NPs 15 nm à la face basale des cellules après transport par la voie cavéole dépendante. **d** - Endocytose clathrine dépendante et regroupement dans les endosomes des NPs de 15 et 50 nm. **e** - Endocytose par macropinocytose des trois types de NPs et regroupement direct dans les endosomes. **f** - Libération des trois types de NPs du côté basal des cellules par les endosomes. **g** - Accumulation des trois types de NPs dans la voie endo-lysosomiale.

3.4 Partie expérimentale

L'étude de la transcytose des NPs au travers de la mono-couche endothéliale de cellules HPAECs nécessite la mise en place d'un modèle de culture cellulaire répondant à certains critères spécifiques :

- ◇ **Organisation uni-lamellaire de la mono-couche de cellules.** Les conditions de culture cellulaire appliquées doivent permettre l'obtention d'une mono-couche de cellules HPAECs régulière sur l'ensemble de la surface d'échange du modèle.
- ◇ **Espace libre sous la mono-couche de cellules.** Le modèle de culture doit permettre la compartimentation du système en deux espaces séparés par une interface, la mono-couche cellulaire. Le compartiment supérieur permet l'exposition de l'interface aux objets dont on veut tester le transport. Le compartiment inférieur permet la récupération et la quantification des objets d'intérêt.
- ◇ **Culture cellulaire en deux dimensions.** Les cellules composant la mono-couche cellulaire ne doivent pas pouvoir s'insérer dans le support perméable les soutenant afin d'éviter un potentiel biais sur la détermination du passage des objets d'intérêt par contamination du compartiment inférieur par du matériel cellulaire.
- ◇ **Absence de transport paracellulaire de macromolécules.** La densité cellulaire doit être suffisante pour assurer l'imperméabilité de la mono-couche cellulaire aux macromolécules. L'existence de jonctions intercellulaires bien établies et résistantes au traitement doit être vérifiée.
- ◇ **Compatibilité avec les techniques de préparation d'échantillon de MET et MOE.** Le modèle cellulaire doit supporter le traitement parfois brutal de préparation en vue de l'observation. Cela est particulièrement vrai pour les protocoles de MET, l'échantillon est exposé à différents solvants et manipulé de nombreuses fois. Il est nécessaire ici de rechercher un support de culture cellulaire limitant au maximum l'impact de la préparation sur l'échantillon. Il est également nécessaire d'adapter les protocoles de préparation en conséquence.
- ◇ **La quantification des phénomènes de transport** doit tenir compte non seulement des éléments accédant à l'espace sub-cellulaire, mais également de l'ensemble de la population d'objets transportés. La possibilité d'une séquestration d'une partie de la population d'objets transportés dans les différents compartiments du modèle doit être explorée.

Il est donc nécessaire de développer une méthodologie d'observation des échantillons permettant le suivi de l'ensemble de cette population. Pour se faire, le critère principal est la **résolution d'observation** des échantillons. Les techniques de suivi du transport doivent permettre la **visualisation directe** des objets transportés. L'utilisation, par exemple, de la fluorescence inhérente aux NPs de silice utilisées dans cette étude représente un avantage indéniable pour leur localisation au sein de l'échantillon. Néanmoins, la résolution des techniques de fluorescence ne permet pas d'observer une NP unique et encore moins de vérifier la structure de l'objet fluorescent. On peut par exemple imaginer que les NPs pourraient être dégradées par les cellules et que la fluorescence observée serait alors attribuable aux fluorophores résiduels. La microscopie électronique nous offre ici un outil de choix pour la visualisation directe des processus de transport. La méthodologie utilisée ici doit s'appuyer sur les techniques de stéréologie pour la quantification et la mise en place de protocoles spécialement pensés pour apporter une **information quantitative du transport**.

3.4.1 Culture cellulaire sur membranes supportées

Les expériences de transport sur inserts supportés de types Transwell[®] ont été réalisées sur deux types d'inserts différents selon l'objectif de l'étude. La configuration du système de culture est présentée en figure 3.16. Le premier type de membrane est composé de polyéthylène téréphthalate (PIHT12R48, Millipore), cette matière lui confère une faible rigidité une fois extraites de leur support plastique. Cela favorise le traitement des échantillons en ultra-microtomie et cryoultra-microtomie, évitant une destruction locale de l'échantillon. Les résines utilisées pour l'inclusion des échantillons dans les protocoles classiques pénètrent relativement bien dans ces membranes. Par contre, ces membranes sont opaques et ne permettent pas l'observation directe des échantillons en microscopie optique. Elles sont également légèrement auto-fluorescentes en microscopie à épifluorescence. Un second type de membranes supportées a donc été utilisé pour la MOE. Lui aussi en PET (353095, Falcon), une épaisseur de la membrane et une organisation des pores régulière leur confèrent un rendu transparent. Ces membranes sont, par contre, très friables et tendent à s'arracher lors des étapes d'ultra-microtomie. Des membranes composées de polycarbonate ont également été testées sans résultats satisfaisants.

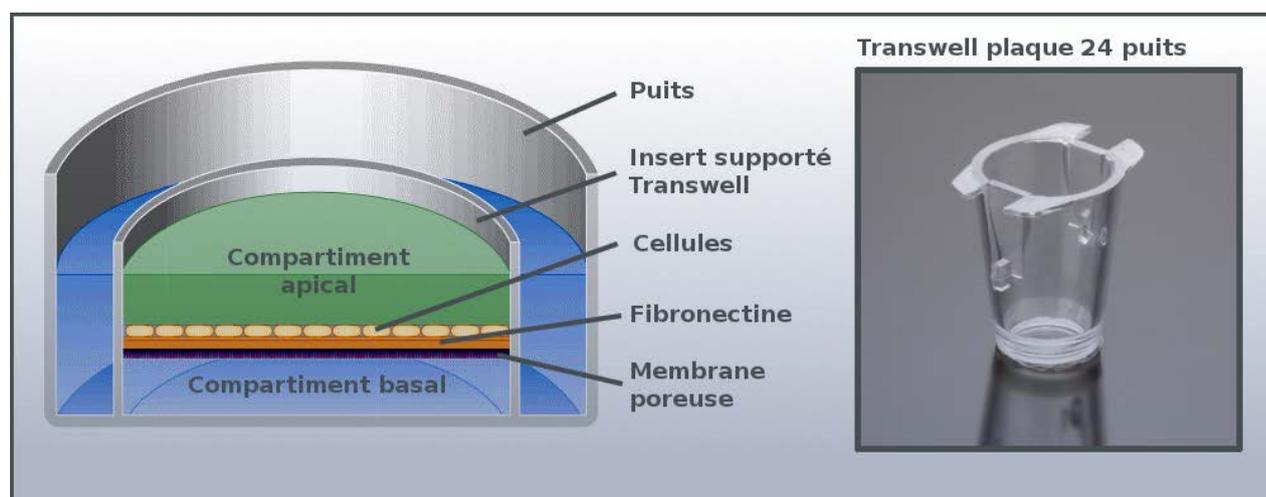


FIGURE 3.16 – Schéma du système Transwell[®] d'insert supportés pour la culture cellulaire. La photo représente l'un des types d'inserts utilisés dans l'étude.

Pour les deux types de membranes, la taille des pores utilisés est de $0,4 \mu\text{m}$. Le protocole est le même : les cellules HPAECs (entre les passages 4 et 5) sont cultivées à confluence sur des flasques T25 puisensemencées à $65\,000$ cellules par cm^2 sur les membranes Transwells. Cette densité d'ensemencement est supérieure à la densité classiquement utilisée mais permet l'obtention rapide de mono-couches denses. Lors de l'ensemencement les membranes Transwell[®] sont recouvertes de fibronectine afin d'assurer une bonne adhérence des cellules.

Les cellules sont laissées à adhérer pendant une nuit puis le milieu des deux compartiments est changé. Les volumes de milieu utilisés sont de $300\text{-}350 \mu\text{L}$ pour le compartiment supérieur et $700 \mu\text{L}$ pour le compartiment inférieur. Les cellules sont cultivées sur les membranes pendant 2 à 4 jours jusqu'à obtenir des conditions d'étanchéité et de densité de la mono-couche cellulaire satisfaisantes pour la suite des expériences. Les niveaux de milieu sont réajustés tous les jours.

3.4.2 Mesure de l'imperméabilité de la mono-couche cellulaire

L'imperméabilité de la mono-couche cellulaire au passage de macromolécules va ici dépendre de la densité des jonctions cellulaires et de leur capacité à empêcher le passage para-cellulaire. L'objectif de ce modèle de culture cellulaire étant l'observation de phénomènes de transports trans-cellulaires, il convient de limiter au maximum l'impact de la voie para-cellulaire afin de ne pas introduire un biais dans la quantification du transport.

En complément de techniques immuno-cytochimiques de marquage des jonctions cellulaires (les anticorps utilisés et protocoles sont développés dans la partie expérimentale du chapitre suivant, tables 4.1), deux critères ont été utilisés pour définir l'imperméabilité des mono-couches cellulaires au passage paracellulaire : la résistance électrique trans-endothéliale et le coefficient de perméabilité au *Lucifer Yellow*.

3.4.2.1 Résistance trans-endothéliale

La RETE repose sur le principe de perméabilité membranaire dû à la présence de pores dans la mono-couche cellulaire. L'existence d'ouvertures entre les cellules permet le passage de l'eau et des solutés aqueux au travers de l'endothélium. En opposition à cela, les membranes endothéliales, composées de lipides, forment une barrière restreignant le passage de ces solutés et isolent électriquement l'espace intra-cellulaire de l'extérieur. La **résistance électrique** entre l'espace supérieur et l'espace inférieur des cellules va donc dépendre de la **densité des jonctions cellulaires**. Chaque ouverture au travers de l'endothélium agit comme un conduit électrique diminuant la résistance électrique totale de l'endothélium *in-vitro*.

La RETE peut être directement mesurée dans les modèles de culture cellulaire sur inserts supportés. La mesure est réalisée en utilisant un ohmmètre (ERS2, MERS00002, Millicell) muni d'une sonde (ERS2 probe, MERSSTX01, Millicell) pourvue de deux électrodes permettant l'enregistrement de la résistance électrique en ohms entre le compartiment supérieur et le compartiment inférieur. La sonde est laissée dix minutes dans un milieu complet avant utilisation. Trois mesures consécutives sont réalisées par échantillon dans le milieu complet ECGM. La résistance électrique mesurée est soustraite à la résistance électrique de la membrane seule relevée sur un insert témoin dépourvu de cellules. La valeur de résistance est ensuite exprimée en fonction de la surface de la membrane supportée. Le milieu de culture est changé après la mesure.

Pour les expériences de suivi de la RETE après exposition aux NPs, le milieu de culture contenant les NPs est changé pour le milieu de culture complet (ECGM) avant la mesure. La sonde est nettoyée et décontaminée à l'éthanol après chaque puits et aux UV entre les utilisations.

3.4.2.2 Coefficient de perméabilité, passage paracellulaire du *Lucifer Yellow*

La perméabilité à une macro-molécule d'une mono-couche cellulaire cultivée sur une membrane supportée de type Transwell[®] peut être déterminée par l'ajout d'un traceur dans le compartiment supérieur à une concentration initiale connue. L'apparition du traceur dans le compartiment inférieur au cours du temps de culture permet de déterminer le coefficient de perméabilité de la mono-couche de cellules pour ce traceur.

Le traceur ici utilisé est le *Lucifer Yellow* (LY, Molecular Probes). Il ne peut traverser la mono-couche cellulaire que par transport paracellulaire. Fluorescent, il est excitable à 485 nm et émet à

530 nm. La lecture de tous les résultats est faite sur un lecteur de plaques fluorescent. Une gamme étalon du LY est réalisée en même temps que chaque enregistrement à des concentrations allant de 0,1 à 50 μM . Chaque jour de culture un enregistrement est réalisé.

Pour chaque enregistrement : le milieu de culture est changé dans les deux compartiments par du milieu basal blanc (ECBM). Le traceur est ajouté au compartiment supérieur à une concentration finale de 100 μM et les échantillons sont placés à incuber pour une heure à 37°C dans un incubateur de culture cellulaire. Les milieux des compartiments supérieur et inférieur sont ensuite prélevés et déposés dans une plaque 96 puits avec la gamme étalon pour lecture au spectro-fluorimètre. La courbe standard donnée par la gamme étalon est utilisée pour calculer la concentration en LY du compartiment inférieur. Le coefficient de perméabilité est ensuite calculé selon la formule 3.1 où P_c est le coefficient de perméabilité; V le volume du compartiment inférieur (mL); A l'aire de la membrane de l'insert (cm^2); C_i la concentration initiale en LY (μM); C_f la concentration finale en LY du compartiment inférieur et T le temps d'incubation en secondes.

$$P_c = \frac{V}{A \times C_i} \times \frac{C_f}{T} \quad (3.1)$$

3.4.3 Protocole d'inclusion en résine des membranes supportées pour la microscopie électronique

L'inclusion d'échantillons sur membranes supportées en résine épon a été réalisée selon le même protocole que pour les échantillons sur lamelle de verre présentés dans la partie expérimentale du chapitre 2. Les étapes de déshydratation ont été uniquement réalisées dans l'éthanol afin de ne pas dégrader les membranes PET. La seconde différence étant l'utilisation d'un protocole d'inclusion à plat des membranes afin d'éviter qu'elles ne se froissent pendant la polymérisation.

Pour assurer une bonne pénétration de la résine épon dans la membrane PET, un décollement minimal de la mono-couche cellulaire et une orientation régulière des échantillons, les membranes poreuses ont été séparées de leur support plastique à l'aide d'un scalpel en les détournant. Les membranes sont ensuite placées à plat, cellules au-dessus sur une planchette et découpées au scalpel en deux morceaux dans une goutte de PBS. Après déshydratation, les échantillons sont inclus en résine épon entre deux films d'aclar selon le protocole décrit en figure 3.17 et placés à polymériser.

Cette technique d'inclusion permet l'obtention d'échantillons ultra-plats orientés sur lesquels il est possible d'appliquer des techniques de microscopies corrélatives. L'échantillon inclus à plat est traité en l'état par ultra-microtomie. Il est monté par la tranche sur le porte-échantillon.

Cette technique s'applique également pour l'inclusion en gélatine d'échantillons biologiques orientés pour la réalisation de marquages immuno-cytochimiques en méthode Tokuyasu.

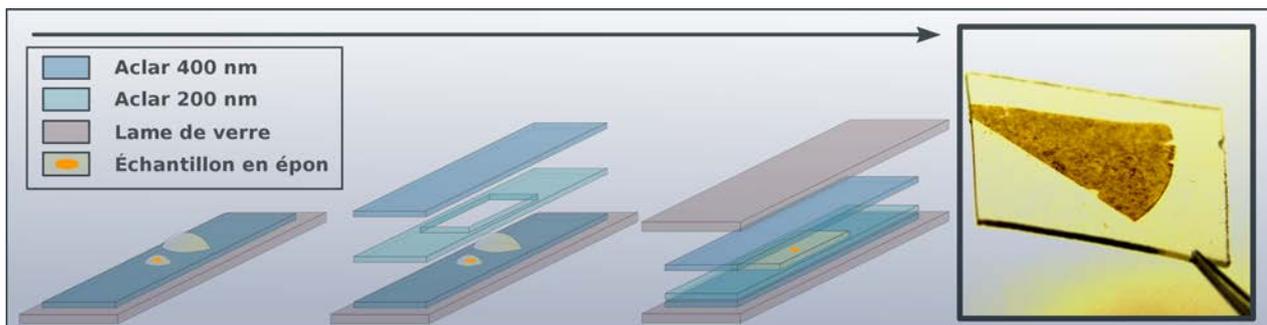


FIGURE 3.17 – Inclusion à plat d'échantillons orientés. L'échantillon est placé sur une lame de verre recouverte d'un film d'aclar de 400 nm d'épaisseur. Un film de 200 nm percé d'un trou d'une taille légèrement supérieure à l'échantillon vient l'encadrer, formant un moule. Un second film d'aclar de 400 nm et une seconde lame de verre viennent compléter le moule. Le tout est serré entre deux pinces sans former de bulles d'air au niveau de l'échantillon et placé à l'étuve pour polymérisation. Une membrane supportée incluse dans une fine épaisseur de résine épon est visible à droite.

3.4.4 Approche de quantification par stéréologie

"Dreams apart, numerical precision is the very soul of science, and its attainment affords the best, perhaps the only criterion of the truth of theories and the correctness of experiment."

D'Arcy Wentworth Thompson (1917) [Thompson 1917]

La microscopie électronique à transmission permet l'exploration des structures nanométriques. Elle souffre néanmoins de biais important dans la représentativité des informations apportées. La MET est une technique qualitative d'observation des échantillons. La résolution extrême de l'observation entraîne une difficulté au moment de généraliser l'information de l'image à la réalité de l'ensemble de l'échantillon. Afin de compenser ces faiblesses, il est nécessaire de rajouter un niveau d'observation statistique à l'étude de MET.

La visualisation de l'échantillon en MET passe, en biologie cellulaire, par son traitement en ultramicrotomie et son observation sous la forme de coupes ultra-fines en deux dimensions. Les **méthodes stéréologiques** regroupent les outils spécialement développés pour l'obtention **d'informations quantitatives** sur des structures en **trois dimensions** à partir d'observations réalisées sur des **coupes** [Gundersen 1988]. Ces méthodes statistiques permettent l'estimation des volumes, surfaces, longueurs et quantité d'objets. Ces caractéristiques vont être exprimées dans la plupart des études de stéréologie en terme de **ratios** par rapport à un système de référence [Mayhew 1983]. Par exemple le volume des noyaux d'une population de cellules pourra être exprimé en fonction du volume du cytoplasme cellulaire de la même population.

Représentativité de l'information par rapport à l'échantillon. La validité de ce type d'étude dépend de deux paramètres principaux :

- ◇ **L'absence d'erreurs systématiques.** Les sources de biais dans une étude statistique en MET sont multiples : la calibration de l'appareil, la sélection lors des étapes expérimentales, la sélection au niveau de l'acquisition d'images par l'utilisateur ("meilleure" image), l'utilisation d'à priori, etc. L'intensité du biais apporté à l'étude n'est pas mesurable et pourra au mieux être minimisée.
- ◇ **L'efficacité optimale.** L'étude doit être humainement réalisable. L'observation au MET revient à observer un système vaste et complexe au travers d'une fenêtre extrêmement petite. Il n'est pas possible de multiplier les étapes d'observation de très nombreuses fois.

La solution est d'utiliser des méthodes d'échantillonnage efficaces à tous les niveaux du système à observer. Un échantillonnage en cascade est réalisé aussi bien dans les étapes de préparation de l'échantillon que dans les étapes d'observation. L'utilisation de méthodes aléatoires pour la détermination des zones d'intérêts permet de limiter le biais par :

- ◇ leur absence de biais inhérent,
- ◇ leur design permettant une équité de représentation des objets au sein de l'échantillon,
- ◇ la suppression du biais dû à l'utilisateur (conscient ou inconscient).

3.4.4.1 Étude de ratios volumiques

Dans le cadre de l'étude du transport de NPs, il convient de se poser la question suivante : que faut-il quantifier ? Il faut ici utiliser un système, le plus simple possible, pour quantifier une "quantité" de NPs dans des cellules adhérentes cultivées sur support rigide. Cette quantité pourrait potentiellement être exprimée en nombre de NPs, en volume exact (puisque le volume d'une NP est connu) ou en ratios volumiques. La quantification en nombre ne permet pas une comparaison directe entre conditions et introduit un biais de par l'absence d'un facteur de comparaison correspondant à la population cellulaire. La quantification par volume exact va être très dépendante de l'homogénéité en taille des NPs et souffre également de l'absence de comparaison sur la population. Par contre, l'utilisation de ratios volumiques permet la comparaison des volumes de NPs par rapport aux volumes cellulaires pour des conditions différentes. De plus cette information est facilement accessible par l'utilisation d'outils simples de stéréologie.

Estimation de la densité volumique d'un objet A inclus dans un objet B. Le principe de Delesse (voir figure 3.18) permet de déterminer le volume d'un élément A inclus dans une matrice B par l'estimation du rapport des surfaces de A et B sur des coupes aléatoires de l'ensemble de la section (voir équation 3.2). Il est ici important de noter que la densité volumique de A par rapport à B peut seulement être obtenue en moyennant les valeurs des surfaces de A et B sur un nombre suffisant de coupes. L'orientation de la coupe ou de l'objet dans l'échantillon n'a ici aucune importance pour le calcul de densités volumiques.

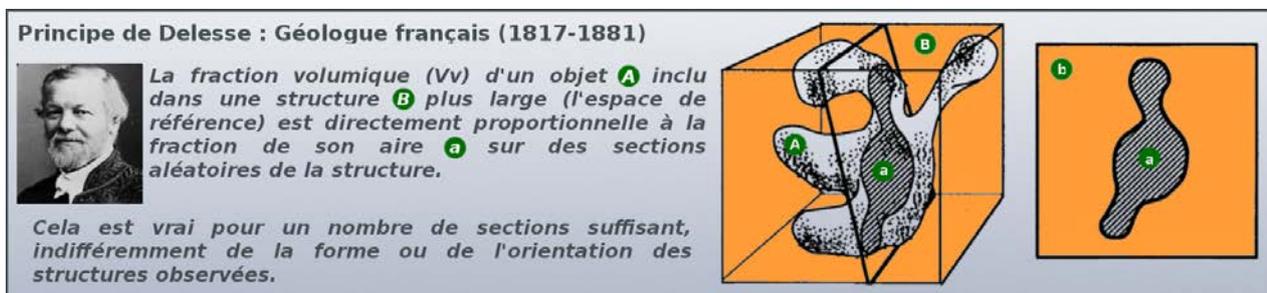


FIGURE 3.18 – Principe de Delesse. Détermination du volume d'un objet inclus dans une matrice par la réalisation de coupes deux dimensions de l'ensemble.

$$Vv_{(A,B)} = \frac{Vol_A}{Vol_B} = \frac{\sum Aires_A}{\sum Aires_B} \quad (3.2)$$

Il est donc possible d'estimer les densités volumiques en NPs des échantillons (structure d'intérêt) en fonction du volume du cytoplasme cellulaire (matrice) sur des coupes transversales d'échantillons. Les surfaces en NPs sont évaluées par interaction avec des grilles cycloïdes permettant l'obtention du rapport volumique entre NPs et cytoplasme cellulaire pour chaque condition.

3.4.4.2 Approche utilisée

La figure 3.19 présente la démarche utilisée pour la quantification du volume de NPs dans les cellules endothéliales cultivées sur membranes supportées.

Échantillonnage. Un échantillonnage en cascade a été utilisé ici. Deux échantillons ont été préparés par condition à étudier. Deux régions différentes ont été coupées sur chaque échantillon, donnant quatre coupes ultra-fines séparées. L'échantillon a été inclus selon le processus d'inclusion à plat, les sections ultra-fines sont réalisées dans le sens transversal. Chaque grille a été contrastée selon un contraste classique acétate d'uranyle et citrate de plomb développé précédemment. Sur chaque grille, quatre cellules successives ont été imagées sans sélection, à un grossissement permettant la visualisation aisée des NPs. Pour se faire, une série d'images accolées a été réalisée avec un pourcentage de recouvrement entre images d'environ 20% permettant une bonne reconstruction.

Les cellules étant adhérentes, cette méthode d'acquisition ne nécessite pas d'orienter l'échantillon dans le microscope et permet simplement d'imager la ligne de cellules en continu. Il s'agit ici d'une méthode se plaçant à l'interface entre l'acquisition aléatoire uniforme d'images au microscope (acquisition à partir d'un point de départ aléatoire et suivant un pas de déplacement défini) et le comptage direct (exploration continue de l'échantillon et quantification directe au microscope).

Traitement des images. L'ensemble des étapes de traitement de l'image et de comptage a été réalisé avec le logiciel ImageJ [Abramoff 2004]. La reconstruction des images en une mosaïque continue a été effectuée avec le plugin MosaicJ pour ImageJ [Thevenaz 2007]. Les images ont ensuite été réduites de moitié en taille afin d'être manipulées plus facilement. Un algorithme de lissage a été utilisé pour limiter le bruit de fond sur l'image (rayon 50 pixels; algorithme "rolling-ball") et mieux visualiser les NPs de plus petite taille. L'intensité des pixels sur l'image a ensuite été normalisée.

Comptage par superposition de grilles cycloïdes. Les comptages ont été effectués manuellement par superposition de grilles cycloïdes de tailles différentes. Les approches de segmentation des particules ont été tentées sans succès pour les NPs de 15 nm, le comptage manuel a donc été utilisé. Le volume du cytoplasme a été quantifié par superposition d'une grille cycloïde de $0,08 \mu\text{m}^2$ par carreau placé aléatoirement sur l'image via le plugin *Grid* pour Imagej [Ronm 2000]. La taille des grilles cycloïdes utilisées pour l'estimation des volumes de NPs est respectivement de $0,002\mu\text{m}^2$, $0,004\mu\text{m}^2$ et $0,008\mu\text{m}^2$ pour les NPs de 15 nm, 50 nm et 100 nm. Lors des comptages, différents sous-groupes reflétant la répartition des NPs ont été déterminés. La quantification a été réalisée en fonction de ces répartitions (NPs localisées aux membranes apicales et basales, internalisées isolées, internalisées en groupes et internalisées dans de larges vésicules). Pour les NPs au contact des membranes apicales et basales, seules celles directement au contact de ces membranes ont été comptées. L'évaluation des rapports volumiques est faite par la formule 3.3, où P est le nombre d'intersections entre l'objet et la grille. L'erreur standard à la moyenne est calculée sur l'ensemble des échantillons.

$$V_{v(NPs,Cyto)} = \frac{Vol_{NPs}}{Vol_{Cyto}} = \frac{\sum Aires_{NPs}}{\sum Aires_{Cyto}} = \frac{\sum P_{NPs} \times Aire_{Grille_{NPs}}}{\sum P_{Cyto} \times Aire_{Grille_{Cyto}} \quad (3.3)$$

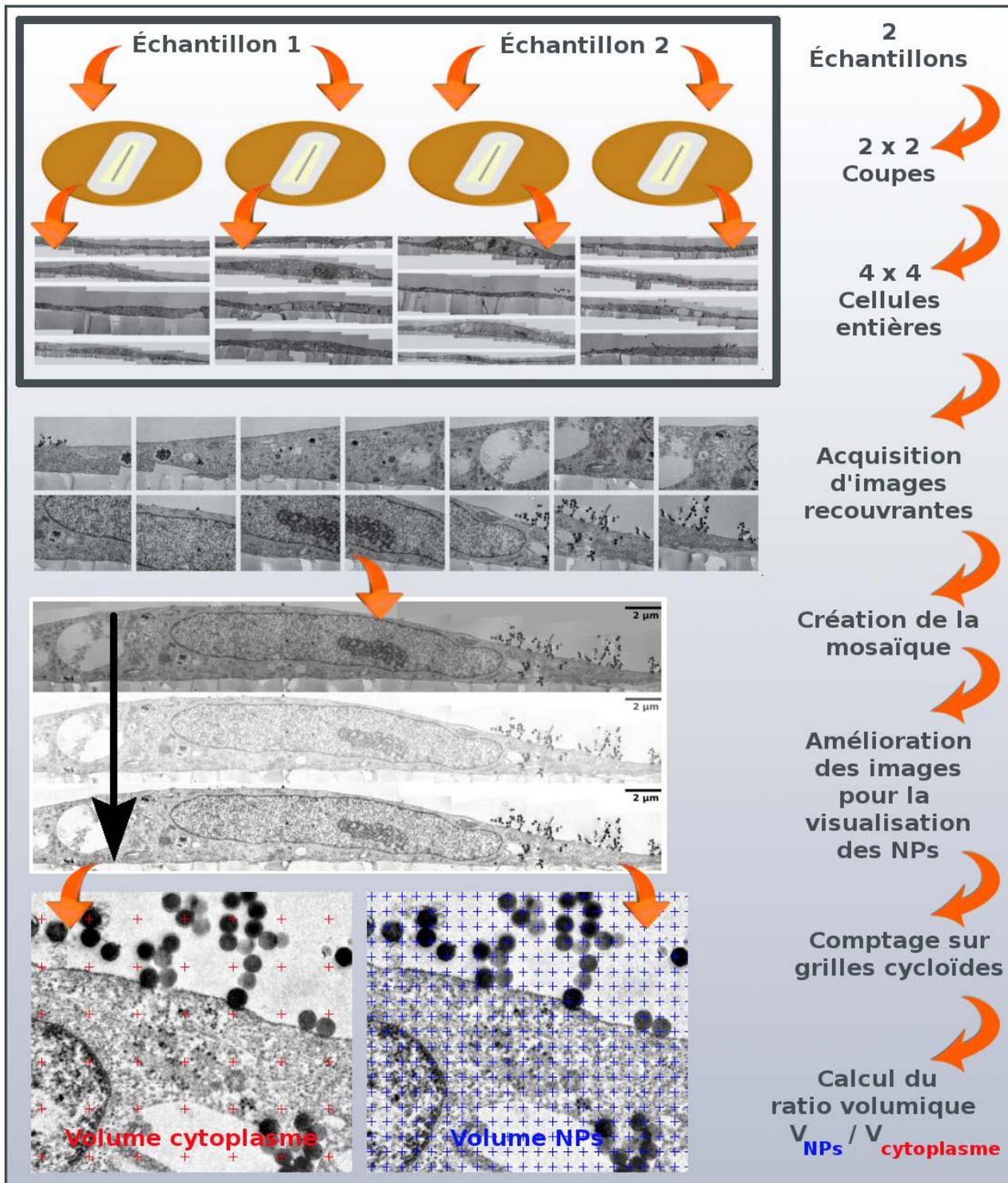


FIGURE 3.19 – Schéma des différentes étapes pour l'analyse par stéréologie.

3.4.4.3 Surestimation du volume des NPs

Une des sources majeures d'erreurs lors de l'application de méthodes stéréologiques sur des coupes ultra-fines vient de l'effet de l'épaisseur de la coupe pour l'estimation des volumes des objets inclus. Cet effet, généralement appelé l'effet Holmes [Holmes 1921], dépend de l'épaisseur de la coupe, de la taille de l'objet inclus dans celle-ci et de sa forme. Les méthodes stéréologiques s'appuient sur le principe que les comptages sont réalisés sur des coupes de l'échantillon (principe de Delesse) alors que le comptage s'effectue sur une projection sur un plan d'observation de l'ensemble du contenu de la coupe. De manière logique, l'épaisseur de la coupe introduit donc un biais lors de l'évaluation des volumes des objets inclus. De même, la géométrie des objets peut introduire une variation dans le volume déduit (voir figure 3.20).

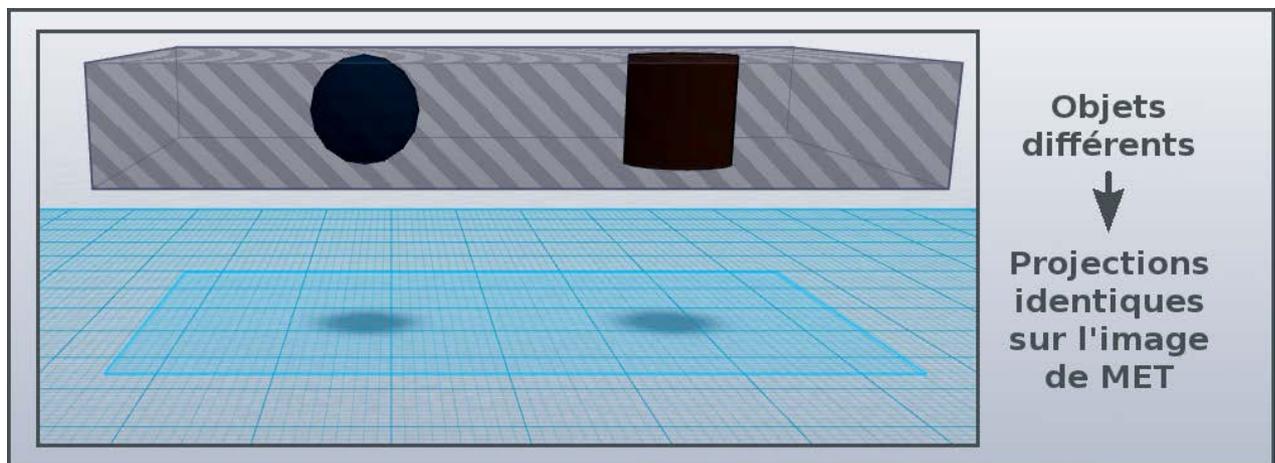


FIGURE 3.20 – *Effet Holmes, sur-projection. Deux objets de formes différentes vont avoir la même projection en MET. Le volume d'une sphère dense aux électrons incluse dans la coupe va être surestimé sur l'image.*

Ici, la géométrie des objets dont le volume est évalué est connue. Il s'agit de sphères de diamètres connus et réguliers. Il est donc possible de corriger les valeurs de volumes obtenus en leur appliquant un facteur de correction K_{NP_s} comme décrit dans l'équation 3.4 [Weibel 1978].

$$Vol_{NP_s} = \sum Aires_{NP_s} \times K_{NP_s} \quad (3.4)$$

$$K_{NP_s} = \frac{1}{1 + \frac{3}{2} \times g} = \frac{1}{1 + \frac{3}{2} \times \frac{t}{d}} \quad (3.5)$$

K_{NP_s} dépend de la forme de l'objet, mais également de l'épaisseur relative de la coupe g correspondant à l'épaisseur de la coupe t divisée par le diamètre des NPs d (voir équation 3.5). L'épaisseur de coupe ici retenue est 50 nm. Les facteurs de correction apportés pour les trois types de NPs sont donc de : 0,16 pour les 15 nm ; 0,4 pour les 50 nm et 0,57 pour les 100 nm.

Améliorations d'un modèle cellulaire pour l'étude du transport trans-endothélial du LDL.

Sommaire

4.1 Objectifs de l'étude	122
4.2 Résultats	123
4.2.1 Développement d'un système de culture cellulaire sous flux laminaire	123
4.2.2 Modifications morphologiques des cellules HCAECs sous flux	125
4.2.3 Effet du stress de cisaillement sur la cavéoline 1 et les cavéoles	128
4.2.4 Effet du stress de cisaillement sur CD36	130
4.3 Discussion	134
4.4 Partie expérimentale	136
4.4.1 Culture cellulaire	136
4.4.2 Microscopie photonique à fluorescence	137
4.4.3 Protocole d'immuno-marquage en pré-inclusion pour la MET	137

4.1 Objectifs de l'étude

Parallèlement à l'étude de l'interaction des NPs avec l'endothélium pulmonaire *in-vitro*, nous avons souhaité appliquer la méthodologie développée précédemment à l'étude du transport trans-endothélial de NPs biologiques, les LDL. Les travaux de Marie-Christine Gerbod-Gianone (maître de conférence au laboratoire) étudient un lien entre le récepteur *scavenger* CD36 et le transport trans-endothélial du LDL natif. L'hypothèse développée met en avant un transport cavéole dépendant du LDL médié par le CD36. Des résultats préliminaires sur des cultures cellulaires HDLECs (*Human dermal Lymphatic endothelial cells*, cellules dermales lymphatiques endothéliales humaines), montrent une localisation partielle de CD36 dans les cavéoles. Dans nos conditions de culture les cellules lymphatiques HDLECs expriment le CD36 à la membrane plasmique, néanmoins, un modèle cellulaire utilisant des cellules d'artère coronaire, correspondant mieux à l'étude de l'athérosclérose est envisagé.

Ainsi les études présentées dans cette partie ont été réalisées sur les cellules HCAECs (*Human Coronary Artery Endothelial Cells* - cellules endothéliales d'artère coronaire humaines). Les cellules HCAECs ont été utilisées en vue du développement d'un modèle d'étude du transport du LDL *in-vitro*. Dans les conditions habituelles de culture cellulaire, les cellules HCAECs expriment CD36, mais celui-ci n'est pas localisé à la membrane plasmique.

Nous émettons l'hypothèse que dans des cellules soumises à un stress de cisaillement physiologique, CD36 serait recruté à la membrane plasmique. Un système permettant l'exposition à un flux laminaire mimant les contraintes hémodynamiques présentes dans les vaisseaux sanguins a été développé au laboratoire. Le système a ensuite été appliqué aux cellules HCAECs dans l'espoir d'observer le recrutement de CD36 à la membrane plasmique sous l'effet de ce stimulus.

La **première** partie de cette étude présente le développement d'un système de culture cellulaire sous flux. Ce système permet de mimer les conditions de stress de cisaillement rencontrées dans les vaisseaux sanguins.

La **seconde** partie de cette étude présente la caractérisation par MOE et MET des changements morphologiques résultant du flux laminaire sur les cellules HCAECs.

La **troisième** partie de cette étude présente les résultats préliminaires obtenus lors de l'étude de la localisation intracellulaire de CD36, récepteur *scavenger* et potentiel candidat pour le transport trans-cellulaire du LDL dans l'endothélium des cellules HCAECs exposées au flux.

