HAL
open science

Utilisation de nanoparticules pour délivrer des protéines dans les épithéliums respiratoires : caractérisation des mécanismes impliqués

Christophe Lionel Dombu Youta

To cite this version:

Christophe Lionel Dombu Youta. Utilisation de nanoparticules pour délivrer des protéines dans les épithéliums respiratoires : caractérisation des mécanismes impliqués. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2012. Français. NNT : 2012LIL2S015 . tel-00787621

HAL Id: tel-00787621

https://theses.hal.science/tel-00787621v1

Submitted on 12 Feb 2013

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 du Droit et de la Santé – Lille 2

Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille

N° attribué par la bibliothèque :

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée et soutenue publiquement par :

Christophe Lionel DOMBU YOUTA

Le 03/09/2012

Utilisation de nanoparticules pour délivrer des protéines dans les épithéliums respiratoires. Caractérisation des mécanismes impliqués

Composition du jury :

Rapporteurs :	Professeur Patrick MIDOUX (CNRS, Orléans)
	Docteur Emannuel GARCION (INSERM, Angers)
Examinateurs :	Professeur Régis MATRAN (EA4483, Lille)
	Dr Fabrice NESSLANY (Institut Pasteur, Lille)
Directeur de thèse :	Professeur Didier BETBEDER (EA4483, Lille)
Co-directeur de thèse :	Professeur Frank LE CURIEUX (Helsinki/Lille)

Travaux effectués au sein de l'équipe EA4483, IFR 114 IMPRT, Faculté de Médecine, Pôle recherche, Département de physiologie, 1 place de Verdun, 59045 Lille cedex, France

REMERCIEMENTS

A toutes les personnes qui m'ont soutenu pendant la réalisation de ce travail, j'adresse ma profonde gratitude,

ϑ A mon directeur de thèse le Pr. Didier Betbeder, qui m'a fait découvrir l'univers infiniment passionnant des nanotechnologies. Pour la passion qu'il m'a transmise, pour son encadrement pendant ces années, pour sa présence et ses précieux conseils pendant la rédaction de ce manuscrit.

Au professeur Frank Le Curieux, qui a participé à la mise en place de ce projet et qui entre Lille et Helsinki a su garder un regard très constructeur sur l'avancée des travaux.

ϑ A mes parents Michel et Calixte Dombu qui ont toujours cru en moi, j'exprime mes tendres et sincères remerciements. Votre présence, vos paroles, vos inquiétudes et vos encouragements ont été ma force.

ϑ A Gaëlle Smeets, ma femme, qui avec beaucoup de plaisirs, a su partager avec moi les moments importants pendant ces années. Merci pour ces encouragements toujours bien inspirés, pour ta présence et pour ta participation à la relecture et la mise en forme de ce document.

ϑ Merci à tous les membres de ma famille. Plus particulièrement à Carine et Valéry, ma sœur et mon frère. A plus de 6000 kilomètres vous avez toujours été présents.

ϑ A Gislaine Lienhardt, ma « seconde maman » à qui je dois tant. Merci pour tes encouragements, pour nos nombreuses discussions sur la vie, sur la science et même sur les nanotechnologies.

ϑ Au Dr Maya Kroubi, j'adresse des remerciements particuliers. Une amie et une collègue qui a su guider mes premiers pas au laboratoire.

ϑ A mes amis avec qui j'ai partagé tant de choses, Alain, Hilaire, Armand, Alina, Romuald, Karim, Julie, Cécile, Cindy, Cyrille, Cédric et tous les autres. Merci pour tout.

ϑ Enfin, tous ceux qui ont été présents et m'ont apporté leurs conseils et leur amitié dans cette période. Vous avez tous permis à ce travail de voir le jour. Je pense au Dr Jiang Chang, au Dr Fabrice Nesslanny, au Dr Philippe Gosset, au Dr Julien Buyck, au Dr. Julie Kerr-Conte, au Dr Steve Lancel au Pr Regis Matran et Remi Neuvière, à Danièle Leroy, Meryem Tardivel, le Dr Rodolphe Carpentier, Fanny Mercier, le Dr Youssef Jallouli et à tous les autres.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS 3
TABLE DES MATIERES 5
LISTE DES PUBLICATIONS 7
LISTE DES ABBREVIATIONS 7
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX 10
PREAMBULE 12

PARTIE I : INTRODUCTION GENERALE 13
I. LA VECTORISATION 14
II. NANOPARTICULES, NANOTECHNOLOGIES, NANOMEDECINE 15
III. DEVELOPPEMENT DES NANOPARTICULES COMME SYSTEME DE DELIVRANCE DE MOLECULES D'INTERET PHARMACEUTIQUE 17
3.1. Nanoparticules comme vecteurs 17
3.2. Classification des principales nanoparticules utilisées en vectorisation 21
3.2.1. Liposomes 21
3.2.2. Micelles 21
3.2.3. Les nanocapsules 22
3.2.4. Les nanosphères 22
3.2.5. Dendrimères 23
3.2.6. Les nanoparticules inorganiques 24
3.2.7. Les nanoparticules hybrides métal-organique 24
3.2.8. Les nanoparticules étudiées : nanoparticules polysaccharidiques cationiques et poreuses de maltodextrine 25
3.3. Evolution des nanovecteurs : vers des nanoparticules de plus en plus performantes 27
IV. OBJECTIFS DE LA THESE 29
V. L'ENDOCYTOSE DES NANOPARTICULES 30
5.1. Généralités sur l'endocytose 30
5.1.1. Définition 30
5.1.2. Les voies d'endocytose 31
5.1.3. La pinocytose 32
5.1.3.1. La voie des clathrines 32
5.1.3.2. Les voies d'endocytose indépendantes des clathrines 34
5.1.4. La phagocytose 37
5.2. Régulation de l'endocytose 38
5.3. L'endocytose des nanoparticules 41

VI. DEVELOPPEMENT DES NANOPARTICULES COMME VECTEURS DE MEDICAMENTS A TRAVERS LES VOIES RESPIRATOIRES 43

6.1. L'utilisation des voies respiratoires pour l'administration de médicaments 43
6.2. Nanoparticules comme vecteurs de molécules dans les voies respiratoires 46

PARTIE II : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 50

PARTIE III : RESULTATS 80

CHAPITRE 1 : ETUDES DES MECANISMES D'ENDOCYTOSE 81

CHAPITRE 2 : ETUDE DE LA GENOTOXICITE DES NANOPARTICULES 109

CHAPITRE 3 : DELIVRANCE DE PROTEINES 140

PARTIE IV : DISCUSSION GENERALE 167

PARTIE V : CONCLUSION ET PERSPECTIVES 184

BIBLIOGRAPHIE 187

LISTE DES PUBLICATIONS

Publication 1

Characterization of endocytosis and exocytosis of cationic nanoparticles in airway epithelium cells. **Dombu** CY, Kroubi M, Zibouche R, Matran R, Betbeder D. Nanotechnology. 2010 3;21(35):355102.

Publication 2

Study of serum interaction with a cationic nanoparticle: Implications for in vitro endocytosis, cytotoxicity and genotoxicity. Merhi M, **Dombu** CY, Brient A, Chang J, Platel A, Le Curieux F, Marzin D, Nesslany F, Betbeder D. 2012. Int J Pharm. 2012 14;423(1):37-44.

Publication 3

Influence of surface charge and inner composition of nanoparticles on intracellular delivery of proteins in airway epithelial cells. **Dombu** CY, Carpentier R, Betbeder D. Biomaterials. 2012 33(35):9117-26.

Publication 4 (Revue Bibliographique)

Airway delivery of peptides and proteins using nanoparticles. **Dombu** CY, Betbeder D. Biomaterials. 2013 34(2):516-525.

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AFSSAPS	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
AS	Azide de sodium
BHE	Barrière Hémato Encéphalique
CMC	Concentration Micellaire Critique
CME	Clathrins Mediated Endocytosis
CPZ	Chlorpromazine
DGNP+	Nanoparticules polysaccharidiques cationiques à cœur lipidique à base de Di-Palmitoyl Phosphatidyl Glycerol
DiI	1,1'–dioctadecyl 3, 3,3',3'-tétraméthylindocarboxycyanate perchlorate
DPPG	Di-Palmitoyl Phosphatidyl Glycerol ou 1,2-dipalmitoyl-snglycero- 3-phosphatidylglycérol
DQ-OVA	Dye Quenched-Ovalbumin
EMEM	Eagle Minimum Essential Medium
EMR	Endocytose Médiée par Récepteur
EPR	Enhancing Permeation Retention
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
FPG	formamidopyrimidine -DNA glycosylase ou 8-oxoguanine DNA glycosylase
GAG	Glycosaminoglycanne
GTMA	Glycidyl Tri-Méthyl-Ammonium chloride
HBE	Human Bronchial Epithelial (cells)
HSPG	Héparane sulfate protéoglycanne
IRCP	International System of Radiological Protection
KBR	Kreb's Buffer Ringer
MLV	Multi-Lamellar Vesicle
MBCD	Methyl-bêta Cyclodextrine
LDL	Low density Lipoprotein
LUV	Large Unilamellar Vesicle
MCC	Muco-Ciliary Clearance (clairance muco-ciliaire)
MoF	Metal-organic framework

NP+	Nanoparticules polysaccharidiques cationiques
PACA	Poly (Alkyl CyanoAcrylate)
PAO	Phenylarsine oxyde
PBS	Phosphate Buffered Saline solution
PEG	Poly-Ethylène Glycol
PLGA	Poly-(Lactid-co-Glycolic) Acid
QD	Quantum Dots
USPIO	Ultrasmall Super Paramagnetic Iron Oxides
VR	Voies Respiratoires
SMBV	SupraMolecular BioVector
SPION	Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticle
SRE	Système Réticulo-Endothélial
SUV	Small Unilamellar Vesicle

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1: Principales catégories de nanoparticules utilisées en vectorisation……...25

Figure 2: Représentation schématique des trois générations de nanovecteurs 28

Figure 3: Endocytose des phases fluides et endocytose médiée par récepteur..... 30

Figure 4: Classification des mécanismes d'endocytose 31

Figure 5: Formation de vésicules recouvertes de clathrines..... 33

Figure 6: Vésicules de cavéoles 35

Figure 7: Formation d'une vésicule de macropinocytose..... 36

Figure 8: Organisation membranaire des radeaux lipidiques 37

Figure 9: Phagocytose d'une particule 38

Figure 10: Schéma d'une vésicule d'endocytose montrant les différents acteurs moléculaires responsables de sa formation et sa destination. 39

Figure 11: Destination des vésicules d'endocytose médiée par récepteur 40

Figure 12: Présentation des voies respiratoires humaines..... 44

Figure 13: Comparaison des mucus respiratoires et gastro-intestinales 45

Figure 14: Franchissement des barrières respiratoires par les nanoparticules..... 47

Figure 15: Dépôt régional des particules dans les voies respiratoires en fonction de leur taille..... 48

Figure 16: Cellules 16HBE au microscope électronique à balayage..... 169

Figure 17: Expression membranaire des HSPGs. 171

Figure 18: Equilibre entre l'endocytose et l'exocytose des NP^+ 174

Figure 19: Etude cinétique de l'exocytose des nanoparticules NP^+ (A) et $DGNP^+$ (B) associées à l'ovalbumine (OVA).. 177

Figure 20: Mécanismes d'action possibles de dommages de l'ADN..... 180

Figure 21: Identification fonctionnelle des protéines secrétées par les cellules bronchiques. 181

Tableau 1: Exemples d'utilisation des nanotechnologies 16

Tableau 2: Mécanismes de dépôt des particules inhalées dans les voies respiratoires 47

PREAMBULE

Ce manuscrit présente des travaux effectués dans le cadre d'une thèse de doctorat en biologie cellulaire et nanomédecine. Ces travaux qui se situent à l'interface entre recherche fondamentale et appliquée, avaient pour objectif d'évaluer le potentiel de nanoparticules polysaccharidiques cationiques de maltodextrine (NP^+) comme vecteurs de molécules dans les voies respiratoires humaines. Il s'est agit pour cela de comprendre les mécanismes d'interaction des NP^+ avec les cellules épithéliales des voies respiratoires, d'évaluer leur toxicité sur ces cellules et de caractériser les mécanismes de délivrance intracellulaire de protéines par ces nanoparticules. Les études présentées ont été menées sous la direction du Pr Didier BETBEDER au sein du laboratoire EA4483 de l'Institut de Médecine Préventive et de Recherche Thérapeutique (IMPRT, IFR-114) de Lille. Elles ont été possibles grâce aux soutiens financiers de la région Nord-Pas-de-Calais et de l'université de Lille 2.

Le document se divise en cinq parties:

La PARTIE I est une introduction générale situant le contexte scientifique de la thèse. Elle présente notamment les notions de nanotechnologie, nanomédecine, vectorisation nanoparticulaire et d'endocytose. Nous y traitons également des enjeux scientifiques de la vectorisation nanoparticulaire, et plus particulièrement de l'utilisation des nanoparticules comme systèmes de délivrance de molécules d'intérêt pharmaceutique dans les voies respiratoires.

La PARTIE II présente une revue bibliographique. C'est un état de l'art montrant, au travers de plusieurs études scientifiques et applications, l'intérêt de développer les nanoparticules comme vecteurs de protéines dans les voies respiratoires.

Dans la PARTIE III, nous présentons les résultats de nos travaux. Ces résultats sont présentés sous forme d'articles publiés ou soumis dans différents journaux.

La PARTIE IV est une discussion générale. Nous y traitons plus en détail les résultats obtenus et de leur importance scientifique au vu des différentes données de la littérature.

Enfin, dans la PARTIE V nous faisons une conclusion générale de la thèse.

PARTIE I

INTRODUCTION GENERALE

PARTIE I

INTRODUCTION GENERALE

« Tout grand progrès scientifique est né d'une nouvelle audace de l'imagination. »

John Dewey, philosophe américain (1859-1952)

I. LA VECTORISATION

A la fin du XIXème siècle, l'immunologiste et médecin allemand Paul Ehrlich énonça la théorie du *Magic Bullet*; une balle « magique » capable de transporter des molécules chimiques à l'intérieur de l'organisme, à des concentrations biologiquement actives sans danger pour le patient, et présentant une forte affinité pour les sites d'action (Winau et al., 2004). Ainsi furent posées les premières bases du concept de vectorisation, c'est-à-dire l'ensemble des approches permettant de transporter des molécules biologiquement actives (entité chimique, peptide, protéine, acide nucléique, etc.) jusqu'à leur cible à l'intérieur de l'organisme. La conception d'un vecteur doit répondre à un grand nombre de défis à la fois théoriques et pratiques. Tout d'abord, le vecteur doit être biocompatible, c'est-à-dire toléré par l'organisme. Il doit transporter une molécule d'intérêt en quantité biologiquement efficace et avoir une forte affinité pour les tissus ciblés. Il doit franchir les barrières biologiques et protéger la molécule jusqu'à son site d'action. Enfin, le vecteur ne doit présenter aucune toxicité pour l'organisme. A cela nous rajouterons qu'un vecteur idéal devra permettre de libérer le principe actif de manière chronobiologique, c'est-à-dire en tenant compte de l'état physiologique et du rythme biologique de l'organisme.

Depuis l'énoncé de la théorie du *Magic Bullet*, les recherches sur la vectorisation ont fait des progrès considérables. Aujourd'hui la vectorisation est une discipline scientifique à part entière, pluridisciplinaire, qui offre des possibilités nouvelles pour l'administration des médicaments. De nombreux vecteurs sont étudiés en recherche. Ils peuvent être d'origine biologique tels que des transporteurs présents dans notre sang (hémoglobine, lipoprotéines), d'origine naturelle mais non biologique (virus modifiés), ou d'origine synthétique (liposomes, nanoparticules). Parmi les stratégies développées, une attention particulière est portée sur la conception de vecteurs nanoparticulaires. Les nanoparticules sont des colloïdes synthétiques de petite taille, biocompatibles et capables d'interagir

avec l'environnement biologique. Leur utilisation en médecine et plus particulièrement en vectorisation est en pleine expansion, et laisse entrevoir des résultats prometteurs pour de nombreuses applications telles que le diagnostic des maladies, la délivrance des médicaments et la vaccination.

II. NANOPARTICULES, NANOTECHNOLOGIES, NANOMEDECINE

Le mot nanoparticule vient du grec « nano » qui signifie nain, et de particule qui désigne la quantité la plus infime d'un corps. Outre cet aspect étymologique, le préfixe nano désigne une échelle de grandeur de l'ordre du milliardième de mètre (10^{-9} m). Conformément à la norme européenne ISO TC 229, une nanoparticule est un objet qui a une taille comprise entre 1 et 100 nm sur au moins une de ses dimensions. Ainsi, on désigne par nanoscience ou nanotechnologie, l'étude et la manipulation de matériaux aux échelles atomique, moléculaire et macromoléculaire, où les propriétés diffèrent significativement de celles à plus grande échelle (Warheit et al., 2008). Dans un discours, *There's Plenty of Room at the Bottom, an Invitation to Enter a New Field of Physics*, prononcé en 1959 à l'American Physical Society, le Physicien Richard Feynman discutait déjà des possibilités immenses qu'offrent les nanosciences (Feynman, 1960). En effet, l'émergence des nanosciences est une avancée technologique majeure de ces dernières décennies, qui offre des possibilités nouvelles pour de nombreuses applications.

Les nanoparticules sont classées en deux catégories en fonction de leur origine: les nanoparticules naturelles et les nanoparticules anthropiques (produites par l'homme). Les nanoparticules naturelles sont produites dans la nature sans intervention de l'homme. Nous y retrouvons par exemple, les cendres volcaniques, les poussières ultrafines, les virus, les débris bactériens et les grains de pollen. Les nanoparticules anthropiques quant à elles sont classées en deux catégories, selon qu'elles soient produites de façon intentionnelle ou non. Les nanoparticules anthropiques non-intentionnelles sont principalement des débris de combustion issus de l'activité humaine. Ce sont par exemple des nanoparticules de diesel provenant de la combustion d'hydrocarbures, ou des cendres issues des combustions ménagères et industrielles. Les nanoparticules anthropiques intentionnelles (synthétiques) sont fabriquées volontairement par l'homme pour leur utilisation. En effet, une nanoparticule possède un ensemble de caractéristiques physicochimiques, notamment la taille, la charge de surface, la réactivité, la forme, la porosité ou encore l'hydrophobicité. Chacune de ces caractéristiques lui confère des propriétés uniques et particulières (exemple: réactivité, résistance, biocompatibilité, magnétisme, propriétés optiques) qui trouvent leurs intérêts dans de nombreuses applications (tableau 1).

Tableau 1: Exemples d'utilisation des nanotechnologies

SECTEURS D'ACTIVITE	**EXEMPLES D'APPLICATION**
Automobile et aéronautique	Matériaux renforcés et légers, peintures, additifs pour carburant, pneumatique
Electronique et communication	Processeurs miniaturisés, cellules solaires, ordinateurs, jeux électroniques, écrans plats
Chimie et matériaux	Pigment, poudre céramique, catalyseurs multifonctionnels, textile et revêtement antibactérien, isolation thermique
Pharmaceutique, biomédical, biotechnologie	Vectorisation, vaccins mucosaux, implants, médecine régénératrice, appareils miniaturisés de diagnostic
Energie	Cellules photovoltaïques, matériaux isolants, batteries, photosynthèse artificielle
Environnement	Purification de l'eau, recyclage, pesticides et fertilisants, dépollution, analyses chimiques

La nanomédecine ou nano-biotechnologie est l'application des nanosciences à la recherche biomédicale. Les propriétés particulières d'interaction des nanoparticules avec le vivant en font des outils extrêmement intéressants pour plusieurs domaines de la recherche fondamentale et clinique, tels que la fabrication des biomatériaux, le diagnostic, l'administration de médicaments, la vaccination, la médecine régénératrice, l'imagerie médicale et la purification des biomolécules (Jabbari, 2009). Dans tous ces domaines l'utilisation des nanoparticules connait un essor croissant et montre des résultats prometteurs. Dans ce travail, nous nous intéresserons plus particulièrement au développement des nanoparticules comme vecteurs de molécules d'intérêt pharmaceutiques dans l'organisme.

III. DEVELOPPEMENT DES NANOPARTICULES COMME SYSTEME DE DELIVRANCE DE MOLECULES D'INTERET PHARMACEUTIQUE

3.1. Nanoparticules comme vecteurs

L'émergence des nanovecteurs nourrit de nombreux espoirs pour la recherche médicale. De nombreuses molécules à potentiel thérapeutique sont découvertes chaque jour dans le monde. Cependant, une grande partie d'entre elles restent peu efficaces *in vivo*, à cause de nombreuses contraintes aussi bien techniques que biologiques: instabilité, toxicité, immunogénicité, temps de demi-vie court, métabolisme hépatique, incapacité à franchir les barrières biologiques, faible endocytose…etc. L'utilisation des nanoparticules pourraient répondre à un objectif fondamental de la vectorisation qui est d'améliorer l'efficacité thérapeutique des molécules médicamenteuses, tout en diminuant leurs effets indésirables. En effet, l'idée est d'associer la molécule d'intérêt à un vecteur colloïdal, agissant comme des « transporteurs nanométriques » capable de franchir les barrières biologiques, de protéger la molécule transportée et de la délivrer sous forme biologiquement active dans son site d'action. Aujourd'hui de nombreuses études s'intéressent au développement des nanovecteurs, et plusieurs médicaments ou agents thérapeutiques à base de nanoparticules ont fait leur apparition sur le marché. Leur nombre va croissant et concerne plusieurs domaines de la recherche pharmaceutique : thérapie anticancéreuse, traitement de maladies neurodégénératives, vaccination, thérapie génique, imagerie cellulaire…etc.

Les premières nanoparticules ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) sont des nanoparticules à base d'oxydes de fer (Fe_2O_3), développées comme agents de contraste en imagerie par résonance magnétique (IRM) chez l'homme (Bonnemain, 1998; Sonvico et al., 2005). On y compte notamment certains produits tels que l'Endorem® (imagerie du cancer du foie, laboratoire Guerbet), le Feridex® (détection de lésions du foie, AMAG Pharmaceuticals), le Lumirem® (imagerie du tube digestif, laboratoire Guerbet), le Combidex (imagerie des ganglions lymphatiques du cancer de la prostate) et le Resovist® (détection de lésions du foie, laboratoire Schering). Ce sont des nanoparticules constituées d'un cœur d'oxyde de fer enrobé par des agents de « coating » (principalement des dérivés de dextran, silicone et citrate). Elles ont perdu leur magnétisme, mais restent très sensible à l'exposition à un champ magnétique externe (Lawaczeck et al., 2003). En fonction de leur taille on classe les nanoparticules d'oxyde de fer en deux catégories : les USPION (Ultrasmall Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles) de taille inférieure à 50nm, et les SPION (Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles) qui possèdent une taille supérieure à 50nm. Elles sont cliniquement intéressantes pour l'imagerie du cancer du foie et des métastases (Di Marco et al., 2007). De façon générale, les nanoparticules inorganiques possèdent des caractéristiques d'absorption et de diffraction de la lumière qui les rendent intéressantes comme agent de contraste en imagerie. En effet,

outre les oxydes de fer, plusieurs types de nanoparticules inorganiques sont développés pour le diagnostic par imagerie. Citons par exemple les Quantum-dot qui possèdent une très grande stabilité vis-à-vis de la lumière, les nanoparticules d'or qui sont biocompatibles et facilement fonctionnalisables, les nanoparticules de céramique qui sont biocompatibles et très stables, et les nanotubes de carbone qui convertissent la lumière absorbée en chaleur (Huang et al., 2011).