4.2 Résultats

4.2.1 Développement d'un système de culture cellulaire sous flux laminaire

Dans le cadre des sujets développés au laboratoire, un modèle de culture cellulaire permettant de mimer un stress de cisaillement par un flux de milieu de culture a été développé. Ce système est encore à l'étape de prototype mais permettra, à terme, de moduler finement l'intensité et la régularité du flux appliqué aux cellules afin de mimer les contraintes physiques locales présentes dans l'endothélium.

Le développement de notre système de culture cellulaire sous flux répond à différents besoins :

- ◇ La contrainte de cisaillement à laquelle est soumis l'échantillon doit être contrôlée (flux constant et régulier) et mesurable.
- ◇ L'intérieur du système doit être complètement isolé afin d'éviter toute contamination.
- ◇ Le système doit être suffisamment modulable pour permettre la modification de la géométrie de la zone d'exposition des cellules au flux.
- ◇ Le système doit pouvoir accueillir les échantillons cellulaires cultivés sur les différents supports utilisés au laboratoire.
- ◇ La zone d'exposition au flux des cellules doit être amovible et remplaçable.
- ◇ Le système doit permettre l'injection d'éléments au cours de l'expérience.
- ◇ Le système doit être transparent et autoclavable pour réutilisation.
- ◇ Le système doit être résistant aux conditions de température et d'humidité présentes dans un incubateur de culture cellulaire.

Le développement de ce système de flux a été réalisé en collaboration avec des partenaires locaux (Jacques Leng, LOF) pour les étapes de micro-fluidique et de design de la chambre d'exposition. Le système se compose de deux parties principales :

- ◇ **La boucle fermée.** Il s'agit d'un circuit fermé composé de deux réservoirs de milieu de culture, de tubes et de valves (voir figure 4.1 *a-b*). Le flux est donné par l'action d'une pompe péristaltique. En amont de la pompe est situé un réservoir de milieu. Ouvert sur l'extérieur par un filtre, il permet l'équilibrage du système en CO₂. En aval de la pompe, un second réservoir fermé permet de transformer le flux saccadé, fourni par la pompe, en flux continu. Entre ces deux réservoirs, une série de vannes permet de basculer le flux entre la zone alimentant la chambre et la déviation de celle-ci. La déviation permet l'équilibrage du système avant l'implantation de la chambre et le changement de chambre.
- ◇ **La chambre d'exposition.** Il s'agit d'un canal réalisé en polydiméthylsiloxane (PDMS) dans lequel les cellules sont mises au contact avec le flux de milieu de culture. Le canal fait 200 μm d'épaisseur pour une longueur de 7 cm et une largeur de 0,5 cm. Les cellules peuvent être cultivées sur des lamelles de verre ou des support de culture cellulaire pour la congélation sous haute-pression (voir figure 4.1 *c*). La chambre est composée de deux lames de verre épaisses enserrant le support de culture et le moule en PDMS. Deux ouvertures sont percées dans la lamelle supérieure pour permettre le passage des tubes amenant le milieu de culture.

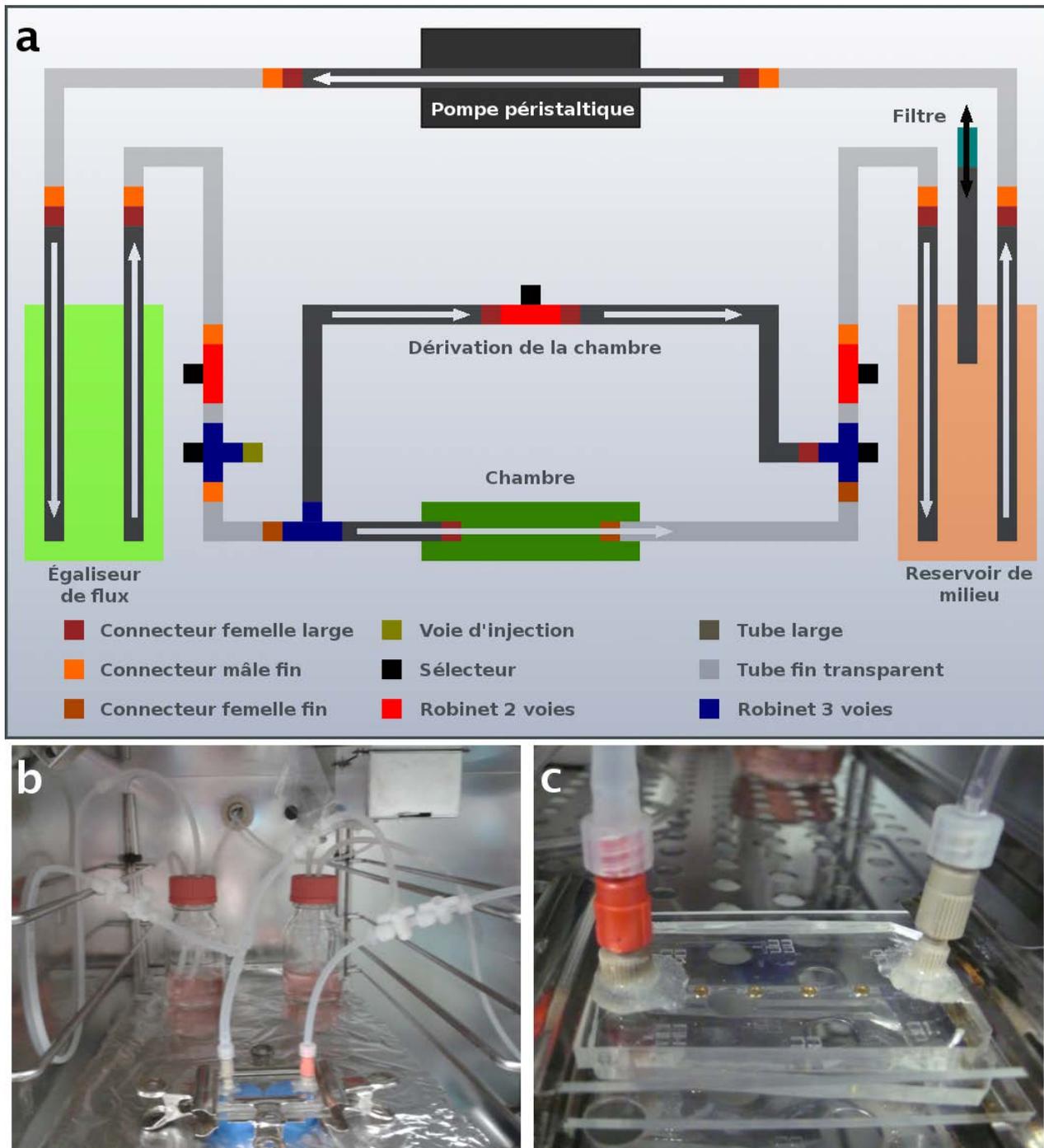


FIGURE 4.1 – Montage de culture cellulaire sous flux. **a** - Schéma général du montage. **b** - Vue du montage dans l'incubateur de culture cellulaire. **c** - Agrandissement de la chambre de flux. Deux lames de verre épaisses enserrant le canal en PDMS dans lequel le flux est appliqué. La configuration de la chambre est modifiable par changement du moule en PDMS et peut s'adapter à divers supports de culture cellulaire.

4.2.2 Modifications morphologiques des cellules HCAECs sous flux

L'effet du flux sur la morphologie du tapis cellulaire de cellules HCAECs a été étudié en utilisant le système développé au laboratoire. L'intensité du stress de cisaillement a été étalonnée et fixée pour l'ensemble des expériences présentées dans cette partie à environ 12 dyn/cm^2 . Cette force mime l'intensité observée dans l'endothélium au niveau des zones à risque pour l'apparition de lésions athérosclérotiques [Chatzizisis 2007].

Les cellules sont cultivées jusqu'à confluence sur une lamelle de verre recouverte de fibronectine. Les lamelles sont ensuite transférées dans la chambre et mises au contact du flux pendant des temps de 24 ou 48 heures. Avant l'application du flux, le tapis cellulaire est formé de cellules en contact et formant un pavage régulier (voir figure 4.2 a-b). Après 24 heures d'exposition au flux, on observe un alignement et un allongement des cellules dans le sens du flux. Les noyaux s'arrangent dans la longueur, dans le sens du flux (voir figure 4.2 c-d). Après 48 heures, cette organisation est encore plus marquée (figure 4.2 d-e).

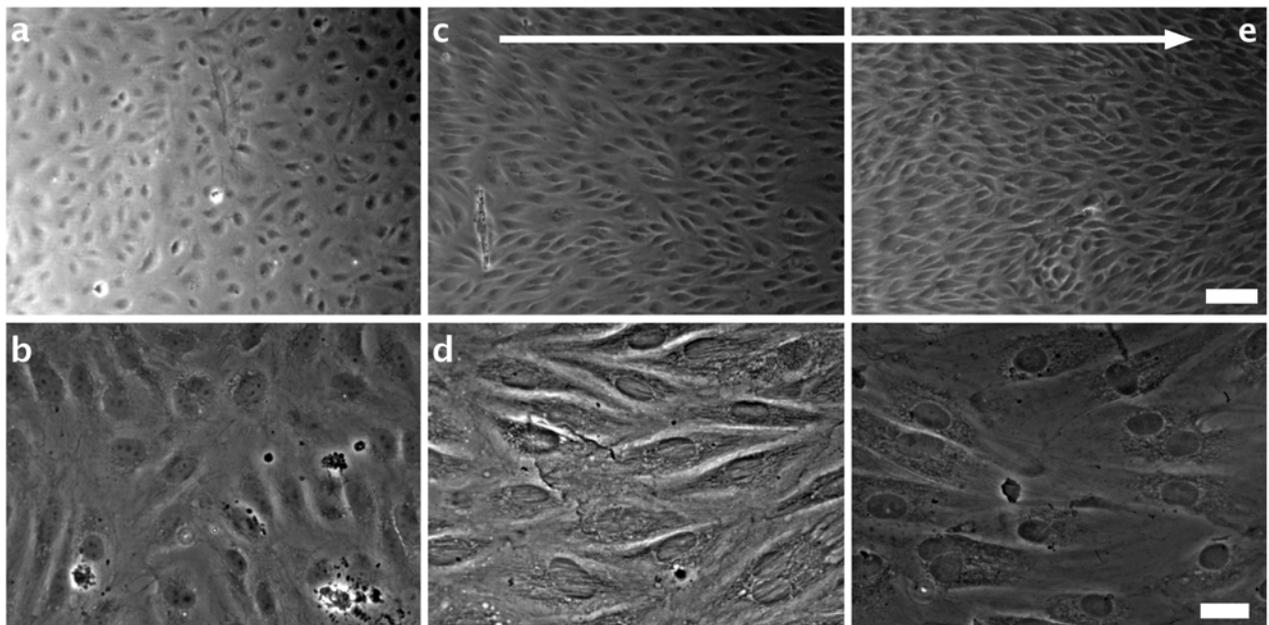


FIGURE 4.2 – Effet de l'application du flux sur les cellules HCAECs. **a-b** - tapis cellulaire en absence de pré-conditionnement. **c-d** - Tapis cellulaire après 24 heures d'exposition à un stress de cisaillement de 12 dyn/cm^2 , on note un allongement des cellules dans le sens du flux (flèche blanche). **d-e** - Tapis cellulaire après 48 heures d'exposition à un stress de cisaillement de 12 dyn/cm^2 . Échelles $100 \mu\text{m}$ (a-c-e), $25 \mu\text{m}$ (b-d-f).

Lors de l'exposition au flux, le cytosquelette d'actine est modifié. On observe sur les cellules cultivées dans des conditions statiques que les filaments d'actine forment un maillage multi-directionnel. La présence de points focaux au niveau des croisements entre filaments est particulièrement marquée (voir figure 4.3 b, flèches blanches). Après l'exposition au flux pendant 24 heures, les points focaux disparaissent (voir figure 4.3 d). On observe un allongement des cellules dans le sens du flux accompagné d'une réorganisation des filaments d'actine. Ils s'organisent parallèlement les uns par

rapport aux autres et dans le sens du flux. Les noyaux s'alignent également dans le sens du flux. Cette réorganisation est caractéristique des cellules correctement exposées au stress de cisaillement [Galbraith 1998].

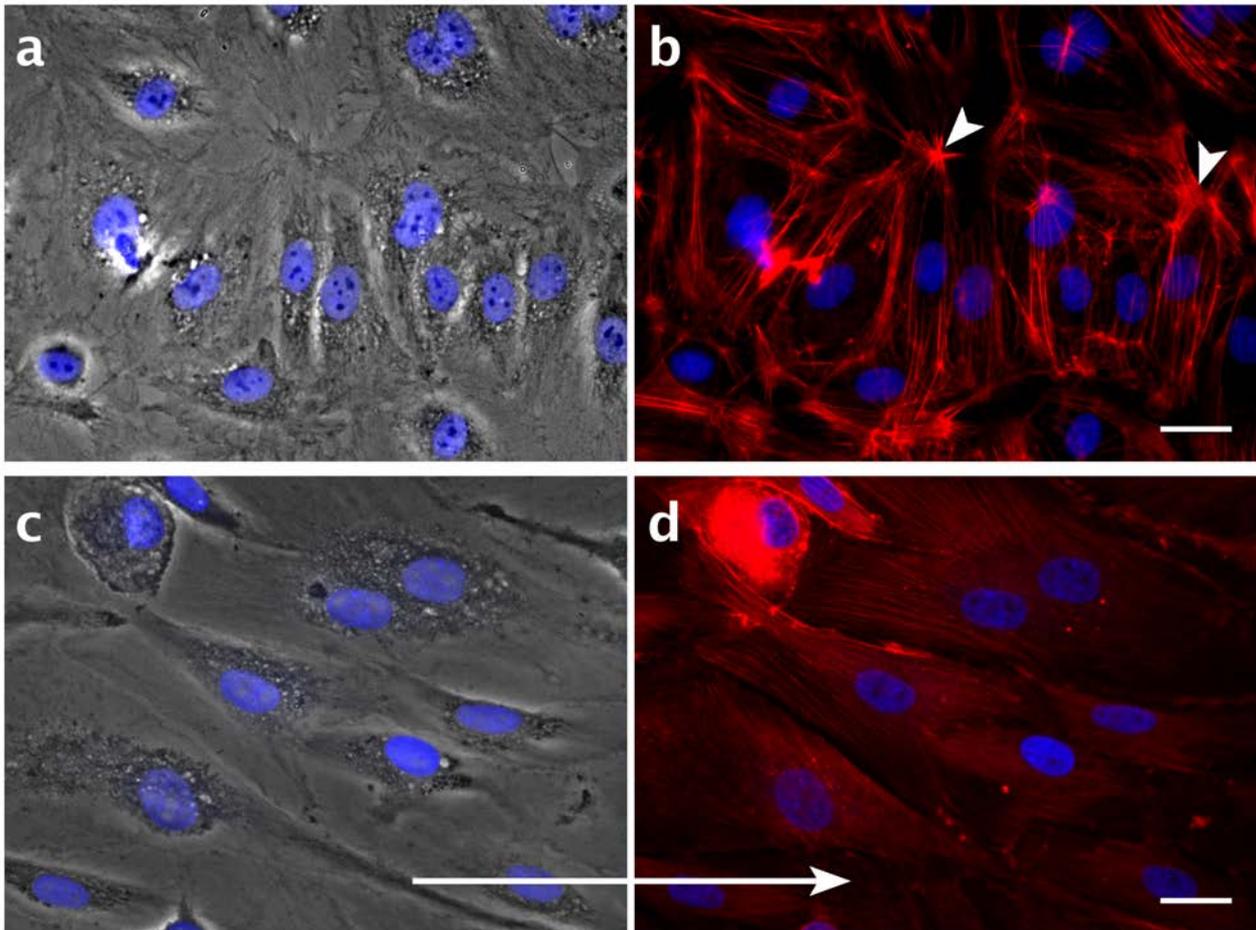


FIGURE 4.3 – Modification morphologique du cytosquelette d'actine après exposition à un stress de cisaillement. **a-b** - Tapis cellulaire en conditions statiques de culture. **c-d** - Tapis cellulaire après exposition à un stress de cisaillement de 12 dyn/cm^2 pendant 24 heures. Allongement des cellules dans le sens du flux (flèche blanche), alignement partiel des noyaux dans le sens du flux. Réorganisation des filaments d'actine dans le sens du flux et disparition des points focaux. Noyaux en bleu, marquage des filaments d'actine en rouge. Échelle 25 microns.

La morphologie des cellules HCAECs en conditions statiques et soumises au flux a ensuite été examinée par MET. On note que en conditions statiques, les cellules HCAECs maintenues en culture pendant quatre jours après confluence présentent en MET de nombreux corps multi-lamellaires (notés *v* sur la figure 4.4), présentant très probablement une fonction de dégradation. Dans notre système de culture cellulaire, ces corps multi-lamellaires (CML) pourraient provenir d'une voie d'autophagie [Hariri 2000]. L'autophagie est un processus de destruction non-discriminatoire amenant au recyclage du matériel cellulaire.

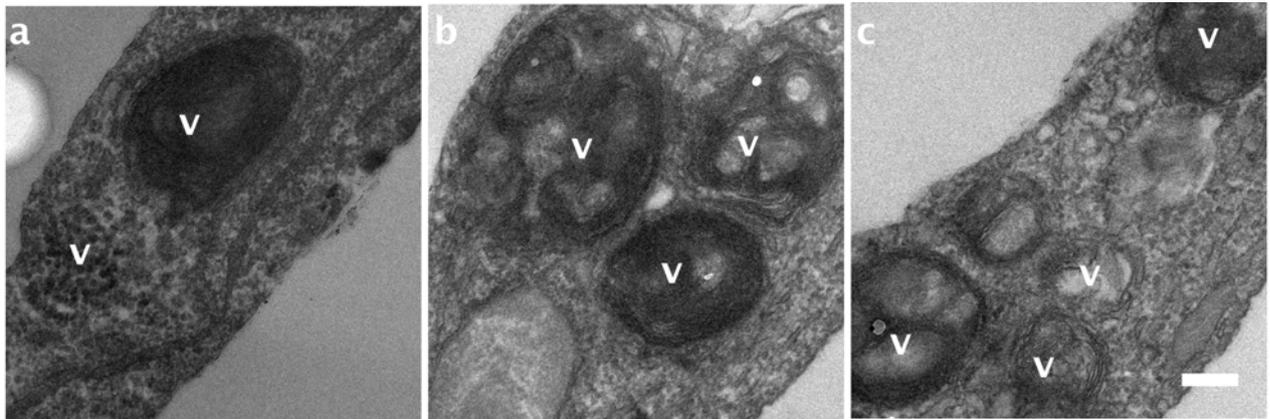


FIGURE 4.4 – Morphologie des cellules au quatrième jour de culture en conditions statiques, coupes transversales MET. Présence de vésicules d'autophagie ou CML dans les cellules (V). Échelle 250 nm.

En présence de flux pendant 24 heures, l'aspect des cellules en MET est bien différent. Les vésicules d'autophagies observées sur les cultures en conditions statiques, aux mêmes temps, ne sont plus visibles sur les cellules traitées (voir figure 4.5). Les cellules sont très riches en organites diverses et facilement reconnaissables (appareil de Golgi, mitochondries, réticulum endoplasmique), attestant du bon état métabolique des cellules.

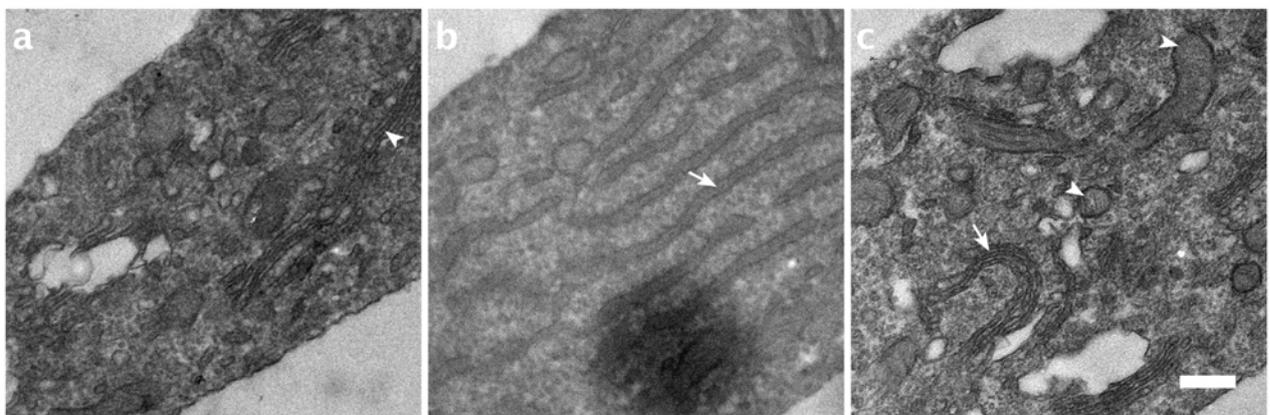


FIGURE 4.5 – Morphologie des cellules au quatrième jour de culture après 24 heures de flux, coupes transversales MET. Présence d'un grand nombre d'organites cellulaires : appareil de Golgi (**a** - pointe de flèche, **c** - flèche), réticulum endoplasmique (**b** - flèche), mitochondries (**c** - pointes de flèches).

Pour conclure sur ces observations, le stimulus de flux a modifié la morphologie des cellules HCAECs en culture, indiquant le passage d'un phénotype plutôt dégradatif (caractérisé par la présence de CML), à un phénotype plus fonctionnel (caractérisé par la présence de nombreuses organites attestant de l'activité métabolique normale de la cellule). Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet du flux sur des protéines pouvant être impliquées dans le développement des phases initiales de l'athérosclérose (cav1 et CD36) selon notre hypothèse.

4.2.3 Effet du stress de cisaillement sur la cavéoline 1 et les cavéoles

En condition de culture cellulaire statique, la cavéoline 1 est localisée dans l'ensemble des cellules HCAECs. Le signal correspondant en MOE est réparti dans les cellules sans orientation définie (voir figure 4.6 *a-b*). Après exposition au flux pendant 24 heures, on observe des zones les plus marquées pour la cavéoline 1 localisées aux extrémités cellulaires et en aval du flux (voir figure 4.6 *c-d*, flèches blanches).

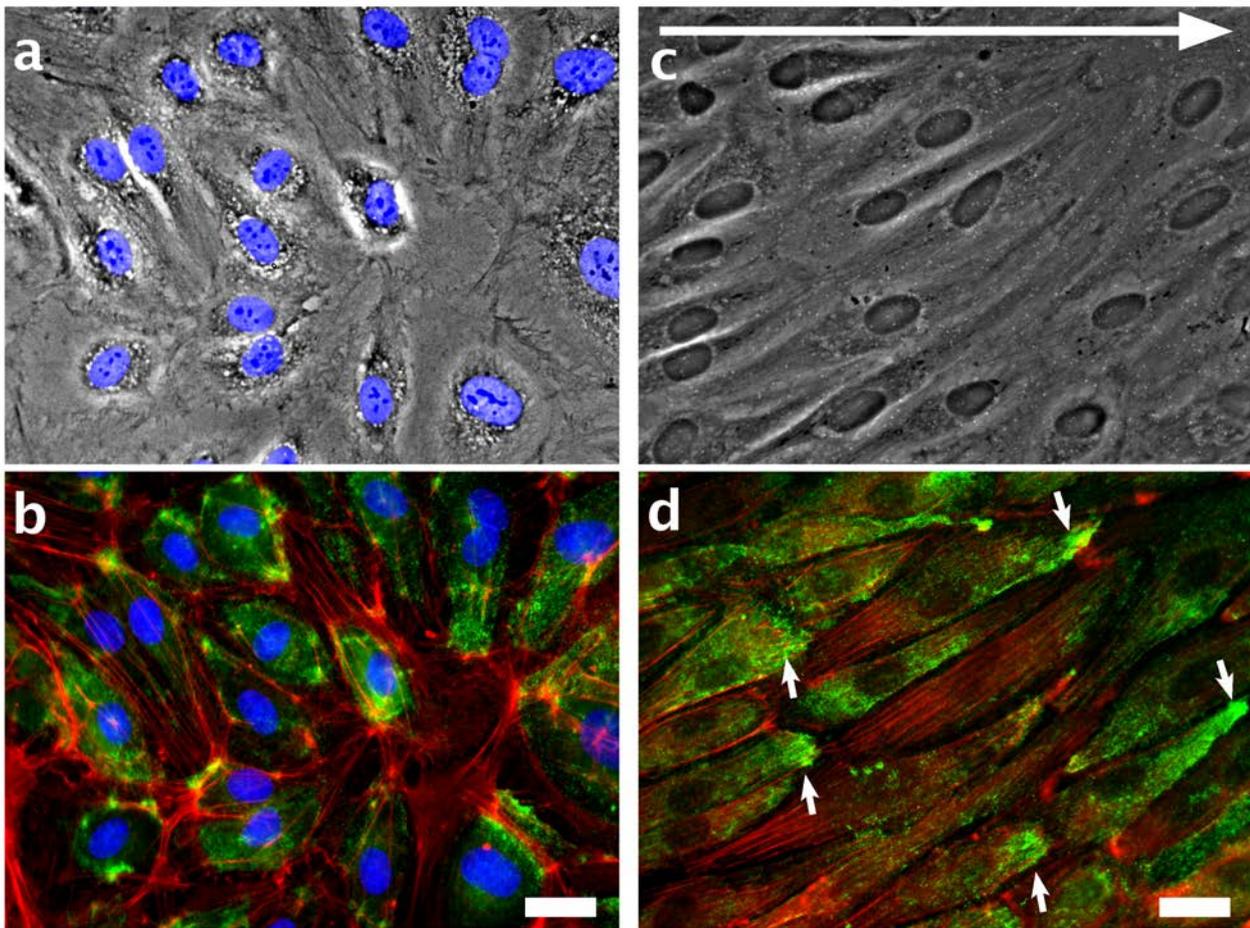


FIGURE 4.6 – Distribution cellulaire de la cavéoline 1 par immuno-fluorescence (IF) en absence et en présence d'exposition au flux. Les cellules ont été perméabilisées. **a-b** - Tapis cellulaire en absence de flux. **a** - Tapis cellulaire en contraste de phase et marquage des noyaux. **b** - IF anti-cavéoline 1 (vert) montrant une répartition sur l'ensemble des cellules. On note une distribution aléatoire des zones riches en cavéoline 1 dans les cellules. Le marquage des filaments d'actine montre la présence de points focaux. **c-d** - tapis cellulaire après 24 heures d'exposition à une contrainte de cisaillement de 12 dyn/cm². **c** - Contraste de phase. **d** - Localisation de la cavéoline 1 dans les extrémités des cellules en aval du flux (sens du flux indiqué par la flèche blanche). Les filaments d'actine s'allongent dans le sens du flux et les points focaux disparaissent. Noyaux en bleu (Hoescht), filaments d'actine en rouge (phalloïdine TRITC), marquage cavéoline 1 en vert (Alexa 488). Échelles 25 µm.

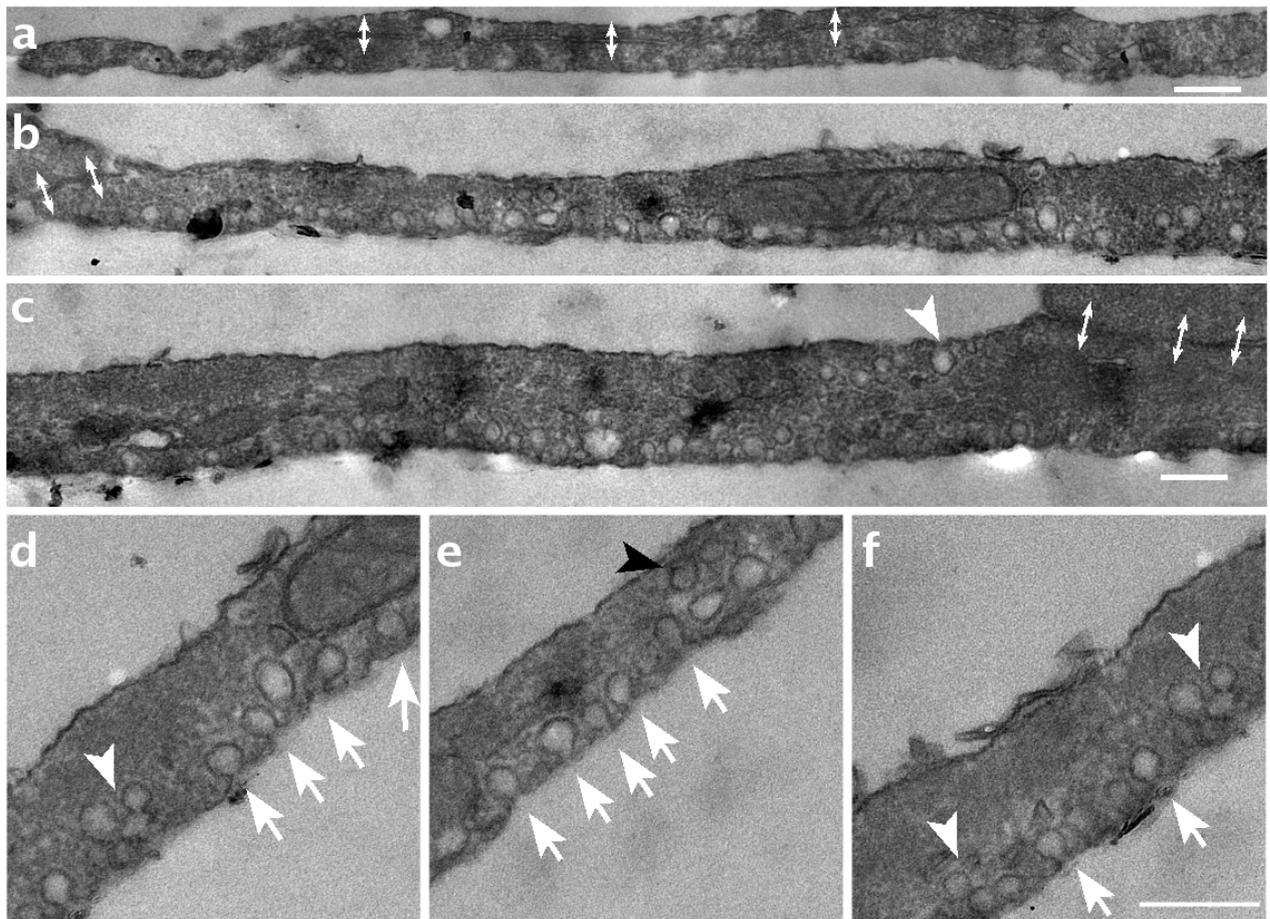


FIGURE 4.7 – *Comparaison en MET de coupes transversales de cellules en présence et en absence de flux. a* - Zone de contacts cellulaires en absence de flux. On note l'absence de vésicules le long des membranes apicales et basales. *b-c* - Zones de contacts cellulaires après 24 heures d'exposition au flux à 12 dyn/cm^2 . On note la présence d'un grand nombre de vésicules correspondant morphologiquement à des cavéoles dont certaines sont ouvertes sur l'espace extra-cellulaire (pointe de flèche blanche). *d-e-f* - Agrandissements de l'image *b*. Quelques vésicules sont ouvertes sur l'espace extra-cellulaire du côté basal (flèches blanches), d'autres semblent former des canaux par assemblage (pointes de flèches blanches). Quelques vésicules sont retrouvées du côté apical (pointe de flèche noire). Les jonctions cellulaires sont indiquées par les doubles-flèches blanches. Échelles 250 nm.

Les différences morphologiques observées sur les cellules soumises au flux ne se limitent pas à l'absence de CML. La densité en vésicules membranaires morphologiquement semblables à des cavéoles est également augmentée (voir figure 4.7). En absence de flux, les zones périphériques des cellules sont dépourvues de ces vésicules (4.7 a). Après 24 heures de d'exposition au flux, on remarque une densité importante de vésicules au contact des membranes apicales et basales de ces zones périphériques (4.7 b-c). Ces vésicules peuvent être ouvertes sur l'espace extra-cellulaire (4.7 d-f, flèches blanches). On notera leur présence majoritairement du côté basal de la cellule, néanmoins, on les retrouve également sur la face apicale (4.7 c, pointe de flèche blanche) et formant des zones riches en vésicules dans toute l'épaisseur de la cellule (4.7 d, f, pointes de flèches blanches).

L'exposition des cellules au flux laminaire entraîne une augmentation de la quantité de cavéoles au niveau des zones périphériques, à proximité des jonctions cellulaires. Ces observations correspondent morphologiquement à ce qui peut être observé dans l'endothélium *in-vivo* (voir chapitre d'introduction).

- ◇ Notre système permet l'exposition des cellules HCAECs à un flux mimant les contraintes de cisaillement existantes dans l'endothélium *in-vivo*.
- ◇ En présence de flux, les cellules HCAECs s'allongent. Les filaments d'actine et les noyaux se réorganisent dans le sens du flux.
- ◇ La distribution intracellulaire de la cavéoline 1 est modifiée en présence de flux et de nombreuses vésicules pouvant correspondre à des cavéoles apparaissent aux extrémités.

4.2.4 Effet du stress de cisaillement sur CD36

En accord avec des résultats obtenus au laboratoire, le récepteur CD36 est exprimé à la membrane de cellules HDLECs. En conditions statiques de culture, le récepteur *scavenger* CD36, est exprimé par les cellules HCAEC mais n'est pas localisé à la membrane (voir figure 4.8). Le marquage en immuno-fluorescence de CD36 dans les cellules en conditions statiques ne révèle qu'un signal très faible, en absence de perméabilisation, correspondant au bruit de fond de l'anticorps secondaire. Sur les cellules perméabilisées, le marquage de CD36 est majoritairement intracellulaire.

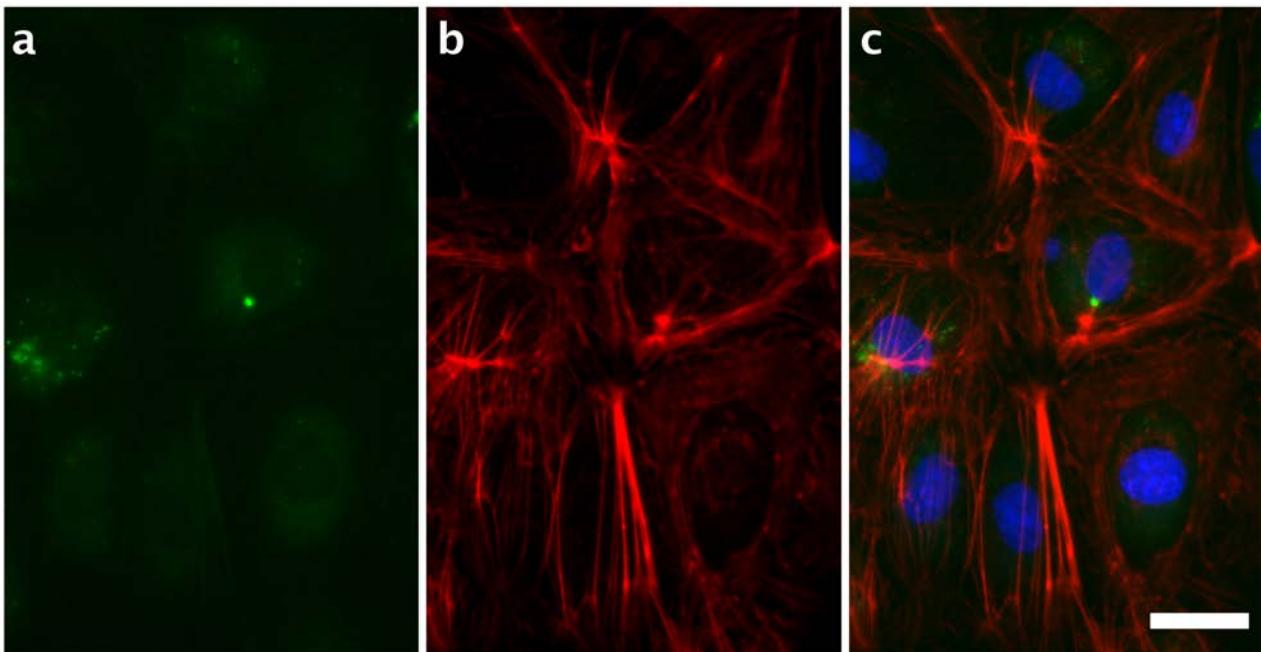


FIGURE 4.8 – Distribution cellulaire de CD36 par immuno-fluorescence en absence de pré-conditionnement sous flux. Les cellules ne sont pas perméabilisées. **a** - Marquage CD36, très peu de marquage des cellules, la majorité du signal se confond au bruit de fond. **b** - Organisation des filaments d'actine. **c** - Image combinée. Marquage CD36 en vert, filaments d'actine en rouge et noyaux en bleu. Échelle 25 μm .

Après exposition au flux pendant 24 heures, la distribution cellulaire du CD36 change (voir figure 4.9). On observe, sur les cellules non perméabilisées, un marquage intense en surface des cellules. La distribution du marquage est très linéaire, présentant un pattern semblable aux filaments d'actine et semble également suivre un pattern plus ponctiforme suivant la forme des cellules.

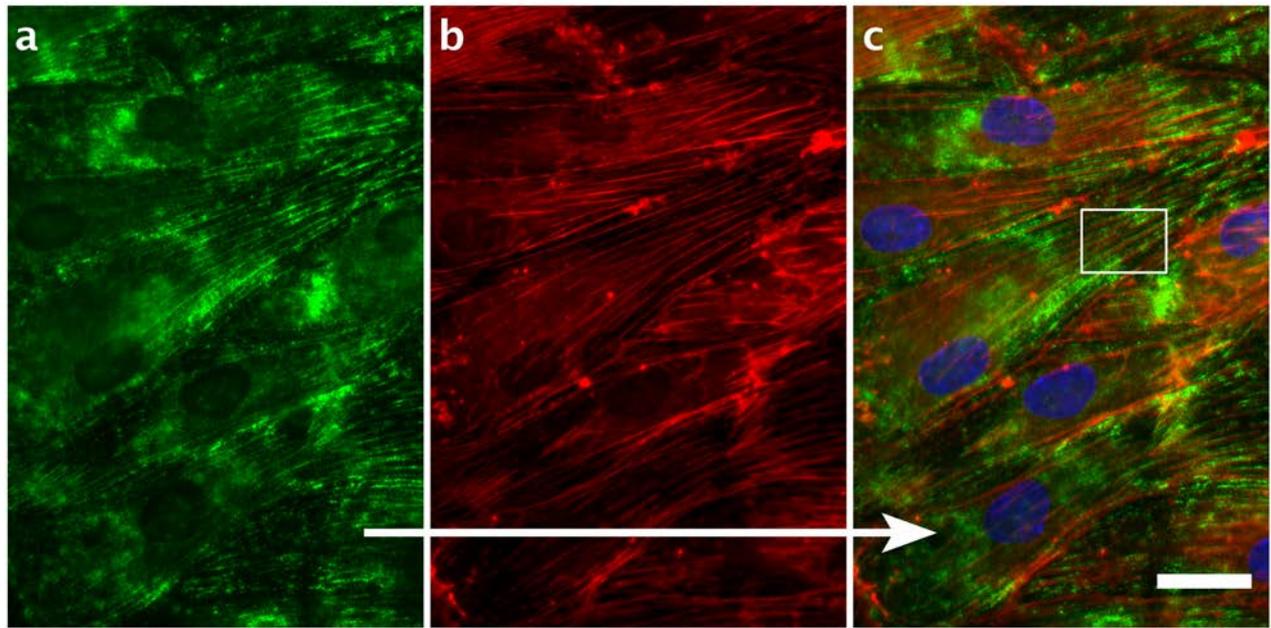


FIGURE 4.9 – Distribution cellulaire de CD36 par immuno-fluorescence après 24 heures de pré-conditionnement sous flux à 12 dyn/cm^2 . Les cellules ne sont pas perméabilisées. Les images ont été réalisées dans les mêmes conditions d'illumination que pour la figure 4.8. **a** - On remarque un marquage intense de CD36 en surface des cellules et qui s'aligne sur les filaments d'actine. **b** - On observe une réorganisation des filaments d'actine dans le sens du flux (flèche blanche). **c** - Image superposée, la zone délimitée par le cadre blanc présente une région de la cellule où CD36 et les filaments d'actine pourraient être partiellement colocalisés. Marquage CD36 en vert, filaments d'actine en rouge et noyaux en bleu. Échelle $25 \mu\text{m}$.

L'observation par microscopie confocale confirme la présence du marquage ponctiforme de CD36 en surface des cellules (voir figure 4.10). Trois tranches optiques ont été sélectionnées. La première au niveau de la surface des cellules (4.10 a-c), montre le marquage CD36 potentiellement en surface au dessus des régions nucléaires. La seconde est située approximativement au milieu de l'épaisseur totale de la cellule (4.10 d-f) et montre une répartition en surface de CD36. La dernière, choisie au niveau basal des cellules (4.10 g-i), montre le signal CD36 le long des filaments d'actine. La figure 4.11 c présente une analyse de colocalisation réalisée avec le greffon Colo2 pour ImageJ entre le signal de CD36 et les filaments d'actine sur une image de microscopie confocale. On remarque une colocalisation partielle de CD36 sur les filaments d'actine. La projection 2D de la colocalisation entre les deux images (voir figure 4.11 d) montre une bonne correspondance entre le signal de CD36 et les filaments d'actine. CD36 et les filaments d'actine ne colocalisent donc pas totalement, néanmoins le signal correspondant à CD36 suit le marquage des filaments d'actine.

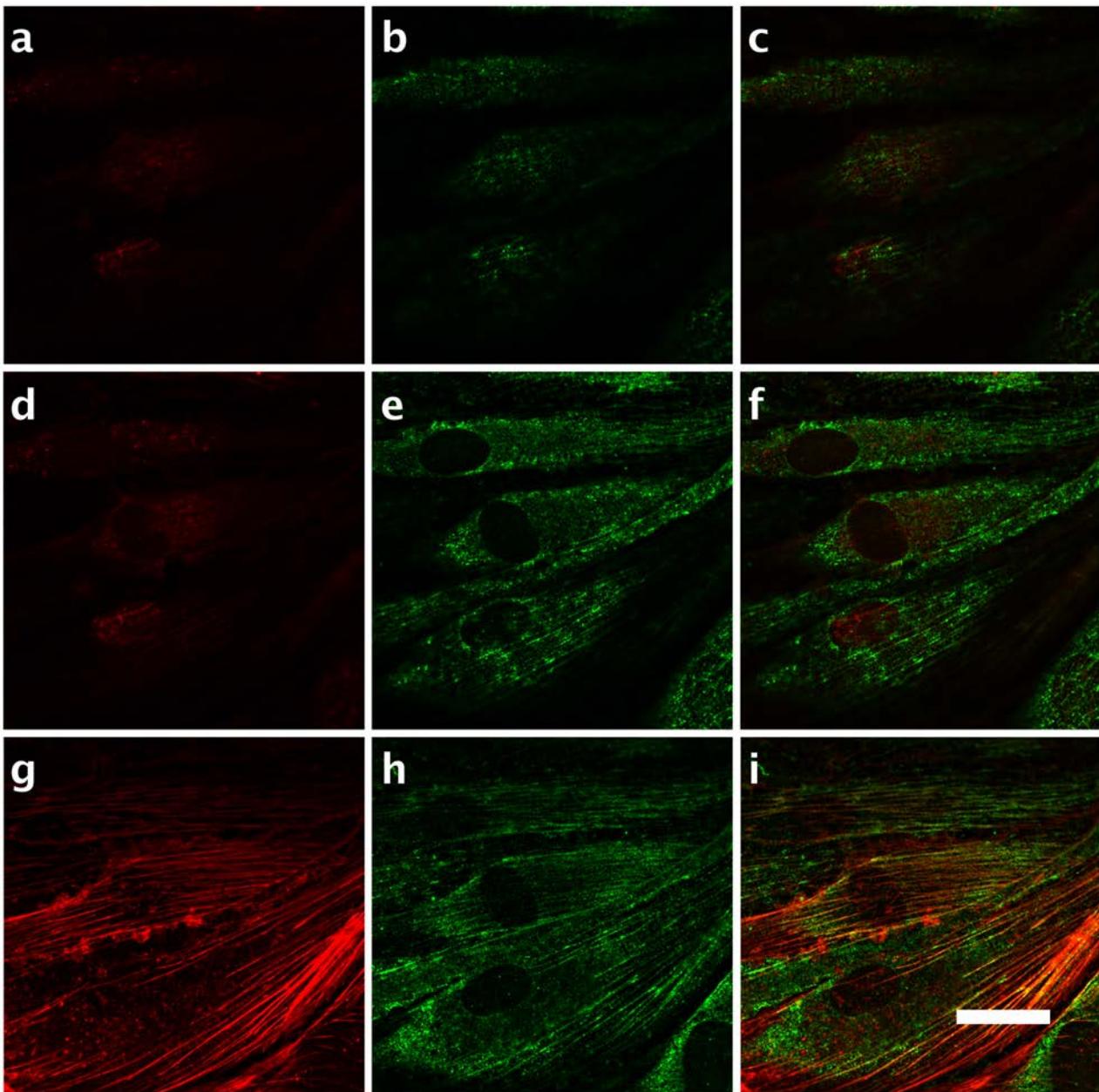


FIGURE 4.10 – Distribution cellulaire de CD36 par immuno-fluorescence après exposition au flux pendant 24 heures, microscopie confocale. **a-c** - Tranche optique située dans la partie supérieure de la cellule au dessus des noyaux. **d-f** - Tranche optique au milieu de l'acquisition. **g-i** - Tranche optique proche de l'extrémité basale des cellules. Marquage des filaments d'actine en rouge (**a, d, g**), CD36 en vert (**b, e, h**) et image composite (**c, f, i**). Échelle 25 μm .

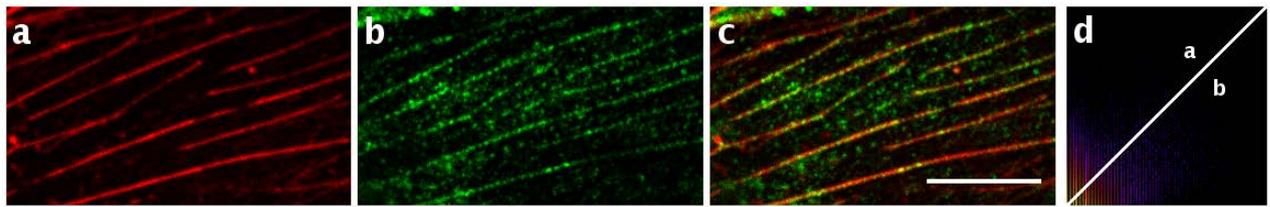


FIGURE 4.11 – Colocalisation de CD36 et des filaments d'actine par immuno-fluorescence après exposition au flux pendant 24 heures, microscopie confocale. Tranche optique située du côté basal de la cellule (comparable aux images **g-i** sur la figure 4.10). **a** - Marquage des filaments d'actine. **b** - Marquage de CD36. **c** - Image composite, on remarque une colocalisation partielle. **d** - Projection 2D de la colocalisation entre les deux images, les signaux colocalisent partiellement (coefficients de Manders de 0,634 pour les filaments d'actine sur le CD36 et de 0,707 pour le CD36 sur les filaments d'actine). Échelle 10 μm .

La localisation du marquage CD36 sur les cellules HCAECs a ensuite été examinée par MET dans les mêmes conditions. La totalité du marquage observé en MET est localisée à la membrane apicale (pointes de flèches blanches) la plupart du temps en groupes. En absence d'exposition au flux, aucun marquage spécifique n'a été observé. La face basale des cellules n'est pas accessible aux anticorps portant les billes d'or. Il nous est donc impossible de détecter le CD36 localisé à la membrane basale.

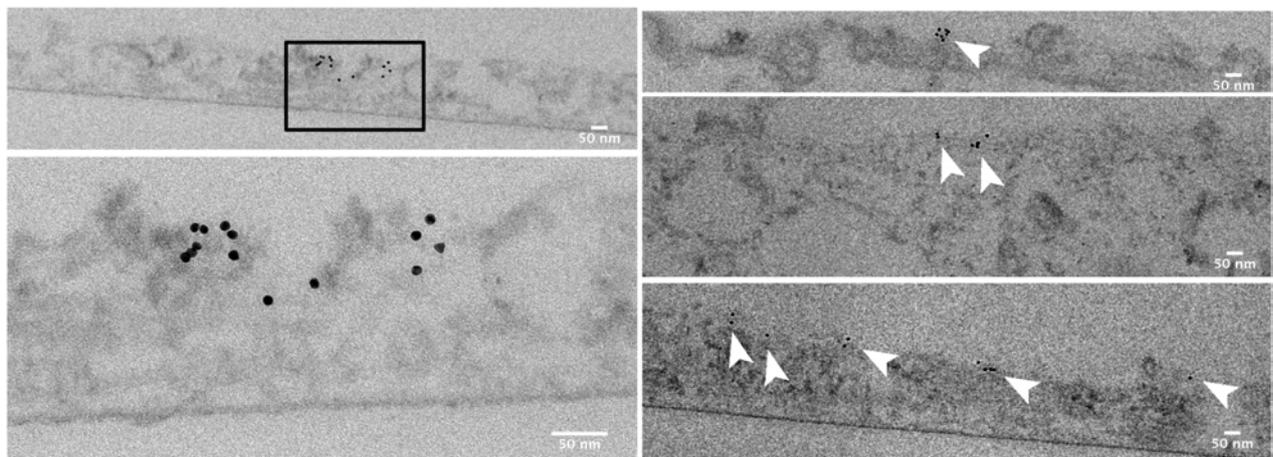


FIGURE 4.12 – Galerie d'images MET montrant la distribution cellulaire de CD36 après exposition au flux pendant 24 heures. Marquage immuno-cytochimique en pré-inclusion, les cellules n'ont pas été perméabilisées. On observe un marquage à la membrane apicale du CD36. Échelles 50 nm.

- ◇ CD36 est absent de la membrane des cellules HCAECs en conditions statiques.
- ◇ L'exposition à un flux mimant les contraintes hémodynamiques provoque l'apparition de CD36 à la membrane apicale dans les cellules HCAECs.

4.3 Discussion

L'objectif de cette partie est la mise au point d'un modèle cellulaire pour l'étude du transport trans-endothélial du LDL dans l'endothélium coronaire humain *in-vitro*. Le système expérimental présenté a été développé en collaboration avec un laboratoire spécialisé en micro-fluidique. Il permet de mimer le stress de cisaillement causé par les contraintes hémodynamiques dans les vaisseaux sanguins sur un tapis cellulaire *in-vitro*. Les cellules endothéliales subissent une dé-différenciation rapide après leur isolement amenant à un glissement de phénotype. Cette dé-différenciation partielle observée *in-vitro* est en partie due à l'absence des facteurs physiques caractéristiques de l'endothélium, à savoir les forces hémodynamiques. Le reconditionnement par l'exposition des cellules HCAECs à un stress de cisaillement, provoque diverses modifications de leur phénotype pouvant être résumées de la manière suivante :

- ◇ On observe un allongement des cellules dans le sens du flux accompagné d'une réorganisation du cytosquelette cellulaire et d'une augmentation de la densité en organelles attestant d'un bon fonctionnement des cellules.
- ◇ La distribution cellulaire de la cavéoline 1 est modifiée par le flux. On note une répartition des zones enrichies en cavéoline 1 au niveau des zones cellulaires périphériques localisées en aval du flux. On observe également dans ces zones par MET, l'apparition de vésicules morphologiquement semblables à des cavéoles.
- ◇ Le conditionnement par le flux entraîne également l'apparition de CD36 à la membrane plasmique.

Le **développement d'un système de conditionnement sous flux en culture cellulaire** répond à un besoin partagé entre différents sujets étudiés au laboratoire (structure des jonctions cellulaires adhérentes, transcytose du LDL, etc.). L'absence de forces hémodynamiques sur l'endothélium *in-vitro* est en partie responsable de la dé-différenciation rapide observée lors de l'isolation de cellules endothéliales [Ando 2009]. De plus, l'objectif est, à terme, d'étudier le transport trans-endothélial du LDL en tant qu'étape initiatrice de l'athérosclérose. Le lien entre les conditions physiques locales et le déclenchement de l'athérosclérose montre un rôle des forces hémodynamiques dans le transport et l'accumulation du LDL [Cheng 2007]. Afin d'étudier le transport du LDL sur un modèle cellulaire s'approchant des conditions physiologiques, le recours à un montage de culture cellulaire sous flux est donc nécessaire.

Plutôt que d'avoir recours à un montage commercial, il a été choisi de développer au laboratoire un montage spécialement adapté aux besoins des techniques d'observation qui seront potentiellement utilisées (MOE et MET). Le prototype utilisé dans cette étude a permis l'application d'un flux et l'observation de changements morphologiques importants sur les cellules HCAECs. Néanmoins, la géométrie de la chambre pourrait être améliorée. Diverses pistes sont actuellement explorées afin de faciliter la manipulation et la mise en route du système (par exemple le serrage de la chambre autour de l'échantillon par vide d'air plutôt que par des pinces métalliques). Les études présentées dans cette partie sont réalisées dans des conditions simples de flux correspondant à la situation retrouvée au niveau des zones prônes au développement de liaisons athérosclérotiques [Chatzizisis 2007]. D'autres géométries du canal d'exposition des cellules au flux sont également envisageables, afin de mimer par exemple des zones de bifurcations artérielles par la modulation du moule en PDMS formant le canal d'application du flux.

En présence d'une contrainte de cisaillement par le flux de l'ordre de 12 dyn/cm² pendant 24 heures, les cellules HCAECs subissent une **modification morphologique importante**. Le tapis cellulaire se réarrange dans le sens du flux. Les cellules s'allongent et leurs noyaux se placent de manière à limiter les frictions au maximum. Le cytosquelette d'actine se réorganise également. On observe une disparition des zones focales caractéristiques des filaments d'actine sur des cultures statiques et leur organisation en fibres de stress parallèles au sens du flux. Ces résultats sont en accord avec les observations de Galbraith *et al.* [Galbraith 1998], qui décrivent trois phases dans la réorganisation de cellules endothéliales soumises à un stress de cisaillement. Une première phase, ayant lieu dans les trois premières heures d'exposition au flux, pendant lesquelles les cellules s'allongent dans le sens du flux, la densité des jonctions cellulaires augmente et des fibres de stress apparaissent. Ils décrivent ensuite, une seconde phase, après 6 heures d'exposition au flux, caractérisée par une réorganisation du noyau et des centres d'organisation des microtubules en amont du flux. La dernière phase, observée pour des cellules soumises 12 heures au flux, est caractérisée par un allongement important des cellules dans le sens du flux et une réorganisation des fibres de stress dans le sens du flux et sur toute la longueur de la cellule. Cet alignement caractéristique des fibres de stress dans la longueur de la cellule est facilement observable par MOE après marquage des filaments d'actine. Ce marquage a été réalisé à chacune de nos expériences, afin de valider l'effet du flux sur les cellules.

En accord avec nos résultats, la **distribution cellulaire de la cavéoline 1** en présence de stress de cisaillement change. Classiquement localisée sur l'ensemble de la surface de la cellule, la cavéoline 1 présente une concentration locale dans la cellule décrite comme étant localisée à l'arrière de cellules en déplacement [Parat 2003] [Beardsley 2005]. En présence de flux, cette concentration locale est observée en aval du flux sur nos expériences. Sun *et al.* présentent des résultats similaires, montrant une localisation préférentielle de ces zones riches en cavéoline 1 en amont du flux [Sun 2003].

L'observation par MET d'une **quantité accrue de vésicules morphologiquement semblables à des cavéoles dans les zones périphériques** après exposition au flux par rapport aux cultures cellulaires statiques représente un avantage important pour l'étude de phénomènes de transport. Il a par exemple été montré que des cellules endothéliales isolées et cultivées voient leur nombre de cavéoles diminuer par rapport à un endothélium *in-vivo* [Schnitzer 1994b]. Aucune statistique n'a été réalisée sur nos échantillons dans le but de quantifier l'augmentation de la quantité de vésicules de "type" cavéoles. Néanmoins, la différence entre cellules en conditions statiques et sous flux est notable. Cette différence a également été observée dans la littérature. Boyd *et al.* ont par exemple pu montrer une augmentation de l'ordre de 45-48% de la quantité de cavéoles aux membranes plasmiques de cellules d'artère bovine [Boyd 2003]. De même, Rizzo *et al.* montrent une augmentation massive de la cavéoline 1 et des autres protéines caractéristiques des cavéoles à la membrane plasmique de cellules d'aortes bovines soumises à un stress de cisaillement. Cette augmentation est également corrélée à une augmentation de la quantité de cavéoles aux membranes des cellules par MET [Rizzo 2003].

En conclusion, l'exposition des cellules HCAECs à un flux mimant les contraintes de stress de cisaillement existantes dans les vaisseaux sanguins confère des caractéristiques observées dans des cellules endothéliales *in-vivo*. La présence de CD36 en surface des cellules HCAECs après exposition au flux nous permet d'envisager l'étude du transport du LDL et l'implication potentielle des cavéoles sur un modèle cellulaire d'endothélium correspondant aux zones prônes à l'athérosclérose *in-vivo*.

4.4 Partie expérimentale

4.4.1 Culture cellulaire

4.4.1.1 Matériel biologique

Les cellules HCAECs (*Human Coronary Artery Endothelial Cells*), cellules endothéliales humaines coronaires artérielles sont achetées chez Promocell (Heidelberg, Allemagne) au passage 3 ainsi que tout milieu de culture sauf contre-indication. Elles sont amplifiées dans du milieu de culture complet (ECBM) jusqu'au passage 4 - 5, puis trypsinées et congelées en aliquots de 500 000 cellules en présence de 10% de SBF, formant le stock.

Chaque cryo-tube stock est décongelé et amplifié sur 2 fioles plastiques (T25 ; Costar, Corning, New York, USA) jusqu'à confluence. Les cellules sont ensuite trypsinées et réensemencées selon les besoins de l'expérience. Classiquement, les cellules sontensemencées à une concentration de 50 000 cellules/cm² sur des lamelles de verres recouvertes de fibronectine (Sigma-Aldrich). Ces cellules sont cultivées jusqu'à confluence par un changement du milieu complet tout les deux jours.

4.4.1.2 Culture cellulaire sous flux laminaire

Une fois à confluence, les cultures cellulaires sont exposées au flux pendant des durées de 24 à une intensité de 12 dyn/cm². La totalité du système à l'exception de la chambre est stérilisée dans un sac étanche et séché à l'étuve avant l'expérience. La boucle du montage de flux est assemblée. Les deux réservoirs sont remplis de 100 mL de milieu complet et soigneusement fermés. Une fois la boucle fermée l'ensemble du montage est transféré dans un incubateur à 37°C et 5 % d'humidité. La pompe péristaltique est installée et le système est mis en fonctionnement. L'équilibrage en CO₂ du système se fait à vitesse maximale, pendant au minimum deux heures.

La chambre est décontaminée à l'éthanol absolu et aux UV juste avant l'expérience. La boucle de dérivation et le canal sont assemblés. Les cellules à confluence cultivées sur lamelle de verre sont placées au niveau du canal. Une goutte de milieu est déposée en surface de la lamelle. Celle-ci est ensuite enserrée entre le canal en PDMS et deux lames de verre épaisses. Il est important d'éviter au maximum la formation de bulles d'air qui pourraient décrocher les cellules. L'ensemble est stabilisé par quatre pinces de serrage en métal.

La chambre contenant les cellules est transférée dans l'incubateur. Le flux est coupé à la pompe dans la boucle du système et, la chambre et sa dérivation sont insérées dans la boucle entre les deux réservoirs. Le flux va ensuite être rétabli progressivement dans le système. Le flux circule d'abord dans la dérivation de la chambre, le temps d'éliminer un maximum de bulles d'air du système. Une fois le système stabilisé, la dérivation de la chambre est fermée forçant le flux vers les cellules. Trois systèmes peuvent être utilisés en même temps dans l'incubateur et sur la même pompe.

Lors de l'arrêt du système, la pompe péristaltique est arrêtée progressivement. Les vannes isolant la chambre sont fermées et la chambre est retirée de la boucle. Une autre chambre peut être insérée dans le système à la suite. La chambre est rapidement démontée et les cellules sont transférées dans une boîte de pétri contenant du milieu complet, puis fixées.

4.4.2 Microscopie photonique à fluorescence

4.4.2.1 Fixation des échantillons

Les échantillons sont fixés par ajout d'une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4% dans du tampon phosphate 0,1M à doubles concentrations dans les puits de culture. Après 5 minutes, la solution est remplacée par une solution de fixateur fraîche. Dans les cas des expériences préparatoires à la microscopie électronique (tests d'immuno-marquages), les conditions de fixation utilisées en MET sont également appliquées.

4.4.2.2 Protocole d'immunofluorescence

Les cellules après fixation sont perméabilisées dans le cas de marquage d'épitopes intra-cellulaires avec du triton X-100 à 0,1 % dans le PBS pendant 2-5 minutes. Les sites antigéniques non-spécifiques sont ensuite saturés avec de la BSA 1% pendant 2 heures à température ambiante. Les cellules sont ensuite incubées avec les anticorps primaires (listés dans la table 4.1), en présence de BSA 0,1% dans du PBS. Après trois rinçages au PBS, les cellules sont incubées avec les anticorps secondaires correspondants. Après une série de rinçages au PBS, les cellules sont incubées avec une solution de Hoescht34580 (Invitrogen) à 5 ng/mL pour un marquage du noyau. Les cellules peuvent également être incubées 30 minutes avec une solution de phalloidine-TRITC (1 ng/mL dans du PBS, Sigma). Les cellules sont ensuite rincées rapidement à l'eau milliQ et montées sur une lame de verre dans du milieu de montage DAKO. Les images sont réalisées sur un microscope à épifluorescence Leica DMI-6000 inversé, un microscope à épifluorescence Olympus BX51 droit ou un microscope confocal Leica DMI6000 TCS SP5 inversé.

Anticorps	Type	Espèce	Références	Dilution
ZO-1	Polyclonal	Lapin	Invitrogen 402200	1/250
Cav1	Polyclonal	Lapin	Abcam	1/200
CD36	Monoclonal	Souris	Monosan FA6-152	1/100

TABLE 4.1 – *Tableau récapitulatif des anticorps primaires utilisés dans l'étude. Détails du type d'anticorps, de l'animal de production, des références du fournisseur et de la dilution finale utilisée.*

4.4.3 Protocole d'immuno-marquage en pré-inclusion pour la MET

Les sites antigéniques non-spécifiques sont saturés avec de la BSA 1% pendant une heure. Les cellules sont ensuite incubées sur la nuit en présence d'anticorps primaires anti-CD36 (voir table 4.1) au 1/50^{ème}. Après trois rinçages au PBS, les cellules sont incubées avec un anticorps secondaire anti-souris portant une bille d'or colloïdal de 10 nm (GAM-10 nm, Aurion, 1/50^{ème}) pendant deux heures. Après rinçages, les cellules sont fixées une heure avec du glutaraldéhyde 1% dans du tampon phosphate 0,1M. L'étape de post-fixation à l'OsO₄ (1%) est réduite à 10 minutes. Les cellules sont ensuite déshydratées et incluses en résine épon selon le protocole développé précédemment.

Conclusion générale et perspectives

L'objectif de ce travail de thèse a été de caractériser **l'interaction, l'internalisation et le transport de NPs de silice de différentes tailles au travers d'un endothélium pulmonaire *in-vitro***. L'**originalité de ce travail**, repose sur l'utilisation de la **MET** associée aux méthodes de stéréologie, pour la **quantification** du transport trans-endothélial des NPs. L'endocytose des NPs de 15, 50 et 100 nm a, tout d'abord, été suivie dans des mono-couches cellulaires cultivées sur supports rigides de cellules HPAECs. L'utilisation d'inserts de culture supportés a, ensuite, permis l'observation et la quantification de la transcytose des NPs et de leur devenir intracellulaire dans la barrière endothéliale. La méthodologie développée lors de ces études peut maintenant être appliquée à l'étude du transport de particules biologiques, telle que l'étude du transport trans-endothélial du LDL.

L'étude de l'**endocytose** et de la **transcytose** des NPs révèle un effet de la taille des particules sur leur transport trans-endothélial et leur accumulation dans l'endothélium *in-vitro*. Les résultats obtenus peuvent être résumés de la manière suivante :

- ◊ Les NPs sont plus facilement prises en charge par les cellules en absence de couronne protéique. Notre objectif étant de visualiser un transport trans-endothélial des NPs, l'ensemble des expériences ont été menées sur des NPs nues. Ce choix s'éloigne de la réalité physiologique, pour laquelle l'opsonisation des NPs est de première importance dans leur interaction avec les cellules de l'endothélium mais répond à un besoin de simplification de notre modèle d'étude.
- ◊ L'internalisation des NPs par les différentes voies d'endocytose dépend de la taille. Les NPs (15, 50 et 100 nm) sont capables d'être internalisées par macropinocytose. Néanmoins, les NPs de 15 et 50 nm sont également endocytées via la voie clathrine. Les NPs de 15 nm sont également internalisées par la voie cavéole en absence d'agrégation massive.
- ◊ L'accumulation intracellulaire des NPs est dépendante de la taille. Les NPs de 50 et 100 nm sont majoritairement accumulées au cours du temps dans les cellules endothéliales. Les NPs de 15 nm sont au contraire éliminées plus facilement.
- ◊ Même si le transport trans-endothélial des NPs est possible pour toutes les tailles par la libération du contenu d'endosomes à la face basale des cellules, la transcytose directe de NPs n'a pu être observée que pour de petits groupes de NPs de 15 nm, potentiellement via la voie cavéole.

Nous avons utilisé la MET, une **méthode** qui est suffisamment **résolutive** pour permettre le **suivi direct des NPs dans les échantillons**. Nous observons uniquement des instantanés de l'interaction entre les NPs et les cellules endothéliales. L'utilisation de la stéréologie permet de quantifier les phénomènes observés. Plusieurs publications décrivent la nécessité de quantifier les phénomènes d'interactions cellulaires des NPs directement en MET . La plupart de ces études se sont focalisées, sur la caractérisation de l'internalisation [Rothen-Rutishauser 2014] et de la distribution cellulaire des NPs [Muhlfeld 2007]. Les auteurs évoquent le besoin de quantification par la stéréologie des

phénomènes de transport [Shapero 2011] mais n'ont pas présenté de solutions techniques ou de résultats. Dans cette étude, nous avons souhaité développer un protocole simple pour la quantification de l'internalisation, de la distribution et de la transcytose de NPs dans la barrière endothéliale *in-vitro*. Ce protocole repose sur un échantillonnage en cascade assurant une bonne représentativité de l'échantillon et une quantification directe à partir d'images de MET. Les protocoles utilisés pourraient encore être améliorés, notamment en diminuant la masse de comptages à réaliser par l'ajout d'une étape d'échantillonnage aléatoire supplémentaire lors de l'observation MET.

Cette étude montre que la **taille** des **nano-objets** mis au contact de la barrière endothéliale détermine leur transport et leur accumulation. La sélectivité des voies d'internalisation et l'aiguillage des NPs vers les voies de dégradation cellulaires (pour les NPs de 50 et 100 nm) ou vers la transcytose directe (pour les 15 nm) est fonction de la taille des particules.

L'application de la méthodologie développée pour l'étude du transport trans-cellulaire des NPs de silice peut maintenant s'appliquer à l'**étude du transport trans-endothélial du LDL** pour l'étude des phases précoces de l'athérosclérose. Il est néanmoins nécessaire de développer un modèle cellulaire tenant compte des caractéristiques physiologiques existant au niveau de l'endothélium pathologique. Dans ce but, un modèle cellulaire d'endothélium d'artères coronaires humaines en présence de contraintes de cisaillement similaires aux forces hémodynamiques observées *in-vivo* a été mis au point. Cette étude présente le développement d'un module de culture cellulaire sous flux laminaire et les premiers résultats obtenus sur des mono-couches de cellules HCAECs. L'exposition à un flux laminaire des cellules HCAECs a entraîné une modification morphologique des cellules, rappelant les caractéristiques *in-vivo*. Ces changements s'accompagnent également d'une réorganisation des zones enrichies en CAV1 et d'une apparition massive de cavéoles dans les zones cellulaires périphériques. Enfin, le récepteur CD36, candidat potentiel pour la transcytose du LDL dans l'endothélium via la voie des cavéoles, est recruté à la membrane apicale après exposition au flux.

Ces résultats sont encourageant pour l'étude du transport du LDL sur ce modèle cellulaire. Néanmoins différentes **améliorations** peuvent encore être apportées au **système de flux laminaire**. Une miniaturisation du système pourrait par exemple permettre l'injection dans le système de substances coûteuses, sans interruption de la circulation du milieu. L'étude de la transcytose des NPs de silice nous a également montré que l'utilisation de supports de culture rigides, par opposition aux supports de culture poreux utilisés dans les expériences de transcytose, peut bloquer le transport trans-endothélial. Une publication récente de Booth *et al.* présente un module de micro-fluidique permettant de soumettre à un stress de cisaillement contrôlé des mono-couches de cellules cultivées sur une membrane supportée et de suivre la perméabilité de la mono-couche par RETE [Booth 2014]. Le développement de supports de culture cellulaires de plus en plus novateurs [Li 2013], s'approchant des conditions physiologiques observées dans l'endothélium ouvre de nombreuses perspectives pour une étude toujours plus approfondie des mécanismes de transport trans-endothélial de macromolécules. Ces améliorations nécessitent le développement de nouveaux outils techniques mais également, la mise en place de modèles cellulaires tenant compte des signaux émis, dans les tissus, par les différents types cellulaires [Tourovskaja 2014], via des approches de co-culture par exemple.

Pour pouvoir suivre le transport du LDL dans l'endothélium par MET, il reste encore à résoudre le problème du **suivi intracellulaire des particules de LDL**. Contrairement aux NPs de silice, denses aux électrons, les LDL sont difficilement observables directement en MET. Des stratégies de marquage des particules de LDL doivent donc être mises en place. Deux approches récentes ont été développées en ce sens. La première propose de greffer les particules de LDL en surface d'une NP d'or colloïdal qui servira à repérer le LDL dans la cellule [Baudoin 2013]. Cette approche basique, simple à mettre en place, n'est pas idéale pour l'étude du transport trans-cellulaire, car elle ne permet pas le suivi d'une particule de LDL isolée mais plutôt le suivi d'une rosace de particules de LDL d'environ 65 nm, entourant la bille d'or. Cela ne correspond plus à la morphologie native de la particule. Une approche plus élégante a été développée par Allijn *et al.*. Au lieu de greffer des particules de LDL sur une bille d'or colloïdal, des nano-cristaux d'or enrobés d'une mono-couche lipidique sont inclus dans les particules de LDL par sonication, permettant leur suivi par MET sans perte d'activité biologique [Allijn 2013]. Ces approches sont en cours de développement au laboratoire (voir annexe A).

L'**objectif** est maintenant d'appliquer les méthodes de caractérisation et de quantification utilisées lors de l'étude de l'interaction des NPs de silice avec la barrière endothéliale, au transport du LDL dans un endothélium exposé à des contraintes hémodynamiques proches de celles observées au niveau des zones prônes au déclenchement de lésions athérosclérotiques. Cette méthodologie peut également s'appliquer à d'autres types de barrières biologiques telles que, par exemple, la barrière hémato-encéphalique, mais également des barrières épithéliales telles que la barrière bronchique pulmonaire, ou la barrière digestive dans le cadre d'études de toxicité ou de transport de macromolécules.

Les résultats des chapitres 2 et 3 sur l'internalisation et la transcytose des NPs de silice de 15, 50 et 100 nm dans la barrière endothéliale in-vitro ont été consignés dans un manuscrit en préparation intitulé : "Size-dependent transcytosis of silica nanoparticles in human endothelial barrier", présenté en annexe C.

Bibliographie

- [Abad 2005] José M Abad, Stijn FL Mertens, Marcos Pita, Victor M Fernández et David J Schiffrin. *Functionalization of thioctic acid-capped gold nanoparticles for specific immobilization of histidine-tagged proteins*. Journal of the American Chemical Society, vol. 127, no. 15, pages 5689–5694, 2005. (Cité en page 33.)
- [Abramoff 2004] Michael D Abramoff, Paulo J Magalhaes et Sunanda J Ram. *Image processing with ImageJ*. Biophotonics international, vol. 11, no. 7, pages 36–43, 2004. (Cité en page 117.)
- [Aderem 1999] Alan Aderem et David M Underhill. *Mechanisms of phagocytosis in macrophages*. Annual review of immunology, vol. 17, no. 1, pages 593–623, 1999. (Cité en page 9.)
- [Ahmed 2013] Muneer Ahmed, Rafael Torres Martin de Rosales et Michael Douek. *Preclinical studies of the role of iron oxide magnetic nanoparticles for nonpalpable lesion localization in breast cancer*. Journal of Surgical Research, vol. 185, no. 1, pages 27–35, 2013. (Cité en page 34.)
- [Al-Amoudi 2004] Ashraf Al-Amoudi, Lars PO Norlen et Jacques Dubochet. *Cryo-electron microscopy of vitreous sections of native biological cells and tissues*. Journal of structural biology, vol. 148, no. 1, pages 131–135, 2004. (Cité en page 85.)
- [Alberts 2013] Bruce Alberts, Dennis Bray, Karen Hopkin, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts et Peter Walter. *Essential cell biology*. Garland Science, 2013. (Cité en page 6.)
- [Allijn 2013] Iris E Allijn, Wei Leong, Jun Tang, Anita Gianella, Aneta J Mieszawska, Francois Fay, Ge Ma, Stewart Russell, Catherine B Callo, Ronald E Gordon et al. *Gold nanocrystal labeling allows low-density lipoprotein imaging from the subcellular to macroscopic level*. ACS nano, vol. 7, no. 11, pages 9761–9770, 2013. (Cité en pages 141 et 168.)
- [Ando 2009] Joji Ando et Kimiko Yamamoto. *Vascular mechanobiology : endothelial cell responses to fluid shear stress*. Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society, vol. 73, no. 11, pages 1983–1992, 2009. (Cité en pages 19 et 134.)
- [Antunes 2014] Marcelo Antunes et José Ignacio Velasco. *Polymer-Carbon Nanotube Nanocomposite Foams*. Polymer Nanotubes Nanocomposites : Synthesis, Properties and Applications, page 279, 2014. (Cité en page 32.)
- [Banerji 2007] Shayla K Banerji et Mark A Hayes. *Examination of nonendocytotic bulk transport of nanoparticles across phospholipid membranes*. Langmuir, vol. 23, no. 6, pages 3305–3313, 2007. (Cité en page 38.)
- [Bartlett 2007] Derek W Bartlett, Helen Su, Isabel J Hildebrandt, Wolfgang A Weber et Mark E Davis. *Impact of tumor-specific targeting on the biodistribution and efficacy of siRNA nanoparticles measured by multimodality in vivo imaging*. Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 104, no. 39, pages 15549–15554, 2007. (Cité en page 36.)
- [Baudoin 2013] Jean-Pierre Baudoin, W Gray Jerome, Christian Kübel et Niels de Jonge. *Whole-cell analysis of low-density lipoprotein uptake by macrophages using STEM tomography*. PloS one, vol. 8, no. 1, page e55022, 2013. (Cité en pages 141 et 168.)