En thérapie, les nanoparticules apportent également de nombreux espoirs. Les médicaments mis sur le marché sont de plus en plus nombreux, tels que l'Ambisome® (formulation liposomale d'amphotéricine B, antifongique), le PEG-Intron® (Interferon alfa PEGylé associé à la ribavirine, traitement des infections chroniques de l'hépatite C chez l'homme) et le Pegasys® (traitement de l'hépatite chronique C chez des adultes). Un exemple illustrant l'apport des nanoparticules est la thérapie anticancéreuse. Les chimiothérapies utilisées à ce jour sont très contraignantes pour plusieurs raisons : faible solubilité des drogues, faible sélectivité pour les cellules cancéreuses, faible perméabilité dans les tissus tumoraux, libération trop rapide, résistance des cellules cancéreuses, forte toxicité sur les tissus sains (Horcajada et al., 2010; Shapira et al., 2011). Pour pallier à ces problèmes, de nombreuses formulations utilisant des drogues anti tumorales (doxorubicine, gencitabine, praclitaxel, bursufan) associées aux nanoparticules sont étudiées. Les études montrent en effet, que les nanoparticules sont capables de traverser les fenestrations des néo-vaisseaux pour s'accumuler massivement dans les tissus tumoraux par un effet dit « EPR » (Enhancing Permeation Retention) (Reddy, 2005; Saha et al., 2010). De plus, cet effet peut être augmenté par le greffage à la surface des nanoparticules de polymères hydrophiles neutres (exemple PEG), qui empêchent leur captation par le système réticulo-endothélial, augmentant la durée de circulation dans le sang (Wang et al., 2010; Wang and Thanou, 2010). Par ailleurs, les études montrent que le ciblage des tumeurs peut être amélioré par l'utilisation de nanoparticules couplées à des anticorps ou des ligands spécifiques des tissus tumoraux (Torchilin, 2010). Grâce à ces nombreux travaux, plusieurs formulations anticancéreuses à base de nanoparticules ont été mises sur la marché ou sont en phase clinique de développement. Elles permettent d'augmenter la toxicité des drogues sur les cellules cancéreuses, tout en réduisant significativement les effets indésirables sur les tissus sains. Parmi les plus connus, nous pouvons citer l'Abraxane® qui a obtenu une AMM en 2008, pour le traitement en monothérapie du cancer du sein métastatique. C'est une formulation nanoparticulaire à base de paclitaxel amorphe et d'albumine sérique humaine. Nous pouvons également citer le Doxil®/Caelyx® (PEG-liposome de doxorubicine), utilisé pour le traitement de nombreux cancers, l'Oncospar® (forme PEGylée de L-asparaginase), utilisé pour le traitement de leucémie lymphoblastique aigue et le Neulasta® utilisé pour la réduction de la durée des neutropénies pendant les chimiothérapies.

S'il n'existe pas encore de médicaments sur le marché, les nanoparticules sont également étudiées pour le traitement des pathologies du système nerveux central telles que le gliome, la maladie

d'Alzheimer, la maladie de parkinson et l'épilepsie. Des formulations nanoparticulaires sont développées pour le traitement mais également pour le diagnostic de ces maladies (Potschka, 2010; Yang, 2010). En effet, le principal obstacle pour le développement de médicaments ciblant le cerveau est le passage de la barrière hémato encéphalique (BHE) (Agarwal et al., 2009; Alam et al., 2010). C'est une barrière extrêmement sélective, très peu perméable pour les médicaments, y compris les petites molécules liposolubles (Alam et al., 2010; Sahni et al., 2011). Des études montrent que les nanoparticules sont capables de traverser les cellules endothéliales de la BHE par transcytose et d'échapper aux mécanismes d'efflux (Chang et al., 2009; Jallouli et al., 2007; Roney et al., 2005). Un exemple intéressant est le développement de nanoparticules pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. Cette maladie se caractérise notamment par la formation et le dépôt d'agrégats de la protéine β-amyloïde dans les espaces inter-synaptiques au niveau du cortex cérébral, une forte accumulation de métaux dans les cellules touchées et de nombreuses lésions oxydatives, induisant une dégénérescence progressive des cellules affectées (Roney et al., 2005). Plusieurs catégories de molécules capables d'empêcher la formation d'agrégats de β-amyloïde, de capter et éliminer les métaux accumulés ou de réduire le stress oxydatif, sont pourtant incapables de traverser la BHE. Des études montrent que la formulation liposomale de curcumine (une molécule antioxydante et anti-inflammatoire étudiée dans le traitement de la maladie d'Alzheimer), permet d'inhiber l'agrégation de la β-amyloïde, et de réduire significativement la cytotoxicité (Taylor et al., 2011). Des résultats similaires ont été observés avec des nanoparticules de polysorbate-80 incorporant de la mélatonine (Schaffazick et al., 2005). Ces travaux montrent des perspectives très encourageantes pour le traitement des maladies du système nerveux central.

Les nanoparticules sont également étudiées dans la recherche de nouveaux vaccins. Elles sont développées à la fois comme transporteur d'antigènes ciblant les cellules immunitaires, mais aussi comme adjuvants vaccinaux capables d'augmenter l'intensité de la réaction immunitaire (Jones, 2008). En effet, les antigènes purifiés, perdent de leur immunogénicité et sont généralement incapables de stimuler une réaction immunitaire efficace. Les nanoparticules sont capables de transporter les antigènes, d'améliorer leur absorption par les cellules immunitaires et de stimuler la réponse immunitaire (Perrie et al., 2008). De plus, les nouvelles formulations nanoparticulaires associent des anticorps ou des ligands spécifiques des cellules présentatrices d'antigènes, initiatrices de la réponse immunitaire permettant leur ciblage (De Temmerman et al., 2011; Rice-Ficht et al., 2010).

Ces exemples montrent l'intérêt de développer des nanoparticules pour le traitement des maladies complexes et pour améliorer les thérapies existantes. Ces efforts se traduisent par le développement de nanoparticules pour des applications toujours plus diverses (maladies métaboliques, thérapie génique, VIH, grippe…) et un nombre toujours plus croissant de produits sur la marché.

3.2. Classification des principales nanoparticules utilisées en vectorisation

En fonction de la nature chimique de leur structure, plusieurs catégories de nanoparticules sont utilisées en vectorisation (figure 1).

3.2.1. Liposomes

Les liposomes furent fabriqués pour la première fois en 1965 par Alec Bangham et ses collègues alors qu'ils effectuaient des recherches sur les propriétés de la bicouche lipidique de la membrane plasmique (Bangham, 1993; Bangham et al., 1965). Ce sont des vésicules artificielles, sphériques, formées par une ou plusieurs bicouches de phospholipides séparées entre elles par un espace aqueux. Les liposomes sont classés en trois catégories, en fonction de leur taille et du nombre de bicouches lipidiques les composant. Les Small Uni-lamellar Vesicles (SUV) qui sont de petits liposomes d'environ 20-100nm de diamètre possédant une seule bicouche de phospholipides, les Large Uni-lamellar Vesicles (LUV) qui sont des liposomes à une seule bicouche de taille très hétérogène et les Multi-lamellar Vesicles (MLV) qui possèdent deux ou plusieurs bicouches lipidiques séparées entre elles par un milieu aqueux.

La nature phospholipidique de la paroi des liposomes en fait des vecteurs biocompatibles, capables de fusionner avec les membranes cellulaires. Par ailleurs, les propriétés de flexibilité, de rigidité ou de fusion de la bicouche lipidique, dépendent de sa composition en phospholipides. Ainsi, les phospholipides à longues chaînes saturées telle que la dipalmitoylphosphatidylcholine augmentent la rigidité et la perméabilité de la bicouche, tandis que la présence de cholestérol ou de lécithines de soja, leur confèrent une structure plus flexible et moins stables (Sahoo and Labhasetwar, 2003). Aujourd'hui les liposomes utilisés possèdent des structures de plus en plus évoluées, incorporant dans leur bicouche des molécules à propriétés divers (anticorps, poly-éthylène glycol) qui améliorent leur stabilité, leur pharmacocinétique et leur ciblage *in vivo*.

3.2.2. Micelles

Les micelles sont des nanoparticules auto-assemblées de 10 à 100nm, constituées d'une couronne de molécules amphiphiles en équilibre dynamique autour d'un cœur non solide (Letchford and Burt, 2007). En solution aqueuse, les molécules amphiphiles s'organisent spontanément et adoptent la conformation structurelle la moins couteuse en énergie, en minimisant les interactions de leurs parties hydrophobes avec l'environnement aqueux. En milieu organique en revanche, les molécules amphiphiles adoptent le comportement inverse et ce sont les parties hydrophiles qui sont orientées au

cœur de la micelle. Ces propriétés des micelles en font des nanoparticules intéressantes car elles sont faciles à préparer et peuvent permettre d'incorporer des molécules aussi bien hydrophiles qu'hydrophobes. De plus, des études montrent que l'organisation stérique particulière de la couronne des micelles les protège de l'opsonisation qui est l'attachement des molécules du complément à la surface de la nanoparticule, et donc permet d'augmenter leur temps de demi-vie dans le sang (Kataoka et al., 2000). La formation des micelles dépend de la quantité de molécules amphiphiles présentes en solution, et il existe une concentration dite « micellaire critique » (CMC) à partir de laquelle les molécules amphiphiles sont capables de s'auto-organiser en micelles, dont la stabilité augmente avec la concentration en molécules amphiphiles (Kabanov and Alakhov, 2002). En dessous de la CMC en revanche, les micelles sont moins stables et se déstructurent. Cette dépendance à la CMC qui les rend instables à la dilution est donc l'une des principales limites à l'utilisation *in vivo* des micelles.

3.2.3. Les nanocapsules

Les nanocapsules sont des particules colloïdales constituées d'un réservoir liquide ou semi-liquide à température ambiante, contenu à l'intérieur d'une enveloppe solide de nature polymérique (Vauthier and Bouchemal, 2009). Dans les systèmes nanocapsulaires, les molécules sont généralement incorporées dans le réservoir, mais elles peuvent aussi être associées de façon covalente ou non à la paroi polymérique. Le type de polymère et les propriétés de surface influencent: la stabilité de la nanocapsule, le type de molécule transportable et la pharmacocinétique de la formulation. Le réservoir des nanocapsules peut être de nature lipidique ou bien aqueuse, permettant d'incorporer des molécules chimiques hydrosolubles ou non (Letchford and Burt, 2007). Toutefois, la plupart des nanocapsules possèdent un réservoir lipidique. Dans le cas d'une nanocapsule à réservoir aqueux, on parle de polymersome. Les polymersomes possèdent une structure proche des liposomes, à la différence que la paroi polymérique des polymersomes est constituée de copolymères amphiphiles (Discher and Eisenberg, 2002; Letchford and Burt, 2007). Cette catégorie de nanocapsules est adaptée pour l'incorporation de molécules hydrophiles.

3.2.4. Les nanosphères

Les nanosphères sont des nanoparticules polymériques colloïdales matricielles; c'est-à-dire dont la structure est entièrement solide. Elles peuvent être pleines ou poreuses. Les nanosphères pleines sont des structures nanométriques compactes, de formes généralement sphériques, synthétisées à base de polymères ou de copolymères. Parmi les plus connues, on trouve par exemple les nanoparticules de poly-(alkyl cyanoacrylate) (PACA) qui sont des particules biocompatibles et biodégradables, étudiées comme vecteurs de molécules dans différents types d'applications, et notamment la vectorisation de

drogues anticancéreuses (Nicolas and Couvreur, 2009; Vauthier et al., 2007). On y trouve également les nanoparticules de PLGA. Dans le cas d'une nanosphère pleine, la molécule à vectoriser peut être associée à la surface de la nanoparticule déjà formée, ou bien incorporée à l'intérieur de la structure polymérique pendant la fabrication de la nanoparticule. Dans ce cas, le polymère doit être biodégradable et la dégradation de la nanoparticule à l'intérieur de l'organisme permet la libération du principe actif. C'est donc un système très intéressant pour la préparation de formulations à délivrance prolongée.

Contrairement aux nanosphères pleines, les nanosphères poreuses ont une structure de mailles plus ou moins serrées dont l'architecture est formée d'une matrice polymérique. Dans ce cas, la molécule d'intérêt peut être insérée dans les structures poreuses, adsorbée en surface, ou bien associée chimiquement au polymère formant la matrice. Ce type de structure poreuse permet d'une part l'incorporation de la molécule dans une nanoparticule préfabriquée, et d'autre part la libération de la molécule sans dégradation du polymère. Par ailleurs, la présence de pores permet d'incorporer de grandes quantités de molécules, sans modifier la taille et les propriétés de surfaces de la nanoparticule (Arayne and Sultana, 2006; Asif et al., 2006; Paillard et al., 2010). De plus, l'architecture flexible de la paroi interne des pores permet de s'adapter à la forme et à la taille de la molécule insérée et augmente les capacités d'association (Horcajada et al., 2010). Enfin, la structure interne de la nanoparticule poreuse peut être modifiée chimiquement par exemple en la rendant hydrophobe/hydrophile en fonction du type de molécule à associer. Ce sont donc des systèmes très attractifs pour des formulations à délivrance contrôlée.

3.2.5. Dendrimères

Les dendrimères sont une catégorie émergeante de nanoparticules synthétisées pour la première fois au début des années 1980. Ces sont des macromolécules nanométriques formées de plusieurs séries de branchements organisés, reliés par un cœur moléculaire (Sahoo and Labhasetwar, 2003). Les dendrimères sont des nanovecteurs très intéressants, peu polydispersés, dont le système de branchement permet de faire plusieurs types d'association chimique sur les différents groupes terminaux. Les molécules transportées sont insérées entre les branchements ou associés chimiquement à ceux-ci. Les propriétés des dendrimères dépendent de la nature chimique du cœur moléculaire et des branchements. Parmi les dendrimères les plus étudiés, on trouve les dendrimères poly-(amidoamine) (PAMAM), les poly-(propylene imine) (PPI) et les polyether-copolyester (PEPE) (Wijagkanalan et al., 2011).

3.2.6. Les nanoparticules inorganiques

Les nanoparticules inorganiques possèdent des propriétés particulières de conductivité, de magnétisme, de biocompatibilité, de réactivité, de résistance, de fluorescence…etc. qui les rendent très intéressantes pour différentes applications y compris le diagnostic et le traitement des maladies (Huang et al., 2011). Parmi les plus étudiées, on retrouve par exemple les nanoparticules d'or pour leur propriétés d'optique, d'électrochimie et de biocompatibilité (Boisselier and Astruc, 2009); les nanoparticules d'argent pour leur propriété antibactérienne (Chaloupka et al., 2010); les nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques pour leur utilisation en imagerie médicale (Neuwelt et al., 2009); les nanoparticules de silice pour leur biocompatibilité et capacité d'interaction avec l'organisme (Slowing et al., 2008) et les nano-cristaux semi-conducteurs dont les plus connus sont les Quantum Dots (QD), très intéressantes pour la stabilité de leur fluorescence (Li et al., 2011).

3.2.7. Les nanoparticules hybrides métal-organique

Egalement appelés MoF (pour Metal-organic Framework), ce sont des nanoparticules hybrides faites d'éléments métalliques interconnectés par des molécules organiques. Elles peuvent également être placées dans la catégorie des nanosphères et se caractérisent par leur grande porosité (taille des pores allant de 0,4 à 6nm) (Horcajada et al., 2008). Cette importante porosité donne aux MoFs une plus grande capacité d'encapsulation (proportionnellement à leur taille), comparé aux autres nanosphères (McKinlay et al., 2010).

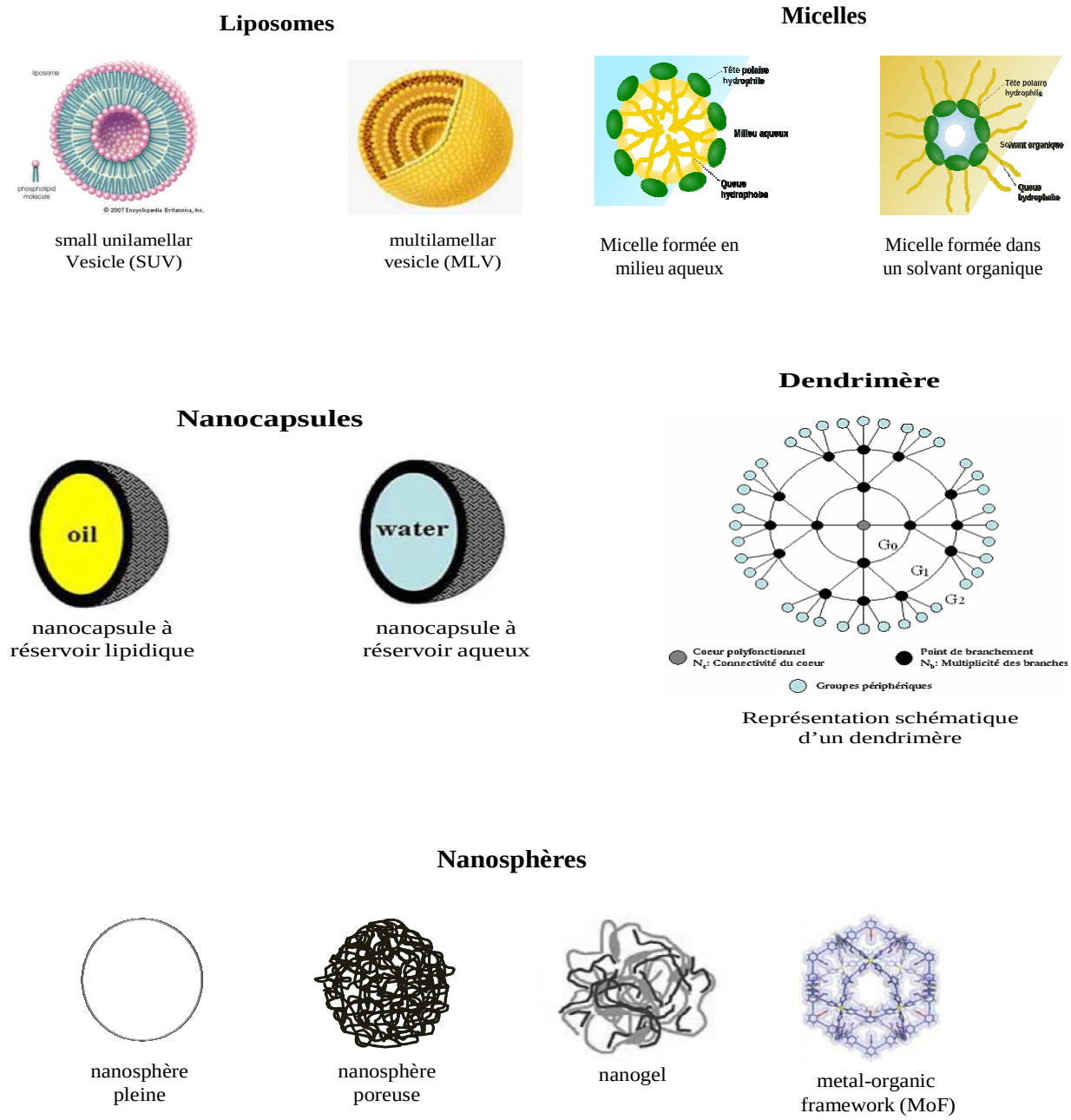


Figure 1. Principales catégories de nanoparticules utilisées en vectorisation

3.2.8. Les nanoparticules étudiées : nanoparticules polysaccharidiques cationiques et poreuses de maltodextrine

Dans ce travail, nous avons étudié des nanoparticules polysaccharidiques cationiques de maltodextrines (NP^+). Ce sont des nanosphères poreuses de 60 nm de diamètre, obtenues par

polymérisation de maltodextrines. Les maltodextrines sont des polysaccharides naturels issus de l'hydrolyse enzymatique partielle d'amidon. Les fragments d'hydrolyse sont des polymères osidiques de D-glucose liés par des liaisons alpha 1-4 formant des chaînes polysaccharidiques de longueurs variables (maltose, oligosides, polyosides). C'est un polymère toléré par l'organisme, facilement digestible (s'absorbe aussi rapidement que le glucose), qui a reçu une autorisation de mise sur le marché par l'agence américaine Food and Drug Administration (FDA) et l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) pour différents types d'applications: pharmaceutique (excipient), agroalimentaire (arôme), cosmétique (stabilisateur d'émulsion, agent de liaison).

Le protocole de fabrication des NP^+ est décrit dans la littérature (Castignolles et al., 1994). Tout d'abord la maltodextrine est hydratée dans une solution de soude à 2N jusqu'à obtention d'un gel. Le gel est réduit en présence de Borohydrure de sodium ($NaBH_4$) puis réticulé pendant plusieurs heures en présence d'un large excès d'épichloridrine (1-chloro-2,3-époxypropane) qui va favoriser la formation de liaisons glycérol di-éther entre les chaînes de maltodextrines. Le gel réticulé est ensuite rendu cationique en présence de Glycidyl Tri-Méthyl Ammonium chloride (GTMA) qui possède un radical ammonium quaternaire. La fixation progressive du GTMA sur la maltodextrine se traduit par le relâchement du gel, à cause des répulsions électrostatiques entre les chaînes positives greffées aux branches de maltodextrine. Le gel obtenu est suspendu dans de l'eau et neutralisé avec de l'acide acétique glacial. Les nanoparticules de 60nm sont obtenues après plusieurs cycles de broyage du gel, à l'aide d'un homogénéisateur à haute pression. Les nanoparticules sont alors filtrées par ultrafiltration tangentielle sur une membrane poreuse, afin d'éliminer les débris et résidus chimiques de la synthèse. Enfin, les nanoparticules sont caractérisées: analyse élémentaire, taille, potentiel zêta et forme (microscopie électronique).

Les NP^+ possèdent de nombreux atouts comme vecteurs de molécules d'intérêt thérapeutique ou vaccinal. Elles sont: biocompatibles, biodégradables, très stables à 4° et 37°C et s'agrègent peu, même en présence de protéines sériques. Depuis leur fabrication pour la première fois dans les années 1990, les NP^+ et leurs formes dérivées ont été très étudiées dans de nombreuses applications: délivrance de protéines anticancéreuses (Castignolles et al., 1994), vaccination (Baudner et al., 2002; Debin et al., 2002), délivrance d'antiparasitaires (Kroubi et al., 2010; Loiseau et al., 2002), allergie (Mascarell et al., 2008; Razafindratsita et al., 2007), délivrance de médicaments anti-nociceptifs (Betbeder et al., 2000), franchissement de la barrière hémato encéphalique (Jallouli et al., 2007). Les résultats obtenus à ce jour montrent que ces nanoparticules pourraient être de bons vecteurs pour l'administration intra-nasale et sublinguale de molécules d'intérêt vaccinal et thérapeutique. Par ailleurs, le squelette polysaccharidique qui forme la structure des NP^+ est facilement modulables et des molécules chimiques aux propriétés diverses peuvent y être greffées de façon covalentes ou non (fluorophores,

lipides, protéines…). Il est possible de recouvrir les NP^+ d'une bicouche de phospholipides ou d'insérer un cœur de phospholipides à l'intérieur de leur structure poreuse (De Miguel et al., 2000; Loiseau et al., 2002; Major et al., 1997). Dans les deux cas, cette phospholipidation permet d'obtenir des nanoparticules amphiphiles aux caractéristiques variables. Dans ce travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux nanoparticules à cœur lipidique. Elles sont obtenues par insertion de dipalmitoyl phosphatidyl glycérol (DPPG) à l'intérieur des NP^+ et se présentent sous forme de nanosphères poreuses à cœur lipidique ($DPPGNP^+$ ou $DGNP^+$).

3.3. Evolution des nanovecteurs : vers des nanoparticules de plus en plus performantes

Depuis la synthèse des premiers vecteurs dans les années 1970, les technologies de synthèse et de vectorisation n'ont cessé de progresser vers la fabrication de vecteurs nanoparticulaires de plus en plus complexes et intelligents (figure 2). Les nanoparticules de « première génération », se caractérisent par leur capacité à associer efficacement les molécules d'intérêt et améliorer leur absorption par l'organisme. Très souvent développées pour des administrations intra-vasculaires, ces vecteurs se caractérisent pourtant par une faible spécificité, une forte accumulation hépatosplénique et une durée de circulation réduite dans le sang. En effet, les vecteurs de première génération sont très facilement capturés par les cellules phagocytaires du système réticulo-endothélial (SRE), ce qui diminue fortement l'efficacité thérapeutique des molécules transportées (Owens and Peppas, 2006). La seconde génération de vecteurs introduit la notion de « furtivité », qui est l'échappement à la vigilance du système immunitaire. Ces nanoparticules sont recouvertes de chaînes polymériques hydrophiles neutres (très souvent le polyéthylène glycol,PEG), qui forment une couronne stérique empêchant la fixation des opsonines (protéines sérique, complément, anticorps…), les rendant indétectables par les macrophages du SRE (Moghimi and Szebeni, 2003). Il a en effet été montré que la PEGylation des nanoparticules diminue significativement leur phagocytose et augmente leur temps de circulation dans le sang (Romberg et al., 2008). Ainsi par leur temps de demi-vie augmenté dans le sang, les vecteurs de deuxième génération accroissent les chances d'accéder à leur cible dans l'organisme. On parle également de ciblage « passif ». Cette faculté est très intéressante pour la délivrance de molécules anticancéreuses, car l'augmentation de la durée de circulation dans le sang augmente son accumulation dans les tumeurs par l'effet dit Enhancement Permeation Retention (Wang and Thanou, 2010).