- [Bawa 2012] Roli Bawa, Shan-Yu Fung, Atsushi Shiozaki, Hong Yang, Gang Zheng, Shaf Keshavjee et Mingyao Liu. *Self-assembling peptide-based nanoparticles enhance cellular delivery of the hydrophobic anticancer drug ellipticine through caveolae-dependent endocytosis*. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 8, no. 5, pages 647–654, 2012. (Cité en page 74.)
- [Beardsley 2005] Andrew Beardsley, Kai Fang, Heather Mertz, Vince Castranova, Sherri Friend et Jun Liu. *Loss of caveolin-1 polarity impedes endothelial cell polarization and directional movement*. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 5, pages 3541–3547, 2005. (Cité en page 135.)
- [Benmerah 1998] Alexandre Benmerah, Christophe Lamaze, Bernadette Bègue, Sandra L Schmid, Alice Dautry-Varsat et Nadine Cerf-Bensussan. *AP-2/Eps15 interaction is required for receptor-mediated endocytosis*. *The Journal of cell biology*, vol. 140, no. 5, pages 1055–1062, 1998. (Cité en page 8.)
- [Bian 2014] Fang Bian, Xiaoyan Yang, Fan Zhou, Pin-Hui Wu, Shasha Xing, Gao Xu, Wenjing Li, Jiangyang Chi, Changhan Ouyang, Yonghui Zhanget al. *C-reactive protein promotes atherosclerosis by increasing LDL transcytosis across endothelial cells*. *British journal of pharmacology*, vol. 171, no. 10, pages 2671–2684, 2014. (Cité en page 23.)
- [Birrenbach 1976] G Birrenbach et PP Speiser. *Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology*. *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 65, no. 12, pages 1763–1766, 1976. (Cité en page 31.)
- [Bleeker 2013] Eric AJ Bleeker, Wim H de Jong, Robert E Geertsma, Monique Groenewold, Evelyn HW Heugens, Marjorie Koers-Jacquemijns, Dik van de Meent, Jan R Popma, Anton G Rietveld, Susan WP Wijnhoven et al. *Considerations on the EU definition of a nanomaterial : science to support policy making*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, vol. 65, no. 1, pages 119–125, 2013. (Cité en page 30.)
- [Boisseau 2011] Patrick Boisseau et Bertrand Loubaton. *Nanomedicine, nanotechnology in medicine*. *Comptes Rendus Physique*, vol. 12, no. 7, pages 620–636, 2011. (Cité en page 31.)
- [Bolender 1974] Robert P Bolender. *Stereological analysis of the guinea pig pancreas I. Analytical model and quantitative description of nonstimulated pancreatic exocrine cells*. *The Journal of cell biology*, vol. 61, no. 2, pages 269–287, 1974. (Cité en page 5.)
- [Booth 2014] R Booth, S Noh et H Kim. *A multiple-channel, multiple-assay platform for characterization of full-range shear stress effects on vascular endothelial cells*. *Lab on a Chip*, vol. 14, no. 11, pages 1880–1890, 2014. (Cité en page 140.)
- [Boucrot 2007] Emmanuel Boucrot et Tomas Kirchhausen. *Endosomal recycling controls plasma membrane area during mitosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 19, pages 7939–7944, 2007. (Cité en page 6.)
- [Boyd 2003] Nolan L Boyd, Heonyong Park, Hong Yi, Yong Chool Boo, George P Sorescu, Michelle Sykes et Hanjoong Jo. *Chronic shear induces caveolae formation and alters ERK and Akt responses in endothelial cells*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 285, no. 3, pages H1113–H1122, 2003. (Cité en page 135.)

- [Brannon-Peppas 2012] Lisa Brannon-Peppas et James O Blanchette. *Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy*. *Advanced drug delivery reviews*, vol. 64, pages 206–212, 2012. (Cité en page 35.)
- [Brenner 1959] S Brenner et RW Horne. *A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses*. *Biochimica et biophysica acta*, vol. 34, pages 103–110, 1959. (Cité en page 84.)
- [Bretscher 1982] MS Bretscher. *Surface uptake by fibroblasts and its consequences*. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, volume 46, pages 707–712. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. (Cité en page 11.)
- [Bronner 1998] Felix Bronner. *Calcium absorption a paradigm for mineral absorption*. *The Journal of nutrition*, vol. 128, no. 5, pages 917–920, 1998. (Cité en page 17.)
- [Brown 1979] Michael S Brown et Joseph L Goldstein. *Receptor-mediated endocytosis : insights from the lipoprotein receptor system*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 76, no. 7, pages 3330–3337, 1979. (Cité en page 24.)
- [Brown 1986] Michael S Brown et Joseph L Goldstein. *A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis*. *Science*, vol. 232, no. 4746, pages 34–47, 1986. (Cité en page 26.)
- [Bruns 1968] Romaine R Bruns et George E Palade. *Studies on blood capillaries I. General organization of blood capillaries in muscle*. *The Journal of cell biology*, vol. 37, no. 2, pages 244–276, 1968. (Cité en pages 4 et 5.)
- [Calvo 1998] Dominica Calvo, Diego Gomez-Coronado, Yajaira Suarez, Miguel A Lasuncion et Miguel A Vega. *Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL*. *Journal of lipid research*, vol. 39, no. 4, pages 777–788, 1998. (Cité en page 27.)
- [Caswell 2008] Patrick Caswell et Jim Norman. *Endocytic transport of integrins during cell migration and invasion*. *Trends in cell biology*, vol. 18, no. 6, pages 257–263, 2008. (Cité en page 6.)
- [Cedervall 2007] Tommy Cedervall, Iseult Lynch, Stina Lindman, Tord Berggård, Eva Thulin, Hanna Nilsson, Kenneth A Dawson et Sara Linse. *Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 7, pages 2050–2055, 2007. (Cité en page 34.)
- [Chatzizisis 2007] Yiannis S Chatzizisis, Ahmet Umit Coskun, Michael Jonas, Elazer R Edelman, Charles L Feldman et Peter H Stone. *Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling : molecular, cellular, and vascular behavior*. *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 49, no. 25, pages 2379–2393, 2007. (Cité en pages 28, 125 et 134.)
- [Chen 2005] Min Chen et Anna von Mikecz. *Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles*. *Experimental cell research*, vol. 305, no. 1, pages 51–62, 2005. (Cité en page 37.)
- [Cheng 2007] Caroline Cheng, Frank Helderman, Dennie Tempel, Dolf Segers, Beerend Hierck, Rob Poelmann, Arie van Tol, Dirk J Duncker, Danielle Robbers-Visser, Nicolette TC Ursem *et al*. *Large variations in absolute wall shear stress levels within one species and between species*. *Atherosclerosis*, vol. 195, no. 2, pages 225–235, 2007. (Cité en pages 28 et 134.)

- [Chisolm 2000] Guy M Chisolm et Daniel Steinberg. *The oxidative modification hypothesis of atherogenesis : an overview*. Free radical biology and medicine, vol. 28, no. 12, pages 1815–1826, 2000. (Cité en page 25.)
- [Chung 1990] MK Chung et MW Rich. *Introduction to the cardiovascular system*. Alcohol Health and Research World, vol. 14, no. 4, pages 269–276, 1990. (Cité en page 2.)
- [Chung 2007] Tsai-Hua Chung, Si-Han Wu, Ming Yao, Chen-Wen Lu, Yu-Shen Lin, Yann Hung, Chung-Yuan Mou, Yao-Chang Chen et Dong-Ming Huang. *The effect of surface charge on the uptake and biological function of mesoporous silica nanoparticles in 3T3-L1 cells and human mesenchymal stem cells*. Biomaterials, vol. 28, no. 19, pages 2959–2966, 2007. (Cité en page 37.)
- [Collins 2001] Tucker Collins, Myron I Cybulsky et al. *NF- κ B : pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis ?* The Journal of clinical investigation, vol. 107, no. 3, pages 255–264, 2001. (Cité en page 24.)
- [Conner 2003] Sean D Conner et Sandra L Schmid. *Regulated portals of entry into the cell*. Nature, vol. 422, no. 6927, pages 37–44, 2003. (Cité en page 14.)
- [Connor 2005] Ellen E Connor, Judith Mwamuka, Anand Gole, Catherine J Murphy et Michael D Wyatt. *Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity*. Small, vol. 1, no. 3, pages 325–327, 2005. (Cité en page 36.)
- [Corbalan 2011] J Jose Corbalan, Carlos Medina, Adam Jacoby, Tadeusz Malinski et Marek W Radomski. *Amorphous silica nanoparticles trigger nitric oxide/peroxynitrite imbalance in human endothelial cells : inflammatory and cytotoxic effects*. International journal of nanomedicine, vol. 6, page 2821, 2011. (Cité en page 42.)
- [Corbalan 2012] J Jose Corbalan, Carlos Medina, Adam Jacoby, Tadeusz Malinski et Marek W Radomski. *Amorphous silica nanoparticles aggregate human platelets : potential implications for vascular homeostasis*. International journal of nanomedicine, vol. 7, page 631, 2012. (Cité en page 37.)
- [Corbin 2006] Ian R Corbin, Hui Li, Juan Chen, Sissel Lund-Katz, Rong Zhou, Jerry D Glickson et Gang Zheng. *Low-density lipoprotein nanoparticles as magnetic resonance imaging contrast agents*. Neoplasia, vol. 8, no. 6, pages 488–498, 2006. (Cité en page 24.)
- [Corchero 2009] José Luis Corchero et Antonio Villaverde. *Biomedical applications of distally controlled magnetic nanoparticles*. Trends in biotechnology, vol. 27, no. 8, pages 468–476, 2009. (Cité en page 34.)
- [Craig 1998] Linden E Craig, Jeffrey P Spelman, John D Strandberg et M Christine Zink. *Endothelial cells from diverse tissues exhibit differences in growth and morphology*. Microvascular research, vol. 55, no. 1, pages 65–76, 1998. (Cité en page 19.)
- [Cybulsky 2001] Myron I Cybulsky, Kaeko Iiyama, Hongmei Li, Suning Zhu, Mian Chen, Motoi Iiyama, Vanessa Davis, Jose-Carlos Gutierrez-Ramos, Philip W Connelly, David S Milstone et al. *A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis*. The Journal of clinical investigation, vol. 107, no. 10, pages 1255–1262, 2001. (Cité en page 24.)
- [Damke 1995] Hanna Damke, Takeshi Baba, Alexander M Van der Bliet et Sandra L Schmid. *Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive*

- mutant of dynamin*. *Journal of Cell Biology*, vol. 131, no. 1, pages 69–80, 1995. (Cité en page 8.)
- [Dass 2006] Crispin R Dass et Peter FM Choong. *Selective gene delivery for cancer therapy using cationic liposomes : in vivo proof of applicability*. *Journal of controlled release*, vol. 113, no. 2, pages 155–163, 2006. (Cité en page 36.)
- [Dehouck 1997] Benedicte Dehouck, Laurence Fenart, Marie-Pierre Dehouck, Annick Pierce, Gerard Torpier et Romeo Cecchelli. *A new function for the LDL receptor : transcytosis of LDL across the blood–brain barrier*. *The Journal of cell biology*, vol. 138, no. 4, pages 877–889, 1997. (Cité en page 25.)
- [Dembo 1987] MICAH Dembo et GEORGE I Bell. *The thermodynamics of cell adhesion*. *Curr. Topics Memb. Trans*, vol. 29, pages 71–89, 1987. (Cité en page 64.)
- [Derjaguin 1941] BV Derjaguin. *Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes*. *Acta Physicochim. USSR*, vol. 14, pages 633–662, 1941. (Cité en page 31.)
- [Deserno 2002] Markus Deserno et William M Gelbart. *Adhesion and wrapping in colloid-vesicle complexes*. *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 106, no. 21, pages 5543–5552, 2002. (Cité en page 38.)
- [Doherty 2009] Gary J Doherty et Harvey T McMahon. *Mechanisms of endocytosis*. *Annual review of biochemistry*, vol. 78, pages 857–902, 2009. (Cité en page 12.)
- [Drab 2001] Marek Drab, Paul Verkade, Marlies Elger, Michael Kasper, Matthias Lohn, Birgit Lauterbach, Jan Menne, Carsten Lindschau, Fanny Mende, Friedrich C Luft *et al.* *Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice*. *Science*, vol. 293, no. 5539, pages 2449–2452, 2001. (Cité en page 13.)
- [Dreher 2006] Matthew R Dreher, Wenge Liu, Charles R Michelich, Mark W Dewhirst, Fan Yuan et Ashutosh Chilkoti. *Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers*. *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 98, no. 5, pages 335–344, 2006. (Cité en page 34.)
- [Duan 2013] Junchao Duan, Yongbo Yu, Yang Li, Yang Yu et Zhiwei Sun. *Cardiovascular toxicity evaluation of silica nanoparticles in endothelial cells and zebrafish model*. *Biomaterials*, vol. 34, no. 23, pages 5853–5862, 2013. (Cité en page 42.)
- [Endemann 1993] G Endemann, LW Stanton, KS Madden, CM Bryant, R Tyler White et AA Protter. *CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein*. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, no. 16, pages 11811–11816, 1993. (Cité en page 27.)
- [Faklaris 2009] Orestis Faklaris, Vandana Joshi, Theano Irinopoulou, Patrick Tauc, Mohamed Senour, Hugues Girard, Céline Gesset, Jean-Charles Arnault, Alain Thorel, Jean-Paul Boudouet *et al.* *Photoluminescent diamond nanoparticles for cell labeling : study of the uptake mechanism in mammalian cells*. *ACS nano*, vol. 3, no. 12, pages 3955–3962, 2009. (Cité en page 37.)
- [Falk 1995] Erling Falk, Prediman K Shah et Valentin Fuster. *Coronary plaque disruption*. *Circulation*, vol. 92, no. 3, pages 657–671, 1995. (Cité en page 21.)

- [Fawcett 1965] DW Fawcett. *Surface specializations of absorbing cells*. J. Histochem. Cytochem, vol. 13, no. 75, page 52, 1965. (Cité en page 5.)
- [Febbraio 2000] Maria Febbraio, Eugene A Podrez, Jonathan D Smith, David P Hajjar, Stanley L Hazen, Henry F Hoff, Kavita Sharma, Roy L Silverstein *et al.* *Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice*. Journal of Clinical Investigation, vol. 105, no. 8, pages 1049–1056, 2000. (Cité en page 27.)
- [Fernandez-Hernando] Carlos Fernandez-Hernando, Jun Yu *et Sua.* *Genetic evidence supporting a critical role of endothelial caveolin-1 during the progression of atherosclerosis*. (Cité en page 26.)
- [Fery 2003] Andreas Fery, Sergio Moya, Pierre-Henri Puech, Françoise Brochard-Wyart *et* Helmuth Mohwald. *Interaction of polyelectrolyte coated beads with phospholipid vesicles*. Comptes Rendus Physique, vol. 4, no. 2, pages 259–264, 2003. (Cité en page 38.)
- [Firestone 1994] Raymond A Firestone. *Low-density lipoprotein as a vehicle for targeting antitumor compounds to cancer cells*. Bioconjugate chemistry, vol. 5, no. 2, pages 105–113, 1994. (Cité en page 24.)
- [Ford 2001] Marijn GJ Ford, Barbara MF Pearse, Matthew K Higgins, Yvonne Vallis, David J Owen, Adele Gibson, Colin R Hopkins, Philip R Evans *et* Harvey T McMahon. *Simultaneous binding of PtdIns (4, 5) P2 and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes*. Science, vol. 291, no. 5506, pages 1051–1055, 2001. (Cité en page 8.)
- [Fra 1995] Anna M Fra, Edward Williamson, Kai Simons *et* Robert G Parton. *De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin*. Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 92, no. 19, pages 8655–8659, 1995. (Cité en page 13.)
- [Frank 1991] Michael M Frank *et* Louis F Fries. *The role of complement in inflammation and phagocytosis*. Immunology today, vol. 12, no. 9, pages 322–326, 1991. (Cité en page 34.)
- [Frank 2004] Philippe G Frank, Hyangkyu Lee, David S Park, Narendra N Tandon, Phillip E Scherer *et* Michael P Lisanti. *Genetic ablation of caveolin-1 confers protection against atherosclerosis*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, vol. 24, no. 1, pages 98–105, 2004. (Cité en page 26.)
- [Frank 2008] Philippe G Frank, Stephanos Pavlides, Michelle W-C Cheung, Kristin Daumer *et* Michael P Lisanti. *Role of caveolin-1 in the regulation of lipoprotein metabolism*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, vol. 295, no. 1, pages C242–C248, 2008. (Cité en page 27.)
- [Gagescu 2000] Raluca Gagescu, Nicolas Demaurex, Robert G Parton, Walter Hunziker, Lukas A Huber *et* Jean Gruenberg. *The recycling endosome of Madin-Darby canine kidney cells is a mildly acidic compartment rich in raft components*. Molecular biology of the cell, vol. 11, no. 8, pages 2775–2791, 2000. (Cité en page 14.)
- [Galbiati 2001] Ferruccio Galbiati, Jeffrey A Engelman, Daniela Volonte, Xiao Lan Zhang, Carlo Minetti, Maomi Li, Harry Hou, Burkhard Kneitz, Winfried Edelmann *et* Michael P Lisanti. *Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and t-tubule abnormalities*. Journal of Biological Chemistry, vol. 276, no. 24, pages 21425–21433, 2001. (Cité en page 13.)

- [Galbraith 1998] CG Galbraith, R Skalak et S Chien. *Shear stress induces spatial reorganization of the endothelial cell cytoskeleton*. Cell motility and the cytoskeleton, vol. 40, no. 4, pages 317–330, 1998. (Cité en pages 126 et 135.)
- [Garcia-Cardena 2006] G Garcia-Cardena et MA Gimbrone Jr. *Biomechanical modulation of endothelial phenotype : implications for health and disease*. In The Vascular Endothelium II, pages 79–95. Springer, 2006. (Cité en page 27.)
- [Garcia 2011] Alexander N Garcia, Stephen M Vogel, Yulia A Komarova et Asrar B Malik. *Permeability of endothelial barrier : cell culture and in vivo models*. In Permeability Barrier, pages 333–354. Springer, 2011. (Cité en page 20.)
- [Garrett 2000] Wendy S Garrett, Li-Mei Chen, Ruth Kroschewski, Melanie Ebersold, Shannon Turley, Sergio Trombetta, Jorge E Galán et Ira Mellman. *Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42*. Cell, vol. 102, no. 3, pages 325–334, 2000. (Cité en page 10.)
- [Gerloff 2009] Kirsten Gerloff, Catrin Albrecht, Agnes W Boots, Irmgard Forster et Roel PF Schins. *Cytotoxicity and oxidative DNA damage by nanoparticles in human intestinal Caco-2 cells*. Nanotoxicology, vol. 3, no. 4, pages 355–364, 2009. (Cité en page 37.)
- [Ghetie 1997] Victor Ghetie et E Sally Ward. *FcRn : the MHC class I related receptor that is more than an IgG transporter*. Immunology today, vol. 18, no. 12, pages 592–598, 1997. (Cité en page 17.)
- [Ghinea 1989] N Ghinea, Monica Eskenasy, Maya Simionescu et Nicolae Simionescu. *Endothelial albumin binding proteins are membrane-associated components exposed on the cell surface*. Journal of Biological Chemistry, vol. 264, no. 9, pages 4755–4758, 1989. (Cité en page 18.)
- [Ghosh 1990] Soumitra S Ghosh, Philip M Kao, Ann W McCue et Hugh L Chappelle. *Use of maleimide-thiol coupling chemistry for efficient syntheses of oligonucleotide-enzyme conjugate hybridization probes*. Bioconjugate chemistry, vol. 1, no. 1, pages 71–76, 1990. (Cité en page 33.)
- [Glenn 2009] JA May H Ratan JR Glenn et W Losche P Spangenberg S Heptinstall. *GPIIb-IIIa antagonists cause rapid disaggregation of platelets pre-treated with cytochalasin D. Evidence that the stability of platelet aggregates depends on normal cytoskeletal assembly*. 2009. (Cité en page 74.)
- [Goncalves 2009] Isabel Goncalves, Mihaela Nitulescu, Mikko PS Ares, Gunilla Nordin Fredrikson, Bo Jansson, Zhan-Chun Li et Jan Nilsson. *Identification of the target for therapeutic recombinant anti-apoB-100 peptide antibodies in human atherosclerotic lesions*. Atherosclerosis, vol. 205, no. 1, pages 96–100, 2009. (Cité en page 25.)
- [Gonzalez 2010] Laetitia Gonzalez, Leen CJ Thomassen, Gina Plas, Virginie Rabolli, Dorota Napierska, Ilse Decordier, Mathieu Roelants, Peter H Hoet, Christine EA Kirschhock, Johan A Martens et al. *Exploring the aneugenic and clastogenic potential in the nanosize range : A549 human lung carcinoma cells and amorphous monodisperse silica nanoparticles as models*. Nanotoxicology, vol. 4, no. 4, pages 382–395, 2010. (Cité en page 37.)
- [Gottlieb 1993] Theodore A Gottlieb, Ivan E Ivanov, Milton Adesnik et David D Sabatini. *Actin microfilaments play a critical role in endocytosis at the apical but not the basolateral surface of polarized epithelial cells*. The Journal of cell biology, vol. 120, no. 3, pages 695–710, 1993. (Cité en page 10.)

- [Gref 1994] Ruxandra Gref, Yoshiharu Minamitake, Maria Teresa Peracchia, Vladimir Trubetskoy, Vladimir Torchilin et Robert Langer. *Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres*. Science, vol. 263, no. 5153, pages 1600–1603, 1994. (Cité en page 35.)
- [Griffiths 1993] Gareth Griffiths. *Fixation for fine structure preservation and immunocytochemistry*. In Fine Structure Immunocytochemistry, pages 26–89. Springer, 1993. (Cité en page 81.)
- [Guardia 2014] Pablo Guardia, Andreas Riedinger, Hamilton Kakwere, Florence Gazeau et Teresa Pellegrino. *Magnetic Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia and Controlled Drug Delivery*. Bio-and Bioinspired Nanomaterials, 2014. (Cité en page 32.)
- [Guarnieri 2011] Daniela Guarnieri, Angela Guaccio, Sabato Fusco et Paolo A Netti. *Effect of serum proteins on polystyrene nanoparticle uptake and intracellular trafficking in endothelial cells*. Journal of Nanoparticle Research, vol. 13, no. 9, pages 4295–4309, 2011. (Cité en page 68.)
- [Guarnieri 2014] Daniela Guarnieri, Maria Ada Malvindi, Valentina Belli, Pier Paolo Pompa et Paolo Netti. *Effect of silica nanoparticles with variable size and surface functionalization on human endothelial cell viability and angiogenic activity*. Journal of nanoparticle research, vol. 16, no. 2, pages 1–14, 2014. (Cité en page 42.)
- [Gundersen 1988] HJG Gundersen, P Bagger, TF Bendtsen, SM Evans, LXMN Korbo, N Marcussen, A Møller, K Nielsen, JR Nyengaard, B Pakkenberget al. *The new stereological tools : disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis*. Apmis, vol. 96, no. 7-12, pages 857–881, 1988. (Cité en page 115.)
- [Hariri 2000] Mehrdad Hariri, Ghania Millane, Marie-Pierre Guimond, Ginette Guay, James W Dennis et Ivan R Nabi. *Biogenesis of multilamellar bodies via autophagy*. Molecular biology of the cell, vol. 11, no. 1, pages 255–268, 2000. (Cité en page 126.)
- [Harush-Frenkel 2008] Oshrat Harush-Frenkel, Eva Rozentur, Simon Benita et Yoram Altschuler. *Surface charge of nanoparticles determines their endocytic and transcytotic pathway in polarized MDCK cells*. Biomacromolecules, vol. 9, no. 2, pages 435–443, 2008. (Cité en page 107.)
- [Hayer 2010] Arnold Hayer, Miriam Stoeber, Danilo Ritz, Sabrina Engel, Hemmo H Meyer et Ari Helenius. *Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation*. The Journal of cell biology, vol. 191, no. 3, pages 615–629, 2010. (Cité en page 14.)
- [He 2009] Qianjun He, Zhiwen Zhang, Yu Gao, Jianlin Shi et Yaping Li. *Intracellular Localization and Cytotoxicity of Spherical Mesoporous Silica Nano-and Microparticles*. Small, vol. 5, no. 23, pages 2722–2729, 2009. (Cité en page 37.)
- [Heiskala 2001] Marja Heiskala, Per A Peterson et Young Yang. *The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport*. Traffic, vol. 2, no. 2, pages 92–98, 2001. (Cité en page 4.)
- [Heuser 1980] John Heuser. *Three-dimensional visualization of coated vesicle formation in fibroblasts*. The Journal of cell biology, vol. 84, no. 3, pages 560–583, 1980. (Cité en page 11.)
- [Hewlett 1994] Lindsay J Hewlett, Alan R Prescott et Colin Watts. *The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations*. The Journal of cell biology, vol. 124, no. 5, pages 689–703, 1994. (Cité en page 10.)
- [Hoeller 2005] Daniela Hoeller, Sinisa Volarevic et Ivan Dikic. *Compartmentalization of growth factor receptor signalling*. Current opinion in cell biology, vol. 17, no. 2, pages 107–111, 2005. (Cité en page 6.)

- [Holmes 1921] Arthur Holmes. Petrographic methods and calculations : With some examples of results achieved. Thomas Murby & Company, 1921. (Cité en page 119.)
- [Horie 2013] Masanori Horie, Haruhisa Kato et Hitoshi Iwahashi. *Cellular effects of manufactured nanoparticles : effect of adsorption ability of nanoparticles*. Archives of toxicology, vol. 87, no. 5, pages 771–781, 2013. (Cité en page 37.)
- [Howes 2010] Mark T Howes, Matthew Kirkham, James Riches, Katia Cortese, Piers J Walser, Fiona Simpson, Michelle M Hill, Alun Jones, Richard Lundmark, Margaret R Lindsay *et al.* *Clathrin-independent carriers form a high capacity endocytic sorting system at the leading edge of migrating cells*. The Journal of cell biology, vol. 190, no. 4, pages 675–691, 2010. (Cité en pages 9, 15 et 16.)
- [Hughson 1996] ELAINE J Hughson et ROBERT P Hirt. *Assessment of cell polarity*. Oxford University Press, Oxford, vol. 37, page 66, 1996. (Cité en pages 19 et 20.)
- [Hunziker 1998] Walter Hunziker et Jean-Pierre Kraehenbuhl. *Epithelial transcytosis of immunoglobulins*. Journal of mammary gland biology and neoplasia, vol. 3, no. 3, pages 287–302, 1998. (Cité en page 17.)
- [Imada 1987] Masato Imada, Haruyuki Tatsumi et Hisao Fujita. *Scanning electron microscopy of vascular architecture in the gastric mucosa of the golden hamster*. Cell and tissue research, vol. 250, no. 2, pages 287–293, 1987. (Cité en page 5.)
- [Iversen 2011] Tore-Geir Iversen, Tore Skotland et Kirsten Sandvig. *Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles : present knowledge and need for future studies*. Nano Today, vol. 6, no. 2, pages 176–185, 2011. (Cité en page 40.)
- [Jain 2001] Rakesh K Jain. *Delivery of molecular medicine to solid tumors : lessons from in vivo imaging of gene expression and function*. Journal of controlled release, vol. 74, no. 1, pages 7–25, 2001. (Cité en page 34.)
- [Jiménez 2009] Nuria Jiménez, Karin Vocking, Elly G van Donselaar, Bruno M Humbel, Jan A Post et Arie J Verkleij. *Tannic acid-mediated osmium impregnation after freeze-substitution : a strategy to enhance membrane contrast for electron tomography*. Journal of structural biology, vol. 166, no. 1, pages 103–106, 2009. (Cité en page 84.)
- [Jo 2012] Dong Hyun Jo, Jin Hyoung Kim, Young Suk Yu, Tae Geol Lee et Jeong Hun Kim. *Antiangiogenic effect of silicate nanoparticle on retinal neovascularization induced by vascular endothelial growth factor*. Nanomedicine : Nanotechnology, Biology and Medicine, vol. 8, no. 5, pages 784–791, 2012. (Cité en page 42.)
- [Jongstra-Bilen 2006] Jenny Jongstra-Bilen, Mehran Haidari, Su-Ning Zhu, Mian Chen, Daipayan Guha et Myron I Cybulsky. *Low-grade chronic inflammation in regions of the normal mouse arterial intima predisposed to atherosclerosis*. The Journal of experimental medicine, vol. 203, no. 9, pages 2073–2083, 2006. (Cité en page 23.)
- [JosephJerry 2009] D JosephJerry *et al.* *Stability, toxicity and differential cellular uptake of protein passivated-Fe₃O₄ nanoparticles*. Journal of Materials Chemistry, vol. 19, no. 35, pages 6328–6331, 2009. (Cité en page 68.)
- [Kalia 2006] Manjula Kalia, Sudha Kumari, Rahul Chadda, Michelle M Hill, Robert G Parton et Satyajit Mayor. *Arf6-independent GPI-anchored protein-enriched early endosomal compartments*

- fuse with sorting endosomes via a Rab5/phosphatidylinositol-3-kinase-dependent machinery.* Molecular biology of the cell, vol. 17, no. 8, pages 3689–3704, 2006. (Cité en page 16.)
- [Kermanizadeh 2011] Ali Kermanizadeh, Giulio Pojana, Birgit K Gaiser, Renie Birkedal, Dagmar Bilanicova, Haakan Wallin, Keld Alstrup Jensen, Borje Sellergren, Gary R Hutchison, Antonio Marcomini et al. *In vitro assessment of engineered nanomaterials using a hepatocyte cell line : cytotoxicity, pro-inflammatory cytokines and functional markers.* Nanotoxicology, vol. 7, no. 3, pages 301–313, 2011. (Cité en page 37.)
- [Kim 2012] Jong Ah Kim, Christoffer Aberg, Anna Salvati et Kenneth A Dawson. *Role of cell cycle on the cellular uptake and dilution of nanoparticles in a cell population.* Nature nanotechnology, vol. 7, no. 1, pages 62–68, 2012. (Cité en page 68.)
- [Kincer 2002] Jeanie F Kincer, Annette Uittenbogaard, James Dressman, Theresa M Guerin, Maria Febbraio, Ling Guo et Eric J Smart. *Hypercholesterolemia promotes a CD36-dependent and endothelial nitric-oxide synthase-mediated vascular dysfunction.* Journal of Biological Chemistry, vol. 277, no. 26, pages 23525–23533, 2002. (Cité en page 27.)
- [Kirkham 2005] Matthew Kirkham, Akikazu Fujita, Rahul Chadda, Susan J Nixon, Teymuras V Kurzchalia, Deepak K Sharma, Richard E Pagano, John F Hancock, Satyajit Mayor et Robert G Parton. *Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles.* The Journal of cell biology, vol. 168, no. 3, pages 465–476, 2005. (Cité en page 16.)
- [Kirpotin 2006] Dmitri B Kirpotin, Daryl C Drummond, Yi Shao, M Refaat Shalaby, Keelung Hong, Ulrik B Nielsen, James D Marks, Christopher C Benz et John W Park. *Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models.* Cancer research, vol. 66, no. 13, pages 6732–6740, 2006. (Cité en page 36.)
- [Knowles 1984] DM II Knowles, B Tolidjian, C Marboe, V Dagati, M Grimes et L Chess. *Monoclonal anti-human monocyte antibodies OKM1 and OKM5 possess distinctive tissue distributions including differential reactivity with vascular endothelium.* The Journal of immunology, vol. 132, no. 5, pages 2170–2173, 1984. (Cité en page 27.)
- [Koivusalo 2010] Mirkka Koivusalo, Christopher Welch, Hisayoshi Hayashi, Cameron C Scott, Moshe Kim, Todd Alexander, Nicolas Touret, Klaus M Hahn et Sergio Grinstein. *Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling.* The Journal of cell biology, vol. 188, no. 4, pages 547–563, 2010. (Cité en page 74.)
- [Krauss 1982] Ronald M Krauss et David J Burke. *Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans.* Journal of lipid research, vol. 23, no. 1, pages 97–104, 1982. (Cité en page 24.)
- [Krendel 2007] Mira Krendel, Emily K Osterweil et Mark S Mooseker. *Myosin 1E interacts with synaptojanin-1 and dynamin and is involved in endocytosis.* FEBS letters, vol. 581, no. 4, pages 644–650, 2007. (Cité en page 12.)
- [Kreuter 2007] Jorg Kreuter. *Nanoparticles, an historical perspective.* International Journal of Pharmaceutics, vol. 331, no. 1, pages 1–10, 2007. (Cité en page 31.)
- [Lacorre 2004] Delphine-Armelle Lacorre, Espen S Baekkevold, Ignacio Garrido, Per Brandtzaeg, Guttorm Haraldsen, François Amalric et Jean-Philippe Girard. *Plasticity of endothelial cells :*

- rapid dedifferentiation of freshly isolated high endothelial venule endothelial cells outside the lymphoid tissue microenvironment.* Blood, vol. 103, no. 11, pages 4164–4172, 2004. (Cité en page 19.)
- [Lakowicz 2000] Joseph R Lakowicz, Ignacy Gryczynski, Zygmunt Gryczynski, Kazimierz Nowaczyk et Catherine J Murphy. *Time-resolved spectral observations of cadmium-enriched cadmium sulfide nanoparticles and the effects of DNA oligomer binding.* Analytical biochemistry, vol. 280, no. 1, pages 128–136, 2000. (Cité en page 33.)
- [Lamaze 2001] Christophe Lamaze, Annick Dujeancourt, Takeshi Baba, Charles G Lo, Alexandre Benmerah et Alice Dautry-Varsat. *Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway.* Molecular cell, vol. 7, no. 3, pages 661–671, 2001. (Cité en page 15.)
- [Le Bihan 2009] Olivier Le Bihan, Pierre Bonnafous, Laszlo Marak, Thomas Bickel, Sylvain Trépout, Stéphane Mornet, Felix De Haas, Hugues Talbot, Jean-Christophe Taveau et Olivier Lambert. *Cryo-electron tomography of nanoparticle transmigration into liposome.* Journal of structural biology, vol. 168, no. 3, pages 419–425, 2009. (Cité en page 39.)
- [Lesniak 2012] Anna Lesniak, Federico Fenaroli, Marco P Monopoli, Christoffer Åberg, Kenneth A Dawson et Anna Salvati. *Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells.* ACS nano, vol. 6, no. 7, pages 5845–5857, 2012. (Cité en pages 66, 68 et 106.)
- [Lewis 1931] Warren H Lewis. *Pinocytosis.* Bull. Johns Hopkins Hosp, vol. 49, no. 17-27, pages 1–6, 1931. (Cité en page 9.)
- [Li 1993] Hongmei Li, Myron I Cybulsky, MA Gimbrone et Peter Libby. *An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium.* Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, vol. 13, no. 2, pages 197–204, 1993. (Cité en page 24.)
- [Li 2009] Shyh-Dar Li et Leaf Huang. *Nanoparticles evading the reticuloendothelial system : role of the supported bilayer.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, vol. 1788, no. 10, pages 2259–2266, 2009. (Cité en page 35.)
- [Li 2013] Yuhui Li, Guoyou Huang, Xiaohui Zhang, Lin Wang, Yanan Du, Tian Jian Lu et Feng Xu. *Engineering cell alignment in vitro.* Biotechnology advances, 2013. (Cité en page 140.)
- [Libby 2002] Peter Libby, Paul M Ridker et Attilio Maseri. *Inflammation and atherosclerosis.* Circulation, vol. 105, no. 9, pages 1135–1143, 2002. (Cité en pages 22 et 24.)
- [Libby 2011] Peter Libby, Paul M Ridker et Göran K Hansson. *Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis.* Nature, vol. 473, no. 7347, pages 317–325, 2011. (Cité en page 22.)
- [Lim 2011] Jet Phey Lim et Paul A Gleeson. *Macropinocytosis : an endocytic pathway for internalising large gulps.* Immunology and cell biology, vol. 89, no. 8, pages 836–843, 2011. (Cité en page 10.)
- [Lisanti 1995] Michael P Lisanti, ZhaoLan Tang, Philipp E Scherer, Eric Kübler, Anthony J Koleske et Massimo Sargiacomo. *Caveolae, transmembrane signalling and cellular transformation.* Molecular membrane biology, vol. 12, no. 1, pages 121–124, 1995. (Cité en page 13.)

- [Liu 2002] Yi Liu, Benjamin P-C Chen, Min Lu, Yi Zhu, Michael B Stemberman, Shu Chien et John Y-J Shyy. *Shear stress activation of SREBP1 in endothelial cells is mediated by integrins*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 22, no. 1, pages 76–81, 2002. (Cité en page 29.)
- [Lovric 2005a] Jasmina Lovric, Hassan S Bazzi, Yan Cuie, Genevieve RA Fortin, Françoise M Winnik et Dusica Maysinger. *Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots*. *Journal of Molecular Medicine*, vol. 83, no. 5, pages 377–385, 2005. (Cité en page 36.)
- [Lovric 2005b] Jasmina Lovric, Sung Ju Cho, Françoise M Winnik et Dusica Maysinger. *Unmodified cadmium telluride quantum dots induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death*. *Chemistry and biology*, vol. 12, no. 11, pages 1227–1234, 2005. (Cité en page 36.)
- [Mah 2000] C Mah, I Zolotukhin, TJ Fraites, J Dobson, C Batich et BJ Byrne. *Microsphere-mediated delivery of recombinant AAV vectors in vitro and in vivo*. *Mol Ther*, vol. 1, page S239, 2000. (Cité en page 32.)
- [Mahnke 2000] Karsten Mahnke, Ming Guo, Sena Lee, Homero Sepulveda, Suzy L Swain, Michel Nussenzweig et Ralph M Steinman. *The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments*. *The Journal of cell biology*, vol. 151, no. 3, pages 673–684, 2000. (Cité en page 6.)
- [Malek 1999] Adel M Malek, Seth L Alper et Seigo Izumo. *Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis*. *Jama*, vol. 282, no. 21, pages 2035–2042, 1999. (Cité en page 29.)
- [Malugin 2010] Alexander Malugin, Hamidreza Ghandehari et al. *Cellular uptake and toxicity of gold nanoparticles in prostate cancer cells : a comparative study of rods and spheres*. *Journal of Applied Toxicology*, vol. 30, no. 3, pages 212–217, 2010. (Cité en page 36.)
- [Marleau 2005] Sylvie Marleau, Diala Harb, Kim Bujold, Roberta Avallone, Khadija Iken, Yanfei Wang, Annie Demers, Martin G Sirois, Maria Febbraio, Roy L Silverstein et al. *EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions*. *The FASEB journal*, vol. 19, no. 13, pages 1869–1871, 2005. (Cité en page 27.)
- [Matsumura 1986] Yasuhiro Matsumura et Hiroshi Maeda. *A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy : mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs*. *Cancer research*, vol. 46, no. 12 Part 1, pages 6387–6392, 1986. (Cité en page 36.)
- [Mayhew 1983] TM Mayhew. *Stereology : progress in quantitative microscopical anatomy*. *Progress in anatomy*, vol. 3, pages 81–112, 1983. (Cité en page 115.)
- [Mayor 2007] Satyajit Mayor et Richard E Pagano. *Pathways of clathrin-independent endocytosis*. *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 8, no. 8, pages 603–612, 2007. (Cité en pages 8 et 15.)
- [McClay 1998] David R McClay et Philip L Hertzler. *Quantitative measurement of cell adhesion using centrifugal force*. *Current Protocols in Cell Biology*, pages 9–2, 1998. (Cité en page 88.)

- [McNally 2003] J Scott McNally, Michael E Davis, Don P Giddens, Aniket Saha, Jinah Hwang, Sergey Dikalov, Hanjoong Jo et David G Harrison. *Role of xanthine oxidoreductase and NAD (P) H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, vol. 285, no. 6, pages H2290–H2297, 2003. (Cité en page 29.)
- [Medarova 2007] Zdravka Medarova, Wellington Pham, Christian Farrar, Victoria Petkova et Anna Moore. *In vivo imaging of siRNA delivery and silencing in tumors*. Nature medicine, vol. 13, no. 3, pages 372–377, 2007. (Cité en page 34.)
- [Mehta 1998] JL Mehta et DY Li. *Identification and autoregulation of receptor for OX-LDL in cultured human coronary artery endothelial cells*. Biochemical and biophysical research communications, vol. 248, no. 3, pages 511–514, 1998. (Cité en page 27.)
- [Mehta 2006] Dolly Mehta et Asrar B Malik. *Signaling mechanisms regulating endothelial permeability*. Physiological reviews, vol. 86, no. 1, pages 279–367, 2006. (Cité en page 4.)
- [Meier 2002] Oliver Meier, Karin Boucke, Silvija Vig Hammer, Stephan Keller, Robert P Stidwill, Silvio Hemmi et Urs F Greber. *Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake*. The Journal of cell biology, vol. 158, no. 6, pages 1119–1131, 2002. (Cité en page 10.)
- [Mercer 2009] Jason Mercer et Ari Helenius. *Virus entry by macropinocytosis*. Nature cell biology, vol. 11, no. 5, pages 510–520, 2009. (Cité en page 6.)
- [Milici 1987] AJ Milici, NE Watrous, H Stukenbrok et GE Palade. *Transcytosis of albumin in capillary endothelium*. The Journal of cell biology, vol. 105, no. 6, pages 2603–2612, 1987. (Cité en page 19.)
- [Molday 1982] Robert S Molday et Donald Mackenzie. *Immunospecific ferromagnetic iron-dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells*. Journal of immunological methods, vol. 52, no. 3, pages 353–367, 1982. (Cité en page 32.)
- [Moore 2006] Kathryn J Moore et Mason W Freeman. *Scavenger receptors in atherosclerosis beyond lipid uptake*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, vol. 26, no. 8, pages 1702–1711, 2006. (Cité en page 27.)
- [Moriwaki 1998] Hideaki Moriwaki, Noriaki Kume, Tatsuya Sawamura, Takuma Aoyama, Hajime Hoshikawa, Hiroshi Ochi, Eiichiro Nishi, Tomoh Masaki et Toru Kita. *Ligand specificity of LOX-1, a novel endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, vol. 18, no. 10, pages 1541–1547, 1998. (Cité en page 27.)
- [Mornet 2005] Stéphane Mornet, Olivier Lambert, Etienne Duguet et Alain Brisson. *The formation of supported lipid bilayers on silica nanoparticles revealed by cryoelectron microscopy*. Nano Letters, vol. 5, no. 2, pages 281–285, 2005. (Cité en page 39.)
- [Muhlfeld 2007] Christian Muhlfeld, Terry M Mayhew, Peter Gehr et Barbara Rothen-Rutishauser. *A novel quantitative method for analyzing the distributions of nanoparticles between different tissue and intracellular compartments*. Journal of Aerosol Medicine, vol. 20, no. 4, pages 395–407, 2007. (Cité en pages 107 et 139.)
- [Murase 1998] Takatoshi Murase, Noriaki Kume, Risa Korenaga, Joji Ando, Tatsuya Sawamura, Tomoh Masaki et Toru Kita. *Fluid shear stress transcriptionally induces lectin-like oxidized*

- LDL receptor-1 in vascular endothelial cells*. *Circulation research*, vol. 83, no. 3, pages 328–333, 1998. (Cité en page 27.)
- [Naka 2003] Kensuke Naka, Hideaki Itoh, Yoshihiro Tampo et Yoshiki Chujo. *Effect of Gold Nanoparticles as a Support for the Oligomerization of L-Cysteine in an Aqueous Solution*. *Langmuir*, vol. 19, no. 13, pages 5546–5549, 2003. (Cité en page 33.)
- [Nakashima 2007] Yutaka Nakashima, Hiroshi Fujii, Shinji Sumiyoshi, Thomas N Wight et Katsuo Sueishi. *Early human atherosclerosis accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration*. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol. 27, no. 5, pages 1159–1165, 2007. (Cité en page 24.)
- [Napierska 2009] Dorota Napierska, Leen CJ Thomassen, Virginie Rabolli, Dominique Lison, Laetitia Gonzalez, Micheline Kirsch-Volders, Johan A Martens et Peter H Hoet. *Size-Dependent Cytotoxicity of Monodisperse Silica Nanoparticles in Human Endothelial Cells*. *Small*, vol. 5, no. 7, pages 846–853, 2009. (Cité en pages 37 et 42.)
- [Napierska 2010] Dorota Napierska, LC Thomassen, Dominique Lison, Johan A Martens, Peter H Hoet et al. *The nanosilica hazard : another variable entity*. *Part Fibre Toxicol*, vol. 7, no. 1, page 39, 2010. (Cité en page 40.)
- [Napierska 2012] Dorota Napierska, Leen CJ Thomassen, Bart Vanaudenaerde, Katrien Luyts, Dominique Lison, Johan A Martens, Benoit Nemery et Peter HM Hoet. *Cytokine production by co-cultures exposed to monodisperse amorphous silica nanoparticles : the role of size and surface area*. *Toxicology letters*, vol. 211, no. 2, pages 98–104, 2012. (Cité en page 42.)
- [Napierska 2013] Dorota Napierska, Rozenn Quarck, Leen CJ Thomassen, Dominique Lison, Johan A Martens, Marion Delcroix, Benoit Nemery et Peter H Hoet. *Amorphous Silica Nanoparticles Promote Monocyte Adhesion to Human Endothelial Cells : Size-Dependent Effect*. *Small*, vol. 9, no. 3, pages 430–438, 2013. (Cité en page 42.)
- [Napper 1977] D.H Napper. *Steric stabilization*. *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 58, no. 2, pages 390 – 407, 1977. (Cité en page 31.)
- [Nel 2006] Andre Nel, Tian Xia, Lutz Mädler et Ning Li. *Toxic potential of materials at the nanolevel*. *Science*, vol. 311, no. 5761, pages 622–627, 2006. (Cité en page 36.)
- [Neutra 1996] Marian R Neutra, Andreas Frey et Jean-Pierre Kraehenbuhl. *Epithelial M cells : gateways for mucosal infection and immunization*. *Cell*, vol. 86, no. 3, pages 345–348, 1996. (Cité en page 17.)
- [Ogawa 1993] Kazushige Ogawa, Tomoyoshi Watabe et Kazuyuki Taniguchi. *Transport pathways for macromolecules in the aortic endothelium : I. Transendothelial channels revealed by three-dimensional reconstruction using serial sections*. *The Anatomical Record*, vol. 236, no. 4, pages 653–663, 1993. (Cité en page 18.)
- [Oh 1998] Phil Oh, Deirdre P McIntosh et Jan E Schnitzer. *Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium*. *The Journal of cell biology*, vol. 141, no. 1, pages 101–114, 1998. (Cité en pages 14 et 15.)
- [Oh 2007] Phil Oh, Per Borgström, Halina Witkiewicz, Yan Li, Bengt J Borgström, Adrian Chrastina, Koji Iwata, Kurt R Zinn, Richard Baldwin, Jacqueline E Testa et al. *Live dynamic imaging*

- of caveolae pumping targeted antibody rapidly and specifically across endothelium in the lung.* Nature biotechnology, vol. 25, no. 3, pages 327–337, 2007. (Cité en page 36.)
- [OMS 1958] OMS. *Classification of atherosclerotic lesions : report of a study group [meeting held in Washington, DC from 7 to 11 October 1957].* 1958. (Cité en page 21.)
- [Orr 2005] A Wayne Orr, John M Sanders, Melissa Bevard, Elizabeth Coleman, Ian J Sarembock et Martin Alexander Schwartz. *The subendothelial extracellular matrix modulates NF- κ B activation by flow a potential role in atherosclerosis.* The Journal of cell biology, vol. 169, no. 1, pages 191–202, 2005. (Cité en page 29.)
- [ rtegren 2004] Unn  rtegren, Margareta Karlsson, Natascha Blazic, Maria Blomqvist, Fredrik H Nystrom, Johanna Gustavsson, Pam Fredman et Peter Str lfors. *Lipids and glycosphingolipids in caveolae and surrounding plasma membrane of primary rat adipocytes.* European Journal of Biochemistry, vol. 271, no. 10, pages 2028–2036, 2004. (Cité en page 14.)
- [Owens III 2006] Donald E Owens III et Nicholas A Peppas. *Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles.* International journal of pharmaceutics, vol. 307, no. 1, pages 93–102, 2006. (Cité en page 34.)
- [Palade 1953] GEORGE E Palade. *Fine structure of blood capillaries.* J Appl phys, vol. 24, no. 1, pages 1424–1436, 1953. (Cité en page 4.)
- [Palinski 1989] Wulf Palinski, Michael E Rosenfeld, Seppo Yla-Herttuala, Geoff C Gurtner, Steve S Socher, Susan W Butler, Sampath Parthasarathy, Thomas E Carew, Daniel Steinberg et Joseph L Witztum. *Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo.* Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 86, no. 4, pages 1372–1376, 1989. (Cité en page 25.)
- [Pandey 2013] Ashutosh Pandey, Swati Chandra, Lalit Kumar Singh Chauhan, Gopeshwar Narayan et Debapratim Kar Chowdhuri. *Cellular internalization and stress response of ingested amorphous silica nanoparticles in the midgut of *Drosophila melanogaster*.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, vol. 1830, no. 1, pages 2256–2266, 2013. (Cité en page 37.)
- [Parat 2003] Marie-Odile Parat, Bela Anand-Apte et Paul L Fox. *Differential caveolin-1 polarization in endothelial cells during migration in two and three dimensions.* Molecular biology of the cell, vol. 14, no. 8, pages 3156–3168, 2003. (Cité en page 135.)
- [Park 2009] Eun-Jung Park et Kwangsik Park. *Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro.* Toxicology letters, vol. 184, no. 1, pages 18–25, 2009. (Cité en page 37.)
- [Partlow 2008] Kathryn C Partlow, Gregory M Lanza et Samuel A Wickline. *Exploiting lipid raft transport with membrane targeted nanoparticles : a strategy for cytosolic drug delivery.* Biomaterials, vol. 29, no. 23, pages 3367–3375, 2008. (Cité en page 74.)
- [Parton 2007] Robert G Parton et Kai Simons. *The multiple faces of caveolae.* Nature reviews Molecular cell biology, vol. 8, no. 3, pages 185–194, 2007. (Cité en page 14.)
- [Patel 2010] Pinal C Patel, David A Giljohann, Weston L Daniel, Dan Zheng, Andrew E Prigodich et Chad A Mirkin. *Scavenger receptors mediate cellular uptake of polyvalent oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles.* Bioconjugate chemistry, vol. 21, no. 12, pages 2250–2256, 2010. (Cité en page 68.)

- [Pelkmans 2001] Lucas Pelkmans, Jürgen Kartenbeck et Ari Helenius. *Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER*. *Nature cell biology*, vol. 3, no. 5, pages 473–483, 2001. (Cité en pages 13 et 14.)
- [Pelkmans 2004] Lucas Pelkmans, Thomas Bürli, Marino Zerial et Ari Helenius. *Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic*. *Cell*, vol. 118, no. 6, pages 767–780, 2004. (Cité en page 14.)
- [Pelkmans 2005] Lucas Pelkmans et Marino Zerial. *Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae*. *Nature*, vol. 436, no. 7047, pages 128–133, 2005. (Cité en page 13.)
- [Peters 1985] Klaus-Ruediger Peters, William W Carley et George E Palade. *Endothelial plasma-membral vesicles have a characteristic striped bipolar surface structure*. *The Journal of cell biology*, vol. 101, no. 6, pages 2233–2238, 1985. (Cité en page 13.)
- [Peters 2004] Kirsten Peters, Ronald E Unger, C James Kirkpatrick, Antonietta M Gatti et Emanuela Monari. *Effects of nano-scaled particles on endothelial cell function in vitro : studies on viability, proliferation and inflammation*. *Journal of Materials Science : Materials in Medicine*, vol. 15, no. 4, pages 321–325, 2004. (Cité en page 42.)
- [Pirolo 2008] Kathleen F Pirolo et Esther H Chang. *Does a targeting ligand influence nanoparticle tumor localization or uptake ?* *Trends in biotechnology*, vol. 26, no. 10, pages 552–558, 2008. (Cité en page 36.)
- [Podrez 2007] Eugene A Podrez, Tatiana V Byzova, Maria Febbraio, Robert G Salomon, Yi Ma, Manojkumar Valiyaveetil, Eugenia Poliakov, Mingjiang Sun, Paula J Finton, Brian R Curtiset al. *Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype*. *Nature medicine*, vol. 13, no. 9, pages 1086–1095, 2007. (Cité en page 27.)
- [Pol 2000] Albert Pol, Albert Lu, Mònica Pons, Sandra Peiró et Carlos Enrich. *Epidermal Growth Factor-mediated Caveolin Recruitment to Early Endosomes and MAPK Activation ROLE OF CHOLESTEROL AND ACTIN CYTOSKELETON*. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 39, pages 30566–30572, 2000. (Cité en page 14.)
- [Puri 2001] Vishwajeet Puri, Rikio Watanabe, Raman Deep Singh, Michel Dominguez, Jennifer C Brown, Christine L Wheatley, David L Marks et Richard E Pagano. *Clathrin-dependent and-independent internalization of plasma membrane sphingolipids initiates two Golgi targeting pathways*. *The Journal of cell biology*, vol. 154, no. 3, pages 535–548, 2001. (Cité en page 74.)
- [Quignard 2012] Sandrine Quignard, Gervaise Mosser, Michel Boissiere et Thibaud Coradin. *Long-term fate of silica nanoparticles interacting with human dermal fibroblasts*. *Biomaterials*, vol. 33, no. 17, pages 4431–4442, 2012. (Cité en page 68.)
- [Radhakrishna 1997] Harish Radhakrishna et Julie G Donaldson. *ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway*. *The Journal of cell biology*, vol. 139, no. 1, pages 49–61, 1997. (Cité en page 15.)
- [Ragnai 2011] Michelle Nic Ragnai, Meredith Brown, Dong Ye, Mattia Bramini, Sean Callanan, Iseult Lynch et Kenneth A Dawson. *Internal benchmarking of a human blood-brain barrier cell model for screening of nanoparticle uptake and transcytosis*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 77, no. 3, pages 360–367, 2011. (Cité en page 42.)

- [Razani 2002] Babak Razani, Xiao Bo Wang, Jeffery A Engelman, Michela Battista, Guy Lagaud, Xiao Lan Zhang, Burkhard Kneitz, Harry Hou, George J Christ, Winfried Edelmann *et al.* *Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae.* *Molecular and cellular biology*, vol. 22, no. 7, pages 2329–2344, 2002. (Cité en page 13.)
- [Rizzo 2003] Victor Rizzo, Christine Morton, Natacha DePaola, Jan E Schnitzer et Peter F Davies. *Recruitment of endothelial caveolae into mechanotransduction pathways by flow conditioning in vitro.* *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 285, no. 4, pages H1720–H1729, 2003. (Cité en page 135.)
- [Roberts 1995] W Gregory Roberts et George E Palade. *Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor.* *Journal of Cell Science*, vol. 108, no. 6, pages 2369–2379, 1995. (Cité en page 19.)
- [Ronn 2000] Lars CB Ronn, Igor Ralets, Barbara P Hartz, Morten Bech, Anton Berezin, Vladimir Berezin, Arne Moller et Elisabeth Bock. *A simple procedure for quantification of neurite outgrowth based on stereological principles.* *Journal of neuroscience methods*, vol. 100, no. 1, pages 25–32, 2000. (Cité en page 117.)
- [Roser 1998] Marianne Roser, Dagmar Fischer et Thomas Kissel. *Surface-modified biodegradable albumin nano-and microspheres. II : effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats.* *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, vol. 46, no. 3, pages 255–263, 1998. (Cité en page 35.)
- [Rothberg 1992] Karen G Rothberg, John E Heuser, William C Donzell, Yun-Shu Ying, John R Glenney et Richard GW Anderson. *Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats.* *Cell*, vol. 68, no. 4, pages 673–682, 1992. (Cité en page 13.)
- [Rothen-Rutishauser 2006] Barbara M Rothen-Rutishauser, Samuel Sch urch, Beat Haenni, Nadine Kapp et Peter Gehr. *Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with advanced microscopic techniques.* *Environmental science & technology*, vol. 40, no. 14, pages 4353–4359, 2006. (Cité en page 38.)
- [Rothen-Rutishauser 2014] Barbara Rothen-Rutishauser, Dagmar A Kuhn, Zulqurnain Ali, Michael Gasser, Faheem Amin, Wolfgang J Parak, Dimitri Vanhecke, Alke Fink, Peter Gehr et Christina Brandenberger. *Quantification of gold nanoparticle cell uptake under controlled biological conditions and adequate resolution.* *Nanomedicine*, vol. 9, no. 5, pages 607–621, 2014. (Cité en pages 107 et 139.)
- [Roux 2006] Aurélien Roux, Katherine Uyhazi, Adam Frost et Pietro De Camilli. *GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission.* *Nature*, vol. 441, no. 7092, pages 528–531, 2006. (Cité en page 12.)
- [Russell-Jones 1998] Gregory J Russell-Jones. *Use of Vitamin B12 Conjugates to Deliver Protein Drugs by the Oral Route.* *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, vol. 15, no. 6, 1998. (Cité en page 17.)
- [Sabatini 1963] David D Sabatini, Klaus Bensch et Russell J Barrnett. *Cytochemistry and electron microscopy The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation.* *The Journal of cell biology*, vol. 17, no. 1, pages 19–58, 1963. (Cité en page 80.)

- [Sabharanjak 2002] Shefali Sabharanjak, Pranav Sharma, Robert G Parton et Satyajit Mayor. *GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytotic pathway*. *Developmental cell*, vol. 2, no. 4, pages 411–423, 2002. (Cité en pages 15 et 16.)
- [Samuel 2012] Stephen Paul Samuel, Namrata Jain, Frank O'Dowd, Toby Paul, Dmitry Kashanin, Valerie A Gerard, Yurii K Gun'ko, Adriale Prina-Mello et Yuri Volkov. *Multifactorial determinants that govern nanoparticle uptake by human endothelial cells under flow*. *International journal of nanomedicine*, vol. 7, page 2943, 2012. (Cité en page 42.)
- [Sandvig 1990] Kirsten Sandvig et B Van Deurs. *Selective modulation of the endocytic uptake of ricin and fluid phase markers without alteration in transferrin endocytosis*. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 265, no. 11, pages 6382–6388, 1990. (Cité en page 8.)
- [Sandvig 2005] Kirsten Sandvig et Bo van Deurs. *Delivery into cells : lessons learned from plant and bacterial toxins*. *Gene therapy*, vol. 12, no. 11, pages 865–872, 2005. (Cité en page 40.)
- [Sanvicens 2008] Nuria Sanvicens et M Pilar Marco. *Multifunctional nanoparticles—properties and prospects for their use in human medicine*. *Trends in biotechnology*, vol. 26, no. 8, pages 425–433, 2008. (Cité en page 32.)
- [Sayes 2005] Christie M Sayes, Andre M Gobin, Kevin D Ausman, Joe Mendez, Jennifer L West et Vicki L Colvin. *Nano-C60 cytotoxicity is due to lipid peroxidation*. *Biomaterials*, vol. 26, no. 36, pages 7587–7595, 2005. (Cité en page 36.)
- [Schnitzer 1988] Jan E Schnitzer, William W Carley et George E Palade. *Albumin interacts specifically with a 60-kDa microvascular endothelial glycoprotein*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 85, no. 18, pages 6773–6777, 1988. (Cité en page 18.)
- [Schnitzer 1994a] Jan E Schnitzer, Phil Oh, Emmett Pinney et Jenny Allard. *Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium : reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules*. *The Journal of cell biology*, vol. 127, no. 5, pages 1217–1232, 1994. (Cité en page 108.)
- [Schnitzer 1994b] JE Schnitzer, A Siflingerbirnboim, PJ DelVecchio et AB Malik. *Segmental differentiation of permeability, protein glycosylation, and morphology of cultured bovine lung vascular endothelium*. *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 199, no. 1, pages 11–19, 1994. (Cité en page 135.)
- [Schubert 2001] William Schubert, Philippe G Frank, Babak Razani, David S Park, Chi-Wing Chow et Michael P Lisanti. *Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo*. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 52, pages 48619–48622, 2001. (Cité en page 26.)
- [Schweitzer 2005] Jill Kuglin Schweitzer, Erin E Burke, Holly V Goodson et Crislyn D'Souza-Schorey. *Endocytosis resumes during late mitosis and is required for cytokinesis*. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 50, pages 41628–41635, 2005. (Cité en page 6.)
- [Segrest 2001] Jere P Segrest, Martin K Jones, Hans De Loof et Nassrin Dashti. *Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins*. *Journal of lipid research*, vol. 42, no. 9, pages 1346–1367, 2001. (Cité en page 24.)

- [Shapero 2011] Kayle Shapero, Federico Fenaroli, Iseult Lynch, David C Cottell, Anna Salvati et Kenneth A Dawson. *Time and space resolved uptake study of silica nanoparticles by human cells*. *Molecular Biosystems*, vol. 7, no. 2, pages 371–378, 2011. (Cité en pages 41, 54, 68 et 140.)
- [Shin 2000] Jeoung-Sook Shin, Zhimin Gao et Soman N Abraham. *Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells*. *Science*, vol. 289, no. 5480, pages 785–788, 2000. (Cité en page 13.)
- [Simionescu 1981a] Maya Simionescu, Nicolae Simionescu, Jeremiah E Silbert et George E Palade. *Differentiated microdomains on the luminal surface of the capillary endothelium. II. Partial characterization of their anionic sites*. *The Journal of cell biology*, vol. 90, no. 3, pages 614–621, 1981. (Cité en page 18.)
- [Simionescu 1981b] N Simionescu. *Transcytosis and traffic of membranes in the endothelial cell*. In *International Cell Biology 1980–1981*, pages 657–672. Springer, 1981. (Cité en page 16.)
- [Simionescu 1981c] Nicolae Simionescu, Maya Simionescu et George E Palade. *Differentiated microdomains on the luminal surface of the capillary endothelium. I. Preferential distribution of anionic sites*. *The Journal of cell biology*, vol. 90, no. 3, pages 605–613, 1981. (Cité en page 18.)
- [Simionescu 1983] NICOLAE Simionescu. *Cellular aspects of transcapillary exchange*. *Physiol Rev*, vol. 63, no. 4, pages 1536–1579, 1983. (Cité en page 4.)
- [Simionescu 1988] Maya Simionescu. *Receptor-mediated transcytosis of plasma molecules by vascular endothelium*. In *Endothelial cell biology in health and disease*, pages 69–104. Springer, 1988. (Cité en page 5.)
- [Simionescu 1990] Maya Simionescu et Nicoale Simionescu. *Endothelial transport of macromolecules : transcytosis and endocytosis. A look from cell biology*. *Cell biology reviews : CBR*, vol. 25, no. 1, pages 5–78, 1990. (Cité en page 7.)
- [Simionescu 2002] Maya Simionescu, Anca Gafencu et Felicia Antohe. *Transcytosis of plasma macromolecules in endothelial cells : a cell biological survey*. *Microscopy research and technique*, vol. 57, no. 5, pages 269–288, 2002. (Cité en pages 7 et 17.)
- [Slowing 2006] Igor Slowing, Brian G Trewyn et Victor S-Y Lin. *Effect of surface functionalization of MCM-41-type mesoporous silica nanoparticles on the endocytosis by human cancer cells*. *Journal of the American Chemical Society*, vol. 128, no. 46, pages 14792–14793, 2006. (Cité en page 66.)
- [Smith 2007] Kurt A Smith, David Jasnow et Anna C Balazs. *Designing synthetic vesicles that engulf nanoscopic particles*. *The Journal of chemical physics*, vol. 127, no. 8, page 084703, 2007. (Cité en page 38.)
- [Smith 2008] Andrew M Smith et Shuming Nie. *Minimizing the hydrodynamic size of quantum dots with multifunctional multidentate polymer ligands*. *Journal of the American Chemical Society*, vol. 130, no. 34, pages 11278–11279, 2008. (Cité en page 35.)
- [Sorkin 2004] Alexander Sorkin. *Cargo recognition during clathrin-mediated endocytosis : a team effort*. *Current opinion in cell biology*, vol. 16, no. 4, pages 392–399, 2004. (Cité en page 11.)

- [Sowa 2003] Grzegorz Sowa, Marc Pypaert, David Fulton et William C Sessa. *The phosphorylation of caveolin-2 on serines 23 and 36 modulates caveolin-1-dependent caveolae formation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 100, no. 11, pages 6511–6516, 2003. (Cité en page 13.)
- [Spudich 2006] Giuletta Spudich, Margarita V Chibalina, Josephine Sui-Yan Au, Susan D Arden, Folma Buss et John Kendrick-Jones. *Myosin VI targeting to clathrin-coated structures and dimerization is mediated by binding to Disabled-2 and PtdIns (4, 5) P2*. Nature cell biology, vol. 9, no. 2, pages 176–183, 2006. (Cité en page 12.)
- [Srivastava 2012] RK Srivastava, Q Rahman, MP Kashyap, AK Singh, G Jain, S Jahan, M Lohani, M Lantow et AB Pant. *Nano-titanium dioxide induces genotoxicity and apoptosis in human lung cancer cell line, A549*. Human and experimental toxicology, page 0960327112462725, 2012. (Cité en page 37.)
- [Stan 2004] Radu V Stan, Eugene Tkachenko et Ingrid R Niesman. *PV1 is a key structural component for the formation of the stomatal and fenestral diaphragms*. Molecular biology of the cell, vol. 15, no. 8, pages 3615–3630, 2004. (Cité en page 13.)
- [Stayton 2009] Isaac Stayton, Jeffrey Winiarz, Katie Shannon et Yinfa Ma. *Study of uptake and loss of silica nanoparticles in living human lung epithelial cells at single cell level*. Analytical and bioanalytical chemistry, vol. 394, no. 6, pages 1595–1608, 2009. (Cité en page 68.)
- [Steinberg 1989] Daniel Steinberg. *The cholesterol controversy is over. Why did it take so long?* Circulation, vol. 80, no. 4, pages 1070–1078, 1989. (Cité en page 23.)
- [Steinbrecher 1999] UrsP Steinbrecher. *Receptors for oxidized low density lipoprotein*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, vol. 1436, no. 3, pages 279–298, 1999. (Cité en page 7.)
- [Stern 2008] Stephan T Stern et Scott E McNeil. *Nanotechnology safety concerns revisited*. Toxicological sciences, vol. 101, no. 1, pages 4–21, 2008. (Cité en page 34.)
- [Sun 2003] RJ Sun, S Muller, FY Zhuang, JF Stoltz et X Wang. *Caveolin-1 redistribution in human endothelial cells induced by laminar flow and cytokine*. Biorheology, vol. 40, no. 1, pages 31–39, 2003. (Cité en page 135.)
- [Tabas 2007] Ira Tabas, Kevin Jon Williams et Jan Boren. *Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis update and therapeutic implications*. Circulation, vol. 116, no. 16, pages 1832–1844, 2007. (Cité en page 21.)
- [Tang 1996] ZhaoLan Tang, Philipp E Scherer, Takashi Okamoto, Kenneth Song, Caryn Chu, D Stave Kohtz, Ikuo Nishimoto, Harvey F Lodish et Michael P Lisanti. *Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle*. Journal of Biological Chemistry, vol. 271, no. 4, pages 2255–2261, 1996. (Cité en page 13.)
- [Tao 2008] Zhimin Tao, Matthew P Morrow, Tewodros Asefa, Krishna K Sharma, Cole Duncan, Abhishek Anan, Harvey S Penefsky, Jerry Goodisman et Abdul-Kader Souid. *Mesoporous silica nanoparticles inhibit cellular respiration*. Nano letters, vol. 8, no. 5, pages 1517–1526, 2008. (Cité en page 37.)
- [Thevenaz 2007] Philippe Thevenaz et Michael Unser. *User-friendly semiautomated assembly of accurate image mosaics in microscopy*. Microscopy research and technique, vol. 70, no. 2, pages 135–146, 2007. (Cité en page 117.)

- [Thompson 1917] Darcy Wentworth Thompson *et al.* *On growth and form*. On growth and form., 1917. (Cité en page 115.)
- [Thorn 2003] Hans Thorn, Karin G Stenkula, Margareta Karlsson, Unn Örtegren, Fredrik H Nystrom, Johanna Gustavsson et Peter Strålfors. *Cell surface orifices of caveolae and localization of caveolin to the necks of caveolae in adipocytes*. *Molecular biology of the cell*, vol. 14, no. 10, pages 3967–3976, 2003. (Cité en page 85.)
- [Thurn 2011] Kenneth T Thurn, Hans Arora, Tatjana Paunesku, Aiguo Wu, Eric Brown, Caroline Doty, Jeff Kremer et Gayle Woloschak. *Endocytosis of titanium dioxide nanoparticles in prostate cancer PC-3M cells*. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 7, no. 2, pages 123–130, 2011. (Cité en page 74.)
- [Tiruppathi 1997] Chinnaswamy Tiruppathi, Wei Song, Magnus Bergenfeldt, Phillip Sass et Asrar B Malik. *Gp60 activation mediates albumin transcytosis in endothelial cells by tyrosine kinase-dependent pathway*. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 41, pages 25968–25975, 1997. (Cité en pages 13 et 18.)
- [Tourovskaja 2014] Anna Tourovskaja, Mark Fauver, Gregory Kramer, Sara Simonson et Thomas Neumann. *Tissue-engineered microenvironment systems for modeling human vasculature*. *Experimental Biology and Medicine*, page 1535370214539228, 2014. (Cité en page 140.)
- [Tran 1987] Dien Tran, Jean-Louis Carpentier, Fumio Sawano, Phillip Gorden et Lelio Orci. *Ligands internalized through coated or noncoated invaginations follow a common intracellular pathway*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 84, no. 22, pages 7957–7961, 1987. (Cité en page 14.)
- [Traub 1998] Oren Traub et Bradford C Berk. *Laminar shear stress mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force*. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol. 18, no. 5, pages 677–685, 1998. (Cité en page 28.)
- [Tricot 2000] Olivier Tricot, Ziad Mallat, Christophe Heymes, Joel Belmin, Guy Leseche et Alain Tedgui. *Relation between endothelial cell apoptosis and blood flow direction in human atherosclerotic plaques*. *Circulation*, vol. 101, no. 21, pages 2450–2453, 2000. (Cité en page 29.)
- [Tuma 2003] Pamela L Tuma et Ann L Hubbard. *Transcytosis : crossing cellular barriers*. *Physiological Reviews*, vol. 83, no. 3, pages 871–932, 2003. (Cité en page 17.)
- [Ungewickell 2007] Ernst J Ungewickell et Lars Hinrichsen. *Endocytosis : clathrin-mediated membrane budding*. *Current opinion in cell biology*, vol. 19, no. 4, pages 417–425, 2007. (Cité en page 12.)
- [Van Amersfoort 1994] Edwin S Van Amersfoort et Jos AG Van Strijp. *Evaluation of a flow cytometric fluorescence quenching assay of phagocytosis of sensitized sheep erythrocytes by polymorphonuclear leukocytes*. *Cytometry*, vol. 17, no. 4, pages 294–301, 1994. (Cité en page 77.)
- [Van Blaaderen 1992] A Van Blaaderen et A Vrij. *Synthesis and characterization of colloidal dispersions of fluorescent, monodisperse silica spheres*. *Langmuir*, vol. 8, no. 12, pages 2921–2931, 1992. (Cité en page 70.)
- [Vasile 1983] Eliza Vasile, Maya Simionescu et Nicolae Simionescu. *Visualization of the binding, endocytosis, and transcytosis of low-density lipoprotein in the arterial endothelium in situ*. *The Journal of cell biology*, vol. 96, no. 6, pages 1677–1689, 1983. (Cité en pages 23 et 26.)