Aujourd'hui les nanoparticules dites de « troisième génération » intègrent le concept de ciblage actif, qui augmente la spécificité pour un site donné. Il s'agit dans ce cas, d'associer à la surface de la nanoparticule des molécules qui vont reconnaitre une cible (anticorps) ou seront reconnues par des

récepteurs présents dans les tissus ciblés (ligand). Par exemple, le récepteur de l'Epidermal Growth Factor (EGF-R) est surexprimé dans 90% des carcinomes et cette surexpression est associée à un mauvais pronostic de survie du patient. Des études montrent que l'utilisation de nanoparticules couplées à des anticorps reconnaissant EGF-R augmente significativement leur accumulation dans les tissus tumoraux.

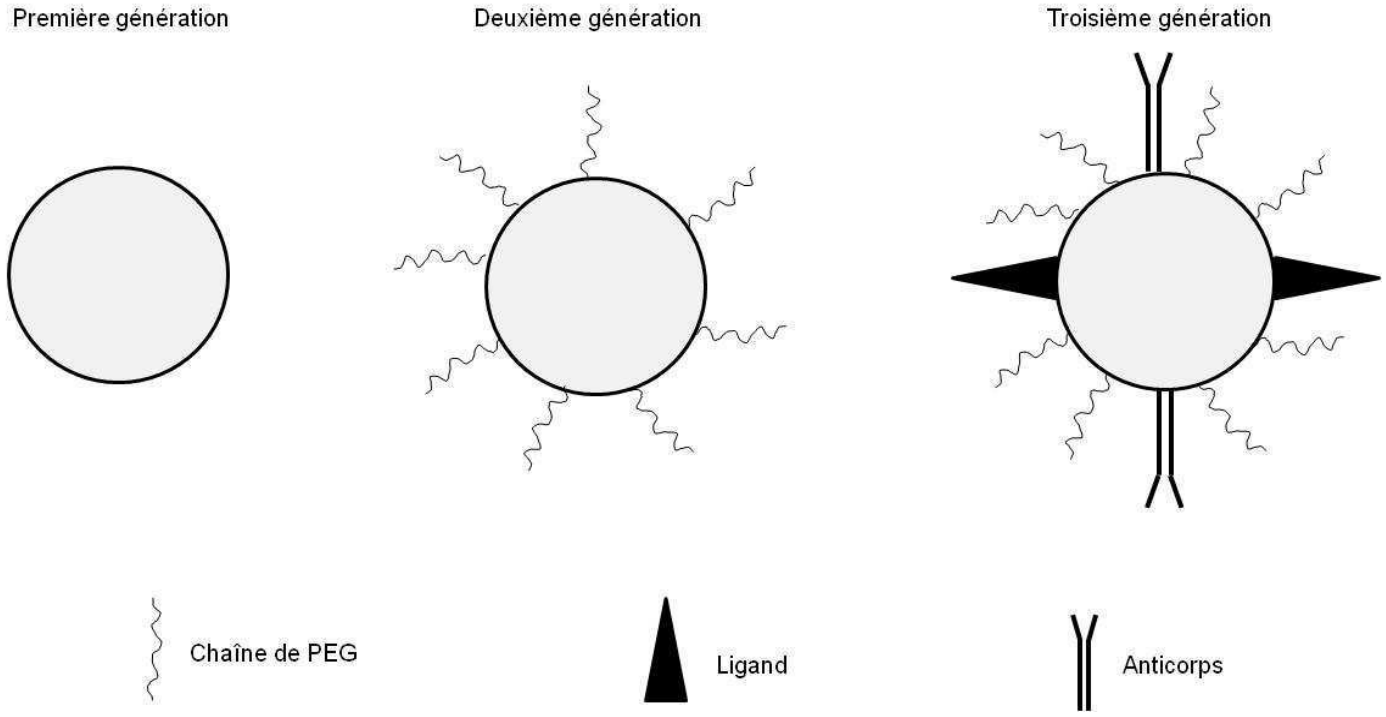


Figure 2. Représentation schématique des trois générations de nanovecteurs

IV. OBJECTIFS DE LA THESE

L'objectif de cette thèse est de comprendre les mécanismes impliqués dans l'interaction des nanoparticules polysaccharidiques cationiques de 60nm avec les cellules épithéliales respiratoires humaines, afin d'évaluer leur potentiel comme système de délivrance de médicaments dans les voies respiratoires.

Pour cela ce travail s'articule en 4 objectifs spécifiques:

1°) Etudier les mécanismes d'interaction des NP^+ avec les épithéliums respiratoires

- ⇨ Caractérisation des mécanismes d'endocytose et d'exocytose
- ⇨ Localisation intracellulaire des nanoparticules

2°) Evaluer leur toxicité sur les cellules épithéliales des voies respiratoires

- ⇨ Cytotoxicité et génotoxicité
- ⇨ Importance des paramètres physicochimiques sur ces mécanismes
- ⇨ Influence du milieu de culture

3°) Evaluer de leur potentiel comme système de délivrance de protéines

- ⇨ Caractérisation de leur association avec les protéines
- ⇨ Etude de la délivrance intracellulaire de protéines
- ⇨ Etude du devenir intracellulaire du complexe nanoparticule-protéine

4°) Comprendre l'importance de la structure interne

- ⇨ Pour l'endocytose
- ⇨ Pour l'association avec les protéines
- ⇨ Pour les mécanismes de délivrance intracellulaire de protéines

V. L'ENDOCYTOSE DES NANOPARTICULES

5.1. Généralités sur l'endocytose

5.1.1. Définition

L'endocytose est le mécanisme par lequel les cellules internalisent des éléments présents dans leur environnement extracellulaire. C'est un mécanisme actif qui nécessite une réorganisation locale de la membrane plasmique pour former une vésicule contenant les molécules d'intérêt. Il existe deux grands processus d'endocytose: l'endocytose des phases fluides et l'endocytose médiée par récepteur (EMR) (figure 3). L'endocytose des phases fluides également appelée micro-pinocytose, est un mécanisme constitutif, dans lequel les phases fluides du milieu extracellulaire sont internalisées par la cellule, sans l'action d'un stimulus externe. Elle participe à la régulation cellulaire et permet notamment à la cellule de contrôler la composition de la membrane plasmique (Kolter and Sandhoff, 2009). Dans le cas d'une endocytose médiée par récepteur, un stimulus extérieur (ligand) se fixe sur un récepteur membranaire à la surface de la cellule, entraînant son activation et l'internalisation du complexe ligand récepteur à l'intérieur d'une vésicule. C'est donc un mécanisme d'endocytose extrêmement régulé, qui se caractérise par un ensemble de voies et de mécanismes d'internalisation qui dépendent du type de récepteur de surface activé. L'endocytose des phases fluides étant essentiellement dépendante de l'état physiologique de la cellule, nous décrirons dans ce chapitre l'endocytose médiée par récepteur.

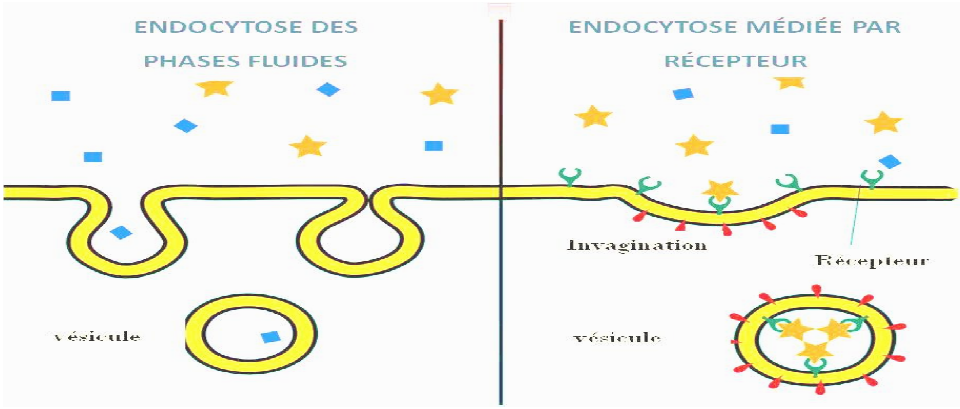


Figure 3. Endocytose des phases fluides et endocytose médiée par récepteur

5.1.2. Les voies d'endocytose médiée par récepteur

En fonction de la nature du ligand et du type de récepteur sollicité, il existe plusieurs voies d'EMR. Celles-ci dépendent par ailleurs du type cellulaire impliqué et de l'état physiologique de la cellule. De façon générale, les voies d'EMR peuvent être divisées en deux grands processus qui sont la pinocytose et la phagocytose (figure 4). La **phagocytose** est un mécanisme particulier d'endocytose spécifique à une catégorie de cellules spécialisées appelées cellules phagocytaires. La **pinocytose** quant à elle est un processus présent dans la plupart des cellules et se subdivise en différents mécanismes spécifiques.

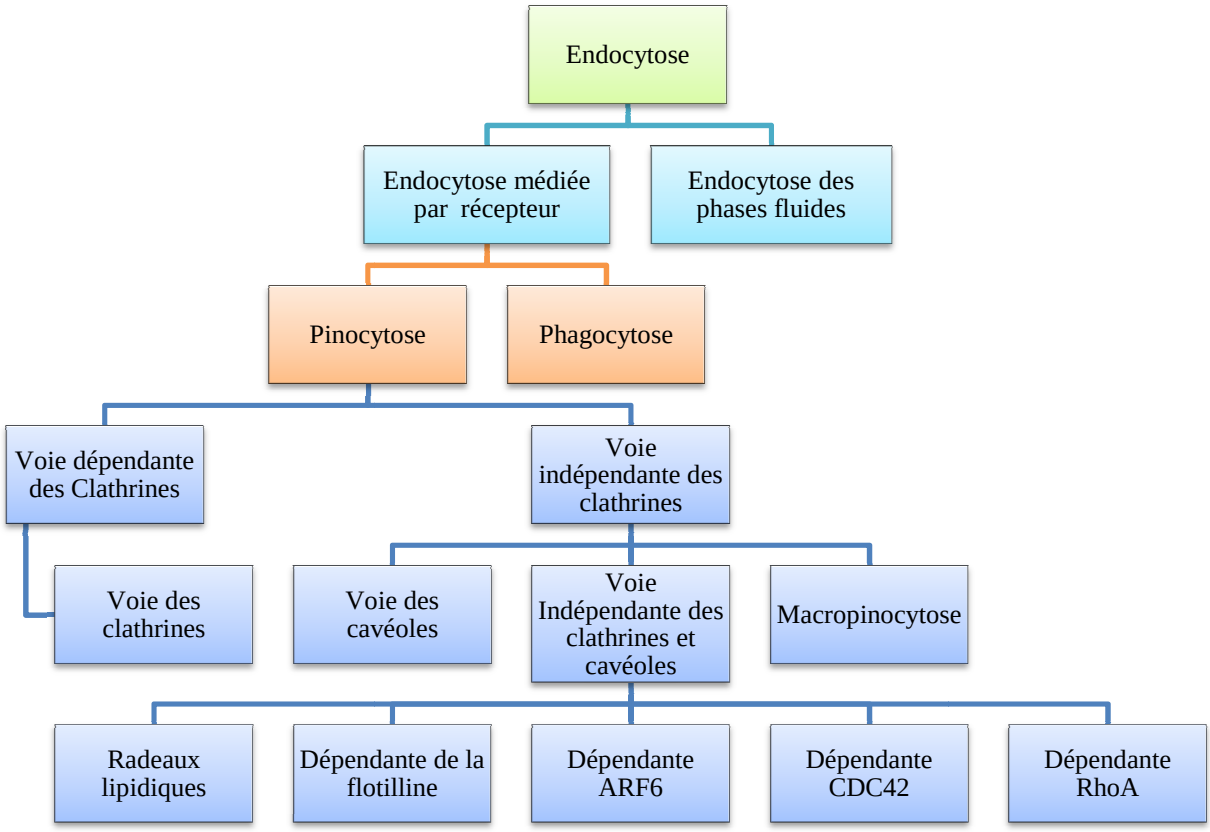


Figure 4. Classification des mécanismes d'endocytose (Sahay et al., 2010)

5.1.3. La pinocytose

5.1.3.1. La voie des clathrines

Depuis la description des puits recouverts de clathrines en 1964 par Roth and Porter (Roth and Porter, 1964), la voie d'endocytose dépendante des clathrines (EDC) est le mécanisme d'endocytose le mieux décrit. C'est un mécanisme majeur commun à tous les mammifères (Sahay et al., 2010) et responsable de 40 à 50% de l'endocytose des phases fluides (Benmerah and Lamaze, 2007). L'EDC se caractérise par la formation de vésicules de 100 à 200 nm ((Benmerah and Lamaze, 2007; Parkar et al., 2009), recouvertes d'un manteau protéique majoritairement composé de clathrines. Cette voie nécessite l'implication de nombreux adaptateurs moléculaires tels que l'adaptatine AP-2, les epsines et la β-arrestine, qui participent à la formation, la stabilisation et le transport intracellulaire des vésicules recouvertes de clathrines (figure 5).

La vésicule formée se détache de la membrane plasmique par l'action d'une GTPase particulière appelée dynamine. Elle est ensuite débarrassée de son manteau protéique, puis fusionne avec les endosomes précoces dans lesquels les molécules internalisées seront triées et redirigées vers d'autres compartiments intracellulaires (Hinshaw, 2000). La plupart des molécules empruntant la voie des clathrines sont dirigées directement ou indirectement vers les lysosomes où elles sont dégradées. Ce transport vésiculaire depuis l'internalisation de la molécule jusqu'à la fusion avec les endosomes est un processus extrêmement rapide, de l'ordre de quelques secondes (Loerke et al., 2009). Il existe plusieurs ligands endogènes caractéristiques de l'EDC. On y compte par exemple la transferrine, les immunoglobulines, le transporteur Low Density Lipoprotein (LDL), l'epithelial Growth Factor (EGF) et l'insuline (Benmerah and Lamaze, 2007).

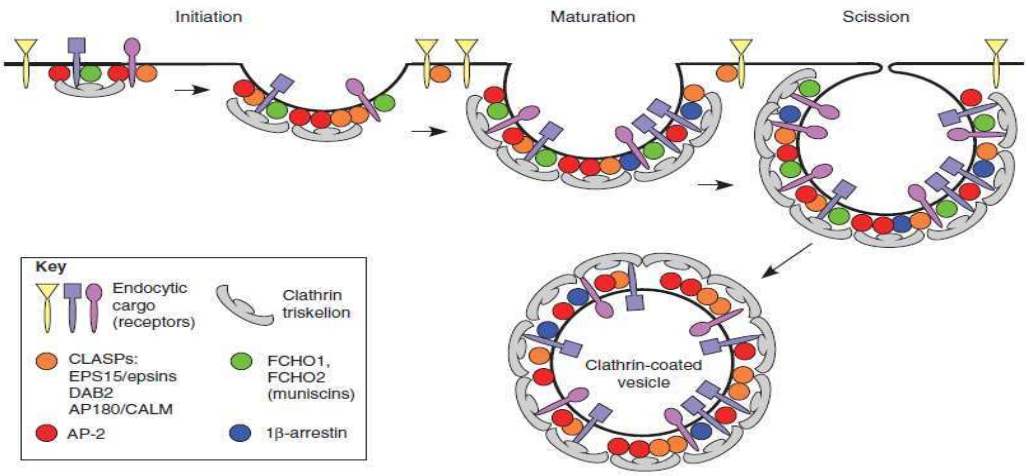


Figure 5. Formation de vésicules recouvertes de clathrines (Reider and Wendland, 2011)

5.1.3.2. Les voies d'endocytose indépendantes des clathrines

- *La voie de cavéoles*

Les cavéoles sont des invaginations membranaires résistantes aux détergents, riches en cavéolines, cholestérol et sphingolipides. La voie des cavéoles est impliquée dans l'internalisation de nombreuses molécules telles que la toxine du choléra, les protéines liant la Glycosyl Phosphatidyl Inositol (GPI-anchored proteins) et le virus SV40 (Kurzchalia and Parton, 1999; Pelkmans et al., 2001). Elle participe également aux mécanismes de transcytose dans les cellules endothéliales (Doherty and McMahon, 2009). Contrairement aux clathrines, les cavéoles sont présentes de façon variable en fonction des tissus et des types cellulaires. En effet, elles sont abondamment exprimées dans les tissus musculaires lisses, les pneumocytes 1, les fibroblastes et les cellules endothéliales (Parton and Simons, 2007), tandis qu'elles ne sont pas exprimées par les lymphocytes (Johannes and Lamaze, 2002). Les vésicules issues de la voie des cavéoles sont des vésicules lisses (sans manteaux protéique) de 50 à 100 nm de diamètre (Parkar et al., 2009). Comme pour la voie des clathrines, la vésicule formée est détachée de la membrane plasmique par l'action de la dynamine et fusionne avec un endosome précoce. Cependant, contrairement à la plupart des autres voies de pinocytose, la voie des cavéoles présente cette particularité que, les vésicules formées peuvent éviter les endosomes précoces et fusionner directement avec des endosomes particuliers appelés cavéosomes (figure 6). La cavéoline est une protéine membranaire oligomérique indispensable à la viabilité des vésicules de cavéoles. Des cellules délétées en cavéolines sont incapables de former des vésicules de cavéoles. En revanche, l'expression du gène de la cavéoline-1 dans des lymphocytes suffit à leur conférer la possibilité de former des vésicules de cavéoles. Par ailleurs, le cholestérol est indispensable à la stabilité des vésicules de cavéoles, et l'utilisation d'agents pharmacologiques déplétant le cholestérol (tels que la filipine ou la nystatine) suffit à désorganiser les vésicules de cavéoles.

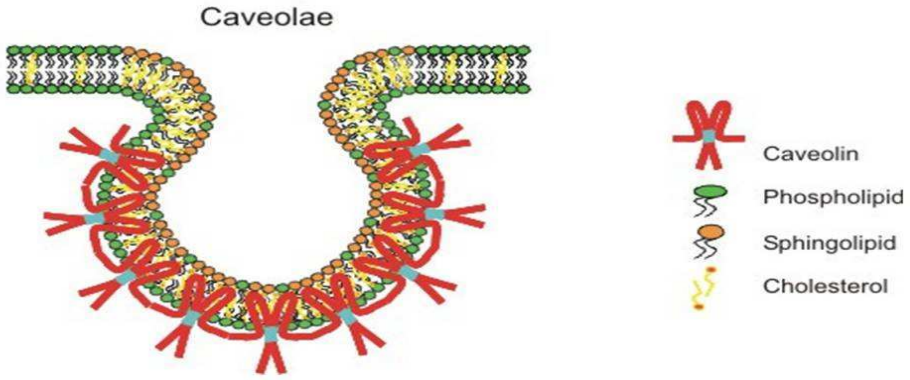


Figure 6. Vésicules de cavéoles (Galbiati et al., 2001)

➢ *La macropinocytose*

Décrite pour la première fois par Warren Lewis, la macropinocytose est un mécanisme qui permet l'internalisation de grandes quantités de particules et phases fluides (Lewis, 1931). C'est un mécanisme actine-dépendant dans lequel la cellule forme des prolongements membranaires (lamellipodes) pour séquestrer des éléments présents dans son milieu extracellulaire (figure 7). C'est un mécanisme dépendant de l'action des protéines kinase (exemple pak1, PKC, ras, PI3K, src) qui stimule l'actine du cytosquelette. Les vésicules formées (macropinosomes) sont de tailles très variables pouvant aller de 0,5 à 10µm de diamètre. En condition physiologique, la macropinocytose est déclenchée par la fixation de facteurs de croissance sur des récepteurs tyrosine kinase (Mercer and Helenius, 2009). Cependant, elle peut être induite par d'autres stimuli tels que des corps apoptotiques, des cellules nécrotiques, des particules exogènes ou des bactéries (Mercer and Helenius, 2009). Elle est également responsable de l'internalisation de certains virus comme le virus de la vaccine (Mercer and Helenius, 2008), les adénovirus-3 (Amstutz et al., 2008) et les Coxsackievirus (Coyne et al., 2007). Comme la plupart des vésicules de pinocytose, les macropinosomes fusionnent avec les endosomes précoces.

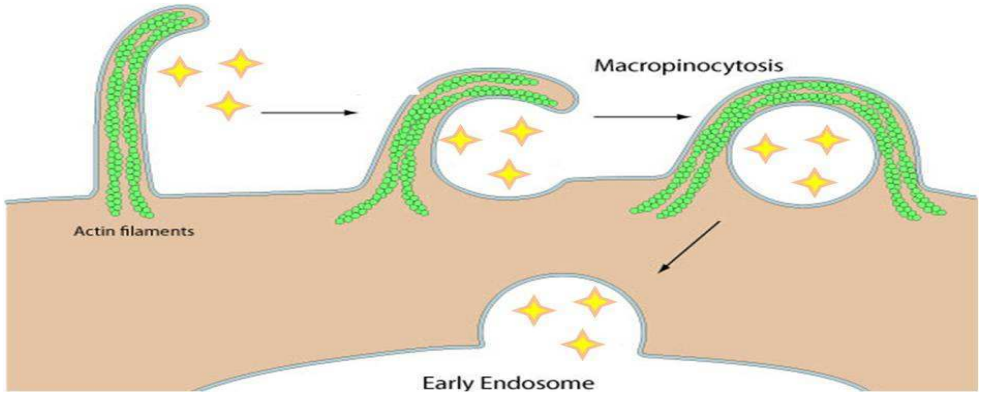


Figure 7. Formation d'une vésicule de macropinocytose

➢ *Les autres voies de pinocytose*

En plus des mécanismes décrits ci-dessus, il existe plusieurs autres voies d'endocytose. Bien que moins bien caractérisées, elles participent de façon importante à l'internalisation de nombreuses molécules. Les **lipid RAFTS** ou **radeaux lipidiques** sont des micro-domaines membranaires

résistants aux détergents, riches en cholestérol et sphingolipides, mais dépourvus en cavéolines (figure 8). Ils sont généralement présents sur les plans latéraux de la membrane plasmique des cellules (Johannes and Lamaze, 2002; Sowa et al., 2001). C'est une voie d'endocytose dépendante de la dynamine, impliquant des mécanismes très similaires à ceux de la voie des cavéoles. La **voie Rho-A** est une voie d'endocytose dépendante de l'action de la GTPase Rho-A. Elle participe à la régulation de l'actine du cytosquelette membranaire et est impliquée dans l'endocytose de molécules telles que la chaîne béta du récepteur à l'intégrine 2 et le récepteur à l'IgE. La **voie Afr-6** est une voie dynamine-dépendante, impliquée dans le recyclage de nombreuses molécules (Donaldson et al., 2009). A cela nous pouvons citer d'autres voies telles que la voie dépendante de la **flotilline** et la **voie cdc-42** dépendante. Cependant ces mécanismes restent mal caractérisés.