- [Veerana 2012] Srivani Veerana, Aby Cheruvathoor Poulouse, Sheikh Mohamed, Athulya Aravind, Yutaka Nagaoka, Yasuhiko Yoshida, Toru Maekawa et D Sakthi Kumar. *FITC labeled silica nanoparticles as efficient cell tags : Uptake and photostability study in endothelial cells*. Journal of fluorescence, vol. 22, no. 2, pages 537–548, 2012. (Cité en page 42.)
- [Verwey 1948] Evert Johannes Willem Verwey, Jan Theodoor Gerard Overbeek et K Van Nes. Theory of the stability of lyophobic colloids : the interaction of sol particles having an electric double layer. Elsevier New York, 1948. (Cité en page 31.)
- [Villars 1996] F Villars, V Conrad, F Rouais, F Lefebvre, J Amedee et L Bordenave. *Ability of various inserts to promote endothelium cell culture for the establishment of coculture models*. Cell biology and toxicology, vol. 12, no. 4-6, pages 207–214, 1996. (Cité en page 19.)
- [Vogel 2001] Stephen M Vogel, Richard D Minshall, Milena Pilipovi , Chinnaswamy Tiruppathi et Asrar B Malik. *Albumin uptake and transcytosis in endothelial cells in vivo induced by albumin-binding protein*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, vol. 281, no. 6, pages L1512–L1522, 2001. (Cité en page 18.)
- [von Eckardstein 2009] Arnold von Eckardstein et Lucia Rohrer. *Transendothelial lipoprotein transport and regulation of endothelial permeability and integrity by lipoproteins*. Current opinion in lipidology, vol. 20, no. 3, pages 197–205, 2009. (Cité en page 5.)
- [Walczyk 2010] Dorota Walczyk, Francesca Baldelli Bombelli, Marco P Monopoli, Iseult Lynch et Kenneth A Dawson. *What the cell sees in bionanoscience*. Journal of the American Chemical Society, vol. 132, no. 16, pages 5761–5768, 2010. (Cité en page 35.)
- [Wang 1993] Li-Hsien Wang, Karen G Rothberg et RG Anderson. *Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation*. The Journal of cell biology, vol. 123, no. 5, pages 1107–1117, 1993. (Cité en pages 13 et 74.)
- [Wang 2003] Joseph Wang. *Nanoparticle-based electrochemical DNA detection*. Analytica Chimica Acta, vol. 500, no. 1, pages 247–257, 2003. (Cité en page 33.)
- [Wang 2009] Zhenjia Wang, Chinnaswamy Tiruppathi, Richard D Minshall et Asrar B Malik. *Size and dynamics of caveolae studied using nanoparticles in living endothelial cells*. ACS nano, vol. 3, no. 12, pages 4110–4116, 2009. (Cité en page 107.)
- [Weibel 1964] Ewald R Weibel et George E Palade. *New cytoplasmic components in arterial endothelia*. The Journal of Cell Biology, vol. 23, no. 1, pages 101–112, 1964. (Cité en page 4.)
- [Weibel 1978] Ewald R Weibel et Dagmar Paumgartner. *Integrated stereological and biochemical studies on hepatocytic membranes. II. Correction of section thickness effect on volume and surface density estimates*. The Journal of cell biology, vol. 77, no. 2, pages 584–597, 1978. (Cité en page 119.)
- [Weissleder 1990] R Weissleder, G Elizondo, J Wittenberg, CA Rabito, HH Bengel et L Josephson. *Ultrasmall superparamagnetic iron oxide : characterization of a new class of contrast agents for MR imaging*. Radiology, vol. 175, no. 2, pages 489–493, 1990. (Cité en page 32.)
- [West 2000] Michele A West, Alan R Prescott, Eeva-Liisa Eskelinen, Anne J Ridley et Colin Watts. *Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation*. Current Biology, vol. 10, no. 14, pages 839–848, 2000. (Cité en page 10.)

- [Williams 2005] Terence M Williams et Michael P Lisanti. *Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, vol. 288, no. 3, pages C494–C506, 2005. (Cité en page 13.)
- [Wolcott 2006] Abraham Wolcott, Daniele Gerion, Micah Visconte, Jia Sun, Adam Schwartzberg, Shaowei Chen et Jin Z Zhang. *Silica-coated CdTe quantum dots functionalized with thiols for bioconjugation to IgG proteins*. The Journal of Physical Chemistry B, vol. 110, no. 11, pages 5779–5789, 2006. (Cité en page 32.)
- [Wolinsky 1980] HARVEY Wolinsky et al. *A proposal linking clearance of circulating lipoproteins to tissue metabolic activity as a basis for understanding atherogenesis*. Circulation research, vol. 47, no. 3, pages 301–311, 1980. (Cité en page 4.)
- [Yamada 1955] Eichi Yamada. *The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse*. The Journal of biophysical and biochemical cytology, vol. 1, no. 5, page 445, 1955. (Cité en page 4.)
- [Yang 2007] Jaemoon Yang, Choong-Hwan Lee, Hyun-Ju Ko, Jin-Suck Suh, Ho-Geun Yoon, Kwangyeol Lee, Yong-Min Huh et Seungjoo Haam. *Multifunctional Magneto-Polymeric Nano-hybrids for Targeted Detection and Synergistic Therapeutic Effects on Breast Cancer*. Angewandte Chemie International Edition, vol. 46, no. 46, pages 8836–8839, 2007. (Cité en page 34.)
- [Yang 2009] Hong Yang, Qiuyun Wu, Meng Tang, Lu Kong et Zuhong Lu. *Cell membrane injury induced by silica nanoparticles in mouse macrophage*. Journal of biomedical nanotechnology, vol. 5, no. 5, pages 528–535, 2009. (Cité en page 37.)
- [Yang 2013] Hong Yang, Fenglong Zhao, Ying Li, Mingming Xu, Li Li, Chunhui Wu, Hirokazu Miyoshi et Yiyao Liu. *VCAM-1-targeted core-shell nanoparticles for selective adhesion and delivery to endothelial cells with lipopolysaccharide-induced inflammation under shear flow and cellular magnetic resonance imaging in vitro*. International journal of nanomedicine, vol. 8, page 1897, 2013. (Cité en page 42.)
- [Ye 2010] Yiyi Ye, Jianwen Liu, Jianhe Xu, Lijuan Sun, Mingcang Chen et Minbo Lan. *Nano-SiO₂ induces apoptosis via activation of p53 and Bax mediated by oxidative stress in human hepatic cell line*. Toxicology in Vitro, vol. 24, no. 3, pages 751–758, 2010. (Cité en page 37.)
- [Ye 2013] Dong Ye, Michelle Nic Raghnaill, Mattia Bramini, Eugene Mahon, Christoffer Åberg, Anna Salvati et Kenneth A Dawson. *Nanoparticle accumulation and transcytosis in brain endothelial cell layers*. Nanoscale, vol. 5, no. 22, pages 11153–11165, 2013. (Cité en pages 42, 43 et 106.)
- [Yla-Herttuala 1989] S Yla-Herttuala, Wulf Palinski, Michael E Rosenfeld, Sampath Parthasarathy, Thomas E Carew, Susan Butler, JL Witztum et Daniel Steinberg. *Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man*. Journal of Clinical Investigation, vol. 84, no. 4, page 1086, 1989. (Cité en page 25.)
- [Zhai 2012] Wanyin Zhai, Changliang He, Lei Wu, Yue Zhou, Hangrong Chen, Jiang Chang et Hongfeng Zhang. *Degradation of hollow mesoporous silica nanoparticles in human umbilical vein endothelial cells*. Journal of Biomedical Materials Research Part B : Applied Biomaterials, vol. 100, no. 5, pages 1397–1403, 2012. (Cité en pages 42 et 68.)

- [Zhang 2007] Yongbin Zhang, Wei Chen, Jun Zhang, Jing Liu, Guangping Chen et Carey Pope. *In vitro and in vivo toxicity of CdTe nanoparticles*. Journal of nanoscience and nanotechnology, vol. 7, no. 2, pages 497–503, 2007. (Cité en page 36.)
- [Zhang 2014] Youzhi Zhang, Xiaoyan Yang, Fang Bian, Pinhui Wu, Shasha Xing, Gao Xu, Wenjing Li, Jiangyang Chi, Changhan Ouyang, Tao Zhenget al. *TNF- α promotes early atherosclerosis by increasing transcytosis of LDL across endothelial cells : crosstalk between NF- κ B and PPAR- γ* . Journal of molecular and cellular cardiology, vol. 72, pages 85–94, 2014. (Cité en pages 23 et 24.)
- [Zhu 2009] Ying Zhu, Wenxin Li, Qingnuan Li, Yuguo Li, Yufeng Li, Xiaoyong Zhang et Qing Huang. *Effects of serum proteins on intracellular uptake and cytotoxicity of carbon nanoparticles*. Carbon, vol. 47, no. 5, pages 1351–1358, 2009. (Cité en page 68.)
- [Ziegler 1998] Thierry Ziegler, Karima Bouzourene, Vanessa J Harrison, Hans R Brunner et Daniel Hayoz. *Influence of oscillatory and unidirectional flow environments on the expression of endothelin and nitric oxide synthase in cultured endothelial cells*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, vol. 18, no. 5, pages 686–692, 1998. (Cité en page 29.)

ANNEXE A

Stratégies de marquage du LDL

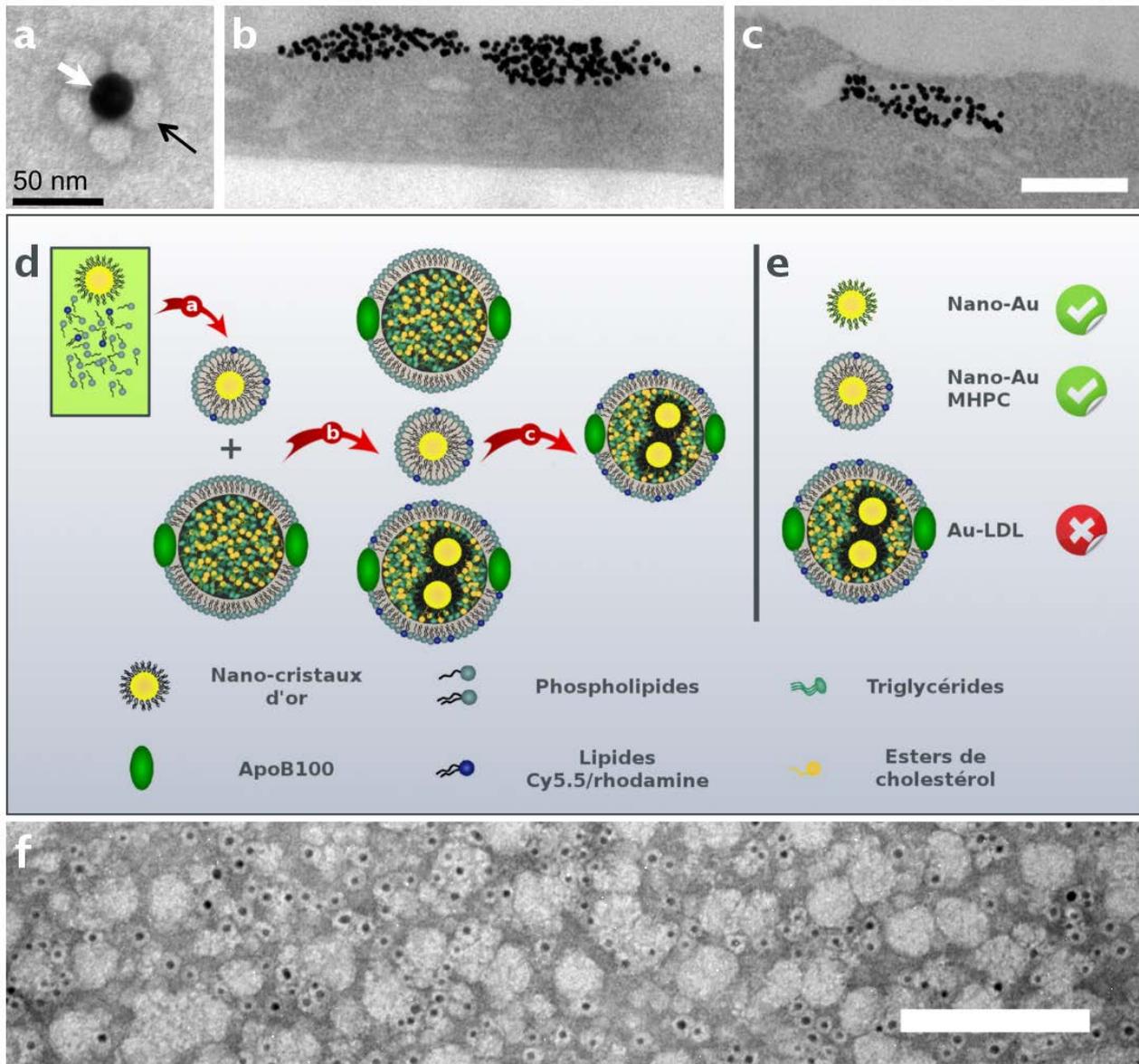


FIGURE A.1 – Approches étudiées pour la sétection du LDL intracellulaire par MET. **a-c** - Approche par greffage des particules de LDL en surface d'une bille d'or colloïdale [Baudoin 2013]. Plusieurs particules de LDL adhèrent à la surface de l'or formant des "rosaces" (**a**). Les complexes Au-LDL, sont sensibles à l'agrégation en surface des cellules (**b**) et sont uniquement localisés dans les endosomes après une heure d'exposition (**c**). **d-f** - Approche par marquage des particules de LDL par des nano-cristaux d'or [Allijn 2013]. **d** - schéma simplifié du protocole. Les nano-cristaux d'or sont enrobés d'une mono-couche de lipides (MHPC, flèche a). Ces nano-cristaux sont ensuite soniqués en présence de particules de LDL (flèche b), provoquant l'entrée de nano-cristaux dans les particules de LDL. Le mélange obtenu est ensuite purifié afin de ne conserver que les particules de LDL marquées (flèche c). **e** - Nous avons, pour le moment, synthétisé deux types de nano-cristaux d'or (2 et 4 nm) et réalisé les enrobages par le MHPC. Les étapes de sonication restent encore à mettre au point. **f** - Exemple de nano-cristaux enrobés mis au contact des LDL. On note une faible intégration dans ces conditions. Échelles : 250 nm (**b-c**) et 100 nm (**f**).

ANNEXE B

Agrandissements de figures

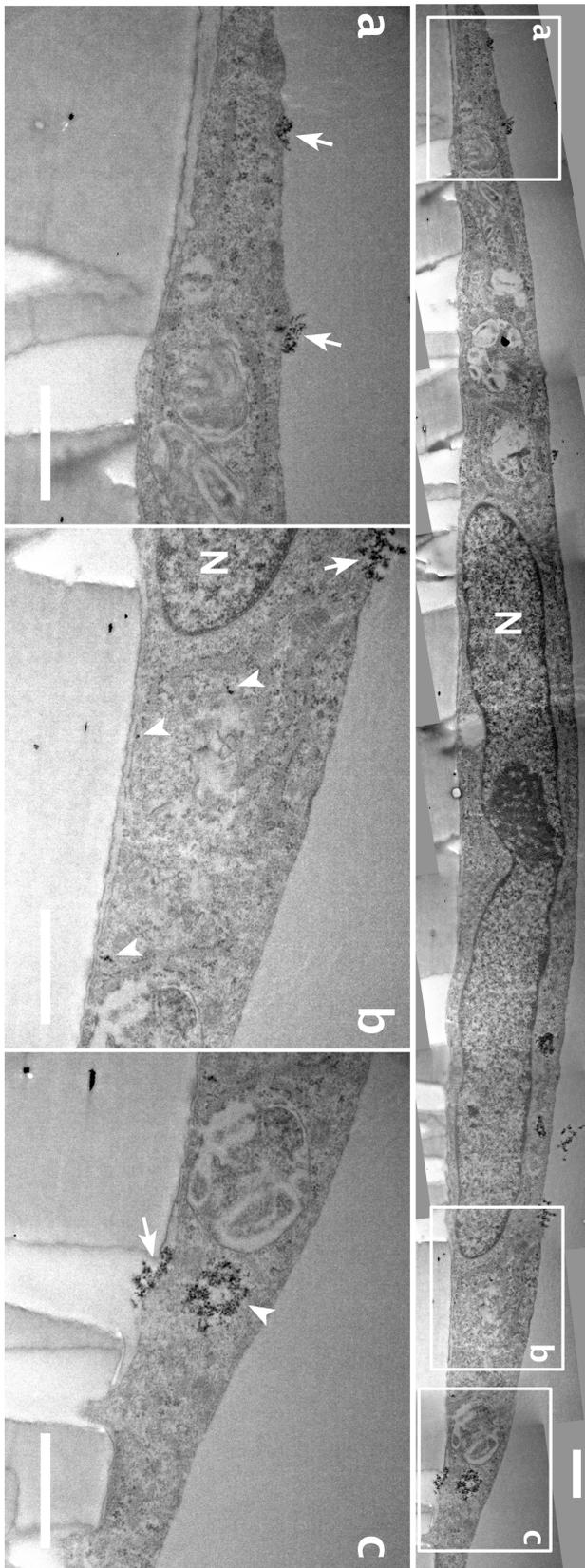


FIGURE B.1 – Agrandissement de la figure 3.6 - Internalisation et transcytose de NPs de 15 nm dans des cellules HPAECs cultivées sur membranes supportées. Coupe transversale d'une cellule, dont trois zones ont été agrandies. **a** - NPs 15 nm en groupes à la membrane apicale (flèches). **b** - NPs libres dans le cytoplasme en petits groupes accédant à l'espace sub-cellulaire (pointes de flèches). **c** - NPs regroupées dans une vésicule (pointe de flèche), et groupe de NPs en cours de libération dans l'espace sub-cellulaire (flèche). N - noyau. Echelle 0,5 μ m.

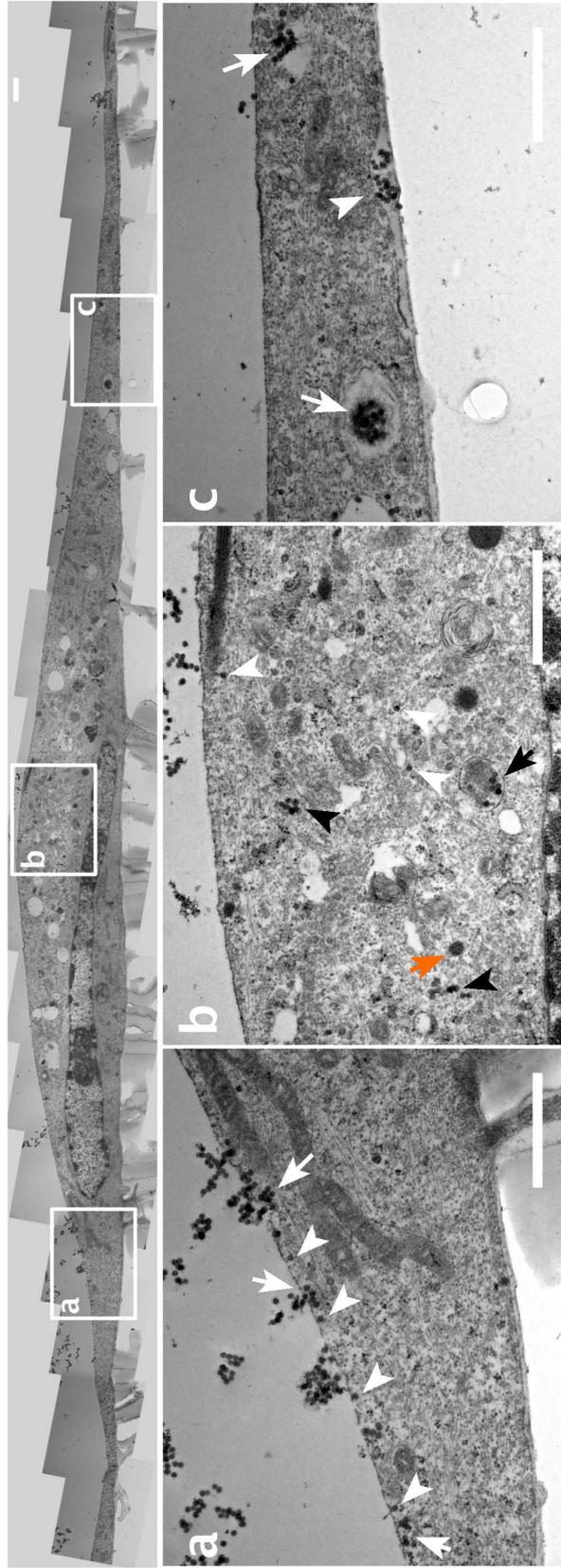


FIGURE B.2 – Agrandissement de la figure 3.7 - Internalisation et transcytose de NPs de 50 nm dans des cellules HPAECs cultivées sur membranes supportées. Coupe transversale d'une cellule, dont trois zones ont été agrandies. **a** - Internalisation des NPs à la membrane apicale en groupes (flèches blanches) ou isolées (pointes noires) ou isolées (pointes de flèches blanches). **b** - NPs libres dans le cytoplasme isolées (pointes de flèches blanches) ou en groupes (pointes de flèches noires), dans une vésicule (flèche orange). **c** - NPs localisées en groupes dans des vésicules de types endosomes / lysosomes (flèches) et en cours de libération au niveau de la membrane basale (pointe de flèche). N - noyau. Échelle 0,5 μm .

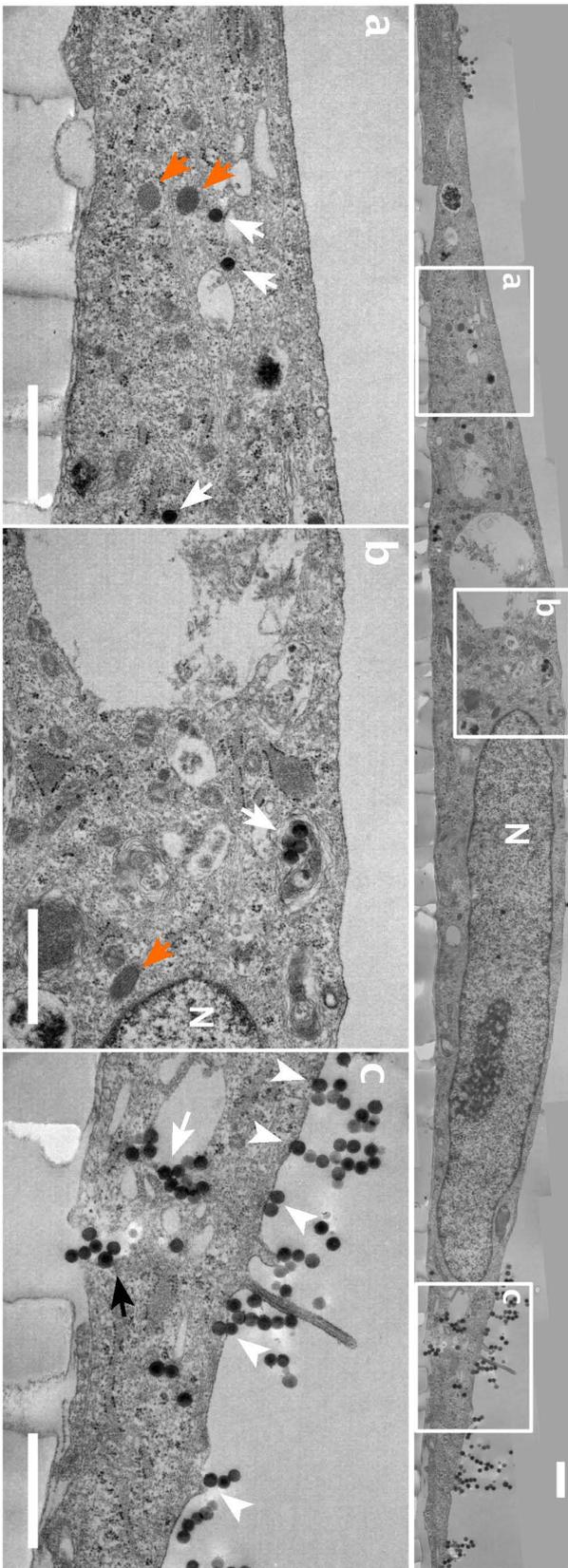


FIGURE B.3 – Agrandissement de la figure 3.8 - Internatalisation et transcytose de NPs de 100 nm dans des cellules HPAECs cultivées sur membranes supportées. Coupe transversale d'une cellule, dont trois zones ont été agrandies. Les flèches orange indiquent des corps de Weibel-Palade, reconnaissables à leur structure tubulaire. **a** - NPs isolées dans le cytoplasme (flèches blanches). **b** - NPs dans une vésicule contenant des débris membranaires et cellulaires (flèche blanche). **c** - NPs en cours d'internatalisation (pointes de flèches blanches), distribuées dans de larges vésicules intracellulaires (flèche blanche) et pouvant être ouvertes sur le compartiment basal (flèche noire). N - noyau. Échelle 0,5 µm. Un agrandissement de la figure est placé en annexes.

ANNEXE C

Article en cours de soumission

Size-dependent transcytosis of silica nanoparticles in human endothelial barrier

Grégoire Naudin^{1,2}, Marion Decossas^{1,2}, Olivier Le Bihan^{1,2}, Stéphane Mornet³ and Olivier Lambert^{1,2*}

¹Institute of Chemistry and Biology of Membranes and Nanoobjects, University of Bordeaux, Chemistry and Biology of Membranes and Nanoobjects (CBMN), Unité Mixte de Recherche (UMR) 5248, Pessac, France;

²Institute of Chemistry and Biology of Membranes and Nanoobjects, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), CBMN, UMR5248, Pessac, France;

³ICMCB, CNRS, Université Bordeaux, 87 avenue du Dr. A. Schweitzer, F-33608 Pessac, France.

CORRESPONDING AUTHOR

To whom correspondence should be addressed: Olivier Lambert, CBMN, UMR 5248, CNRS, University Bordeaux, Institut Polytechnique Bordeaux, Allée Geoffroy Saint-Hilaire 33600 Pessac, France.

Tel : +33-540006829 and +33-540002200; Email: o.lambert@cbmn.u-bordeaux.fr

Running title: Transcytosis of silica nanoparticle

Abstract

Nanoparticles as carriers for imaging and delivery therapeutic agents have been designed for potential biomedical and pharmaceutical applications. Effective systemic nanodelivery is challenged by penetration across the vascular endothelium before reaching diseased tissues and/or tumors. A better understanding of active transport across the vascular endothelium is needed to improve the therapeutic index. A monolayer of human primary endothelial cells has been reconstituted on a microporous membrane. The internalization and transcellular transport of fluorescent silica nanoparticles (16, 50 and 100 nm) (SiNP) have been quantitatively analyzed at nanometer resolution using transmission electron microscopy (TEM) combined with stereology. Transcellular transport has been observed for all SiNPs. However cellular distribution of SiNP and their release at basal membrane were size-dependent. The release of SiNP-16 was more efficient than that of SiNP-50 and SiNP-100. And also cellular accumulation was less important for small particles. Cellular uptake has been analyzed by flow cytometry and by TEM in the presence of different endocytic inhibitors to decipher SiNP internalization pathways. Depending on SiNP size, the involved endocytosis mechanisms were different suggesting that different endocytosis pathways enable transcellular transport. Interestingly the specific caveolin-mediated internalization of SiNP-16 could explain the efficacy of their release at the basal side.

Keywords: endothelial cells, transcytosis, electron microscopy, stereology

Introduction.

Over the last years, several nanoparticles have been designed as carriers for delivery of imaging and therapeutic agents for potential biomedical and pharmaceutical applications. Due to the complexity of *in vivo* systems, their efficiency is severely inhibited by multiple biological barriers (Chrastina et al., 2011). Effective systemic nanodelivery is then challenged by penetration across the vascular endothelium. The vascular endothelium is composed of a monolayer of cells that largely controls the exchange of blood components with the underlying tissues. It forms tight intercellular junctions preventing paracellular passage. Thus the transport across the vascular endothelium implies a transcellular transport such as e.g. transcytosis process enabling the transfer through the cell. This process entails endocytosis, vesicular transfer and exocytosis. There is a need to increase our understanding of how these particles are taken up and transported across the vascular endothelium to improve the therapeutic index.

Silica nanoparticles have been developed as drug delivery vectors for protein and nucleic acids, as cell markers and molecule carriers. Because of their small size and large reactive surface they have a high capability to interact with cellular membrane and induce cellular uptake. *In vivo* evidence exists that silica nanoparticles efficiently translocate through the vascular endothelium. They have been recovered in pulmonary circulation after lung exposure or into the brain after intranasal administration (Yoshida et al., 2013). In lung endothelium, transcytosis of albumin-coated nanoparticles has been described in animal (Ghitescu et al., 1986; Mehta and Malik, 2006) and in isolated endothelial cells (Schnitzer et al., 1994) mediated by caveolae pathway providing a possible way to deliver nanoparticles across endothelial cells (Chrastina et al., 2011; Drab et al., 2001; Schubert et al., 2001; Stan, 2002). Gold nanoparticles complexed with an antibody specific for lung caveolae crossed endothelium barrier suggesting application for drug and gene delivery (McIntosh et al., 2002). Because of biomedical applications of silica nanoparticles as intravascular drug carriers, the studies on interactions between silica nanoparticles and endothelial cells are required. Previous studies have shown interactions with

human endothelial cells (Corbalan et al., 2011; Napierska et al., 2013) raising the questions of their uptake and the potential transcellular transport.

In vitro transcytosis of nanoparticles has been achieved with microporous membranes in brain EC (Ye et al., 2013). While the use of fluorescent nanoparticles was suitable for assessing the cellular uptake, the quantification of their transcellular transport based on fluorescence intensity recovered in the basal chamber seemed less appropriate. Dye release, particle agglomeration impairing the passage through the filter pores, nanoparticle adhesion to the pores without reaching the chamber were three main limitations (Ye et al., 2013). Instead of fluorescence signal, the use of electron microscopy provides the well-suited resolution for visualizing the location of nanoparticles on ultrathin sections giving access to much more events of nanoparticles per cell than with fluorescent microscopy (Rothen-Rutishauser et al., 2014). This 2D observation did not allow a quantitative description in the absence of 3D structure. To overcome this limitation, it has been proposed that accurate and precise quantitative estimates of nanoparticle amount can be retrieved from ultrathin sections using stereological sampling technique (REF). Stereology consists in the estimation of morphometric parameters of three-dimensional (3D) objects based on measurements made on two-dimensional sections. Quantitative estimations provided by appropriate sampling protocol. EM quantitation uses stereological approach (systematic uniform random sampling) well suited to heterogeneous biological specimens examined in cell. At the level of ultrastructure it has been successfully applied to efficient quantitation of gold immunolabeling nanoparticle and endocytosis of clathrin-independent carriers (Howes et al., 2010; Rothen-Rutishauser et al., 2014).

In this study, we report the internalization and transcytosis of fluorescent silica nanoparticles (SiNPs) of different sizes (16, 50, 100 nm in diameter) on a monolayer of pulmonary endothelial cells using complementary techniques of transmission electron microscopy (TEM) and stereology. Transcytosis has been observed for all SiNPs after 1 h exposure. The cellular distribution of SiNP has been analyzed after 1h and 24 h. Unlike SiNP-16, a cellular accumulation of SiNP-50 and SiNP-100 has been measured. To decipher the internalization pathways of siNP, an analysis of the cellular uptake by flow cytometry and

TEM in the presence of different endocytic inhibitors provided new insight on transcellular transport and cellular accumulation.

Methods

Nanoparticle synthesis

Fluorescent 16, 50 and 100 nm SiNPs were synthesized. Fluorochromes were incorporated inside the NPs core during synthesis. SiNPs were labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) that is characterized by an excitation wavelength at 488 nm and maximum emission wavelength at 520 nm. The synthesis of 16 nm-SiO₂-FITC NPs was performed in one step by adding a solution of 5 mL of fluorescent organosilane solution previously prepared mixed with 240 mL of ethanol and 5 mL of TEOS into a 2 L round bottom flask containing 650 mL of EtOH, 2.4 mL of water and 24.1 mL of ammonia. The solution was let to react overnight at room temperature (RT) in the dark. 16 nm-SiO₂-FITC NPs were purified against ultrapure water (18 MΩ) by tangential ultrafiltration with an Amicon system (Millipore, Billerica, USA) equipped with a membrane of 100 kDa cut-off until disappearance of fluorescence in the filtrate. Batches of bigger sizes were purified by centrifugation. Before, ammonia and ethanol were removed from the medium by rotative evaporation at 40°C at the end of the synthesis. The fluorescent particles were extensively washed by centrifugation against ultrapure water at 13,000 g for 15 min until disappearance of fluorescence in the supernatant. Estimation of silica concentrations in the dispersion was carried out by Inductively Coupled Plasma (ICP) using an ICP Optical Emission Spectrometer (ICP-OES) and a gravimetric method. The synthesis of 50- and 100 nm-SiO₂-FITC NPs has been described previously (Vranic et al., 2013). Physicochemical characteristics of NPs are accessible in supplementary data (see Figure S1, Table S1).

Cell culture

Human pulmonary artery endothelial cells (hPAEC) were purchased from Promocell (Heidelberg, Germany) as well as cell culture reagents. They were grown in growth medium (ECGM, Promocell) in a

humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. All the experiments were performed with cells from passages 3 to 4. For NP uptake, cells were grown in T25-flasks (Costar, Corning, New York, USA) to confluence and then seeded at 50 000 cells/cm² onto fibronectin (Sigma-Aldrich) coated glass slides. Alternatively, cells were seeded onto 0.4 µm pore size Millicell hanging cell culture inserts (Millipore, Switzerland) coated with fibronectin at 50 000 cells/cm² in two compartment chambers for translocation experiments. 350 µL of complete culture medium were added to the apical chamber and 650 µL to the basolateral chamber.

Cell treatment

SiNP dispersions were prepared by diluting SiNP stock solutions (19.6 mg/ml in water) into a basal medium (ECBM, Promocell) without phenol red at room temperature, immediately prior to the experiments and were vortexed during 1 min. Before SiNP exposure, cells were rinsed once with ECBM and all treatments were performed in the absence of supplementMix (Promocell). For all experiments, cells were incubated with a concentration of 1.5 µg/cm² for SiNP-16, 5 µg/cm² for SiNP-50 and 10 µg/cm² for SiNP-100 corresponding to an equal developed surface. After 1h treatment, cells were washed twice with ECBM and used for short time experiments or put back in ECGM for long time experiments. For the energy-dependent effect on SiNP uptake, cells were preincubated for 1 h at 4°C or with 100 mM sodium azide (SIGMA) and 10 mM 2-deoxy D-glucose (SIGMA) in ECBM prior to exposure. Endocytosis inhibitors (MERCK): chlorpromazine (15 µM) genistein (200 µM), amiloride (100 µM) and cytochalasin D (5 µM) were incubated with cells for 1 h before NP treatment and for 1 h in the presence of SiNP.

Cell viability

HPAEC were seeded on 96 well plates at a density of 10,000 cells/cm² in growth medium and allowed to adhere during 48 h before SiNP and chemical inhibitors exposures. The WST1 reagent (Roche) was used according to the manufacturer's instructions to estimate the cell viability. The WST-1

reagent was added 24h after SiNP treatment to the cells and blanks and incubated for 2 h. Absorbance was measured at 450 nm.

Flow cytometry analysis of SiNP uptake

Cells were seeded at a density of 50,000 cells /cm² in 12 wells plates and allowed to adhere for 48 h in growth medium before exposure to 1 mL of SiNPs in the different conditions. After treatment, cells were trypsinized, and resuspended in cold ECGM without phenol red. Cells were stored on ice and analyzed within 1 h. Cells were preincubated with 0.25 % Trypan Blue for 1 min just before analyses in order to quench the fluorescence of SiNPs absorbed on cell surface. Samples were analyzed on a BD Biosciences FACS CANTO flow cytometer and FITC- SiNPs were excited by a 488-nm laser. Analysis was performed using the DIVA software. Cell debris were excluded, based on the forward and side scatter characteristics of cell populations. The results are expressed as the percentage of inhibition based on the mean of fluorescence intensity of about 10,000 cells analyzed in the gate.

Stereology

For each condition, four ultrathin vertical sections were produced from two separated inserts (2 sections per insert) for reliable sampling. Four adjacent cells were imaged from junction to junction at a magnification of 30,000 x allowing a clear SiNP identification. A stitched image of each cell was generated using MosaicJ plugin for ImageJ (Thévenaz and Unser, 2007). Each stitched image was overlaid with a square lattice grid of 0.08 μm^2 surface placed randomly for cytoplasm counting using the Grid plugin for ImageJ (Rønn et al., 2000). Intersections that fell on the cytoplasm, excluding the nucleus, were recorded across the 16 cells corresponding to four independent areas. For counting SiNP volumes, a square lattice grid of 0.008, 0.004 and 0.002 μm^2 for SiNP-100 nm, SiNP-50 nm and SiNP-16 nm respectively, was also overlaid on the image. Intersections that fell on top of SiNP were recorded as above. Number of points lying over SiNP multiplied by the corresponding grid size was compared, as

a percentage, to points over cytoplasm by grid size, to give the percentage of SiNPs to cytoplasmic volume ($V(v)$). Overprojection effects on SiNP can lead to volume overestimation as described previously (Griffiths et al., 1989). Based on the section thickness, average diameter of spherical SiNPs, a correction factor of 0.16, 0.4 and 0.57 (for SiNP-16, SiNP-50 and SiNP-100) was applied to the $V(v)$ measurements, based on the formula established for spherical object (Weibel and Paumgartner, 1978).

Fluorescence microscopy

Cells cultured on supported membrane inserts for three days were fixed in 4 % paraformaldehyde in phosphate buffer 0.1M for 15 min at room temperature. Supported membranes were stripped from the inserts. Cells were blocked for 1 h in 1% BSA at room temperature and then incubated with primary antibody anti-ZO-1 (Invitrogen, 402200) diluted 1:250 over night at room temperature. After 3 washes in PBS, cells were incubated with secondary antibodies diluted in PBS plus 1% BSA for 1h at room temperature : Alexa Fluor 546-conjugated donkey anti-rabbit IgG antibody diluted 1:200 (Molecular Probes). After 3 washes in PBS cells were incubated with Hoechst for nuclei staining and mounted in low fluorescence mounting medium (Dako) and examined by epifluorescence (inverted LEICA DMI 6000 microscope equipped with a LEICA DFC 350FX camera).

TEM preparation

Cells were fixed using 1.6% (v/v) glutaraldehyde in phosphate buffer 0.1 M, pH 7.4 for 2 h at room temperature. They were post-fixed using 1% (v/v) osmium tetroxide and 0.05% (v/v) ruthenium red for 1 h. Samples on coverslips were dehydrated in ascending series of ethanol dilutions. They were then treated with propylene oxide, impregnated in ascending dilutions of resin in propylene oxide, left in pure resin overnight (Epon, Inland Europe), embedded and polymerized at 60°C for 48 h. Specimens on suspended inserts were dehydrated in ascending ethanol dilutions and impregnated in ascending dilutions of resin in ethanol. Ultra-thin sections (40 nm) performed on ultramicrotome (RMC, powermode PC) were collected on butvar-coated single-slot copper grids, stained with 2 % (v/v) uranyl

acetate for 30 min and with lead citrate for 2.5 min. For SiNP characterization, solutions at 40 $\mu\text{g/mL}$ were deposited on a carbon coated grid previously submitted to a glow discharge (Elmo, Cordouan technologies). Grids were examined by TEM (CM120, FEI) and the images were acquired using a USC1000 2k x 2k and an ORIUS Gatan camera.

Statistical analysis

Data were collected from three separate experiments and expressed as mean \pm standard error of the mean. The statistical differences were analyzed by a paired Student's t-test, p values less than 0.05 were considered to indicate statistical differences. For analysis of statistical difference between three or more groups, a one way analysis of variance followed by a Bonferroni's multiple comparison test was applied. p values below 0.05 were considered to indicate statistical differences.

Results and discussion

Characterization of hPAEC before and after SiNP treatment

A monolayer of hPAEC was successfully formed on supported membranes until confluence (typically after 3-4 days) as assessed by a time-dependent decrease in the permeability of FITC-dextran from the apical to basolateral side (Ren et al., 2013), and TEER value measurements ($40\text{-}50\ \Omega/\text{cm}^2$) comparable to that measured on a brain endothelial barrier (Ye et al., 2013) (Figure 1a). When the hPAEC monolayer was exposed to SiNPs for 1 h at a non-cytotoxic concentration as determined by WST-1 test (see Figures S2), TEER values were close to those before treatment indicating that NPs had little effect on the monolayer permeability (Figure 1B). TEER measurements after a delay of 24 h following SiNP exposure showed that a slight increase of permeability with the larger SiNPs. In addition, the examination of zona occludens (ZO-1) proteins involved in the formation of tight junctions was performed by immunolabeling. ZO-1 staining was continuous at the cell border before (Figure 1C) and after SiNP treatment, (Figures 1 D-F). These results provide evidence that the cell-cell junctions were not extensively destabilized and that no apparent gap was formed after SiNP treatment. Altogether, these results indicated that the hPAEC barrier achieved in our experimental conditions is an appropriate model to study a transcellular transport of SiNP.

Transcytosis of SiNPs

Since TEER values showed a slight increase of monolayer permeability when measured 24 h after SiNP-100 and for SiNP-50 exposures (Figure 1C), our TEM analysis has been performed immediately after 1 h SiNP treatment. TEM observations of transversal sections of exposed cells showed that the three types of SiNPs were present at the apical membrane, into the cytoplasm and at the basal side of cells (Figures 2-4). At the apical membrane, isolated particles or as small clusters were in contact with the plasma membrane (Figures 2a, 3a and 4c). Within cells, SiNPs were observed within large vesicles (Figures 2c, 3c and 4b). In addition there were also isolated or clusters of SiNP without being

surrounded by an apparent lipid membrane (Figures 2b,3b and 4a). Interestingly, they were outside the cells and attached to invaginations of the basal cell membrane (Figures 2c,3c and 4c). Adjacent cells forming well-structured cell-cell junctions corroborated that the monolayer was not disrupted by SiNP interactions (see Figures S3). No SiNP was observed between two cells at the cell-cell contact areas. Altogether, these results indicated that the three types of SiNPs were internalized and transported through the endothelial cells via a transcytosis process.

Using stereology, the percentages of SiNPs attached to membranes at both apical and basal sides and within the cell were quantified on a set of 16 cells as described in Fig S5. Figure 5 showed other examples other SiNP-1- and SiNP-50 transcytosis (Figures 5a,5b) and an overlay of the lattice grid for recording intersections (Figure 5c). The results showed a SiNP distribution depending on their size (Figure 5d). The SiNP amount within cells represented 70 %, 62 % and 55 % for SiNP-16, SiNP-50 and SiNP-100, respectively. And conversely, 8% of SiNP-16, 23 % of SiNP-50 and 32 % of SiNP-100 were encountered at the apical membrane. Comparatively, the internalization process seemed more efficient for SiNP-16 than for the two other SiNPs and the remaining amount at the apical membrane increased with the SiNP size. At the basal membrane, the ratios of SiNP-16, SiNP-50 and SiNP-100 were 22 %, 15%, 13 % respectively, suggesting that the release of SiNP-16 was more efficient than that of SiNP-50 and SiNP-100. SiNP-50 and SiNP-100 were present as large clusters at the basal side (Figure 5b, 5c) while SiNP-16 formed small clusters made of 3 to 8 particles (Figure 5a). Altogether, these results revealed a substantial transcytosis of the three SiNPs. Moreover the rate of their cellular uptake and their release at the basal membrane decreased with the particle size.

In our experimental conditions, the transcytosis events were rather frequent and SiNP were released as small clusters. A recent study of transport of silica nanoparticle (50 nm, 100 nm in diameter) across brain EC monolayer showed that they were present as large agglomerates inside cells and rarely released (Ye et al., 2013). In spite of the fact that endothelial cells originated from two different organs, the dispersion of our SiNPs was performed in serum-free medium unlike Ye's experiments reporting poor

nanoparticle dispersion in serum. Our results suggested that the nanoparticle dispersion may affect the transcytosis process.

Cytoplasm distribution of SiNPs

To further understand the transcytosis process and the correlation with SiNP size, the SiNP population within the cell has been analyzed using stereology (Figure 5e). TEM observations indicating that SiNPs were mainly observed within large vesicles, isolated, and as clusters, the SiNP population has been then divided in those three groups (Figures 2-4). About 64 % of SiNP-16 was encountered in small clusters of less than 80 nm and in assemblies of small clusters (Figure 2b). These small clusters were distributed all along in between apical and basal sides (Figure 2b). No visible membrane surrounding these clusters was visible. 25 % of SiNP-16 was found with vesicles. Some vesicles contained a large amount of SiNP-16 (Figure 2c). Isolated SiNP-16 were scarcely observed. SiNP-50 were internalized as isolated (23 %), small groups of two or three SiNPs and large clusters (40 %) whose sizes were larger than 100 nm (Figures 4b). SiNP-50 were also entrapped inside well defined vesicles containing also parts of membranes (Figures 4b and 4c). Unlike SiNP-16, large groups of SiNP-50 were in contact to the basal side of the cell (Figure 4c). SiNP-100 were mainly present as isolated (35 %) and within vesicles (50 %) also containing parts of membranes suggesting a possible accumulation of SiNPs (Figure 4b). Si-NP100 were observed close to invaginations of the basal membrane suggestive of SiNP-100 release after vesicle fusion providing some clues on their transcytosis (Figure 4c).

This stereology analysis clearly showed differences in SiNP distribution regarding their size (Figure 5e). There was an increase of SiNPs within vesicles from 25 % for SiNP-16 to 50 % for SiNP-100, indicating a correlation between the size and the amount of SiNP observed within vesicles. In addition the percentage of SiNP as isolated particles increased with their size. In contrast, the formation of clusters of few particles decreased with the particle size.

Our results indicated that the nanoparticle size was an important parameter governing their intracellular trafficking. The presence of SiNP-50 and 100 isolated in cytoplasm and in endo-lysosomal

vesicles was in a concordance with the distribution of silica nanoparticles observed in supported brain endothelial cells (Ye et al., 2013) suggesting similar endocytosis mechanisms for both brain and pulmonary endothelial cells. The distribution of SiNP16 exhibited a majority of small clusters in the cytoplasm. To compare with nanoparticles with a similar range of size, albumin-conjugated gold nanoparticles were detected within small and large vesicles (Ye et al., 2013) and polymer-coated gold particle in large vesicles (Rothen-Rutishauser et al., 2014). Unlike SiNP-16, they were not observed as small clusters in the cytoplasm likely because of the different chemical surfaces.

Fate of SiNPs within hPAEC 24 h after SiNP treatment

To get more information on the transcytosis process over time, an analysis of SiNP distribution within the cytoplasm has been performed 24 h later after SiNP treatment. Clearly, the SiNP distribution was different from that immediately after SiNP exposure. Most of the SiNPs were observed within large vesicles likely corresponding to endosomes and lysosomes (Figures 6a-c). Stereological analysis confirmed TEM observations (Figure 6d). In addition, few SiNPs were visible at the apical membrane (less than 4 % for SiNP-16 and SiNP-50; 14 % for SiNP-100) and at the basal side (less than 7 % for all SiNPs). To assess whether or not the SiNPs were stored over time within cells, a comparison of the volume ratios of SiNPs with respect to the cytoplasm at 1 h and at 24 h was calculated using stereological processes as described in material and method (Figure 6e). The results indicated that there were much more SiNP-50 and SiNP-100 after 24 h indicative of an accumulation over time inside the cells. On the contrary, the volume ratio of SiNP-16 after 24 h was 50 % less than that after 1 h suggesting that SiNP-16 were released more efficiently. The stereology analyses provided evidence that the cellular fate of SiNP were modulated by the particle size as well as their cellular distributions and their release. Intracellular trafficking being strongly related to cellular uptake, we further investigated the role of the internalization process.

Internalization pathways of SiNPs within hPAEC

The cellular uptake has been investigated for the three SiNPs using inhibitors of endocytic pathways, chlorpromazine for clathrin-mediated endocytosis (CME), genistein for caveolin-mediated endocytosis (CaME) and amiloride for actin-dependent macropinocytosis. The uptake of SiNPs by cells treated with or without endocytic inhibitors has been analyzed by flow cytometry (FC) (Figure 7) and also by TEM to get additional details at nanometer scale (Figure 8). For SiNP-100, FC data revealed that the uptake was strongly inhibited in cells pretreated with amiloride suggesting macropinocytosis as primary pathway. TEM observations revealed SiNP-100 attached to the apical membrane. No particle was encountered within cells (Figure 8c). This result was in good agreement with FC data. The residual fluorescence signal likely arose from the SiNP-100 attached to the membrane. FC indicated that chlorpromazine or genistein treatments slightly impaired the cellular uptake of SiNP-100. TEM showed that SiNP-100 were present within vesicles and also isolated in the cytoplasm, indicative of their internalization mediated by macropinocytosis (Figure 8e and 8i).

For SiNP-50, the cellular uptake was reduced on cells pretreated with chlorpromazine or with amiloride, the latter being more efficient (Figure 7). TEM observations of amiloride-treated cells exposed to SiNP-50 showed SiNPs attached to the apical membrane (Figure 8b). Isolated SiNPs were also visible in the cytoplasm probably arising from CME. Cells treated with chlorpromazine mainly showed SiNP-50 within vesicles resulting from macropinocytosis uptake (Figure 8d).

For SiNP-16, genistein and chlorpromazine reduced the uptake of SiNP whereas amiloride treatment did not prevent the internalization (Figure 7). Note that even if the measurement of SiNP-16 uptake in the presence of amiloride was slightly greater than that of control, the difference was not statistically significant. Amiloride-treated cells showed SiNP-16 attached to the apical membrane and in the cytoplasm either as small clusters or in small vesicles, likely indicative of CME and CaME (Figure 8a). Cells treated with chlorpromazine mainly showed SiNP-16 within vesicles or as rare clusters (Figure 8c). Cells treated with genistein showed only SiNP-16 within vesicles. No cluster was encountered (Figure 8g). These results suggested that the endocytic pathways have a selectivity regarding the particle size entailing macropinocytosis for large particles, CME and CaME for smaller particles. Thus the effect

of particle size on the cellular distribution and release of SiNPs shown by stereological analysis was certainly related to their size-dependent endocytic pathway.

It has been previously reported a size-selective uptake of albumin-coated nanoparticle mediated by caveolae in endothelial cells (Wang et al., 2009). The uptake of particles (i.e. 20 and 40 nm albumin-coated nanoparticles) smaller than the size of caveolae, was 5-10 times greater than 100 nm particles. Likewise our results indicated that CaME only recruited SiNP-16 exhibiting a more drastic size selectivity in the absence of an albumin coating. The glycoprotein (gp60) albumin binding protein may trigger the uptake of larger particles. In the absence of particular ligand, the size of caveolae appears as a key determinant restricting the uptake of nanoparticles in endothelial cell.

In addition, when the temperature of cell culture was set at 4°C or when cells were depleted of energy using sodium azide (which impairs ATP production), the intracellular fluorescence of cells exposed to SiNPs decreased considerably (Figure 7). These results indicated that the uptake of SiNPs in endothelial cells is mainly an energy-dependent process as observed in various cell types including pancreatic, hepatic and epithelial cells (Lu et al., 2007; Shapero et al., 2011; Vranic et al., 2013; Xing et al., 2005).

To summarize our results, a general scheme of the fate of SiNPs regarding their internalization pathway was presented in Figure 9. CME and CaME were preferential pathways for SiNP-16 internalization. SiNP-16 were observed in vesicles likely arising from CME. The presence of small clusters was essentially related to CaME (Figure 9 (a)), according to genistein experiments. Since caveolae size was in the range of 50-100 nm, more than one SiNP-16 could fit into a caveolae. In support of our observations, it has been reported that a caveolae can accommodate up to three 20 nm nanoparticles (Wang et al., 2009). Interestingly, CaME has been shown a preferential route for transcytosis. Therefore it is very likely that transcytosis of SiNP-16 revealed by TEM arose from the caveolae pathway (Figure 9 (c)). Notably small clusters detected at the basal membrane would undergo a direct transcytosis mediated by CaME providing an explanation of the efficacy of SiNP-16 release. CME and macropinocytosis were involved in the uptake of isolated particles and clusters of SiNP-50. Likewise macropinocytosis mediated the internalization of isolated and clusters of SiNP-100. For SiNP-

50 and SiNP-100, they were stored into large vesicles containing several particles (Figure 9 (d) and (e)). According TEM observations, these vesicles seemed to fuse into large degradative vesicles probably engaged in the endo-lysosomal pathway as observed 24 h after SiNP exposition (Figure 9 (g)). However these vesicles could have another fate. Since large clusters of all SiNPs were observed outside the cell at the basal side, it is likely that these SiNP-containing vesicles fused with the basal membrane enabling a SiNP release outside the cell (Figure 9 (i)). A transcytosis through the endo-lysosomal pathway has been already proposed for anionic nanoparticles in epithelia cells (Harush-Frenkel et al., 2008). A similar transport could occur in endothelial cells as well. Although there was evidence of exocytosis at the basal membrane leading to SiNP transcytosis, the involved mechanisms remained unknown and required further investigations. Note that this pathway was probably not very efficient since our stereology measurement showed an increased amount of SiNP-50 and SiNP-100 into large vesicles over 24 h. On the contrary, even if a SiNP-16 storage was also observed, their cellular release was more efficient than the two other SiNPs probably because of the direct transcytosis mediated by CaME.

Conclusion

In conclusion, our results have shown the transcytosis for three sizes of SiNPs through the hPAEC monolayer. Stereology analysis indicated that the transcytosis was modulated by the particle size as well as the SiNP storage with the cell. SiNP-16 was more prone to cross endothelial barrier than SiNP-50 and SiNP-100. Analysis of internalization mechanisms revealed that the involvement of macropinocytosis, clathrin- and caveolin- mediated endocytosis was modulated by the particle size. The specific caveolin-mediated internalization of SiNP-16 may explain the efficacy of their release at the basal side. These results bring new insights on active transendothelial transport pathways, caveolae representing an effective solution for delivering small nanoparticles.

ACKNOWLEDGMENT

This work has been supported in part by TiSiTrans (N°PNR-EST-2010/2/79) ANSES grants and Conseil Régional d'Aquitaine (20121301007) grants. G. Naudin was recipient of an ANRT fellowship. We thank Cordouan Technologies for the use of their apparatus.

FIG.LEGENDS

Figure 1: Characterization of hPAEC monolayer

a) TEER measured during the formation of hPAEC monolayer (diamond) and in the absence of cells (black square). Leakage of Lucifer yellow (triangle) expressed as permeability coefficient. Graph represents the mean \pm SEM TEER and leakage of Lucifer yellow from three separate experiments. b) TEER measurements in presence of SiNPs. c-f) Immunofluorescence of ZO-1 proteins before and after addition of SiNP-16, SiNP-50 and siNP-100. (Blue: Hoescht-stained nuclei, Red: ZO1, Green: FITC-SiNPs). Scale bar 25 μ m.

Figure 2: Transcytosis of SiNP-16 across hPAEC monolayer after 1 h

A large field of view showing a transversal section of a complete cell exposed to SiNP-16 made with stitched TEM images. a-c) Enlarged TEM images corresponding to the white squares. SiNP-16 were present at the apical membrane (white arrows in a, b), into the cytoplasm (white arrow heads) and at the basal side (white arrow in c). N: nucleus. Scale bars 500nm.

Figure 3: Transcytosis of SiNP-50 across hPAEC monolayer after 1 h

A large field of view showing a transversal section of a complete cell exposed to SiNP-50 made with stitched TEM images. a-c) Enlarged TEM images corresponding to the white squares. SiNP-50 were present at the apical membrane (white arrows in a), into the cytoplasm (as isolated (white arrow heads in a,b) or as clusters (black arrow heads) and in vesicle (black arrow in b and white arrow in c)) and at the basal side (white arrow head in c). N: nucleus. Mitochondria (orange arrow head). Scale bars 500nm.

Figure 4: Transcytosis of SiNP-100 across hPAEC monolayer after 1 h

A large field of view showing a transversal section of a complete cell exposed to SiNP-100 made with stitched TEM images. a-c) Enlarged TEM images corresponding to the white squares. SiNP-100 were present at the apical membrane (white arrow heads in c), into the cytoplasm (as isolated (white arrows in a) and in vesicle (white arrow in b, c) and at the basal side (black arrow in c). N: nucleus. Mitochondria (orange arrow head). Scale bars 500nm.

Figure 5: Analysis of SiNP distribution after 1 h using stereology

a) TEM image of SiNP-16 at the basal side (black arrows). b) TEM image of SiNP-50 at the basal side (black arrows). c) TEM image of SiNP-100 overlaid with a $0.008 \mu\text{m}^2$ square lattice grid showing intersections that fell on top of SiNP-100. d) Quantification of SiNP distribution in percentage at apical membrane (black) inside the cell (grey) and at basal membrane (dark grey). e) Quantification of SiNP in percentage inside vesicle (grey) as cluster (dark grey) and isolate (black). Surface density of SiNP was calculated from high resolution images using square grids for measuring SiNP and cytoplasm surfaces. The SiNP volume is proportional to the SiNP surface density. Scale bar 500 nm

Figure 6: Fate of NP uptake by hPAEC after 24 h

a-c) TEM images of large amount of SiNPs accumulated in larges vesicles. SiNP-16 (a), SiNP-50 (b) SiNP-100 (c). d) Quantitation of SiNP in percentage inside vesicle (grey) as cluster (dark grey) and isolate (black). e) Ratios of SiNP volume after 1 h and 24 h. Scale bars 500 nm.

Figure 7: Effect of endocytic inhibitors on SiNP uptake

Cells were pre-treated at 37°C with chlorpromazine, genistein, amiloride, sodium azide and 2-deoxy-D-glucose for 1h and then exposed to SiNPs and inhibitors for 1h. Cells maintained at 4°C were exposed to SiNPs for 1h after 1h of preincubation at 4°C . Quantification of internalization was performed by flow cytometry, after addition of TB. Results are expressed as relative mean cell fluorescence intensity to untreated cells at 37°C (%) \pm SEM. * significantly different from the control ($P \leq 0.05$). n=3.

Figure 8: Representative TEM images of hPAEC exposed to SiNPs in the presence of inhibitors

First row: SiNP-16 uptake in the presence of amiloride (a), chlorpromazine (d), genistein (g), sodium azide and 2-deoxy-D-glucose (k). Second row: SiNP-50 uptake in the presence of amiloride (b), chlorpromazine (e), genistein (h), sodium azide and 2-deoxy-D-glucose (l). Third row: SiNP-50 uptake in the presence of amiloride (c), chlorpromazine (f), genistein (i), sodium azide and 2-deoxy-D-glucose (m) Scale bars 500 nm.

Figure 9: A schematic drawing summarizing the cellular uptake, intracellular tracking and transcytosis of SiNP-16, SiNP50 and SiNP-100.

CaME (a), CME (d) and micropinocytosis (e) are involved in SiNP internalization. A direct transcytosis (c) or a formation of vesicles containing several SiNPs (d) before their release at the basal side (f) are potential transcytosis pathways. Otherwise, degradative vesicles containing a large amount of SiNPs are formed (g).

REFERENCES

- Chrastina, A., Massey, K.A., and Schnitzer, J.E. (2011). Overcoming in vivo barriers to targeted nanodelivery. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 3, 421–437.
- Corbalan, J.J., Medina, C., Jacoby, A., Malinski, T., and Radomski, M.W. (2011). Amorphous silica nanoparticles trigger nitric oxide/peroxynitrite imbalance in human endothelial cells: inflammatory and cytotoxic effects. *Int. J. Nanomedicine* 6, 2821–2835.
- Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F., Luft, F.C., et al. (2001). Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293, 2449–2452.
- Ghitescu, L., Fixman, A., Simionescu, M., and Simionescu, N. (1986). Specific binding sites for albumin restricted to plasmalemmal vesicles of continuous capillary endothelium: receptor-mediated transcytosis. *J. Cell Biol.* 102, 1304–1311.
- Griffiths, G., Back, R., and Marsh, M. (1989). A quantitative analysis of the endocytic pathway in baby hamster kidney cells. *J. Cell Biol.* 109, 2703–2720.
- Harush-Frenkel, O., Rozentur, E., Benita, S., and Altschuler, Y. (2008). Surface charge of nanoparticles determines their endocytic and transcytotic pathway in polarized MDCK cells. *Biomacromolecules* 9, 435–443.
- Howes, M.T., Kirkham, M., Riches, J., Cortese, K., Walser, P.J., Simpson, F., Hill, M.M., Jones, A., Lundmark, R., Lindsay, M.R., et al. (2010). Clathrin-independent carriers form a high capacity endocytic sorting system at the leading edge of migrating cells. *J. Cell Biol.* 190, 675–691.
- Lu, J., Liong, M., Sherman, S., Xia, T., Kovichich, M., Nel, A.E., Zink, J.I., and Tamanoi, F. (2007). Mesoporous Silica Nanoparticles for Cancer Therapy: Energy-Dependent Cellular Uptake and Delivery of Paclitaxel to Cancer Cells. *Nanobiotechnology J. Intersect. Nanotechnol. Mol. Biol. Biomed. Sci.* 3, 89–95.
- McIntosh, D.P., Tan, X.-Y., Oh, P., and Schnitzer, J.E. (2002). Targeting endothelium and its dynamic caveolae for tissue-specific transcytosis in vivo: a pathway to overcome cell barriers to drug and gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 1996–2001.
- Mehta, D., and Malik, A.B. (2006). Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol. Rev.* 86, 279–367.
- Napierska, D., Quarck, R., Thomassen, L.C.J., Lison, D., Martens, J.A., Delcroix, M., Nemery, B., and Hoet, P.H. (2013). Amorphous silica nanoparticles promote monocyte adhesion to human endothelial cells: size-dependent effect. *Small Weinh. Bergstr. Ger.* 9, 430–438.
- Ren, Y., Guo, L., Tang, X., Apparsundaram, S., Kitson, C., Deguzman, J., Fuentes, M.E., Coyle, L., Majmudar, R., Allard, J., et al. (2013). Comparing the differential effects of LPA on the barrier function of human pulmonary endothelial cells. *Microvasc. Res.* 85, 59–67.
- Rønn, L.C., Ralets, I., Hartz, B.P., Bech, M., Berezin, A., Berezin, V., Møller, A., and Bock, E. (2000). A simple procedure for quantification of neurite outgrowth based on stereological principles. *J. Neurosci. Methods* 100, 25–32.

- Rothen-Rutishauser, B., Kuhn, D.A., Ali, Z., Gasser, M., Amin, F., Parak, W.J., Vanhecke, D., Fink, A., Gehr, P., and Brandenberger, C. (2014). Quantification of gold nanoparticle cell uptake under controlled biological conditions and adequate resolution. *Nanomed.* 9, 607–621.
- Schnitzer, J.E., Oh, P., Pinney, E., and Allard, J. (1994). Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J. Cell Biol.* 127, 1217–1232.
- Schubert, W., Frank, P.G., Razani, B., Park, D.S., Chow, C.W., and Lisanti, M.P. (2001). Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo. *J. Biol. Chem.* 276, 48619–48622.
- Shapero, K., Fenaroli, F., Lynch, I., Cottell, D.C., Salvati, A., and Dawson, K.A. (2011). Time and space resolved uptake study of silica nanoparticles by human cells. *Mol. Biosyst.* 7, 371–378.
- Stan, R.-V. (2002). Structure and function of endothelial caveolae. *Microsc. Res. Tech.* 57, 350–364.
- Thévenaz, P., and Unser, M. (2007). User-friendly semiautomated assembly of accurate image mosaics in microscopy. *Microsc. Res. Tech.* 70, 135–146.
- Vranic, S., Boggetto, N., Contremoulins, V., Mornet, S., Reinhardt, N., Marano, F., Baeza-Squiban, A., and Boland, S. (2013). Deciphering the mechanisms of cellular uptake of engineered nanoparticles by accurate evaluation of internalization using imaging flow cytometry. *Part. Fibre Toxicol.* 10, 2.
- Wang, Z., Tiruppathi, C., Minshall, R.D., and Malik, A.B. (2009). Size and dynamics of caveolae studied using nanoparticles in living endothelial cells. *ACS Nano* 3, 4110–4116.
- Weibel, E.R., and Paumgartner, D. (1978). Integrated stereological and biochemical studies on hepatocytic membranes. II. Correction of section thickness effect on volume and surface density estimates. *J. Cell Biol.* 77, 584–597.
- Xing, X., He, X., Peng, J., Wang, K., and Tan, W. (2005). Uptake of silica-coated nanoparticles by HeLa cells. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 5, 1688–1693.
- Ye, D., Raghnaill, M.N., Bramini, M., Mahon, E., Åberg, C., Salvati, A., and Dawson, K.A. (2013). Nanoparticle accumulation and transcytosis in brain endothelial cell layers. *Nanoscale* 5, 11153–11165.
- Yoshida, T., Yoshioka, Y., Tochigi, S., Hirai, T., Uji, M., Ichihashi, K., Nagano, K., Abe, Y., Kamada, H., Tsunoda, S., et al. (2013). Intranasal exposure to amorphous nanosilica particles could activate intrinsic coagulation cascade and platelets in mice. *Part. Fibre Toxicol.* 10, 41.

Figure 1

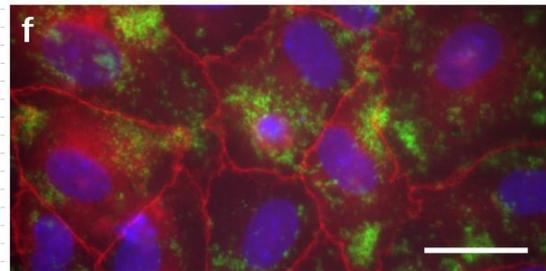
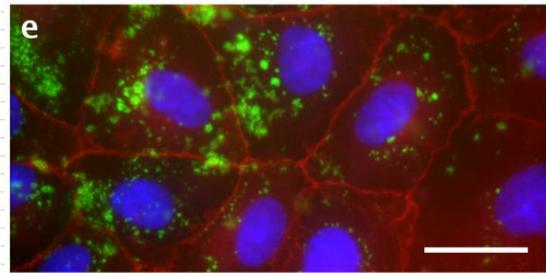
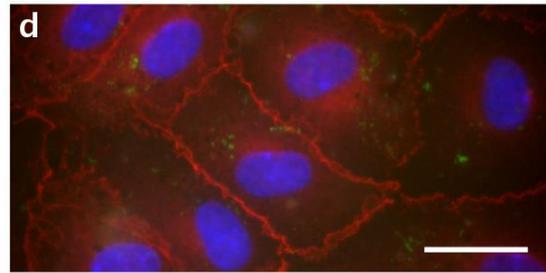
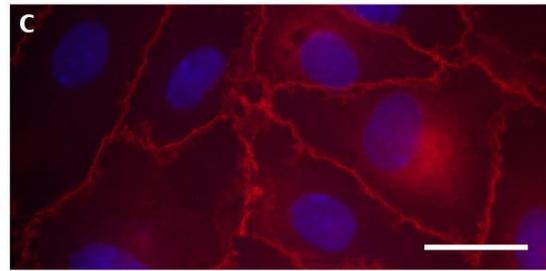
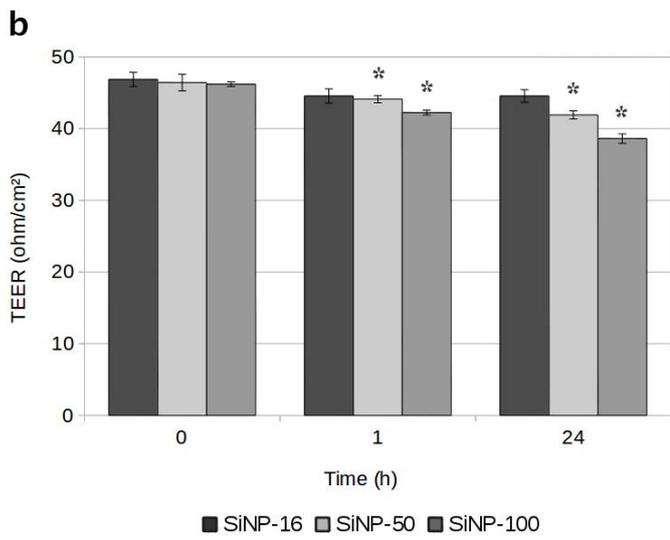
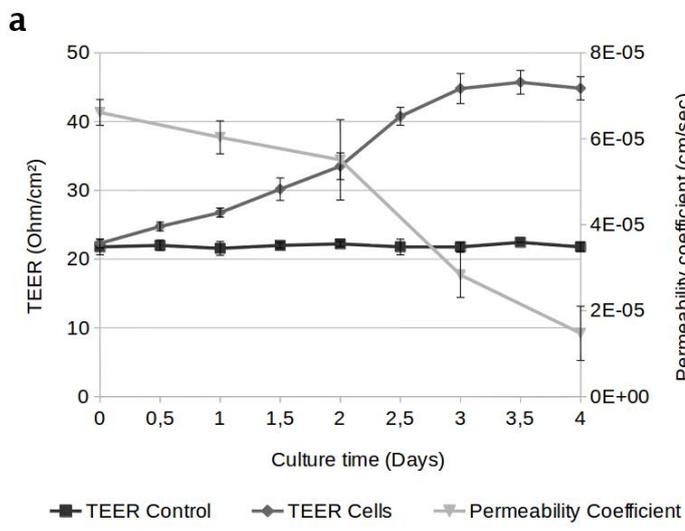