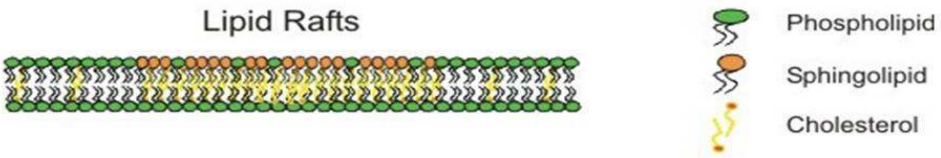


Figure 8. Organisation membranaire des radeaux lipidiques (Galbiati et al., 2001)

5.1.4. La phagocytose

La phagocytose est un mécanisme d'endocytose réservé à des cellules spécialisées appelées cellules phagocytaires ou phagocytes. Ce sont principalement des cellules du système immunitaire telles les macrophages, les polynucléaires, les cellules de Langherans et les cellules dendritiques; qui participent à l'élimination des particules exogènes, la destruction de cellules endommagées et la coordination de la réponse immunitaire. C'est un processus d'endocytose qui permet d'internaliser des éléments de très grande taille, et exige une grande flexibilité du cytosquelette membranaire des phagocytes. En effet, des études ont montré que des macrophages ayant une taille d'environ 14µm étaient capables de phagocyter des billes de latex de plus de 20µm de diamètre (Cannon and Swanson, 1992). La première étape de la phagocytose est l'opsonisation, c'est-à-dire l'adsorption de protéines spécifiques appelées

opsonines à la surface de la particule à phagocyter. Ces opsonines sont des protéines circulantes du milieu biologique telles que les immunoglobulines, les protéines du complément, les protéines du sérum, les protéines du surfactant, qui en se fixant à la surface de la particule, vont la rendre visible par des récepteurs spécifiques à la surface des cellules phagocytaires (exemple: récepteurs du complément, récepteurs de fragments Fc, récepteurs au mannose, récepteurs Scarvenger…).

La fixation de la particule opsonisée sur le récepteur entraîne l'activation de celui-ci, qui va initier une cascade de réactions entraînant l'internalisation de la particule à l'intérieur d'une vésicule appelée phagosome. La particule phagocytée sera digérée après fusion du phagosome avec les lysosomes.

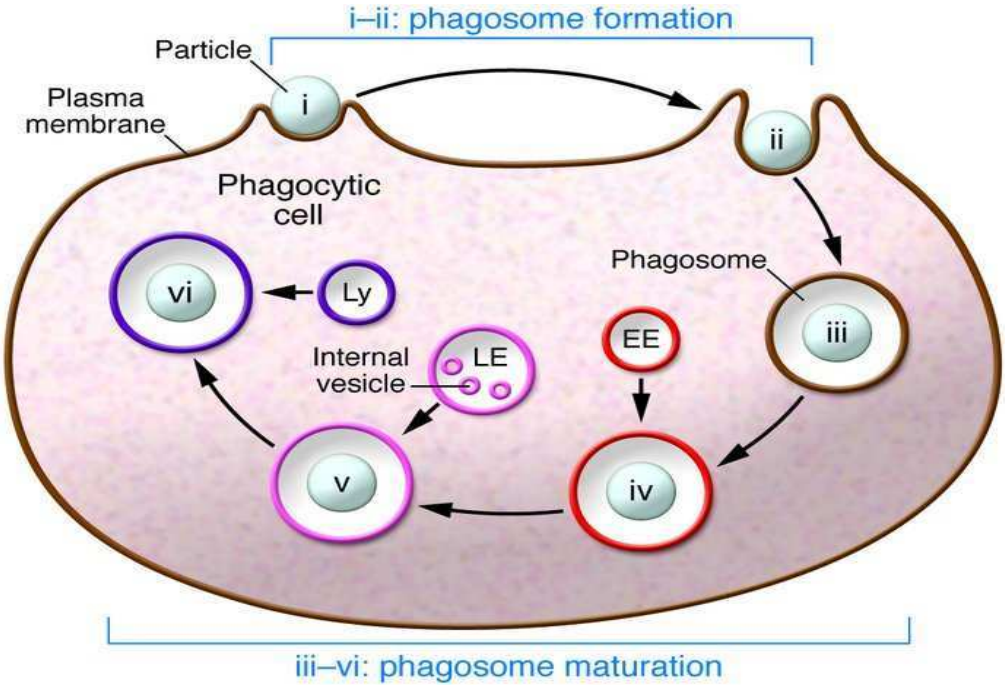


Figure 9. Phagocytose d'une particule (Desjardins, 2003). LE : late endosome ; EE : early endosome ; Ly : llysosome

5.2. Régulation de l'endocytose

Les phénomènes d'endocytose participent à la régulation cellulaire. Nous avons décrit plusieurs mécanismes d'endocytose médiés par récepteurs; c'est-à-dire initiés par la fixation d'un ligand extracellulaire sur un récepteur membranaire. Toutefois, l'endocytose de phases fluides joue également un rôle important dans la signalisation cellulaire et la régulation de la composition membranaire (Damke et al., 1995). L'endocytose est un mécanisme extrêmement régulé qui décide du devenir des molécules internalisées. Ce contrôle passe par une succession d'étapes, la première étant la fixation du ligand sur son récepteur. La fixation du ligand entraîne une activation des parties membranaire et cytoplasmique du récepteur, lui permettant de recruter des partenaires moléculaires appelés adaptateurs (lipides, protéines, cytosquelette…) (figure 10).

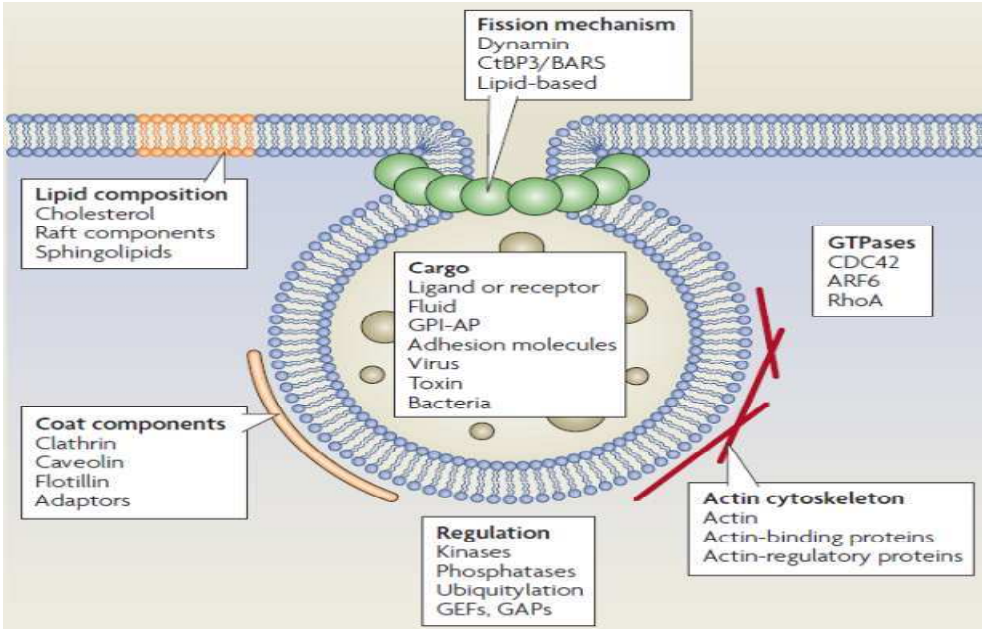


Figure 10. Schéma d'une vésicule d'endocytose montrant les différents acteurs moléculaires responsables de sa formation et sa destination.

Le type de partenaire recruté dépend de la nature du récepteur. Ainsi, les vésicules de clathrines recrutent des molécules telles que l'AP-2 et la β-arrestine, tandis que les vésicules de cavéoles interagissent préférentiellement avec le cholestérol et les GPI-anchored proteins. Ces partenaires en recrutant à leur tour d'autres molécules (lipides membranaire, cytosquelette, protéines G…) vont contrôler la formation de la vésicule d'endocytose et son adressage intracellulaire (Ziello et al., 2010). Dans la plupart des mécanismes de pinocytose, les vésicules d'endocytose fusionnent avec les endosomes précoces (figure 11). Ce sont des vésicules tubulaires légèrement acides (pH ~ 6,5) d'environ 400nm (Jovic et al., 2010), dans lesquels les molécules sont triées puis adressées vers

d'autres destinations. A ce niveau, trois destinations s'offrent à elles : elles peuvent être renvoyées à l'extérieur des cellules (exocytose, transcytose), envoyées dans le cytosol, ou bien dirigées vers d'autres endosomes (lysosomes, noyau, corps multi-vésiculaires, appareil de golgi…). Les modalités de tri et d'adressage sont déterminées par la composition de la vésicule d'endocytose et les caractéristiques de l'endosome précoce : composition lipidique de la membrane, nature des protéines (GTPases Rab), géométrie tubulo-vésiculaire… (Mayor and Pagano, 2007; Parkar et al., 2009). Par exemple, les protéines vésiculaires liant la GPI sont connues pour favoriser le transport vers l'appareil de golgi (Doherty and McMahon, 2009; Martin and Pagano, 1994). La multiplicité des acteurs moléculaires et la complexité des interactions font que plusieurs destinations différentes peuvent être associées à une même voie d'entrée. De la même manière, des molécules qui sont internalisées par des voies différentes peuvent avoir une même destination finale. L'idée selon laquelle : « *une voie, une destination* » n'est donc pas exacte.

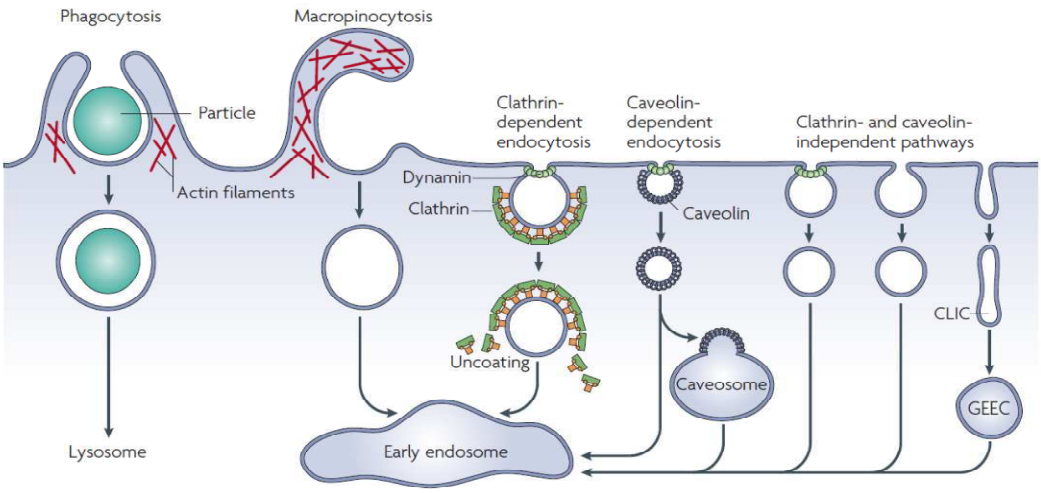


Figure 11. Destination des vésicules d'endocytose médiée par récepteur (Mayor and Pagano, 2007)

Par ailleurs, le fait qu'une même molécule puisse intervenir dans plusieurs voies d'endocytose, rajoute à la complexité de la régulation de l'endocytose. Ainsi, la déplétion du cholestérol des membranes inhibe la formation des vésicules de cavéoles dans les cellules. Cependant, des études montrent qu'en fonction du type cellulaire et du degré de déplétion, elle peut également inhiber d'autre voies telles que la macropinocytose, la voie des clathrines et la voie Rho-A (Grimmer et al., 2002; Mayor and Pagano, 2007). Enfin, la machinerie de l'endocytose peut être régulée en fonction de l'état physiologique de la cellule. Ainsi, l'Epidermal Growth Factor (EGF) est internalisé sous une forme fonctionnelle par la

voie des clathrines, tandis que son internalisation par la voie des cavéoles inhibe son activité (Park et al., 2000). De plus, la présence en forte concentration de l'EGF à l'extérieur des cellules entraîne également son internalisation par macropinocytose (Orth et al., 2006). De façon similaire, des études montrent que l'endocytose du récepteur à l'EGF (EGFR) par la voie des clathrines entraine son recyclage alors qu'une endocytose par des mécanismes indépendants des clathrines entraîne sa dégradation dans les endosomes acides (Sigismund et al., 2008). Ces études illustrent la complexité de la régulation des phénomènes d'endocytose, et l'importance des conditions environnementales dans cette régulation.

5.3. L'endocytose des nanoparticules

Comme les macromolécules biologiques et les virus, les nanoparticules pénètrent dans les cellules par des mécanismes d'endocytose. Etudier et caractériser ces mécanismes est nécessaire pour concevoir leur meilleure utilisation comme vecteurs intracellulaires de molécules. Plusieurs voies d'endocytose ont été décrites pour l'internalisation des nanoparticules. Elles dépendent des caractéristiques physicochimiques des nanoparticules (taille, forme, charge de surface, hydrophobicité…), du type cellulaire impliqué mais aussi de l'état physiologique de la cellule (Cartiera et al., 2009).

- **La taille** des nanoparticules joue un rôle majeur dans l'endocytose, capable d'influencer aussi bien la cinétique d'endocytose que la voie d'endocytose empruntée. Contrairement aux microparticules, l'endocytose des nanoparticules implique surtout des mécanismes de pinocytose (Chaudhuri et al., 2011). Les études montrent qu'en dessous de 250nm, les particules sont de moins en moins sensibles aux mécanismes de phagocytose (Hillaireau and Couvreur, 2009). Les études suggèrent que la taille des nanoparticules pourrait influencer leurs voies d'entrée dans les cellules. Cela tient en partie au fait que les vésicules formées possèdent des échelles de tailles spécifiques, en fonction de chaque voie (macropinocytose : 0,5-5µm ; clathrines : 100-200nm ; cavéoles : 50-100nm ; lipid raft : ~100nm). Ainsi, des particules de taille >100nm seront plus facilement internalisées par la voie des clathrines, la macropinocytose et la phagocytose. En revanche, des nanoparticules de petite taille (< 50nm) sont plus souvent internalisées par des mécanismes plus particuliers. Ainsi, Lai et ses collaborateurs ont montré qu'en réduisant la taille des nanoparticules on augmente progressivement leur internalisation par des mécanismes clathrines/cavéoles-indépendants et leur localisation cytosolique ; tandis qu'on réduit leur accumulation dans les compartiments acides (Lai et al., 2007). Enfin, des travaux menés par Lai et ses collègues suggèrent qu'une taille d'environ 25-30nm optimiserait l'endocytose des nanoparticules (Lai et al., 2008).

- **La charge de surface** influence également l'endocytose, et notamment la capacité des nanoparticules à interagir avec la surface des cellules. En général les nanoparticules cationiques se fixent plus facilement à la surface des cellules, grâce à leur capacité à interagir avec les récepteurs anioniques présents à la surface des cellules (héparane sulfate protéoglycannes, glycosamino glycannes). Cela se traduit de façon générale par une endocytose plus rapide et plus importante des nanoparticules cationiques par rapport aux nanoparticules anioniques et neutres (Kumari and Yadav, 2011). Par ailleurs, certaines données de littérature suggèrent que la charge de surface peut influencer la voie d'endocytose, en fonction du type cellulaire. Des études avec des cellules Hela montrent par exemple une endocytose de nanoparticules cationiques de PLGA par la voie des clathrines tandis que les nanoparticules anioniques de PLGA emprunteraient d'autres voies (Harush-Frenkel et al., 2007). Des travaux similaires sur les cellules MDCK montrent que malgré une endocytose de nanoparticules cationiques et anioniques de PLGA par la voie des clathrines, seules les nanoparticules cationiques étaient capables de transcytose à travers les cellules (Harush-Frenkel et al., 2008). Perumal et ses collègues observent également une endocytose de dendrimères anioniques dans des cellules alvéolaires A549 par la voie des cavéoles, et une endocytose indépendante des clathrines et des cavéoles pour des dendrimères cationiques (Perumal et al., 2008). Enfin, la densité semble avoir son importance, et des études montrent que des nanoparticules de forte charge de surface (cationiques ou anionique) sont plus fortement opsonisées et éliminées par phagocytose (Chonn et al., 1991).

- D'autres paramètres physicochimiques peuvent également influencer les mécanismes d'endocytose des nanoparticules. Par exemple, Champion et ses collaborateurs ont montré qu'en modifiant la forme et la **géométrie** des nanoparticules de polystyrène, on modifiait significativement leur endocytose par les macrophages alvéolaires (Champion et al., 2007). Par ailleurs les propriétés de surface comme la **réactivité, l'hydrophobicité**, et **l'agrégation** sont connues pour jouer des rôles dans l'endocytose.

Considéré séparément chacun de ces paramètres est capable d'influencer de façon significative l'interaction des nanoparticules avec les cellules et leur voie d'endocytose. Cependant, une nanoparticule se définit par un ensemble de caractéristiques physicochimiques susceptibles d'influencer ses propriétés. Les concentrations utilisées, l'environnement biologique et les conditions expérimentales influencent également ces propriétés (agrégation, forme, interactions de surface, hydrophobicité). Des études récentes montrent en effet que l'association de protéines à la surface de nanoparticules de polyethyleneimine (PEI) modifie leurs mécanismes d'endocytose par les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique (Chang et al., 2009; Chang et al., 2012; Georgieva et al., 2011).

VI. DEVELOPPEMENT DES NANOPARTICULES COMME VECTEURS DE MEDICAMENTS A TRAVERS LES VOIES RESPIRATOIRES

6.1. L'utilisation des voies respiratoires pour l'administration de médicaments

Explorer les possibilités qu'offrent les voies respiratoires (VR) pour la délivrance de médicaments est un enjeu croissant de la recherche médicale. L'idée n'est toutefois pas nouvelle et les VR sont utilisées depuis longtemps, de façon traditionnelle, pour l'administration de certaines substances telles que l'opium et le tabac (Gonda, 2000). Sur le plan médical, de nombreux principes actifs tels les gaz anesthésiants, des antiasthmatiques, hormones, des agents antiparasitaires ou même des protéines sont administrées par les VR (Labiris and Dolovich, 2003). Plus récemment, l'avancée des connaissances en biologie et le développement des techniques médicales ont permis de mieux comprendre les mécanismes d'absorption des molécules dans la muqueuse respiratoire, et la délivrance de médicaments par les VR apparaît chaque jour un peu plus comme une alternative sérieuse aux autres voies d'administration.

En effet, l'administration de médicaments par les VR est un mode d'administration non-invasif, facile d'accès, qui permet aux molécules d'éviter le premier passage métabolique dans le foie (Sakagami, 2006). Les VR depuis les cavités buccale et nasale jusqu'aux poumons constituent une large surface d'absorption potentielle de médicaments (figure 12).

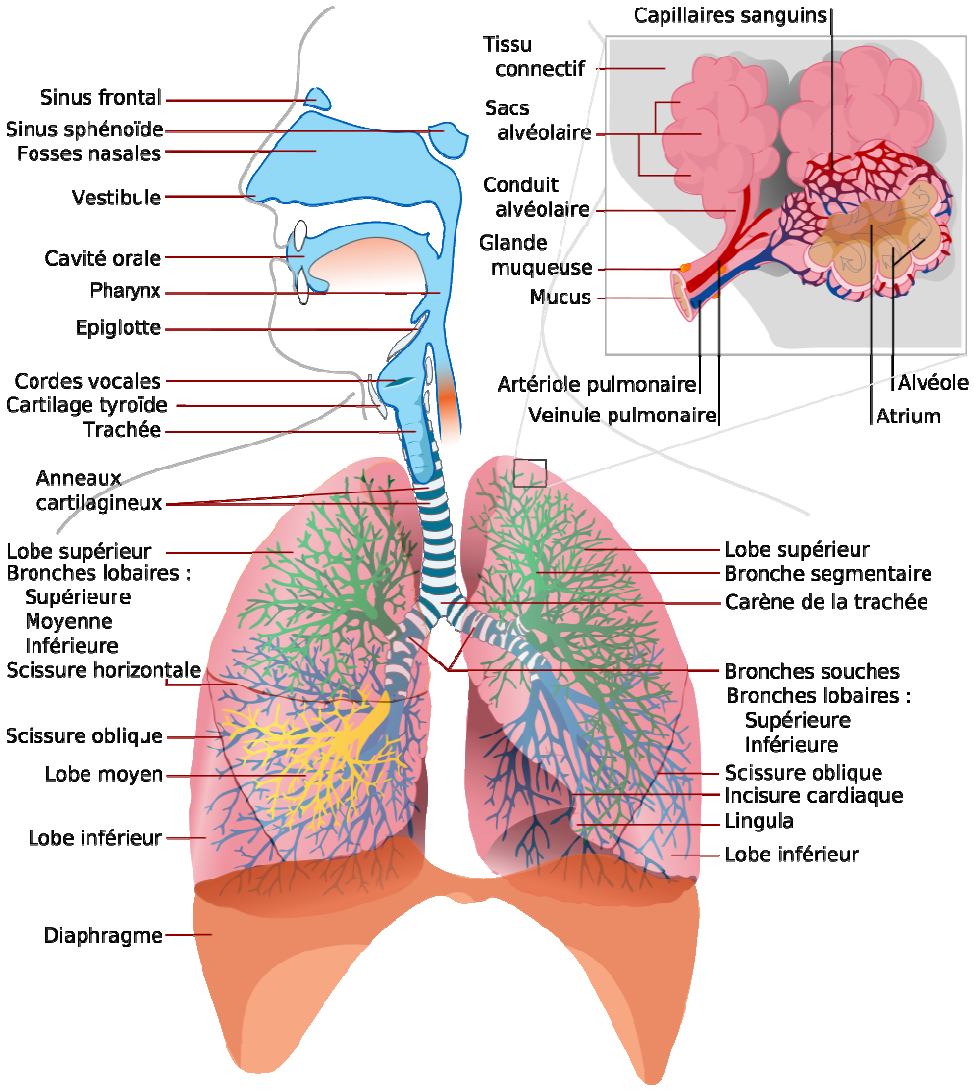


Figure 12. Présentation des voies respiratoires humaines

Elles possèdent de nombreux atouts : une faible épaisseur de cellule épithéliale, une activité enzymatique faible par rapport aux voies orale et systémique, une faible couche de mucus comparée à la muqueuse gastro-intestinale (figure 13) (Agu et al., 2001) et une forte vascularisation sous-jacente, très intéressant pour le passage des molécules dans le sang (Sakagami, 2006). Enfin, la muqueuse respiratoire est un site d'absorption très connecté à l'ensemble de l'organisme, adapté à la délivrance de molécules à action locale comme systémique. Dans le domaine de la vaccination par exemple, des études montrent que l'administration intra-nasale ou pulmonaire d'antigènes par les voies respiratoires stimule une protection immunitaire dans l'ensemble de l'organisme, y compris dans d'autres muqueuses (Neutra and Kozlowski, 2006; Ninomiya et al., 2002; Slutter et al., 2010).

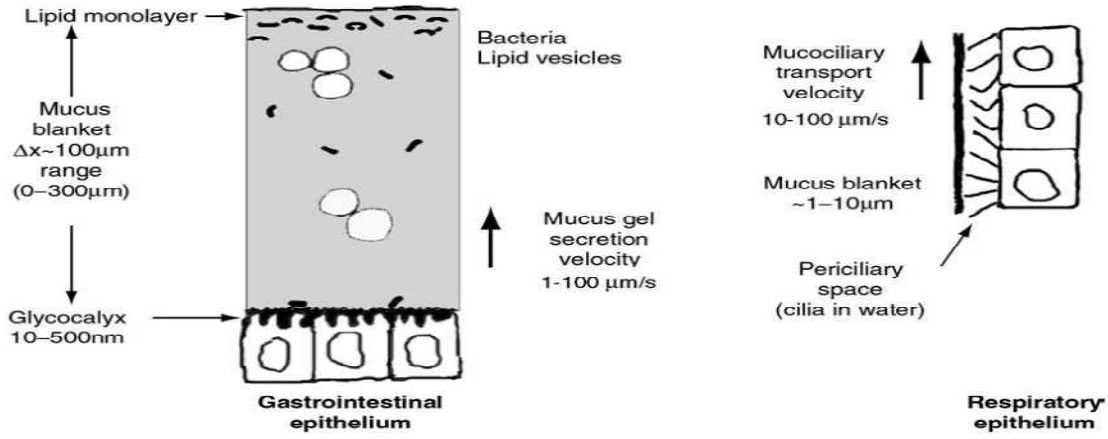


Figure 13. Comparaison des mucus respiratoires et gastro-intestinales (Cone, 2009).

Cependant, par sa fonction d'interface entre l'organisme et le milieu extérieur, la muqueuse respiratoire s'organise également en une barrière protectrice qui limite le passage des particules et pathogènes exogènes.

C'est une barrière composée de plusieurs éléments aux fonctions à la fois spécifiques et complémentaires:

La **clairance mucociliaire (CM) ou mouvement mucociliaire** est un mécanisme actif et continu qui permet le transport du mucus des conduits respiratoires, vers le tractus gastro-intestinal. Ce mécanisme en séquestrant puis éliminant les particules inhalées, est le principal responsable du « nettoyage » des conduits respiratoires. Le mucus respiratoire est un fluide hypotonique d'environ 10µm d'épaisseur composé d'eau (95%), de sels (1%), de protéines et glycoprotéines (mucines) (1-2%) et d'autres éléments (Houtmeyers et al., 1999; Widdicombe, 2002). Le battement des cils est un mouvement continu, synchrone et rapide (fréquence d'environ 10-20Hz) qui en déplaçant la couche de mucus d'environ 10-100µm par seconde permet de renouveler la totalité du mucus respiratoire toutes les 10 minutes (Cone, 2009).

La barrière cellulaire. Les conduits respiratoires sont tapissés par plusieurs types cellulaires aux fonctions spécifiques (cellules cubiques, cellules cylindriques ciliées, cellules de Clara, cellules séreuses, cellules à mucus, pneumocytes…). Ces cellules liées entre elles par un étroit réseau de

jonctions serrées et adhérentes, forment une barrière cellulaire imperméable aux xénobiotiques et macromolécules. De plus, elles sécrètent de nombreuses molécules (protéases, antioxydants, lysozyme, défensines) qui participent à la signalisation cellulaire et à la protection de la muqueuse (Petecchia et al., 2009; Polette et al., 2007).

La barrière immunitaire. Elle est constituée d'une part, par une abondante population de cellules phagocytaires qui capturent et dégradent les particules inhalées, et d'autre part, par la production de nombreuses molécules de l'immunité innée et adaptative (complément, opsonines, immunoglobulines, défensines, lysozyme…).

Une **barrière biochimique** constituée par des nombreuses hydrolases secrétées, qui détruisent les molécules en suspension.

L'action combinée de tous ces acteurs va faire de la muqueuse respiratoire un environnement extrêmement sélectif, hostile à la pénétration de macromolécules. Envisager la délivrance d'une molécule d'intérêt pharmaceutique par les VR revient donc au préalable à mettre en place des stratégies permettant de franchir ces barrières. C'est-à-dire d'améliorer la protection, le transport et l'absorption des molécules dans les VR. Parmi celles-ci, le développement de vecteurs colloïdaux et notamment des nanoparticules, montre des résultats encourageants.

6.2. Nanoparticules comme vecteurs de molécules dans les voies respiratoires

Les nanoparticules sont de plus en plus développées comme systèmes de délivrance de molécules dans les VR. En effet ces vecteurs colloïdaux sont capables de protéger les molécules d'intérêt de l'action des hydrolases, d'éviter la phagocytose par les macrophages et d'améliorer l'absorption des molécules, leur passage et leur pharmacocinétique dans les VR (figure 14) (Azarmi et al., 2008; Sung et al., 2007).

Ces propriétés des nanoparticules sont déterminées par leurs caractéristiques physicochimiques (taille, forme, nature chimique, propriétés de surface). Ces caractéristiques physicochimiques et notamment la taille et les propriétés de surface, sont déterminantes pour l'interaction avec le mucus et l'échappement aux mécanismes d'élimination (clairance mucociliaire). Elles influencent l'efficacité des vecteurs

nanoparticulaires en agissant principalement sur trois grands paramètres : le dépôt régional dans les conduits respiratoires, l'interaction avec le mucus et l'interaction avec les cellules.

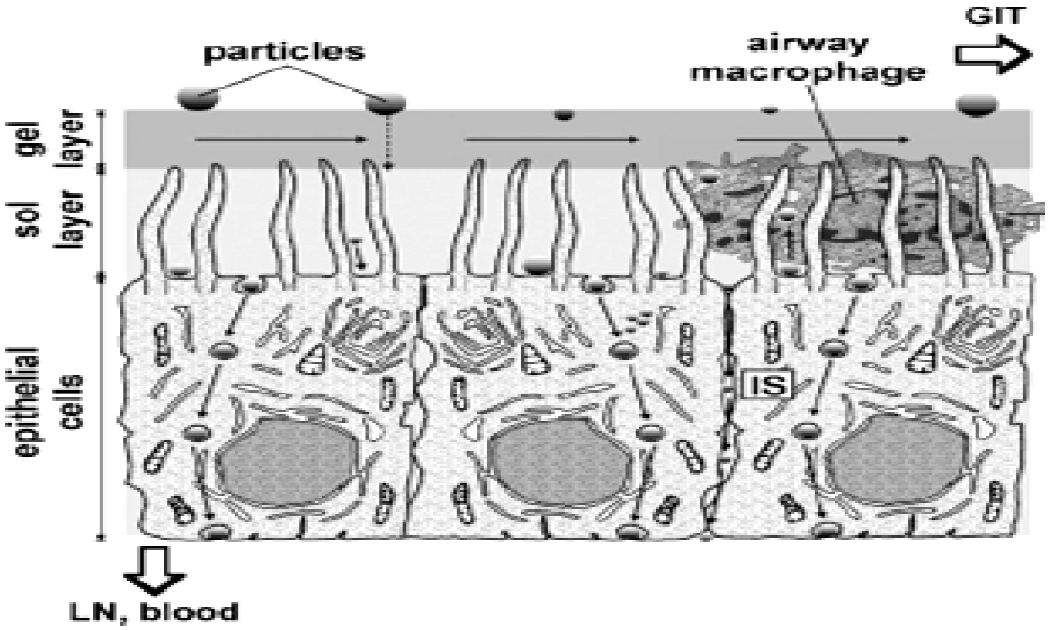


Figure 14. Franchissement des barrières respiratoires par les nanoparticules. Lymphoïd nodes (LN), gastro-intestinal tract (GIT).

Le dépôt des particules inhalées le long des conduits respiratoires se fait par cinq mécanismes principaux (tableau 2) qui dépendent directement de leur diamètre hydrodynamique et de leur densité (Heyder et al., 1986).

Tableau 2: Mécanismes de dépôt des particules inhalées dans les voies respiratoires

	Microparticules			**Nanoparticules**	
	Interception	**Impactation**	**Sédimentation**	**Diffusion brownienne**	**Interactions moléculaires**
Description	Interaction avec la surface des conduits	Collision avec les parois pendant le transport	Dépôt des particules sous l'action de la gravité	Déplacement dans le mucus	Interactions moléculaires avec les composants de la muqueuse

Paramètres déterminants	Diamètre hydrodynamique	Masse, vitesse de l'air	Masse de la particule	Diamètre hydrodynamique	Nature chimique de la particule

Cela s'explique d'une part par l'architecture et la topographie particulière des conduits respiratoires (courbures, bifurcations, diminution de la taille…) et d'autre part par la présence de mucus qui tapisse ces conduits. Les particules de grande taille sont rapidement arrêtées et déposées dans les conduits respiratoires supérieurs (Alfoldy B et al., 2009; Asgharian et al., 2006). Les particules de petite taille, et notamment les nanoparticules sont capables d'accéder à toutes les régions du tractus respiratoire, y compris les plus profondes (figure 15). Elles suivent le flux de l'air inhalé et leur dépôt dépend principalement de leur capacité à interagir avec le mucus (*Hoffmann, 2011*), et donc de leurs caractéristiques physicochimiques (*Serra et al, 2009*).

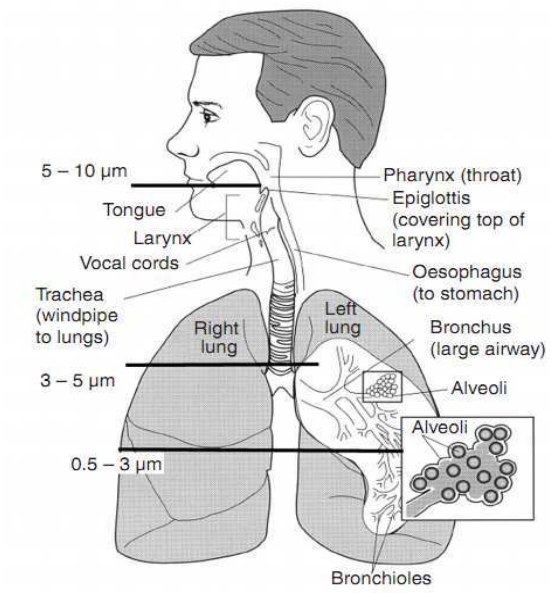


Figure 15. Dépôt régional des particules dans les voies respiratoires en fonction de leur taille (Brown, 2005)

Deux principales catégories de nanoparticules sont développées pour échapper à la clairance mucociliaire, ce sont les nanoparticules mucoadhésives et les nanoparticles mucopermissives. Les nanoparticules mucoadhésives sont des nanoparticules capables de s'associer fortement aux muqueuses (Salamat-Miller et al., 2005). Elles se caractérisent par un temps de résidence plus long et une biodisponibilité plus importante dans le tractus respiratoire (Patil and Sawant, 2008). Plusieurs types de nanoparticules mucoadhésives sont développés comme vecteurs de molécules dans les voies respiratoires. Parmi celles-ci les nanoparticules polysaccharidiques et plus particulièrement les

nanoparticules à base de chitosan sont les plus étudiées. Le chitosan est un polysaccharide naturel, biocompatible, biodégradable et peu toxique (Felt et al., 1998; Illum, 1998). Des études montrent que des liposomes ou des nanoparticules de PLGA voient leur absorption et leur biodisponibilité significativement augmentées dans les VR quand elles sont recouvertes de chitosan (Tahara et al., 2009; Takeuchi et al., 1996). De nombreuses études montrent que la formulation d'insuline dans des nanoparticules de chitosan augmente significativement sa biodisponibilité dans les VR et sa durée d'activité dans le sang (Fernandez-Urrusuno et al., 1999; Illum, 2007). Les nanoparticules mucopermissives se caractérisent par leurs propriétés qui minimisent les interactions avec le mucus respiratoire, permettant aux nanoparticules de passer rapidement à travers celui-ci pour atteindre les cellules (Lai et al., 2009). Cette propriété est obtenue en recouvrant les nanoparticules d'une couche de polymère hydrophile neutre (généralement PEG) qui réduit les interactions avec le mucus. Toutefois, cette catégorie de nanoparticules reste encore peu développée. Enfin, les nanoparticules sont capables de traverser la barrière de cellules épithéliales et d'accéder à la circulation sanguine. Ce passage peut se faire entre les cellules (para-cellulaire) ou à travers les cellules (trans-cellulaire). Dans le cas d'un passage para-cellulaire, les nanoparticules rompent l'adhésion cellulaire en déstabilisant les jonctions serrées (Vllasaliu et al., 2010). Le passage trans-cellulaire quant à lui se fait par transcytose des nanoparticules vers le côté basal des cellules, après leur endocytose sur la face luminale (Takenaka et al., 2012).

Une fois la barrière cellulaire franchie, les nanoparticules sont capables de translocation à travers les cellules endothéliales des vaisseaux qui irriguent les conduits respiratoires, et d'accéder à la circulation sanguine (Mühlfeld et al., 2007). Cette propriété rend les nanoparticules intéressantes pour la délivrance dans les VR, de molécules à action systémique. Ainsi, les nanoparticules sont des vecteurs adaptés au transport de molécules dans les VR. Les nombreuses recherches sur différents domaines d'application tels que la vaccination (Tai et al., 2011), la délivrance de protéines thérapeutiques (Dong et al., 2010), l'imagerie médicale (Ahlstrom et al., 1999) ou encore le ciblage du système nerveux central (Liu et al., 2011b; Liu et al., 2012) montrent des résultats très encourageants. Une compréhension plus approfondie de l'importance des caractéristiques physicochimiques dans leur interaction avec la muqueuse respiratoire permettrait de concevoir des vecteurs nanoparticulaires de plus en plus performants pour la délivrance dans les VR.

PARTIE II

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

NANOPARTICLES FOR AIRWAY DELIVERY OF PEPTIDES AND PROTEINS

Présentation

Ce chapitre présente une revue bibliographique publiée dans le journal Biomaterials. Il s'agit d'un état de l'art montrant l'intérêt de développer des nanoparticules comme système de transport et de délivrance de protéines et de peptides dans les voies respiratoires. Nous y présentons une description des voies respiratoires humaines, leur structure, leur histologie, leur fonctionnement, et leur intérêt comme voie d'administration des médicaments. La revue présente des exemples d'utilisation de nanoparticules pour la délivrance de peptides et de protéines, pour de nombreuses applications (cancer, vaccin, diabète…). Nous montrons l'importance des propriétés physicochimiques des nanoparticules utilisées, les avantages et limites des différentes approches. Enfin, la revue se termine par une partie conclusion et discussion qui fait une synthèse des travaux de la littérature et nous y abordons les questions de toxicité, et du type de protéine présentant un intérêt pour ce mode d'administration.

AIRWAY DELIVERY OF PEPTIDES AND PROTEINS USING NANOPARTICLES

Dombu Youta Christophe[1], Betbeder Didier[1,2,*]

1 *EA4483, IMPRT, IFR 114, Faculté de médecine pôle recherche, Université de Lille 2, 59000 Lille, France*

2 *Université d'Artois, 9 rue du temple, 62030 Arras, France*

[*] *Corresponding author*

E-mail: didier.betbeder@univ-lille2.fr *phone: +33 320 62 68 83*

TABLE OF CONTENTS

ABSTRACT 54

INTRODUCTION 55

1. STRUCTURE AND FUNCTION OF HUMAN AIRWAY 56

1.1. Description 56
1.2. The airway mucosa is the primary defense of the respiratory 56
1.3. The airway cells 58

2. NANOPARTICLES AS AIRWAY DELIVERY SYSTEMS 59

3. NANOPARTICLES FOR AIRWAY DELIVERY OF PEPTIDES AND PROTEINS 61

4. APPLICATIONS 62

3.1. Airway delivery of therapeutic proteins 62
3.2. Protein delivery for vaccination 63
3.3. Cancer 65
3.4. Delivery to the nervous system 67

REFERENCES 71

ABSTRACT

Delivery of peptides and proteins via the airways is one of the most exiting applications of nanomedicine. These macromolecules produced at high scale could be used for many therapeutics applications, however due to their poor stability in physiological medium, their low potential to cross biological barriers, most of these macromolecules cannot be used in therapy. Nanoparticulates drug delivery systems have emerged as one of the most promising technologies to overcome this limitation, owing mainly to their demonstrated capacity to cross biological barriers and to enter cells in high yields, therefore improving macromolecules delivery. In this review, we summarize the current advances made on nanoparticles designed for transmucosal delivery of peptides and proteins. Challenges that must be overcome to derive clinical benefit are discussed in perspective.

INTRODUCTION

Since the first attempts to administer inhaled insulin in the early 1920s, airway delivery of proteins has gradually emerged as a serious non-invasive alternative for proteins administration. Indeed, the human respiratory tract is an easily accessible route with a large surface, which allows molecules to bypass the first metabolic passage in the liver. Moreover, the low thickness of the epithelial barrier, the vast underlying vasculature, the low proteolysis activity, the low acidity and the thinner mucus layer compared to the gastrointestinal mucosa, make the airways suitable either for local and systemic applications (Agu and Ugwoke, 2001). However the respiratory mucosa forms a very tight and complex barrier, hardly permeable to macromolecules such as proteins. Indeed, proteins alone are poorly bio-available in airway, due to poor ability to cross the epithelial cells wall, proteolysis, rapid elimination by macrophages and muco-ciliary clearance. For example, insulin has an extremely low systemic bioavailability (about 1%) following intranasal administration (Illum, 1994). Among strategies developed to improve proteins bioavailability and absorption through the respiratory mucosa, the use of colloidal carriers and especially nanoparticles rise high attentions. Indeed, nanoparticles are demonstrated to provide several benefits such as protein stability, bioavailability, targeting, uptake and biological activity. In this review, we present a synthesis of studies that show through different fields of applications, the interest of using nanoparticles both local and systemic application. We will present the functioning of the respiratory tract, as well as challenges to be overcome to enable effective delivery of proteins. We will give examples for therapeutic proteins delivery in cancer therapy, CNS targeting, allergy and vaccination.

Description

The airways form an organized structure with unique morphology, made of several components: epithelial and non-epithelial cells, sub-mucosa glands, muscular tissue, lymphoid tissues, vascular and nervous elements. In the process of breathing, the inhaled air is transported throughout successive conducts, from the nasal cavities to the lungs. The human respiratory tract is subdivided into three successive parts as shown in Fig.1 (ICRP, 1994). (i) The upper airways or (extra-thoracic region) are the gateway for entering air and comprise successively the nasal cavity, the pharynx and the larynx. They also participate in other functions such as phonation, olfaction and deglutition [1]. (ii) In the thorax, the upper airways give way to the tracheobronchial region, responsible for air conduction and protection from inhaled particles, and are successively made of, the thoracic section of the larynx, and the tracheobronchial tree. The tracheobronchial tree is composed of the trachea and the two bronchi which are divided in their deep parts into many successive branches with smaller sections named bronchioles. (iii) The respiratory part of the airways corresponding to the alveolar region. There are made of the respiratory bronchioles, alveolar ducts and the alveoli. Lungs are massive spongy organs composed of respiratory bronchioles, pulmonary alveoli and capillaries. The lungs alveoli are highly vascularized small bags made of thin wall pneumocytes, which role is to ensure respiratory gas exchanges with the blood. From the upper to the deeper regions, the airway ducts diameters gradually decrease while the number of branches and the surface area increase. Therefore, the surface area gradually increases from approximately 4m² in the two bronchi, to reach 110-140 m² in the lungs. This unique organization ensures high volumes of gas exchange, to a total lung volume of about 5500 ml [2]. This large surface area makes the airway an interesting route for protein absorption.

The airway mucosa is the primary defense of the respiratory

The airway mucosa tract is responsible for airways homeostasy, humidification, mucous secretion, mucociliary clearance and antibacterial defense [3]. The epithelium lining the airway is covered by a 10µm film of mucus [4]. This mucus is a hypotonic fluid made of 95% water, 1% salts (1%), 1-2% proteins and glycoproteins (mucins), and other elements [5]. Mucins are secreted or membrane-associated high molecular weight glycoproteins, produced by mucus secreting cells. They are highly glycosilated as 80% sugars are linked to a protein part rich in threonine and serine amino acids [6]. Several molecules secreted by airways cells are present in airways fluids and participate in protection against infections, cellular communication and cellular regulation. These molecules are mainly secreted by serous cells (proteases, antioxidants, lysozyme, lactoferrin, defensins, secretory leukocyte

peptidase inhibitor, lactoperoxidase). Pneumocytes secret surfactant proteins and some peptides, proteins are also secreted by macrophages. Moreover serum proteins are also present in the mucus as they diffuse through the epithelial cells by different mechanisms including transduction. The mucociliary clearance is the active transport of the mucus along the airways ducts to the digestive tract, due to coordinate motion of cilia present on airways ciliated cells. Under normal situation, cilia motion is a constant mechanism on the frequency of 12-15 Hz, performed by airway epithelial ciliated cells under neuro-stimulation [7]. The mucociliary clearance, supported by the mucus production plays a major role of innate immunity, by entrapping and eliminating inhaled particles and pathogens present in the airways [8].

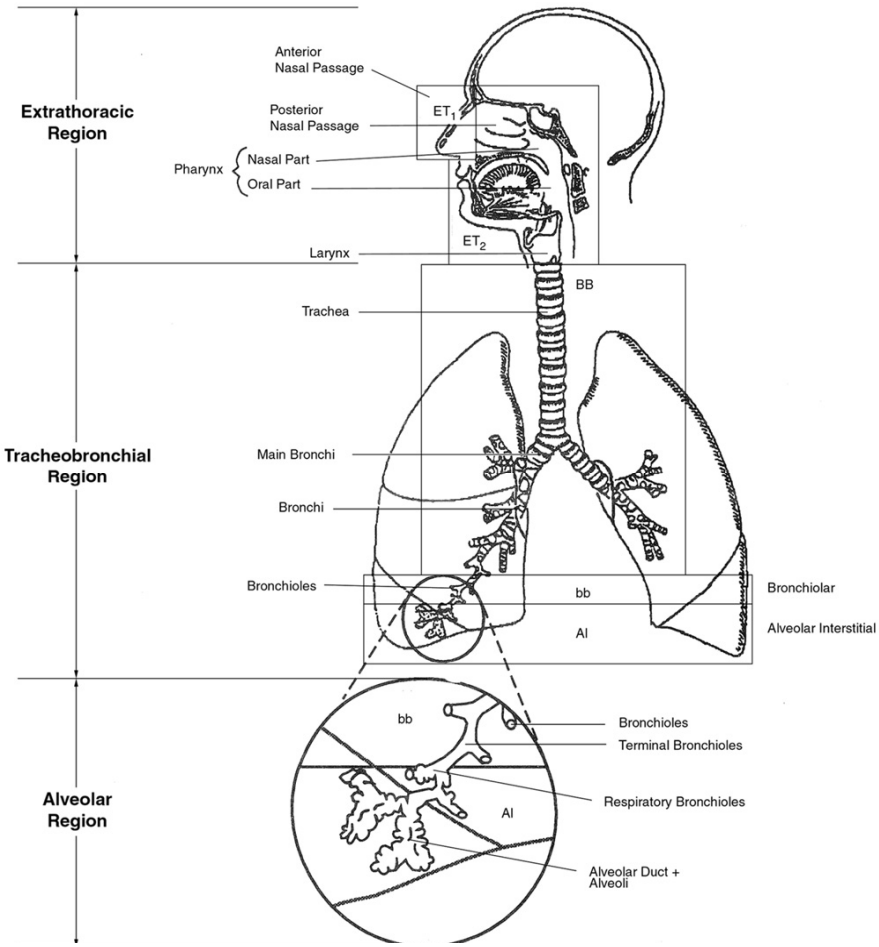


Figure 1: Illustration of the major anatomical regions of the human respiratory tract (ICRP, 1994). Abbreviations: ET1: anterior nasal passages; ET2: posterior nasal passages, naso-oropharynx, and larynx; BB: bronchial region, including trachea and bronchi; bb: bronchiolar region consisting of bronchioles and terminal bronchioles; AI: alveolar-interstitial region, consisting of respiratory bronchioles, and alveolar ducts and sacs surrounded by alveoli [2].

Aside the mucociliary transport, macrophage phagocytosis plays major role in the protection of the respiratory tract. The two mechanisms are complementary and act in different manners along the airways. Indeed, the mucociliary clearance operates only in the airways ducts while macrophages operate in the lungs alveoli, and are responsible for particles clearance in the deep lungs, including fine and ultrafine particles [9, 10]. Phagocytosis is facilitated by opsonization, which is the attachment of proteins on the particle surface making it more visible by surface receptors on phagocytic cells [11, 12]. The airway are characterized by specific opsonins such as the surfactant protein-A (SP-A) and surfactant protein-D (SP-D), which are principally secreted by type II alveolar cells, and few by Clara cells and some submucosal glands cells [13-15].

The airway cells

The epithelium lining the airway is a continuous layer of cells bounded together with multiple tight junctions [16]. The integrity of these tight junctions is important to maintain impermeability toward xenobiotics and was also demonstrated to play roles in cell signaling and proteins expression [16, 17]. This epithelium is made of several cell types with different but complementary functions, whose proportions vary all along the respiratory tract (table 1). For example, the epithelium lining the larynx is a squamous stratified epithelium [1], while the trachea is covered by a pseudo-stratified layer of columnar ciliated epithelial cells. In humans, ciliated cells represent about 56% of epithelial cells in the trachea then their proportion gradually decreases to about 15% in the fifth generation bronchioles [18]. They persist throughout the major bronchi and in the respiratory bronchioles, and then give way to a cubical epithelium in the periphery. In the deep airways, goblet cells proportion toward ciliated cells is estimated to 1 for 5, then both ciliated and goblet cells numbers gradually decrease in smaller airways in favor to Clara and serous secreting cells [7, 18]. Finally in the lungs, the epithelium is mainly composed of alveolar epithelial cells; subdivided into two different cells types: the type II pneumocytes representing the large majority and type I pneumocytes.

Many secreting and non-secreting cells such as dendritic cells, macrophages, Clara cells, serous cells, goblet cells and mucous-secreting cells, also take part in the composition of the airways mucosa [6]. There are responsible for mucus secretion, proteins secretion, xenobiotics metabolism, cell communication, and airway protection, maintenance and differentiation. Furthermore, some environmental stresses such as airways injury, reconstruction, inflammation, asthma and cystic fibrosis were shown to influence airways' cells proportion and organization [19]. Finally, the ubiquitous exposure to airborne assaults make the airways epithelium a very dynamic tissue in constant renewal, with a total turnover estimated to 30-50 days, and supported by numerous progenitor cells [8, 20].

Table 1: **Principal airway cells**

	Characteristics	Localization(s)	Function(s)	References
Squamous cells	Stratified non ciliated cells	Pharynx, larynx	Protection, secretion	[1]
Ciliated columnar cells	Pseudo-stratified ciliated cells	Trachea, bronchi, bronchioles	Mucociliary clearance, immunity	[18]
TypeII pneumocytes	Spherical cells with dense lamellar bodies	Lungs, respiratory bronchioles	Secretion, surfactant synthesis and regulation, gas exchange, xenobiotic metabolism, progenitor cells	[19, 21]
TypeI pneumocytes	Thin cells	Lungs, respiratory bronchioles	Secretion, gas exchange	[19, 21]
Clara cells	Ovoid non ciliated cells	Bronchioles	protection, immunity, progenitor cells	[22, 23]
Goblets Cells	Electron dense large granules	Tracheobranchial tree, bronchioles (rare)	Mucous secretion	[7, 18]
Serous cells	Electron-dense cytoplasm, much rough endoplasmic reticulum	Small bronchi and bronchioles	Mucous and proteins secretion	[24]
Macrophages	Large cells with dense granules	Alveoli, Connective tissue, pleural space, and pulmonary capillaries	Phagocytosis, antigen presentation, inflammation, neoplastic cells destruction, secretions	[9, 25]
Dendritic cells	Large cells with dense granules and pseudopodia	NALT, Interepithelial space, below lamina propria, alveolar interstitium	Inflammation, innate/adaptative immunity, secretion	[26]
Endocrine, Kultchitsky and Feyrter cells	Dense-core granulated (DCG) cell	Surface epithelium in bronchi	Smooth muscle tone, mucous secretion and ciliary stimulation	[27]

NANOPARTICLES AS AIRWAY DELIVERY SYSTEMS

Nanoparticles have several advantages as airway delivery systems. Their small hydrodynamic diameter allows them to partially avoid clearance and to deposit in every region of the respiratory tract, including the deep lung. Numerous studies, including *in vivo* experiments and computational

modeling described the influence of particles size on their local deposition along the airway [2, 28, 29]. It is widely accepted that, particles below 3µm are more susceptible to reach the deep lung [30]. Moreover, smaller particles and especially nanoparticles (<100 nm) are preferentially expected to reach the deep lung, the trachea-bronchial tree, and nasopharyngeal region [31]. In addition, nanoparticles are less susceptible to phagocytosis compared with larger particles. Indeed, several studies converge to a size-range of approximately 0.5-3µm in which particles' phagocytosis is optimal [32, 33]. For example, Lunov and co-workers showed that polystyrene particles with sizes between 250nm and 3µm were preferentially phagocytosed by macrophages [34]. Interestingly, this size range fits with the role of macrophages in pathogen clearance, as 1-4µm represents the most common size of airborne and waterborne bacterial pathogens [35, 36]. Several studies showed that nanoparticle uptake by macrophages is highly depend on their properties and their physicochemical characteristics such as size, surface charge, shape, mucus interaction and endocytosis [10, 37, 38]. For example, a hydrophobic surface is known to facilitate nanoparticle phagocytosis, while the shape influence attachment and internalization by macrophages [32, 33].

In addition, NP can improve the bioavailability of molecules in the airway, due to their ability to be deposed in the mucosa. Mucoadhesion is the particular interaction of a mucosal membrane with a synthetic surface; therefore mucoadhesivity of nanoparticles is their ability to interact with a mucosa surface [39, 40]. Mucoadhesive nanoparticles were found to have longer residence time and improved bioavailability in the airway. This property was shown to be influenced by nanoparticles physicochemical characteristics such as surface charge, size, porosity and the nature of the polymer [41]. Different mucoadhesive polymers have been reported in the literature, including chitosan (CS), alginate, polyvinyl pyrrolidone, polyacrylic acid copolymer, polyvinyl alcohol copolymers, and cellulose derivatives [42, 43]. Among them, polysaccharides such as chitosan and its derivatives retain high attention due to their biocompatibility, biodegradability and low toxicity [44-47]. Takeushi and co-worker showed that surface coating of liposomes with CS polymers highly improved their absorption to mucosa proportionally to CS percentage, compared to uncoated liposomes [48]. Moreover, PLGA nanospheres coating with CS improved their uptake by A549 alveolar epithelial cells, without causing additional cytotoxicity [49]. Interestingly, it has been reported that coating nanoparticles with polysaccharide polymers may also limits their interaction with opsonins [50, 51]. Recently, lectins are developed as cyto-adhesive polymers, due to their ability to preferentially bind epithelial cells surface receptors. Therefore combining nanoparticles with lectins is an emerging strategy under investigation to improve their airway bioavailability by allowing direct attachment to the epithelial cells, and thus limiting interactions with the mucus [41, 52].

Another advantage of nanoparticles is their ability to be highly endocytosed by airways epithelial cells. The endocytosis pathway principally depends on the nanoparticles properties [53, 54], and cell type into consideration [55]. In a recent study, 60nm cationic maltodextrins nanoparticles (NP^+) were

found to bind anionic receptors on human bronchial epithelial cells, followed by a fast internalization via the clathrin endocytosis pathway [56]. Indeed nanoparticles with cationic surface are usually known to bind anionic receptors, typically from the family of glycosaminoglycans (GAGs) such as heparan sulfate proteoglycans (HSPGs), syndecans, betaglycans and glypicans [57-60]. Similarly, the clathrin route was described for the uptake of others different nanoparticles by airways cells, including chitosan nanoparticles [61], PLGA nanoparticles [49, 62], gold nanoparticles [63], and nanodiamonds [64]. On the other hand, other endocytosis mechanisms such as caveolae mediated uptake, non-clathrin/caveolae uptake and macropinocytosis, were described in the internalization of nanoparticles and virus by airway cells [53, 65]. For example, DNA nanoparticles were shown to penetrate BEAS-2B airways cells via a caveolae mediated endocytosis [66]. In a same manner, macropinocytosis was found to be implicated in nanoparticles uptake by airway macrophages, additionally to phagocytosis [67]. Interestingly, it was reported that proteins attachment on nanoparticles surface (opsonization) may influence their uptake. Indeed, opsonization of polystyrene particles with immunoglobulin was found to modify their endocytosis mechanism from clathrins and macropinocytosis pathways, to phagocytosis [34]. Other studies showed that nanoparticles can cross alveoli cells by transcytosis, and merge into the bloodstream [10, 68, 69]. This translocation of nanoparticles also constitutes an interesting asset for systemic drug delivery, following airways administration [69-71]. In summary, nanoparticles elicit considerable advantages as airway delivery systems. They are able to be deposed efficiently in the airway tract, to avoid clearance mechanisms, and to take advantage of the endocytosis machinery of airway epithelial cells, making them highly potent vectors for macromolecules delivery systems.

NANOPARTICLES FOR AIRWAY DELIVERY OF PEPTIDES AND PROTEINS

Associating nanoparticles with proteins is an interesting strategy to improve their bioavailability and biological activity following airway delivery. Indeed, using nanoparticle delivery systems is expected to provide benefits such as, protein stability, sustained release, intracellular targeting, cell/tissue targeting and improved uptake by airway epithelial cells [72-74]. Numerous methods to load nanoparticles with proteins have been developed, including encapsulation, surface adsorption, and chemical linking [75]. For example, 50nm self assembled cationic nanogels are known to strongly interact to form stable nanoparticles even in presence of serum [76]. Particle coating with hydrophilic polymers such as Peg and CS was shown to improve their ability to deliver proteins across the nasal and intestinal mucosa [77]. Numerous nanoparticles have been developed to promote airway delivery of proteins, including mucoadhesive systems, tight junction disrupters, and macrophage targeting systems. For example, it was shown that mucoadhesive nanoparticles can improve protein/peptide

absorption and residence time in mucosa [78, 79]. Moreover, nanoparticles have are expected to enable long-term bioavailability and controlled release of therapeutic proteins [74].

APPLICATIONS

Airway delivery of therapeutic proteins

So far, insulin is the most documented example of peptide delivery via the airway. Studies of inhaled insulin for the treatment of type 1 and 2 diabetes were reported since the early 1920s, when Laqueur and Grevenstuk showed an insulin bioavailability after intra-tracheal administration (Laqueur and Grevenstuk, 1924). Intranasal insulin was also shown to elicit long-term control of plasma glucose compared with the conventional subcutaneous administration, while having similar mechanisms of glycemia control [80-82]. However, many studies also reported a low systemic bioavailability of nasal insulin (less than 1%) [47], therefore requiring very high doses of insulin, up to 10 times more [83]. Although therapeutic peptides and proteins such as insulin can cross the air-blood barrier [84], their absorption through airway epithelial cells is strongly limited by the airways clearance mechanisms, the low penetration through cell membranes and the difficulty to determining effective doses depending on patients [83]. Numerous studies showed that associating insulin to nanoparticles can improve their bioavailability in the respiratory mucosa. For example, PEGylated chitosan nanoparticles were shown to enhance insulin absorption to a greater extent compared to non-nanoparticles chitosan and insulin alone [85, 86]. Chitosan nanoparticles were also found to enhance nasal absorption of insulin in rabbit, regardless insulin molecular weight [87]. Recently, Al-Qadi and co-workers showed that intratracheal administration of dry powder of insulin microencapsulated in chitosan nanoparticles increased its distribution in the deep lungs, and released a biologically active form of insulin in rats' blood. Moreover, they observed a more pronounced and prolonged effect compared to non formulated insulin [88]. Moreover, mucoadhesive liposomes (coated with chitosan) significantly reduced plasma glucose compared to non mucoadhesive liposomes [89]. For example, coating liposomes containing insulin with chitosan was found to produce a significant reduction of glucose level in rat blood for more than 12 hours after administration [48]. Similarly, Sintov and co-worker showed that, intranasal administration of insulin microemulsion was able to control glucose level in plasma with good permeation and pharmacokinetic/ pharmacodynamic comparable to subcutaneous administration, with no need for co-administration of absorption enhancer [90]. In a same manner, the L-penetratin cell penetrating peptide (CPP) was found to increase insulin permeability across nasal epithelial cells after intranasal delivery in male Sprague Dawley rats [91]. These results show that, intranasal administration of insulin bounded nanoparticle is a promising non-invasive strategy to treat diabetes.

Aside insulin, a large numbers of proteins are evaluated in airway delivery including peptide hormones (calcitonin, oxytocin, growth hormone, somatostatin, thyroid-stimulating hormone, follicle-stimulating hormone), growth factors (colony stimulating factor, granulocyte monocyte-colony stimulating factor, Insulin-like growth factor) and cytokines (IL-2, IL-12) [83]. Chen and co-workers showed that formulating calcitonin (a 32 amino-acid polypeptide hormone used in the treatment of bone diseases such as Paget's disease, hypercalcemia, osteoporosis and bone metastasis) in liposomes, were found to produce an activity comparable to subcutaneous injection, with a significant improvement of calcitonin absorption and hypocalcemia activity, compared to calcitonin alone [92]. Same results were obtained using different liposomes [93]. Positively and negatively charged gelatin nanoparticles were also shown to enhance calcitonin intranasal administration [94]. Moreover, pulmonary delivery of calcitonin loaded in gelatin-chitosan nanoparticles was found to produce a sufficient pharmacological availability with a pronounced hypocalcemic effect for more than 24h [95]. In a same manner, incorporation of elcatonin (a calcitonin derivative) in chitosan-PLGA nanospheres produced a prolonged reduction in blood calcium for over 24h compared with the drug solution and the unmodified nanospheres which was rapidly removed from lung [78].

Protein delivery for vaccination

Most of the antigens used for intranasal vaccination are proteins immunogenic enough to generate effective protection against the pathogen in consideration. However, due to barriers encountered in the respiratory mucosa, antigens alone are not effective to generate sufficient immunity; therefore adjuvants are used to increase their immunogenicity. The main challenge in intranasal vaccination is to target the Nasal Associated Lymphoid Tissue (NALT). The NALT is mainly located in the pharynx as a ring of lymphoid tissue (Waldeyer’s ring) just below the epithelial surface, and contains many lymphoid follicles (B-cell areas), macrophages and dendritic cells (figure 2). The epithelium forming the NALT comprises ciliated epithelial cells, mucous goblet cells and non-ciliated cells similar to the M-cells present in the Peyer’s Patches in the intestinal tract. These particular M-cells are responsible for uptake and transcytosis of antigens from the lumen to the NALT [96]. Numerous studies showed that nasal immunization not only can produce local secretion of IgA in the airway mucosa but also can produce systemic IgG [97]. Moreover, intranasal vaccination was shown to induce immune responses, on distal mucosal lymphoid tissues including the oral and vaginal mucosa [98, 99], and stimulate a protective immunity toward different pathogens HIV [100, 101], human papilloma virus [102] and influenza virus.

Nanoparticles are considered as highly potential delivery systems for antigen delivery in the respiratory mucosa, able to protect antigens against degradation and to deliver it to antigen presenting cells [103]. They were shown to improve antigen protection, recognition and uptake by the lymphoid

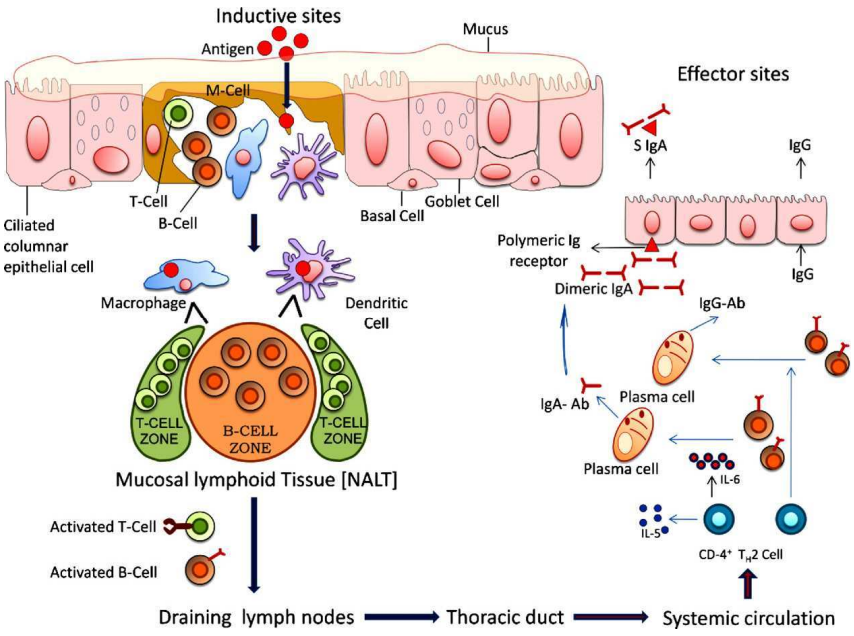
tissues, and in some case to lead modulation of the immune response [104]. For example, some nanoparticles such as chitosan, PLGA, and polystyrene nanoparticles were found to highly improve antigens uptake by the NALT [105-108]. Polysaccharide derivatives nanoparticles, such as trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles were shown to enhance antigens residence time in the airway mucosa, and the production of IgG and IgA [109]. Recently, TMC was shown to induce the production of several maturation markers by the DCs [97, 110]. Furthermore, surface coating of nanoparticles with mannose moieties was shown to improve their uptake by immune cells by enhancing macrophages targeting [111]. This strategy is of interest, as macrophages rather than DCs have been found to be responsible of immunomodulation in some specific patterns for airways infection [112].

The surface glycoproteins hemagglutinin and neuraminidase are the most commonly used antigens proteins for influenza virus vaccination and numerous attempts of formulating hemagglutinin with nanoparticles have been achieved to develop a nasal flu vaccination. For instance, the polysaccharide nanoparticles, Supra Molecular Biovector (SMBV) underwent clinical trial as proteins delivery system for intranasal vaccination against nasal flu [113]. SMBV were shown to produce local and systemic immunity after intranasal vaccination in mice, using Hepatitis B antigens [114], MenC [115]. Moreover, SMBV were able to stimulate both Th1 and Th2 immune response, without modification of IgG profile compared to intramuscular administration [115]. In a same manner, liposomes and liposome based structures formulated with short highly conserved influenza peptides produced protective immunity against influenza virus infection [112]. In a recent study, Gupta and co-workers also showed that, single intranasal vaccination of mice with hemaglutinin using chitosan coated PCL nanoparticles increased the production of Th1 and Th2 antibodies compared to antigen alone, without modifying antibodies isotypes profiles. Interestingly, they also showed that longer retention in airway using chitosan coating resulted in higher production of IgG antibodies [116].

Another interesting example of intranasal immunization using protein associated nanoparticle is for vaccination against *Mycobacterium tuberculosis*. To date, the most common strategy against tuberculosis is vaccination with Bacillus Calmette-Guérin (BCG). However, BCG was shown to be mainly effective in the childhood. The protection fade with age [117] and immunization of adults with BCG does not produce reliable protection [118, 119]. Therefore, nanoparticles are increasingly investigated for vaccination and immunization boost in adults, especially as recent studies showed that intranasal vaccination with antigens may boost immune protection in adults. The proteins ESAT-6, Ag85B, and ESAT-6/Ag85B (fusion protein) are immunogenic proteins commonly used for immunization against Mycobacterium tuberculosis (MbT) [120]. PLGA nanoparticles formulated with ESAT-6 or with Ag85B were shown to induce a strong immunity and memory T cell response in the lungs and the thoracic lymph nodes after intranasal administration [121-123]. Similarly, adjuvanted Pluronic-stabilized polypropylene sulfide nanoparticles conjugated with Ag85B enhanced production of polyfunctional Th1 responses in the spleen, the lung and lung-draining lymph nodes, as well as

Th17 responses, after intranasal administration [124]. These results bring encouraging perpectives for the development of new non-invasive anti-tuberculosis vaccines, with long term immunity in children and adults.

Finally nanoparticles also showed abilities to generate immune protection against infections other than airway's infections, after intranasal immunization with protein. For example, The HIV's membrane glycoproteins gp120, gp124 and gp160 were shown to produce efficient systemic and mucosal protection against HIV infections in animal, when formulated with various nanoparticles, including liposomes [101], PLA nanoparticles [125], gamma-PGA nanoparticles [110] and polystyrene beads [126]. Although intranasal vaccine using nanoparticle/protein formulations are not yet available in the market, these achievements illustrate the potential of nanoparticles for the delivery of protein antigens via the airway.



From Gupta et al., 2011

Cancer

Proteins play major roles in the processes of carcinogenesis and tumor persistence. They are involved in every cellular mechanism including cell signaling, proliferation, migration and apoptosis. Moreover, cancer cells are known to express/over-express several proteins markers. Therefore,

numerous anti-cancer therapies take advantage of the protein-protein interactions to develop proteins and peptides based drugs, in order to specifically target membrane proteins or to impede intracellular machinery of cancer cells. Proteins drugs are developed for different anti-cancer strategies including diagnosis, antibody therapy, vaccination, and cancer targeting using proteins combined with anti-cancer drugs. However intranasal delivery of proteins for cancer therapy still presents serious difficulties, principally due to the airway barriers and the low uptake by tumors.

Different nanoparticles/proteins formulations are being developed to target specific protein receptors on tumors. For example, the epidermal growth factor receptor (EGFR) is a commonly targeted surface receptor, as EGFR is overexpressed in 80% of cancers, and this over expression has been associated with poor survival prognostics [127]. Biotinylated-EGF coupled with gelatin nanoparticles were shown to preferentially target lung adenocarcinoma cells (A549) *in vitro*, compared to normal lung cells. Moreover intranasal delivery to cancerous lungs mice showed accumulation in lung carcinoma cells. On the other hand, some approaches use specific antibodies to target EGFR. Cetuximab (or Erbitux, or C225) is a chimeric human-murine monoclonal antibody that specifically binds EGFR with high affinity, resulting in inhibition of cell proliferation, angiogenesis, invasiveness, metastasis, as well as enhanced apoptosis [128]. Recently, ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles (USPION) conjugated with cetuximab were shown to specifically bind EGFR and accumulate in nasopharyngeal carcinoma cells (CNE1 cells), showing their potential as non-invasive contrast agent for airway carcinoma [129]. In a same manner, various protein/nanoparticles have been studied, including cetuximab conjugated quantum-dot for tumor-specific imaging [130], Anti-ENO1-conjugated gold nanoparticles for non small cell lung cancer (NSCLC) [131] and bombesin coupled gold nanoparticles to target gastrin-releasing peptide (GRP) receptors in NSCLC cells [132].

Interestingly, proteins can be loaded in nanoparticles as airway anticancer drugs or associated with nanoparticles containing anticancer drugs, in order enhance their bioavailability and reduce undesirable effects [133]. El-mir and co-workers showed that, IL2 associated with maltodextrin nanoparticles was able to induce complete regression of a tumor and partial immune protection from tumour rechallenge, after intranasal administration in mice implanted with mammary adenocarcinoma TS/A tumour [134]. Recently, anti-EGFR antibody combined with hybrid plasmonic magnetic nanoparticles was shown to impede EGFR signal transduction on NSCL cell culture, resulting in high cytotoxicity, autophagy and apoptosis [127]. Moreover, heparin-nanoparticles coupled with Cisplatin, was found to significantly increase their association on EGFR and the intracellular concentrations of cisplatin in non-small cell lung cancer H292, compared to the free drug alone [135]. Similarly, combining an anti H-ferritin monoclonal antibody to polylactide nanoparticles formulated with praclitaxel was shown to enhance their accumulation in A-549 cells lung carcinoma cells, leading to a much higher cytotoxicity on these cells.

Finally, therapeutic vaccines against cancer are under development using cancer proteins marquauers associated to nanoparticules. Indeed, nanoparticles are expected to enhance proteins immunogenicity, as these protein makers alone are generally unable to induce sufficient tumor immune responses due to their poor inherent immunogenicity. For example, Matsuo and co-workers recently showed that intranasal vaccination with poly γ-glutamic acid nanoparticles containing ovalbumin were able to induce antitumor immunity against cancer cells transfected with ovalbumin and injected in mice [136]. These achievements show encouraging perspectives for the use of proteins associated nanoparticles to treat airway's cancers.

Delivery to the central nervous system

Proteins and especially neurotrophic factors and recombinant antibodies have great therapeutic potential against neurological diseases. Recently, the brain targeting of proteins via the nasal route increasingly appears as a promising non-invasive route to deliver proteins to the brain, allowing bypassing the so selective blood brain barrier. Indeed, different pathways allowing direct passage of molecules from the nasal cavity to the brain have been characterized. (i) The olfactory nerve passage, operating by molecules transport along the axon to the brain through the manifold small holes of the cribriform plate of the ethmoid bone, after receptor mediated endocytosis in the olfactory epithelium located in the roof of the nasal cavity. (ii) The trigeminal nerves passage, which transports molecules to the posterior parts of the brain, such as cerebellum and brainstem. (iii) The vasculature route, in which molecules cross the blood-brain barrier after passing the epithelial barrier and melting into the circulation stream via the blood vessels draining the nasal mucosa. (Iv) the cerebrospinal fluid (CSF) and lymphatic system route, fitting into the nasal lymphatic's and the subarachnoid space containing CSF, accessible after nasal absorption [137, 138].

Numerous attempts of proteins nose-to-brain targeting have been studied for the treatment of neurological deseases such as Alzheimer disease (IGF-1, NGF, BDNF and insulin), Parkinson disease (TGF-alpha, FGF) and traumatic brain injury (erythropoietin, CNTF). For instance, intranasal delivery of Insulin-like growth factor was shown to elicit IGF biodistribution in the brain and the spinal cord in rats [139]. Brain uptake via the nose can be improved using absorption enhancer such as surfactants, bile salts, lipids, cyclodextrins, chitosan and derivatives, poly-L-arginine, gelatin and poly(acrylic acid) or by using transporteurs such as nanoparticles [137, 140]. For example, Vaka and co-workers showed a 14-fold increase in the bioavailability of intranasally administered NGF with chitosan compared to the formulation without chitosan, in rats [141]. Recently, nanoparticles are increasingly developed to improve CNS uptake of peptides and proteins via the nasal route. Though nanoparticles have already shown ability to overcome the blood-brain barrier via systemic delivery, recent studies are increasingly showing that brain targeting of proteins via the nasal route can be achieved by using

nanoparticles [142]. One strategy to improve nanoparticles uptake by the nasal olfactory epithelium is to coat them with particular proteins such as the lectins Ulex Europeus Agglutinin I (UEA I) and wheat germ Agglutinin (WGA), or with homing peptides which furthermore have advantages of being more tolerated by mammalians [138]. For example, Liu and co-workers showed that association of nanoparticles with WGA enabled their targeting to rat brain using the olfactory and the trygemal nerves pathways [143]. Same results were observed using Solanum tuberosum lectin conjugated PEG-PLGA nanoparticles [144].

Interestingly, nanoparticles can be combined with therapeutic protein to improve nasal targeting of the CNS. For example, intranasal administration in mice of a vasoactive intestinal peptide (VIP) incorporated into PEG-PLA nanoparticles decorated with WGA was studied. The authors showed that WGA decoration induced a preferential affinity and localization of nanoparticles in the olfactory mucosa contrary to the respiratory mucosa. Futhermore, WGA decorated PEG-PLA nanoparticles were shown to efficiently transport VIP to the brain, following intranasal administration [145]. Recently, polysorbate-80 coated nanoparticles were shown to improve distribution of the neurotoxin-II (an analgesic peptide) in brain via intranasal administration to rat [146]. Moreover, Veronesi and co-workers observed a strong protection against glutamate toxicity in rat model's brain after intranasal delivery of thyrotropin-releasing hormone (TRH) incorporated in PLA nanoparticles, showing interesting potential for the treatment of epilepsy patients. Furthermore, this effect was greatly improved using nanoparticles compared with TRH formulation alone [147]. Although the mechanisms of protein delivery to the brain using nanoparticles are still poorly understood especially in terms of toxicity on the brain after repeated administration, these results enlighten the possibility of using nanoparticles as a new non-invasive carrier to deliver proteins to the brain using the nasal route and could bring considerable outcome for the treatment of neurological disease.

DISCUSSION

The ubiquitous role of proteins in most of biological processes makes them molecules with high therapeutic potential. However, they use in therapy remains a difficult challenge, principally due to difficulty of targeting proteins in the body, while maintaining their stability and biological activity. Recently, the airway delivery of proteins is increasingly developed as an alternative non-invasive route of administration, able to bypass the first metabolic passage in the liver, while retaining proteins biological activity. However, multiple barriers present in the respiratory tract severely limit the passage of macromolecules such as large peptides and proteins. In this review, we presented numerous studies showing that, using nanoparticles as peptide and protein vehicles can significantly improve their therapeutic efficacy following airway delivery. Indeed, associating proteins with nanoparticles has been shown to improve they stability, residence time, cell targeting, and uptake by airways

epithelial cells. These properties were found to be dependent on nanoparticles physicochemical characteristics. For example, due to their size, nanoparticles are able to carry proteins throughout every regions of the respiratory tract, including the deep lungs. Moreover, using nanoparticles coated with specific polymers such as PEG was shown to protect proteins from proteolysis, mucus entrapment and macrophage clearance, resulting in a higher bioavailability in the airways. In addition, proteins residence time can significantly be improved in airways using mucoadhesive or cytoadhesive nanoparticles. This constitutes an interesting asset as different cells populations can be targeted by coating nanoparticles with specific cytoadhesive polymers such as lectins or mannose. These results show that developing nanoparticles as peptides and proteins delivery system is a promising strategy to improve their therapeutic efficiency through the airway. The application areas are numerous including cellular imaging, anti-cancer therapy, vaccine development and CNS targeting.

Because of current lack of knowledge regarding the potential toxicity of airway delivered nanoparticles, numerous studies are developing biocompatible and biodegradable nanoparticles. Especially as nanoparticles can directly pass into the brain after intranasal administration, and consequences from repeated and long-term administration are poorly known. This lack of data is explained by the wide variety of nanoparticles, but also because there is currently no widely accepted and reliable methodology to study the toxicity of nanoparticles on the airways, which mimics the real exposure conditions.Studies have long been limited to the toxicity of airborne nanoparticles such as diesel [148], fullerene [149], titanium dioxide [150], oil vapor nanoparticles [151]. Recently, Mura and his colleagues showed that surface characteristics could influence PLGA nanoparticles toxicity on human respiratory cells [152]. Another recent study suggest that nanoparticles interaction with proteins significantly modify their genotoxicity [153]. In contrast, beneficial effect of nanoparticles were observed on inflammation and allergy [154]. However, toxicity studies are usually performed with doses of nanoparticles and on particular experimental conditions that doesn’t really mimic realistic exposure to nanoparticles. Nevertheless, it is likely that nanoparticles toxicity depends on the nanoparticle and experimental models used.

Finally, the type of proteins to be delivered via airway is a crucial parameter to consider. Indeed, the most successful achievements of airway delivery of proteins are generally obtained with peptides or proteins with relatively low molecular weight such as insulin (5.8 kDa), oxytocin (1 kDa), calcitonin (3.4 kDa), elcatonin (3.3 kDa), VIP (3.3 kDa) IgG fragments (approximately 25 kDa), rarely exceeding 50 kDa. This is principally due to the difficulty of large proteins to cross the epithelial cells layer. Moreover, the blood bioavailability of airway delivery proteins remains modest even associated to nanoparticle. For example, the systemic bioavailability of airway delivery insulin formulated in nanoparticles rarely exceeds 30%. Therefore larger amounts of proteins are generally required for airway delivery. Regarding these parameter, the proteins candidates for airway administration should

be peptides or proteins with small molecular weight, with high biological activity, or preferentially developed for local application.

1. Pohunek, P., *Development, structure and function of the upper airways.* Paediatr Respir Rev, 2004. **5**(1): p. 2-8.

2. Hofmann, W., *Modelling inhaled particle deposition in the human lung - A review* Journal of Aerosol Science, 2011. **42**(10): p. 693-724.

3. Vonk, M.J., P.S. Hiemstra, and J.J. Grote, *An antimicrobial peptide modulates epithelial responses to bacterial products.* Laryngoscope, 2008. **118**(5): p. 816-20.

4. Widdicombe, J.H., *Regulation of the depth and composition of airway surface liquid.* J Anat, 2002. **201**(4): p. 313-8.

5. Houtmeyers, E., et al., *Regulation of mucociliary clearance in health and disease.* Eur Respir J, 1999. **13**(5): p. 1177-88.

6. Jeffery, P.K. and D. Li, *Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes.* Eur Respir J, 1997. **10**(7): p. 1655-62.

7. Chilvers, M.A. and C. O'Callaghan, *Local mucociliary defence mechanisms.* Paediatr Respir Rev, 2000. **1**(1): p. 27-34.

8. Crystal, R.G., et al., *Airway epithelial cells: current concepts and challenges.* Proc Am Thorac Soc, 2008. **5**(7): p. 772-7.

9. Brain, J.D., *Mechanisms, measurement, and significance of lung macrophage function.* Environ Health Perspect, 1992. **97**: p. 5-10.

10. Geiser, M., et al., *The role of macrophages in the clearance of inhaled ultrafine titanium dioxide particles.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2008. **38**(3): p. 371-6.

11. Frank, M.M. and L.F. Fries, *The role of complement in inflammation and phagocytosis.* Immunol Today, 1991. **12**(9): p. 322-6.

12. Owens, D.E., 3rd and N.A. Peppas, *Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles.* Int J Pharm, 2006. **307**(1): p. 93-102.

13. van de Wetering, J.K., L.M. van Golde, and J.J. Batenburg, *Collectins: players of the innate immune system.* Eur J Biochem, 2004. **271**(7): p. 1229-49.

14. Cortes, G., et al., *Role of lung epithelial cells in defense against Klebsiella pneumoniae pneumonia.* Infect Immun, 2002. **70**(3): p. 1075-80.

15. Noah, T.L., et al., *Bronchoalveolar lavage fluid surfactant protein-A and surfactant protein-D are inversely related to inflammation in early cystic fibrosis.* Am J Respir Crit Care Med, 2003. **168**(6): p. 685-91.

16. Petecchia, L., et al., *Bronchial airway epithelial cell damage following exposure to cigarette smoke includes disassembly of tight junction components mediated by the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway.* Chest, 2009. **135**(6): p. 1502-12.

17. Polette, M., et al., *Beta-catenin and ZO-1: shuttle molecules involved in tumor invasion-associated epithelial-mesenchymal transition processes.* Cells Tissues Organs, 2007. **185**(1-3): p. 61-5.

18. Wanner, A., M. Salathe, and T.G. O'Riordan, *Mucociliary clearance in the airways.* Am J Respir Crit Care Med, 1996. **154**(6 Pt 1): p. 1868-902.

19. Beers, M.F. and E.E. Morrisey, *The three R's of lung health and disease: repair, remodeling, and regeneration.* J Clin Invest, 2011. **121**(6): p. 2065-73.

20. Reynolds, S.D. and A.M. Malkinson, *Clara cell: progenitor for the bronchiolar epithelium.* Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(1): p. 1-4.

21. Castranova, V., et al., *The alveolar type II epithelial cell: a multifunctional pneumocyte.* Toxicol Appl Pharmacol, 1988. **93**(3): p. 472-83.

22. Ayers, M.M. and P.K. Jeffery, *Proliferation and differentiation in mammalian airway epithelium.* Eur Respir J, 1988. **1**(1): p. 58-80.

23. Wong, A.P., A. Keating, and T.K. Waddell, *Airway regeneration: the role of the Clara cell secretory protein and the cells that express it.* Cytotherapy, 2009. **11**(6): p. 676-87.

24. Rogers, A.V., et al., *Identification of serous-like cells in the surface epithelium of human bronchioles.* Eur Respir J, 1993. **6**(4): p. 498-504.

25. Fels, A.O. and Z.A. Cohn, *The alveolar macrophage.* J Appl Physiol, 1986. **60**(2): p. 353-69.

26. Lambrecht, B.N. and H. Hammad, *Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma.* Immunity, 2009. **31**(3): p. 412-24.

27. Sorokin, S.P., R.F. Hoyt, Jr., and A.D. Pearsall, *Comparative biology of small granule cells and neuroepithelial bodies in the respiratory system. Short review.* Am Rev Respir Dis, 1983. **128**(2 Pt 2): p. S26-31.

28. Longest, P.W. and L.T. Holbrook, *In silico models of aerosol delivery to the respiratory tract - Development and applications.* Adv Drug Deliv Rev, 2011.

29. Bartley, D.L. and J.H. Vincent, *Sampling conventions for estimating ultrafine and fine aerosol particle deposition in the human respiratory tract.* Ann Occup Hyg, 2011. **55**(7): p. 696-709.

30. Carvalho, T.C., J.I. Peters, and R.O. Williams, 3rd, *Influence of particle size on regional lung deposition--what evidence is there?* Int J Pharm, 2011. **406**(1-2): p. 1-10.

31. Madlova, M., et al., *Poly(vinyl alcohol) nanoparticle stability in biological media and uptake in respiratory epithelial cell layers in vitro.* Eur J Pharm Biopharm, 2009. **72**(2): p. 437-43.

32. Kawaguchi, H., et al., *Phagocytosis of latex particles by leucocytes. I. Dependence of phagocytosis on the size and surface potential of particles.* Biomaterials, 1986. **7**(1): p. 61-6.

33. Sharma, G., et al., *Polymer particle shape independently influences binding and internalization by macrophages.* J Control Release, 2010. **147**(3): p. 408-12.

34. Lunov, O., et al., *Differential uptake of functionalized polystyrene nanoparticles by human macrophages and a monocytic cell line.* ACS Nano, 2011. **5**(3): p. 1657-69.

35. Champion, J.A. and S. Mitragotri, *Role of target geometry in phagocytosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(13): p. 4930-4.

36. Champion, J.A., A. Walker, and S. Mitragotri, *Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres.* Pharm Res, 2008. **25**(8): p. 1815-21.

37. Kreyling, W.G., et al., *Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low.* J Toxicol Environ Health A, 2002. **65**(20): p. 1513-30.

38. Oberdorster, G., E. Oberdorster, and J. Oberdorster, *Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles.* Environ Health Perspect, 2005. **113**(7): p. 823-39.

39. Lenaerts, V. and R. Gurny, *Bioadhesive Drug Delivery Systems.* CRC Press, Florida,, 1990: p. 93–104.

40. Patil, S.B. and K.K. Sawant, *Mucoadhesive microspheres: a promising tool in drug delivery.* Curr Drug Deliv, 2008. **5**(4): p. 312-8.

41. Serra, L., J. Domenech, and N.A. Peppas, *Engineering design and molecular dynamics of mucoadhesive drug delivery systems as targeting agents.* Eur J Pharm Biopharm, 2009. **71**(3): p. 519-28.

42. Salamat-Miller, N., M. Chittchang, and T.P. Johnston, *The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery.* Adv Drug Deliv Rev, 2005. **57**(11): p. 1666-91.

43. Morales, J.O. and J.T. McConville, *Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films.* Eur J Pharm Biopharm, 2011. **77**(2): p. 187-99.

44. Felt, O., P. Buri, and R. Gurny, *Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery.* Drug Dev Ind Pharm, 1998. **24**(11): p. 979-93.

45. Illum, L., *Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient.* Pharm Res, 1998. **15**(9): p. 1326-31.

46. Cui, F., F. Qian, and C. Yin, *Preparation and characterization of mucoadhesive polymer-coated nanoparticles.* Int J Pharm, 2006. **316**(1-2): p. 154-61.

47. Illum, L., N.F. Farraj, and S.S. Davis, *Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs.* Pharm Res, 1994. **11**(8): p. 1186-9.

48. Takeuchi, H., et al., *Enteral absorption of insulin in rats from mucoadhesive chitosan-coated liposomes.* Pharm Res, 1996. **13**(6): p. 896-901.

49. Tahara, K., et al., *Improved cellular uptake of chitosan-modified PLGA nanospheres by A549 cells.* Int J Pharm, 2009. **382**(1-2): p. 198-204.

50. Lemarchand, C., R. Gref, and P. Couvreur, *Polysaccharide-decorated nanoparticles.* Eur J Pharm Biopharm, 2004. **58**(2): p. 327-41.

51. Rouzes, C., et al., *Surface modification of poly(lactic acid) nanospheres using hydrophobically modified dextrans as stabilizers in an o/w emulsion/evaporation technique.* J Biomed Mater Res, 2000. **50**(4): p. 557-65.

52. Lehr, C.M., *Lectin-mediated drug delivery: the second generation of bioadhesives.* J Control Release, 2000. **65**(1-2): p. 19-29.

53. Perumal, O.P., et al., *The effect of surface functionality on cellular trafficking of dendrimers.* Biomaterials, 2008. **29**(24-25): p. 3469-76.

54. Vacha, R., F.J. Martinez-Veracoechea, and D. Frenkel, *Receptor-mediated endocytosis of nanoparticles of various shapes.* Nano Lett, 2011. **11**(12): p. 5391-5.

55. dos Santos, T., et al., *Effects of transport inhibitors on the cellular uptake of carboxylated polystyrene nanoparticles in different cell lines.* PLoS One, 2011. **6**(9): p. e24438.

56. Dombu, C.Y., et al., *Characterization of endocytosis and exocytosis of cationic nanoparticles in airway epithelium cells.* Nanotechnology, 2010. **21**(35): p. 355102.

57. Hartig, S.M., et al., *Kinetic analysis of nanoparticulate polyelectrolyte complex interactions with endothelial cells.* Biomaterials, 2007. **28**(26): p. 3843-55.

58. Orr, G., et al., *Syndecan-1 mediates the coupling of positively charged submicrometer amorphous silica particles with actin filaments across the alveolar epithelial cell membrane.* Toxicol Appl Pharmacol, 2009. **236**(2): p. 210-20.

59. Zhang, H., et al., *Differential expression of syndecan-1 mediates cationic nanoparticle toxicity in undifferentiated versus differentiated normal human bronchial epithelial cells.* ACS Nano, 2011. **5**(4): p. 2756-69.

60. Mislick, K.A. and J.D. Baldeschwieler, *Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(22): p. 12349-54.

61. Huang, M., et al., *Uptake of FITC-chitosan nanoparticles by A549 cells.* Pharm Res, 2002. **19**(10): p. 1488-94.

62. Tahara, K., et al., *Hybrid-modified poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres for a novel cellular drug delivery system.* Int J Pharm, 2010. **392**(1-2): p. 311-3.

63. Brandenberger, C., et al., *Quantitative evaluation of cellular uptake and trafficking of plain and polyethylene glycol-coated gold nanoparticles.* Small, 2010. **6**(15): p. 1669-78.

64. Liu, K.K., et al., *Endocytic carboxylated nanodiamond for the labeling and tracking of cell division and differentiation in cancer and stem cells.* Biomaterials, 2009. **30**(26): p. 4249-59.

65. Meier, O., et al., *Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake.* J Cell Biol, 2002. **158**(6): p. 1119-31.

66. Kim, A.J., et al., *Non-degradative intracellular trafficking of highly compacted polymeric DNA nanoparticles.* J Control Release, 2011.

67. Franca, A., et al., *Macrophage scavenger receptor A mediates the uptake of gold colloids by macrophages in vitro.* Nanomedicine (Lond), 2011. **6**(7): p. 1175-88.

68. Nemmar, A., et al., *Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans.* Circulation, 2002. **105**(4): p. 411-4.

69. Yacobi, N.R., et al., *Polystyrene nanoparticle trafficking across alveolar epithelium.* Nanomedicine, 2008. **4**(2): p. 139-45.

70. Choi, H.S., et al., *Rapid translocation of nanoparticles from the lung airspaces to the body.* Nat Biotechnol, 2010. **28**(12): p. 1300-3.

71. Cremaschi, D., C. Porta, and R. Ghirardelli, *Different kinds of polypeptides and polypeptide-coated nanoparticles are accepted by the selective transcytosis shown in the rabbit nasal mucosa.* Biochim Biophys Acta, 1999. **1416**(1-2): p. 31-8.

72. Almeida, A.J. and E. Souto, *Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins.* Adv Drug Deliv Rev, 2007. **59**(6): p. 478-90.

73. Tan, M.L., P.F. Choong, and C.R. Dass, *Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery.* Peptides, 2010. **31**(1): p. 184-93.

74. Illum, L., *Nanoparticulate systems for nasal delivery of drugs: a real improvement over simple systems?* J Pharm Sci, 2007. **96**(3): p. 473-83.

75. Husain, Q., et al., *Immobilization of Aspergillus oryzae beta galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism.* Int J Biol Macromol, 2011. **49**(1): p. 37-43.

76. Ayame, H., N. Morimoto, and K. Akiyoshi, *Self-assembled cationic nanogels for intracellular protein delivery.* Bioconjug Chem, 2008. **19**(4): p. 882-90.

77. Vila, A., et al., *Design of biodegradable particles for protein delivery.* J Control Release, 2002. **78**(1-3): p. 15-24.

78. Takeuchi, H., H. Yamamoto, and Y. Kawashima, *Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery.* Adv Drug Deliv Rev, 2001. **47**(1): p. 39-54.

79. Kawashima, Y., et al., *Mucoadhesive DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres coated with chitosan to improve oral delivery of elcatonin.* Pharm Dev Technol, 2000. **5**(1): p. 77-85.

80. Henkin, R.I., *Inhaled insulin-intrapulmonary, intranasal, and other routes of administration: mechanisms of action.* Nutrition, 2010. **26**(1): p. 33-9.

81. Henkin, R.I., *Intranasal insulin: from nose to brain.* Nutrition, 2010. **26**(6): p. 624-33.

82. Klingler, C., B.W. Muller, and H. Steckel, *Insulin-micro- and nanoparticles for pulmonary delivery.* Int J Pharm, 2009. **377**(1-2): p. 173-9.

83. Siekmeier, R. and G. Scheuch, *Inhaled insulin--does it become reality?* J Physiol Pharmacol, 2008. **59 Suppl 6**: p. 81-113.

84. Brain, J.D., *Inhalation, deposition, and fate of insulin and other therapeutic proteins.* Diabetes Technol Ther, 2007. **9 Suppl 1**: p. S4-S15.

85. Duan, X. and S. Mao, *New strategies to improve the intranasal absorption of insulin.* Drug Discov Today, 2010. **15**(11-12): p. 416-27.

86. Zhang, X., et al., *Nasal absorption enhancement of insulin using PEG-grafted chitosan nanoparticles.* Eur J Pharm Biopharm, 2008. **68**(3): p. 526-34.

87. Fernandez-Urrusuno, R., et al., *Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles.* Pharm Res, 1999. **16**(10): p. 1576-81.

88. Al-Qadi, S., et al., *Microencapsulated chitosan nanoparticles for pulmonary protein delivery: In vivo evaluation of insulin-loaded formulations.* J Control Release, 2011.

89. Jain, A.K., et al., *Muco-adhesive multivesicular liposomes as an effective carrier for transmucosal insulin delivery.* J Drug Target, 2007. **15**(6): p. 417-27.

90. Sintov, A.C., H.V. Levy, and S. Botner, *Systemic delivery of insulin via the nasal route using a new microemulsion system: In vitro and in vivo studies.* J Control Release, 2010. **148**(2): p. 168-76.

91. Khafagy el, S., et al., *Effect of cell-penetrating peptides on the nasal absorption of insulin.* J Control Release, 2009. **133**(2): p. 103-8.

92. Chen, M., et al., *Improved absorption of salmon calcitonin by ultraflexible liposomes through intranasal delivery.* Peptides, 2009. **30**(7): p. 1288-95.

93. Law, S.L., et al., *Enhancement of nasal absorption of calcitonin loaded in liposomes.* J Liposome Res, 2001. **11**(2-3): p. 165-74.

94. Morimoto, K., et al., *Evaluation of gelatin microspheres for nasal and intramuscular administrations of salmon calcitonin.* Eur J Pharm Sci, 2001. **13**(2): p. 179-85.

95. Makhlof, A., et al., *Nanoparticles of glycol chitosan and its thiolated derivative significantly improved the pulmonary delivery of calcitonin.* Int J Pharm, 2010. **397**(1-2): p. 92-5.

96. Illum, L., et al., *Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines.* Adv Drug Deliv Rev, 2001. **51**(1-3): p. 81-96.

97. Slutter, B., et al., *Nasal vaccination with N-trimethyl chitosan and PLGA based nanoparticles: nanoparticle characteristics determine quality and strength of the antibody response in mice against the encapsulated antigen.* Vaccine, 2010. **28**(38): p. 6282-91.

98. Neutra, M.R. and P.A. Kozlowski, *Mucosal vaccines: the promise and the challenge.* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(2): p. 148-58.

99. Ninomiya, A., et al., *Intranasal administration of a synthetic peptide vaccine encapsulated in liposome together with an anti-CD40 antibody induces protective immunity against influenza A virus in mice.* Vaccine, 2002. **20**(25-26): p. 3123-9.

100. Bradney, C.P., et al., *Cytokines as adjuvants for the induction of anti-human immunodeficiency virus peptide immunoglobulin G (IgG) and IgA antibodies in serum and mucosal secretions after nasal immunization.* J Virol, 2002. **76**(2): p. 517-24.

101. Sakaue, G., et al., *HIV mucosal vaccine: nasal immunization with gp160-encapsulated hemagglutinating virus of Japan-liposome induces antigen-specific CTLs and neutralizing antibody responses.* J Immunol, 2003. **170**(1): p. 495-502.

102. Bermudez-Humaran, L.G., et al., *An inducible surface presentation system improves cellular immunity against human papillomavirus type 16 E7 antigen in mice after nasal administration with recombinant lactococci.* J Med Microbiol, 2004. **53**(Pt 5): p. 427-33.

103. Prieur, E., et al., *Combination of human cytomegalovirus recombinant immediate-early protein (IE1) with 80 nm cationic biovectors: protection from proteolysis and potentiation of presentation to CD4+ T-cell clones in vitro.* Vaccine, 1996. **14**(6): p. 511-20.

104. Csaba, N., M. Garcia-Fuentes, and M.J. Alonso, *Nanoparticles for nasal vaccination.* Adv Drug Deliv Rev, 2009. **61**(2): p. 140-57.

105. Amidi, M., et al., *N-trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles loaded with influenza subunit antigen for intranasal vaccination: biological properties and immunogenicity in a mouse model.* Vaccine, 2007. **25**(1): p. 144-53.

106. Keijzer, C., et al., *PLGA, PLGA-TMC and TMC-TPP nanoparticles differentially modulate the outcome of nasal vaccination by inducing tolerance or enhancing humoral immunity.* PLoS One, 2011. **6**(11): p. e26684.

107. Rajapaksa, T.E., et al., *Claudin 4-targeted protein incorporated into PLGA nanoparticles can mediate M cell targeted delivery.* J Control Release, 2010. **142**(2): p. 196-205.

108. Stano, A., et al., *PPS nanoparticles as versatile delivery system to induce systemic and broad mucosal immunity after intranasal administration.* Vaccine, 2011. **29**(4): p. 804-12.

109. Slutter, B., et al., *Antigen-adjuvant nanoconjugates for nasal vaccination: an improvement over the use of nanoparticles?* Mol Pharm, 2010. **7**(6): p. 2207-15.

110. Akagi, T., et al., *Protein direct delivery to dendritic cells using nanoparticles based on amphiphilic poly(amino acid) derivatives.* Biomaterials, 2007. **28**(23): p. 3427-36.

111. Irache, J.M., et al., *Mannose-targeted systems for the delivery of therapeutics.* Expert Opin Drug Deliv, 2008. **5**(6): p. 703-24.

112. Tai, W., et al., *Multistrain influenza protection induced by a nanoparticulate mucosal immunotherapeutic.* Mucosal Immunol, 2011. **4**(2): p. 197-207.

113. von Hoegen, P., *Synthetic biomimetic supra molecular Biovector (SMBV) particles for nasal vaccine delivery.* Adv Drug Deliv Rev, 2001. **51**(1-3): p. 113-25.

114. Debin, A., et al., *Intranasal immunization with recombinant antigens associated with new cationic particles induces strong mucosal as well as systemic antibody and CTL responses.* Vaccine, 2002. **20**(21-22): p. 2752-63.

115. Baudner, B.C., et al., *Enhancement of protective efficacy following intranasal immunization with vaccine plus a nontoxic LTK63 mutant delivered with nanoparticles.* Infect Immun, 2002. **70**(9): p. 4785-90.

116. Gupta, N.K., et al., *Development and characterization of chitosan coated poly-(varepsilon-caprolactone) nanoparticulate system for effective immunization against influenza.* Vaccine, 2011. **29**(48): p. 9026-37.

117. Andersen, P. and T.M. Doherty, *The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine.* Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(8): p. 656-62.

118. Dantas, O.M., et al., *A case-control study of protection against tuberculosis by BCG revaccination in Recife, Brazil.* Int J Tuberc Lung Dis, 2006. **10**(5): p. 536-41.

119. Kaufmann, S.H., *Is the development of a new tuberculosis vaccine possible?* Nat Med, 2000. **6**(9): p. 955-60.

120. Shegokar, R., L. Al Shaal, and K. Mitri, *Present status of nanoparticle research for treatment of tuberculosis.* J Pharm Pharm Sci, 2011. **14**(1): p. 100-16.

121. Carpenter, Z.K., E.D. Williamson, and J.E. Eyles, *Mucosal delivery of microparticle encapsulated ESAT-6 induces robust cell-mediated responses in the lung milieu.* J Control Release, 2005. **104**(1): p. 67-77.

122. Griffiths, G., et al., *Nanobead-based interventions for the treatment and prevention of tuberculosis.* Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(11): p. 827-34.

123. Venkataprasad, N., et al., *Induction of cellular immunity to a mycobacterial antigen adsorbed on lamellar particles of lactide polymers.* Vaccine, 1999. **17**(15-16): p. 1814-9.

124. Ballester, M., et al., *Nanoparticle conjugation and pulmonary delivery enhance the protective efficacy of Ag85B and CpG against tuberculosis.* Vaccine, 2011. **29**(40): p. 6959-66.

125. Lamalle-Bernard, D., et al., *Coadsorption of HIV-1 p24 and gp120 proteins to surfactant-free anionic PLA nanoparticles preserves antigenicity and immunogenicity.* J Control Release, 2006. **115**(1): p. 57-67.

126. Miyake, A., et al., *Induction of HIV-specific antibody response and protection against vaginal SHIV transmission by intranasal immunization with inactivated SHIV-capturing nanospheres in macaques.* J Med Virol, 2004. **73**(3): p. 368-77.

127. Yokoyama, T., et al., *EGFR-targeted hybrid plasmonic magnetic nanoparticles synergistically induce autophagy and apoptosis in non-small cell lung cancer cells.* PLoS One, 2011. **6**(11): p. e25507.

128. Harding, J. and B. Burtness, *Cetuximab: an epidermal growth factor receptor chemeric human-murine monoclonal antibody.* Drugs Today (Barc), 2005. **41**(2): p. 107-27.

129. Liu, D., et al., *Specific targeting of nasopharyngeal carcinoma cell line CNE1 by C225-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles with magnetic resonance imaging.* Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2011. **43**(4): p. 301-6.

130. Lee, J., et al., *Characterization and cancer cell specific binding properties of anti-EGFR antibody conjugated quantum dots.* Bioconjug Chem, 2010. **21**(5): p. 940-6.

131. Ho, J.A., et al., *Diagnostic detection of human lung cancer-associated antigen using a gold nanoparticle-based electrochemical immunosensor.* Anal Chem, 2010. **82**(14): p. 5944-50.

132. Chanda, N., et al., *Bombesin functionalized gold nanoparticles show in vitro and in vivo cancer receptor specificity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(19): p. 8760-5.

133. Debotton, N., et al., *A quantitative evaluation of the molecular binding affinity between a monoclonal antibody conjugated to a nanoparticle and an antigen by surface plasmon resonance.* Eur J Pharm Biopharm, 2010. **74**(2): p. 148-56.

134. El mir, S., et al., *A combination of interleukin-2 and 60 nm cationic supramolecular biovectors for the treatment of established tumours by subcutaneous or intranasal administration.* Eur J Cancer, 2001. **37**(8): p. 1053-60.

135. Peng, X.H., et al., *Targeted Delivery of Cisplatin to Lung Cancer Using ScFvEGFR-Heparin-Cisplatin Nanoparticles.* ACS Nano, 2011. **5**(12): p. 9480-93.

136. Matsuo, K., et al., *Intranasal immunization with poly(gamma-glutamic acid) nanoparticles entrapping antigenic proteins can induce potent tumor immunity.* J Control Release, 2011. **152**(2): p. 310-6.

137. Dhuria, S.V., L.R. Hanson, and W.H. Frey, 2nd, *Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations.* J Pharm Sci, 2010. **99**(4): p. 1654-73.

138. Malerba, F., et al., *Intranasal delivery of therapeutic proteins for neurological diseases.* Expert Opin Drug Deliv, 2011. **8**(10): p. 1277-96.

139. Thorne, R.G., et al., *Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration.* Neuroscience, 2004. **127**(2): p. 481-96.

140. Di Colo, G., Y. Zambito, and C. Zaino, *Polymeric enhancers of mucosal epithelia permeability: synthesis, transepithelial penetration-enhancing properties, mechanism of action, safety issues.* J Pharm Sci, 2008. **97**(5): p. 1652-80.

141. Vaka, S.R., et al., *Delivery of nerve growth factor to brain via intranasal administration and enhancement of brain uptake.* J Pharm Sci, 2009. **98**(10): p. 3640-6.

142. Wang, X., et al., *Evaluation of brain-targeting for the nasal delivery of estradiol by the microdialysis method.* Int J Pharm, 2006. **317**(1): p. 40-6.

143. Liu, Q., et al., *Nose-to-Brain Transport Pathways of Wheat Germ Agglutinin Conjugated PEG-PLA Nanoparticles.* Pharm Res, 2011.

144. Chen, J., et al., *Solanum tuberosum lectin-conjugated PLGA nanoparticles for nose-to-brain delivery: in vivo and in vitro evaluations.* J Drug Target, 2012. **20**(2): p. 174-84.

145. Gao, X., et al., *Brain delivery of vasoactive intestinal peptide enhanced with the nanoparticles conjugated with wheat germ agglutinin following intranasal administration.* J Control Release, 2007. **121**(3): p. 156-67.

146. Ruan, Y., et al., *Nanoparticle-mediated delivery of neurotoxin-II to the brain with intranasal administration: an effective strategy to improve antinociceptive activity of neurotoxin.* Drug Dev Ind Pharm, 2012. **38**(1): p. 123-8.

147. Veronesi, M.C., et al., *Thyrotropin-releasing hormone d,l polylactide nanoparticles (TRH-NPs) protect against glutamate toxicity in vitro and kindling development in vivo.* Brain Res, 2009. **1303**: p. 151-60.

148. Hesterberg, T.W., et al., *Diesel exhaust particulate (DEP) and nanoparticle exposures: what do DEP human clinical studies tell us about potential human health hazards of nanoparticles?* Inhal Toxicol, 2010. **22**(8): p. 679-94.

149. Nielsen, G.D., et al., *In vivo biology and toxicology of fullerenes and their derivatives.* Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2008. **103**(3): p. 197-208.

150. Park, E.J., et al., *Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells.* Toxicol Lett, 2008. **180**(3): p. 222-9.

151. Wang, Y.F., et al., *Size distributions and exposure concentrations of nanoparticles associated with the emissions of oil mists from fastener manufacturing processes.* J Hazard Mater, 2011. **198**: p. 182-7.

152. Mura, S., et al., *Influence of surface charge on the potential toxicity of PLGA nanoparticles towards Calu-3 cells.* Int J Nanomedicine, 2011. **6**: p. 2591-605.

153. Merhi, M., et al., *Study of serum interaction with a cationic nanoparticle: Implications for in vitro endocytosis, cytotoxicity and genotoxicity.* Int J Pharm, 2011. **423**(1): p. 37-44.

154. Hardy, C.L., et al., *Inert 50-nm Polystyrene Nanoparticles That Modify Pulmonary Dendritic Cell Function and Inhibit Allergic Airway Inflammation.* J Immunol, 2012. **188**(3): p. 1431-41.

PARTIE III

RESULTATS

CHAPITRE 1

ETUDES DES MECANISMES D'ENDOCYTOSE

Présentation de l'étude

Comprendre l'interaction des nanoparticules avec les cellules épithéliales respiratoires est une étape importante pour évaluer leur potentiel comme vecteurs de molécules d'intérêt dans les voies respiratoires. Dans ce chapitre, nous avons étudié les mécanismes impliqués dans l'endocytose des nanoparticules NP^+ par les cellules épithéliales bronchiques humaines (lignée 16HBE14o- ou 16HBE). Nous avons déterminé leur cinétique d'entrée et les voies d'endocytose empruntées. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'exocytose de ces NP^+, en décrivant les mécanismes impliqués.

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication parue en 2010 dans le journal Nanotechnology (Dombu et al, 2010).

Characterization of endocytosis and exocytosis of cationic nanoparticles in airway epithelium cells

C. Dombu Youta[1], M. Kroubi[1], R. Zibouche[3], R. Matran[1], D. Betbeder[1,2,*]

[1] *EA 2689, IFR 114, laboratoire de physiologie, Faculté de médecine pôle recherche, Université de Lille 2, 1 place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France*

[2] *Université d'Artois, 9 rue du temple, 62030 Arras, France*

[3] *Université de Paris XIII, 93430 Villetaneuse, France*

[*] *Corresponding author*

E-mail: dbetbeder@aol.com

Abstract

A major challenge of drug delivery using colloids via the airway is to understand the mechanism implied in their interactions with epithelial cells. The purpose of this work was to characterize the process of endocytosis and exocytosis of cationic nanoparticles (NPs) made of maltodextrin which were developed as a delivery system for antigens in vaccine applications. Confocal microscopy demonstrated that these NP are rapidly endocytosed after as little as 3 minutes incubation, and that the endocytosis was also faster than NP binding since most of the NPs were found in the middle of the cells around the nuclei. A saturation limit was observed after 40 minutes incubation, probably due to an equilibrium becoming established between endocytosis and exocytosis. Endocytosis was dramatically reduced at 4°C compared with 37°C, or by NaN3 treatment, both results suggesting an energy dependent process. Protamine pretreatment of the cells inhibited NPs uptake and we found that clathrin pathway is implied in their endocytosis. Cholesterol depletion increased NP uptake by 300% and this phenomenon was explained by the fact that cholesterol depletion totally blocked NP exocytosis. These results suggest that these cationic NPs interact with anionic sites, are quickly endocytosed via the clathrin pathway and that their exocytosis was cholesterol dependent, and are similar to those obtained in other studies with viruses such as influenza.

Keywords: cationic nanoparticles, airway epithelium, maltodextrin, endocytosis, exocytosis

Introduction

Nasal or pulmonary administration of medicines for the delivery of drugs to the mucosal immune system or to the systemic circulation has developed into one of the most promising alternatives to oral or more invasive routes of administration. Although few modern medicines are delivered via the airway, this may be set to change as there is increasing interest in using the nose or the lung as a route of drug delivery. Airway drug delivery has many advantages over other methods, such as oral delivery or injection: the mouth, nose and lungs have high solute permeability, a large surface area for absorption, limited proteolytic activity and delivery is non-invasive [1, 2]. The airway epithelium represents the interface between the external environment and tissue of the airway wall. The epithelium contains ciliated columnar, mucus-secreting goblet and surfactant-secreting Clara cells, and forms a highly regulated and impermeable barrier through the formation of tight junctions. These cells have also a high metabolic activity. This physical and physiological barrier is a key obstacle to the delivery of macromolecular drugs [3]. However nanoparticles can escape to the mucus and interact strongly with epithelial cells [4]. This makes them good candidates as vectors to deliver drugs through or within epithelial cells. Nanoparticles can be used therapeutically as drug carriers, either by dissolving, entrapping or encapsulating the active substance (drug or biologically active material), or by adsorbing or attaching the active substance. Therapeutic polymeric nanoparticles are composed of biodegradable materials, for example synthetic polymers such as poly(lactide-*co*-glycolide) (PLGA) [5, 6]. Nanoparticles (NPs) have demonstrated their potential as vectors of both hydrophilic and lipophilic drugs including macromolecules [7]. The mechanisms of action of these nanoparticulate systems as vectors and delivery systems are nevertheless quite complex and remain poorly understood. Design strategies to enhance drug delivery at specific cellular organelles by taking advantage of the endocytotic pathways are still in the early stages of development. Recently, numerous studies have investigated the mechanisms and pathways involved in NPs endocytosis. They have been found to penetrate epithelial cells via different pathways, most commonly clathrins, caveolae and macropinocytosis [8]. These correlate with the proprieties of NPs which allow them to easily bind to cells' surface receptors and penetrate cells using specifics mechanisms [9].

In the present study we characterized the endocytosis and the exocytosis of a polysaccharide cationic nanoparticle on human bronchial epithelial cells. These NPs are porous and made of maltodextrin [10-12]. They have already been found to have potential for vaccine application after nasal and sub-lingual administration [13-16]. However, little is known concerning the interactions of these nanocarriers with airway epithelial cells.

Materials and methods

A. Materials

Maltodextrin was purchased from Roquette (Roquette, France), NaBH4 from Acros Organics. Epichlorhydrin (1-chloro-2, 3-epoxypropane), FITC (5-[4, 6-dichlorotriazin-2-yl] amino fluorescein, protamine sulfate, filipin-III, chlorpromazine, nystatin, sodium azide and phenylarsine oxide were purchased from Sigma Aldrich. TOPRO-3, GTMA (Glycidyl-trimethyl-ammonium chloride), DMEM culture medium, PBS (Phosphate buffered Saline), rat tail type I Collagen, calf foetal serum, Penicillin/Streptomycin antibiotics mixture and L-glutamine were purchased from Invitrogen. Krebs-Ringer buffer (KRB, 120 mM NaCl, 4.56 mM KCl, 0.246 mM $MgCl_2$, 1.5 mM NaH_2PO_4, 0.704 mM Na_2HPO_4, 1 mM $CaCl_2$, 25 mM $NaHCO_3$, 5.26 mM glucose, pH 7,4).

The Human bronchial epithelial cell line 16HBE14o- was obtained from Dr. Gruenert D.C. (Colchester, Vermont, USA).

B. Methods

Preparation and characterization of polysaccharides cationic nanoparticles from maltodextrins

Polysaccharide cationic nanoparticles (NP^+) were prepared from maltodextrin as described previously [11, 12]. Briefly, 100 g of maltodextrins were dissolved in 2N sodium hydroxide with magnetic stirring at room temperature. Addition to the crude mixture of epichlorhydrin and glycidyl-trimethyl-ammonium chloride (hydroxycholine, cationic ligand) yielded cationic polysaccharide gel. The gel was then neutralised with acetic acid and sheared under high pressure in a Minilab homogenizer (Rannie; APV Baker, Evreux, France). The 60 nm cationic polysaccharide NPs thus obtained were ultra-filtered on an SGI Hi-flow system (hollow fiber module: 30 UFIB/1 S.6/40 kDa; Setric Génie Industriel, Toulouse, France) to remove low-molecular weight reagents and salts. NP^+ labeling was achieved by covalently binding fluorescein isothiocyanate to the polysaccharide core [17]. These labelled particles were washed and purified by ultra-filtration on an SGI Hi-flow system (30UFIB/1S.6/40 kDa) with 1M NaCl and with demineralized water until no free marker was detected in the ultra-filtrate. The labelled polysaccharide particles (1 mg/ml) were stored in sterile tubes after

filtration through a 0.2 µm filter. The mean diameter of NP^+ was determined by laser light scattering with the N4 MD Coulter nanoparticle analyzer (Coultronics, Margency, France). The zeta-potential of nanoparticles were determined by photon correlation spectroscopy (ZetaSizer II, Malvern Instruments) in 15mM NaCl.

Cell culture

16HBE14o- cells (passages 11-25) were grown on 8 well glass chamber slides (Lab-Tek® II) at a density of 2.10^5 cells per well. Chamber slides were previously coated with a mixture of collagen and fibronectin (ratio 4:1) before cell seeding. Cells were incubated for 3 days at 37°C in 5% CO2–95% air. The medium (DMEM, 10% FBS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 1 % L-glutamine) was renewed every 2 days.

Uptake studies

In order to determine uptake kinetics of nanoparticles, confluent 16HBE14o- cells were washed twice with Krebs-Ringer buffer, incubated at 37°C with 10 µg of NP^+ (NP^+ were diluted in 0.4 ml of Krebs-Ringer buffer in all experiments) for specified times, then washed twice with Krebs-Ringer buffer. Cells were fixed for 10 minutes at room temperature with 200 µl of 4% para-formaldehyde (PAF), washed twice and incubated for 20 minutes with 80 µL of TOPRO-3 ($1/1000^e$ diluted in PBS) for nuclei labelling. The slides and their attached monolayer cells were mounted on glass microscope slides with glycerol. NP internalized in cells were quantified by measuring fluorescence intensities from pictures, after fluorescence confocal microscopy.

Binding studies

Cells were pre-incubated for 5 min at 37°C with 100 µg of protamine sulphate diluted in Krebs-Ringer buffer; 10 µg of NP^+ were then added and cells were incubated again for 30 min. Cells were then washed twice with Krebs-Ringer buffer and fixed for 10 minutes at room temperature with 200 µl of 4% PAF, washed twice and the cells were mounted on glass microscope slides with glycerol. NP adsorption was quantified by fluorescence confocal microscopy.

Treatment with endocytosis inhibitors

Cells were pre-incubated for 20 min at 37°C with various endocytosis inhibitors diluted in Krebs-Ringer buffer: filipin (25 µg/ml), chlorpromazine (12.5 µg/ml), nystatin (25 µg/ml), phenylarsine oxide (25 µg/ml), and sodium azide (150 µg/ml). 10 µg of NP^+ were added and cells were incubated again for 30 minutes. NP endocytosis was measured by fluorescence confocal microscopy.

Exocytosis study

Cells were incubated for 30 min at 37°C with 10 µg of NP^+, washed twice and incubated with 0.4 ml of Krebs-Ringer buffer for specified times. The Krebs-Ringer buffer was replaced every 30 minutes. NP^+ were quantified in cells by fluorescence confocal microscopy.

Fluorescence microscopy and data analysis

Cells were mounted on glass microscope slides with glycerol and photographed under a fluorescence confocal microscope (Leica, Wetzlar, Germany). Each analysis was made on at least 100 cells, experiments were performed in quadruplet and four images of each condition were analysed. Confocal microscopy optical slice sections of 2.5µm were made from the luminal to the basal pole of the cells. In each section NPs and nuclei fluorescence were quantified using Sigma Scan Pro 5 (Systat software, Inc.). Statistical analyses were performed using a one-way analysis of variance (ANOVA), and *P* from Student's tests were considered significant for each $P < 0.05$. Calculations were performed using the statistical software program GraphPad Prism 5 (GraphPad Softwares).

Results

Physico-chemical characterization of nanoparticles

The mean particle size of maltodextrin NPs was 60 ± 13 nm (PDI= 0.22) with zeta potential + 25 ± 1.1 mV (Table 1). In order to track the nanoparticles within the cells they were covalently labeled with fluorescein, free fluorescein being removed from fluorescein-labeled NP nanoparticles via ultra-filtration. No fluorescein was released from the nanoparticles even after 12 months storage as assessed by nanosep filtration (data not shown). The NPs prepared in this way can be kept in solution after filtration on a 0.2 µm filter for at least 12 months without any aggregation.

Nanoparticle uptake by epithelial cells

Confocal microscopy was used to observe the kinetics of intracellular distribution of the internalized nanoparticles (Figure1 and Figure2). After incubation with NPs the fluorescence inside the cells increased progressively from 3 to 30 min before reaching a plateau (Figure1 B). Fluorescence intensity of cells treated with NPs for 60 min was much higher than that of cells treated for 3 min, which was consistent with increased cellular uptake (Figure1 and Figure2). Human airway epithelial cells are a pseudo-stratified epithelium and the nuclei of the cells are not exactly at the same level. In order to obtain a statistic overview of the intracellular delivery of NPs within the cells the nuclei were stained with TOPRO-3. We analyzed cells using confocal microscopy optical slice sections of 2.5 µm from the luminal to the basal pole of the cells, in each section NP and nuclei fluorescence was quantified. We observed that after only 3 min incubation the nanoparticles were present inside the cells (around the nuclei) and only a small amount was found on the luminal phase of the cells, strongly suggesting that NP endocytosis is faster than NP binding. After 30 and 120 min incubation no change in particle cellular distribution was observed and was similar to 3 min incubation while the amount of NP internalized increased up to a plateau at 30 minutes (Figure2).

NP entry

In Figure3 the results for the intra-cellular distribution of NP uptake at 4°C and 37°C are shown. Indeed, a dramatic change in NP intra-cellular was observed: experiments performed at 4°C , contrary to observations at 37°C, showed that NP were mainly found on the luminal part of the cells (probably bound to plasma membrane). Moreover, treatment with NaN_3 (a mitochondrial activity inhibitor) strongly inhibits NP endocytosis (Figure4); all these results taken together suggest that NP enter the cells via endocytosis. Treatment of the cells with protamine also inhibits NP endocytosis, suggesting that anionic sites are involved [17].

NP endocytosis pathway

In order to determine the mechanisms implied, cells were treated with various endocytosis inhibitors and the amount of NP endocytosed after 30 min incubation was quantified using SigmaScan pro 5 software (Figure5). We observe that clathrin inhibitors such as chlorpromazine or phenyl arsene oxide [18] significantly inhibit NP endocytosis, while caveolae inhibitors such as filipin or nystatin treatment greatly increased the NP endocytosis. These results suggest that NP endocytosis is mediated by the clathrin pathway while cholesterol depletion, via an unknown mechanism, increases NP uptake.

NP exocytosis

Cells were first pre-incubated for 30 min with NP then the luminal phase was regularly replaced by fresh medium. The amount of NP endocytosed was quantified in comparison to cells were the medium was not replaced (