Figure 2

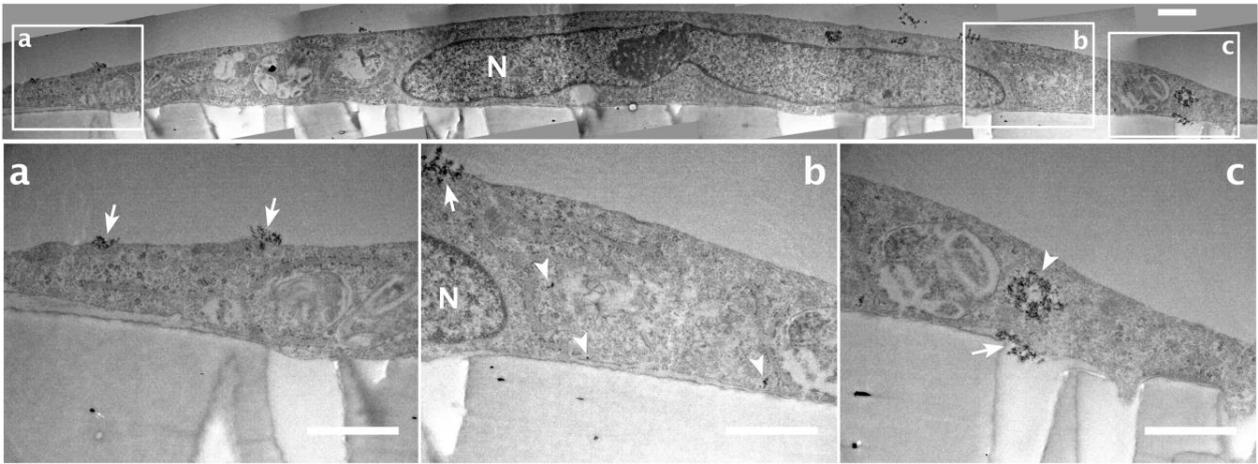


Figure 3

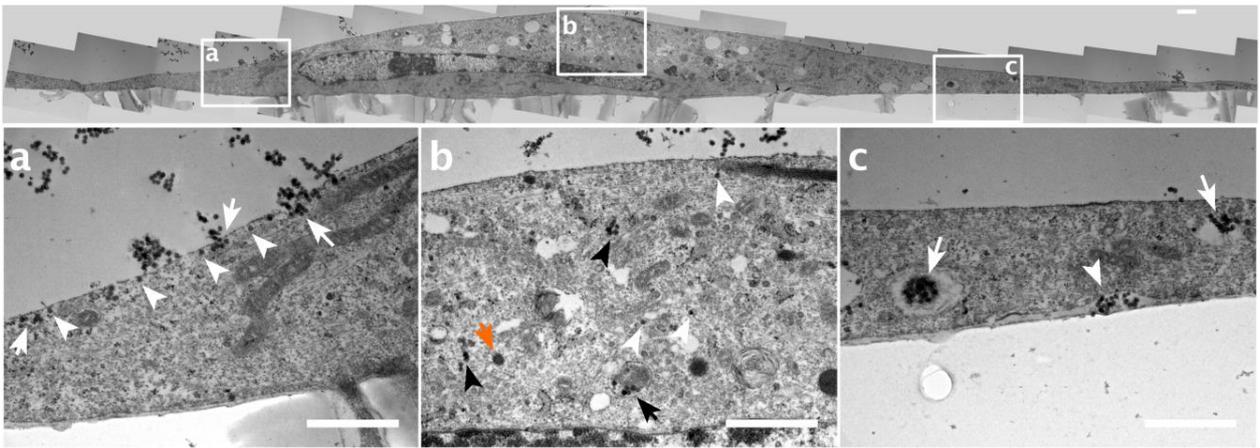


Figure 4

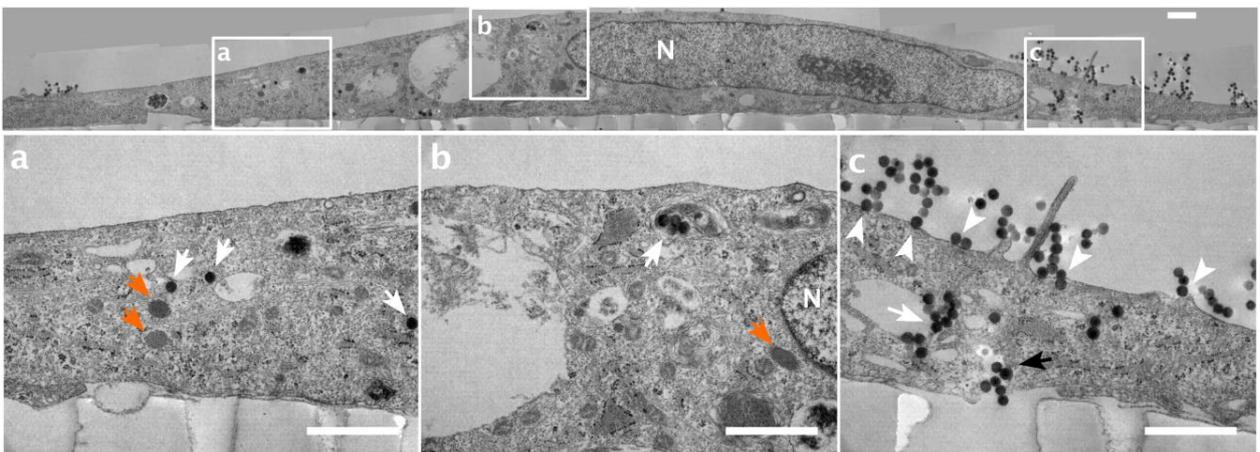


Figure 5

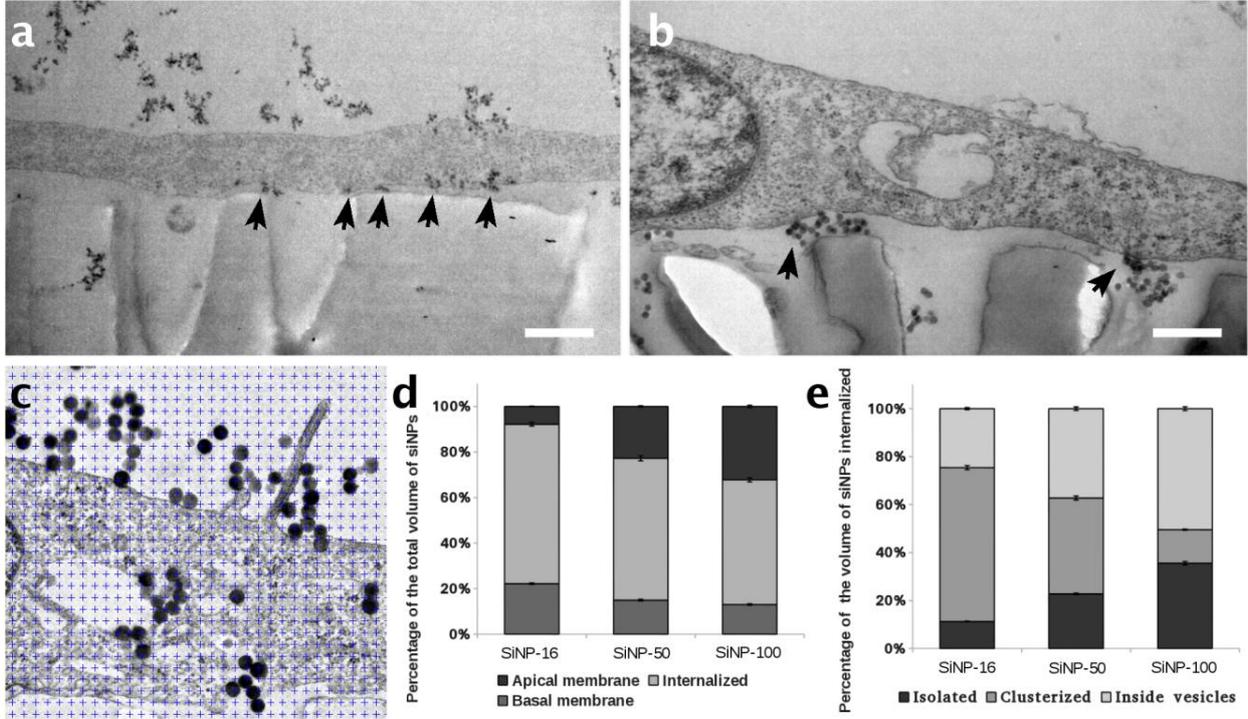


Figure 6

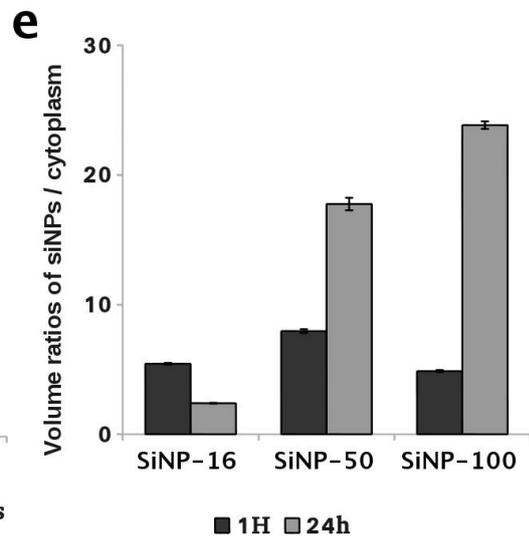
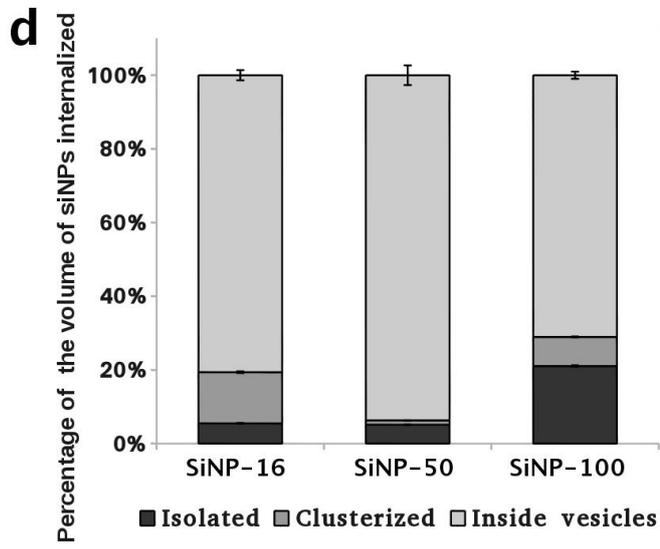
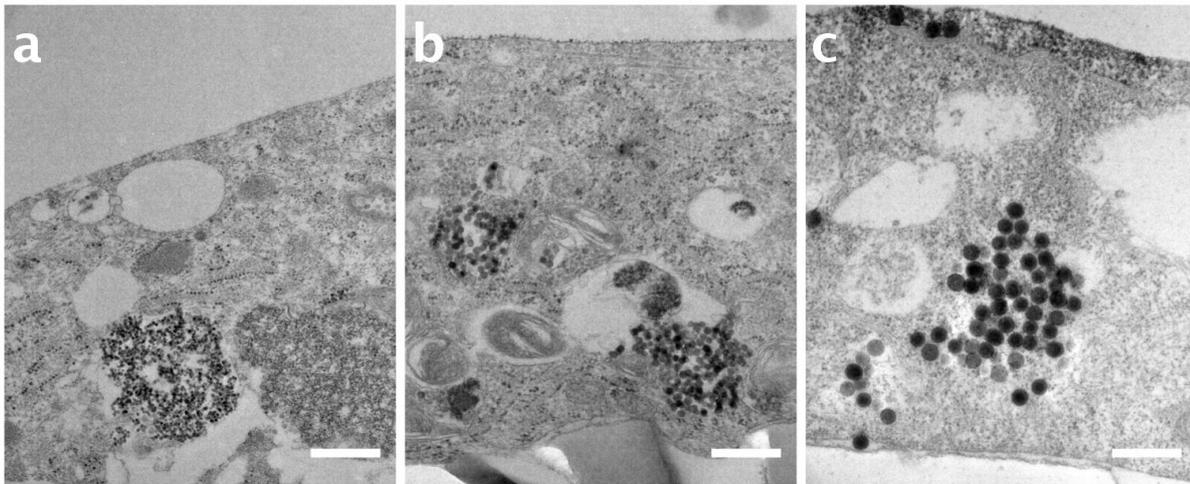


Figure 7

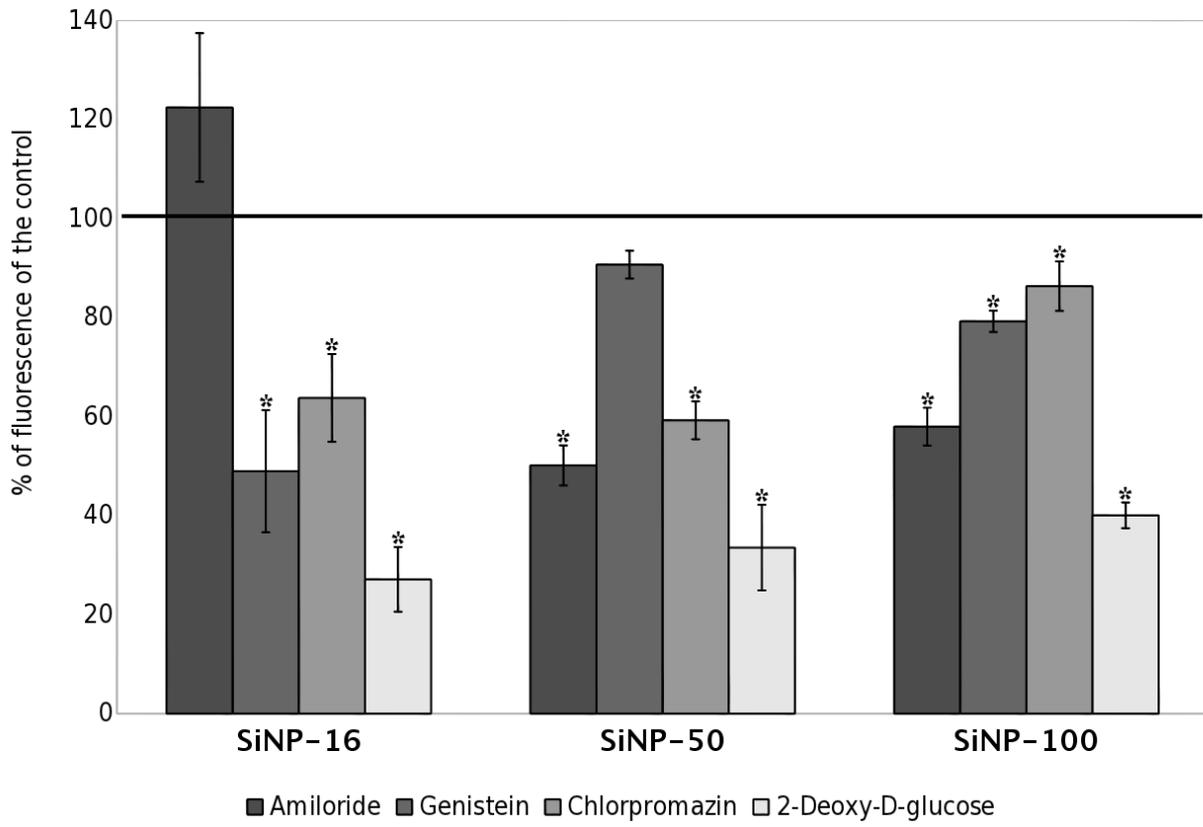


Figure 8

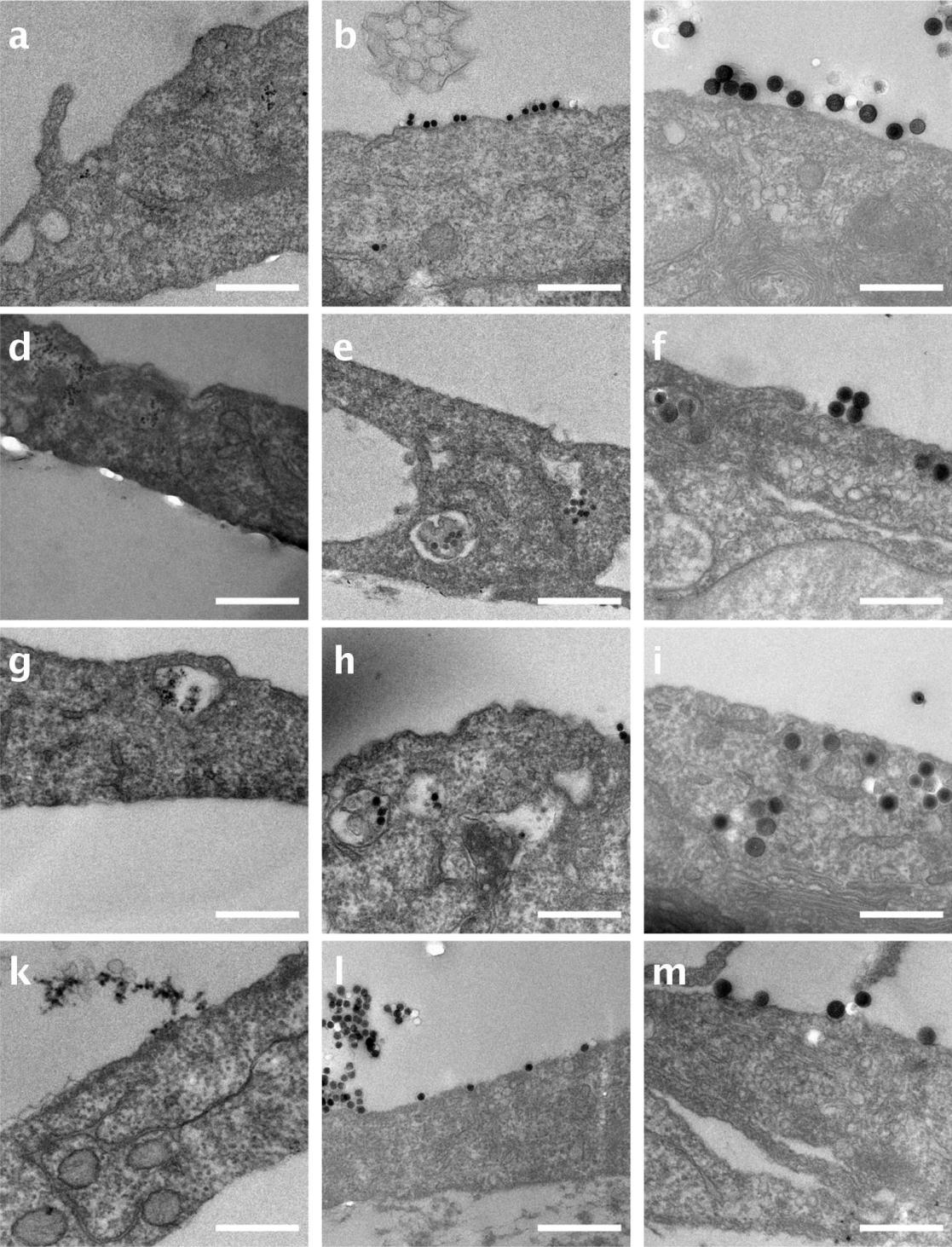
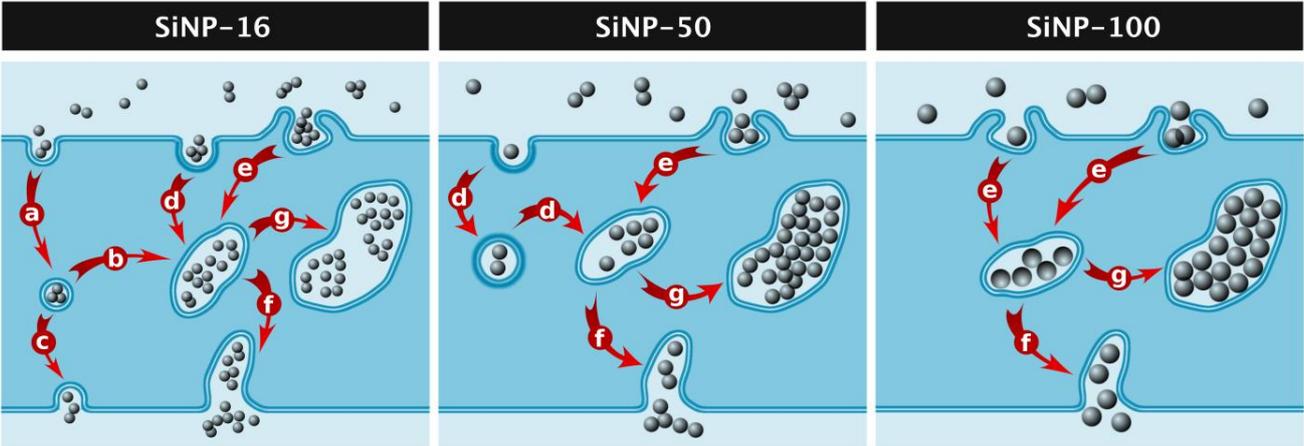
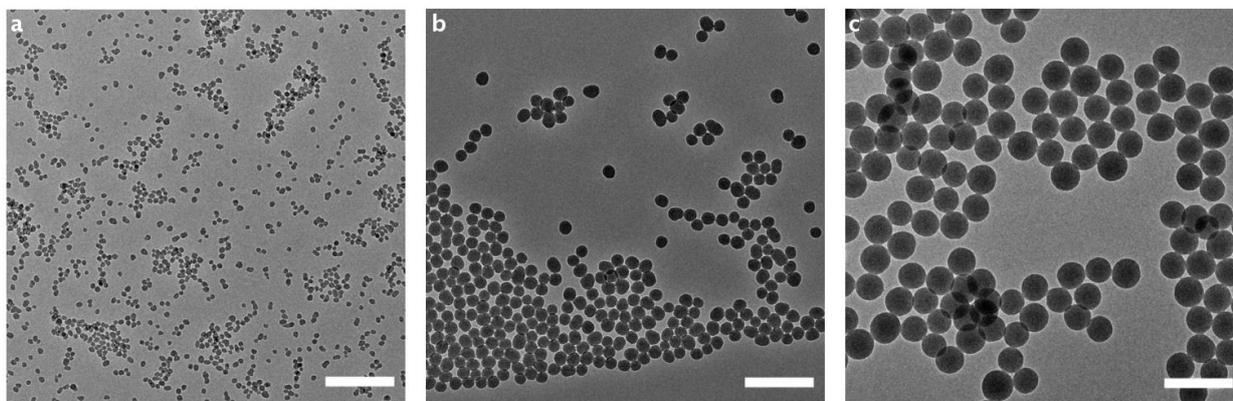


Figure 9



Supplementary material

Figure S1



FigureS1 : TEM images of SiNP-1- SiNP-50 and SiNP-100 in H₂O Scale bars 100 nm

Table S1 Physico-chemical characteristics of NPs.

TEM Size	Hydrodynamic radius (nm)			Zeta potential (mV)		
	16 nm	50 nm	100 nm	16 nm	50 nm	100 nm
Water	28	86	141	-32.4 ± 3.2	-36.0 ± 3.6	-33.5 ± 3.8
ECBM	26	87	145	-19.5 ± 5.7	-25.4 ± 4.9	-29.6 ± 5.2

SiNPs were characterized for their hydrodynamic radius and zeta potential suspended in water and ECBM. Dynamic light scattering and zeta potential values were measured by a Wallis and Vasco granulometer (CordouanTechnologies, Pessac France).

Figure S2

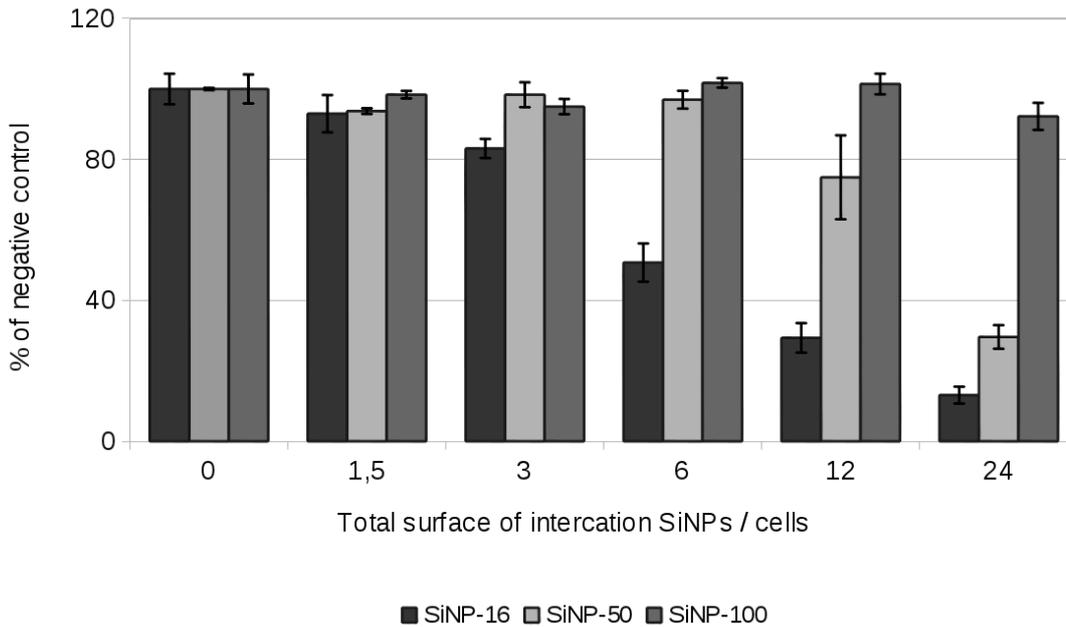


Figure S2 Cytotoxicity of SiNPs in hPAEC.

cells were exposed to various doses of SiNPs for 1 h. Cell viability was measured 24 hours after treatment using the WST-1 assay. Toxicity threshold is observed for a SiNP concentration of 3 (SiNP surface to cell surface ratio) corresponding to 1.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for SiNP-16, 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for SiNP-50 and 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for SiNP-100. Data are the percentages of surviving cells relative to the control reported as the mean \pm SEM of three independent experiments. * Significantly different from control ($p < 0.05$).

Figure S3

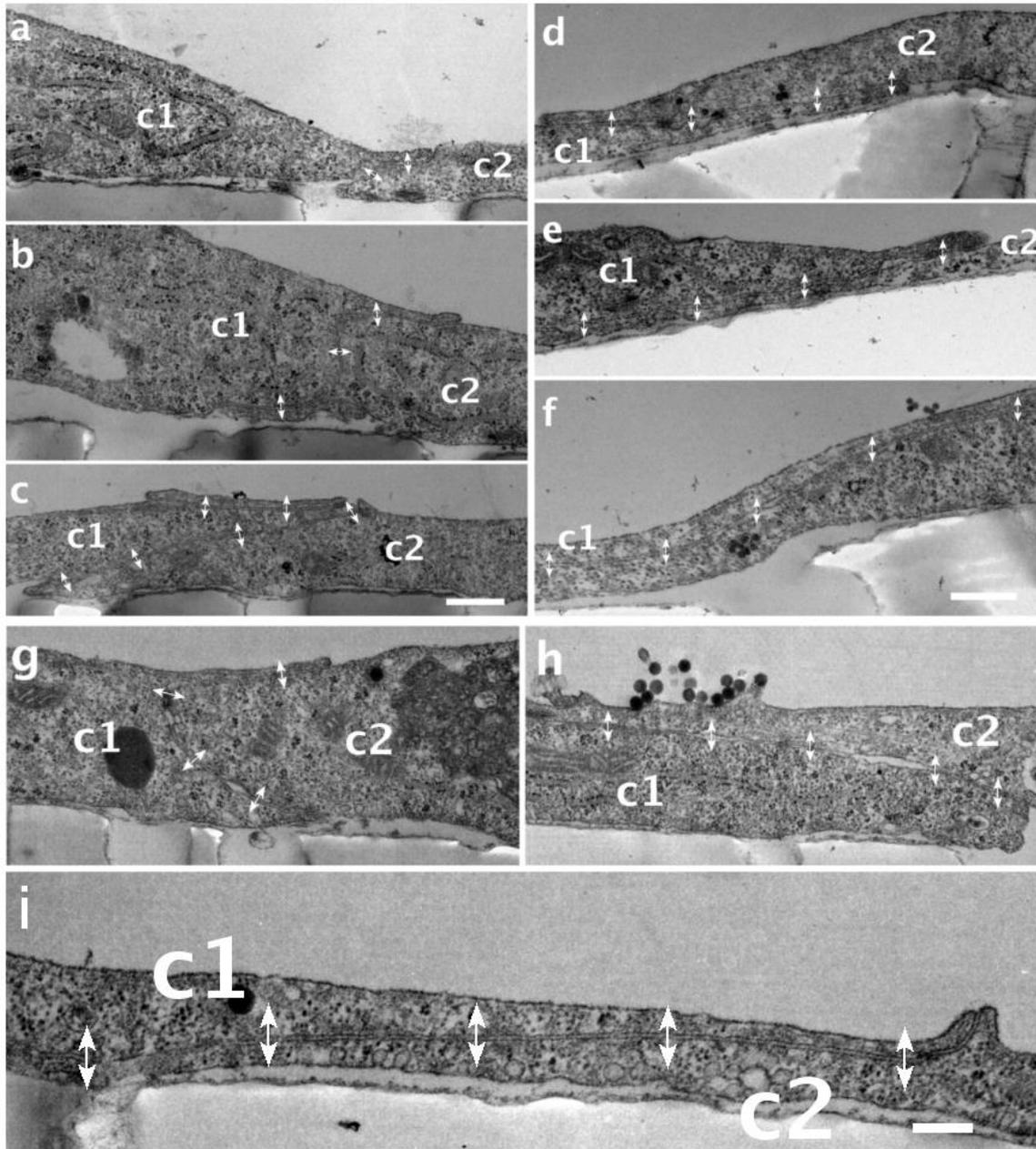


Figure S3: Gallery of TEM images corresponding to cell-cell junctions after SiNP treatments.

a-c) Cell treated with SiNP-16. d-f) Cell treated with SiNP-50. g-i) Cell treated with SiNP-100. The junctions (noted with double arrows) formed between two cells marked (c1) and (c2) were apparently not perturbed by SiNP treatment. No SiNP was visible at cell-cell contacts. Scale bars 500 nm.

Figure S4

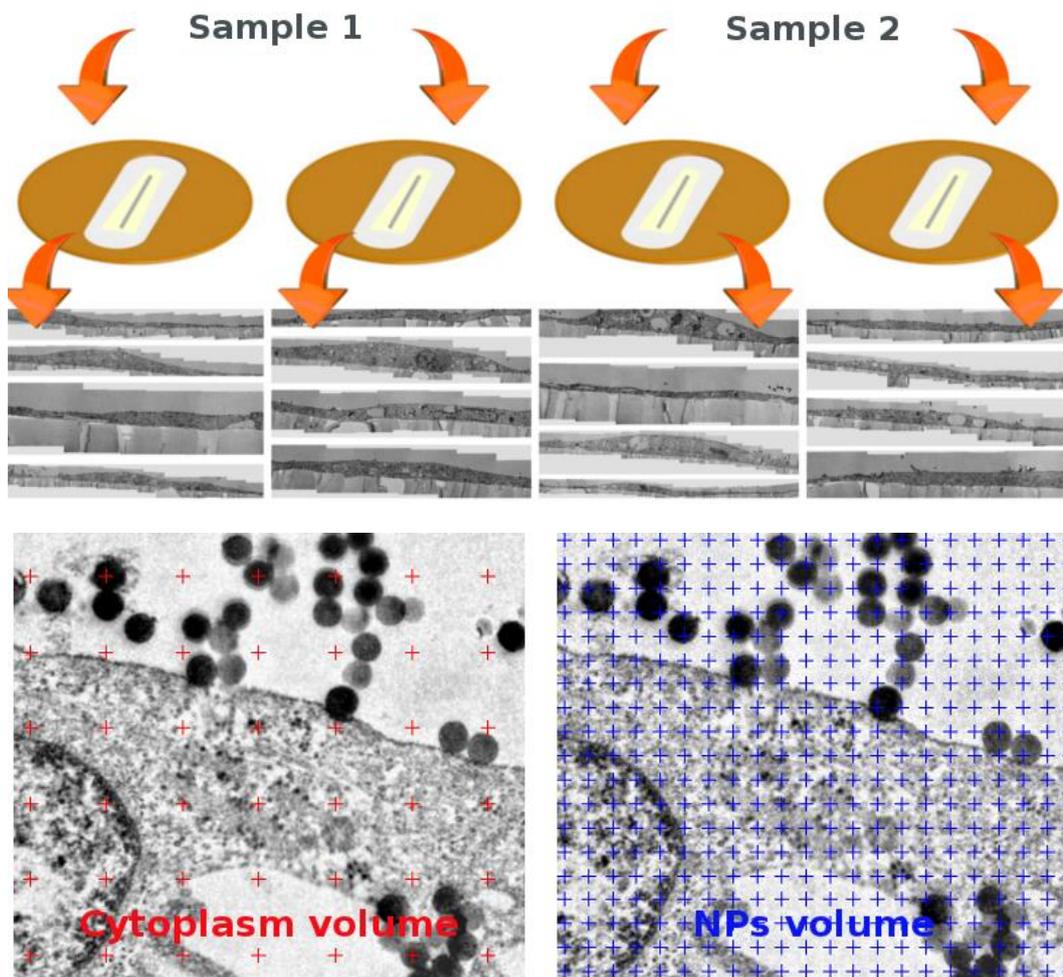


Figure S4: General scheme of stereology process. From two samples, 16 images of cells were recored from 4 TEM grids. After contrast enhancement of high resolution images, cytoplasm volume is estimated with a $0.08 \mu\text{m}^2$ square lattice grid overlaid on every image. A SiNP-100 is shown as example. Intersections with cytoplasm were recorded. Then a $0.008 \mu\text{m}^2$ square lattice grid is overlaid on the same image for counting intersections with SiNPs. The determination of the percentage of SiNPs to cytoplasmic volume is described in Material and Method.

Valorisation scientifique

Articles en cours de soumission

- ◇ **Titre** : Size-dependent transcytosis of silica nanoparticles in human endothelial cell barrier.
- ◇ **Auteurs** : Grégoire Naudin, Marion Decossas, Olivier Le Bihan, Stéphane Mornet and Olivier Lambert.

- ◇ **Titre** : Metallic oxide nanoparticle translocation across human bronchial epithelial barrier.
- ◇ **Auteurs** : Isabelle George, Grégoire Naudin, Sonja Boland, Stéphane Mornet, Vincent Contremoulins ; Karine Beugnon, Laurent Martinon, Olivier Lambert, Armelle Baeza-Squiban.
- ◇ **Journal** : ACS Nano

Article accepté :

- ◇ **Titre** : Internalization and fate of silica nanoparticles in C2C12 skeletal muscle cells : Evidence of a beneficial effect on myoblast fusion.
- ◇ **Auteurs** : Sylvie Poussard, Marion Decossas, Olivier Le Bihan, Stéphane Mornet, Grégoire Naudin, Olivier Lambert.
- ◇ **Journal** : International Journal of Nanomedicine. ID : 74158

Communications orales :

- ◇ **EMBO Course : Electron Microscopy and Stereology in Cell Biology - 2012 - Ceské Budejovice, République Tchèque.**
- ◇ **Titre** : Internalization and transcytosis of biological and synthetic nanoparticles in human endothelial cells

- ◇ **Colloque de la société française des microscopies - 2013 - Nantes, France.**
- ◇ **Titre** : Internalisation de nanoparticules de silice dans les cellules endothéliales pulmonaires humaines.

- ◇ **Condensed matter CMD 25 - JMC 14 - 2014 - Paris, France.**
- ◇ **Titre** : Transcytosis of silica nanoparticules.

Résumé : L'utilisation récente des nanoparticules (NPs) comme vecteurs pour l'imagerie et l'adressage d'agents thérapeutiques en nano-médecine nécessite la compréhension de leurs mécanismes d'internalisation et de transport au niveau des barrières biologiques. Dans ce contexte, l'objectif de cette étude est de caractériser l'interaction et la transcytose de NPs de silice fluorescentes en fonction de leur taille (15, 50 et 100 nm) dans un modèle *in-vitro* de barrière endothéliale pulmonaire humaine. L'internalisation et le transport trans-endothélial des NPs a été analysé quantitativement à l'échelle nanométrique par microscopie électronique à transmission (MET) combinée à de la stéréologie. Un transport trans-endothélial a été observé pour toutes les tailles de NPs. Néanmoins, l'analyse de la distribution intracellulaire révèle une tendance à l'accumulation dans les voies de dégradation cellulaires pour les NPs de 50 et 100 nm. Cette accumulation est moindre pour les NPs de 15 nm. L'internalisation des NPs a également été analysée par cytométrie en flux et MET en présence de différents inhibiteurs de l'endocytose dans le but d'identifier leurs voies d'internalisation. En fonction de la taille des NPs, les mécanismes d'endocytose varient, suggérant une dépendance du transport trans-cellulaire à certains mécanismes d'endocytose. L'internalisation des NPs de 15 nm par la voie d'endocytose cavéole dépendante pourrait ainsi expliquer l'efficacité de leur transport du côté basal. Les méthodologies développées pour l'étude du transport trans-cellulaire des NPs de silice peuvent être appliquées à l'étude de NPs synthétiques plus complexes ou de NPs biologiques, telles que les lipoprotéines de basse-densité, et ce dans un contexte pathologique.

Mots clés : Nanoparticules, endothélium, transcytose, endocytose, microscopie électronique à transmission, stéréologie.

Abstract : The recent use of nanoparticles (NPs) as carriers for imaging and delivery of therapeutic agents in nanomedicine involves understanding their endocytosis and transcytosis mechanisms at biological barriers. In this context, the aim of this study was to characterize the interaction and transcytosis of fluorescent silica NPs in function of their size (15, 50, and 100 nm) in an *in-vitro* model of human pulmonary endothelial barrier. NPs internalization and trans-endothelial transport has been quantitatively analyzed at nanometer resolution using transmission electron microscopy (TEM) combined with stereology. Trans-endothelial transport has been observed for each size of NPs. However cellular distribution analysis shows an accumulation in the cellular degradation pathways for 50 nm and 100 nm NPs. Whereas 15 nm NPs are less accumulated. NPs uptake was also analyzed by flow cytometry and TEM in the presence of different inhibitors to decipher NPs internalization pathways. Depending on NPs size, the involved endocytosis pathways were different, suggesting a dependency of trans-cellular transport toward endocytic mechanisms. The specific internalization of 15 nm NPs by the caveolin dependant pathway could explain the efficacy of their release at the basal side. Techniques developed for the study of the trans-cellular transport of silica NPs can also be applied to more complex synthetic NPs or biological NPs, such as low-density lipoproteins, in a pathological context.

Keywords : Nanoparticles, endothelium, transcytosis, endocytosis, transmission electron microscopy, stereology.

Résumé : L'utilisation récente des nanoparticules (NPs) comme vecteurs pour l'imagerie et l'adressage d'agents thérapeutiques en nano-médecine nécessite la compréhension de leurs mécanismes d'internalisation et de transport au niveau des barrières biologiques. Dans ce contexte, l'objectif de cette étude est de caractériser l'interaction et la transcytose de NPs de silice fluorescentes en fonction de leur taille (15, 50 et 100 nm) dans un modèle *in-vitro* de barrière endothéliale pulmonaire humaine. L'internalisation et le transport trans-endothélial des NPs a été analysé quantitativement à l'échelle nanométrique par microscopie électronique à transmission (MET) combinée à de la stéréologie. Un transport trans-endothélial a été observé pour toutes les tailles de NPs. Néanmoins, l'analyse de la distribution intracellulaire révèle une tendance à l'accumulation dans les voies de dégradation cellulaires pour les NPs de 50 et 100 nm. Cette accumulation est moindre pour les NPs de 15 nm. L'internalisation des NPs a également été analysée par cytométrie en flux et MET en présence de différents inhibiteurs de l'endocytose dans le but d'identifier leurs voies d'internalisation. En fonction de la taille des NPs, les mécanismes d'endocytose varient, suggérant une dépendance du transport trans-cellulaire à certains mécanismes d'endocytose. L'internalisation des NPs de 15 nm par la voie d'endocytose cavéole dépendante pourrait ainsi expliquer l'efficacité de leur transport du côté basal. Les méthodologies développées pour l'étude du transport trans-cellulaire des NPs de silice peuvent être appliquées à l'étude de NPs synthétiques plus complexes ou de NPs biologiques, telles que les lipoprotéines de basse-densité, et ce dans un contexte pathologique.

Mots clés : Nanoparticules, endothélium, transcytose, endocytose, microscopie électronique à transmission, stéréologie.

Abstract : The recent use of nanoparticles (NPs) as carriers for imaging and delivery of therapeutic agents in nanomedicine involves understanding their endocytosis and transcytosis mechanisms at biological barriers. In this context, the aim of this study was to characterize the interaction and transcytosis of fluorescent silica NPs in function of their size (15, 50, and 100 nm) in an *in-vitro* model of human pulmonary endothelial barrier. NPs internalization and trans-endothelial transport has been quantitatively analyzed at nanometer resolution using transmission electron microscopy (TEM) combined with stereology. Trans-endothelial transport has been observed for each size of NPs. However cellular distribution analysis shows an accumulation in the cellular degradation pathways for 50 nm and 100 nm NPs. Whereas 15 nm NPs are less accumulated. NPs uptake was also analyzed by flow cytometry and TEM in the presence of different inhibitors to decipher NPs internalization pathways. Depending on NPs size, the involved endocytosis pathways were different, suggesting a dependency of trans-cellular transport toward endocytic mechanisms. The specific internalization of 15 nm NPs by the caveolin dependant pathway could explain the efficacy of their release at the basal side. Techniques developed for the study of the trans-cellular transport of silica NPs can also be applied to more complex synthetic NPs or biological NPs, such as low-density lipoproteins, in a pathological context.

Keywords : Nanoparticles, endothelium, transcytosis, endocytosis, transmission electron microscopy, stereology.
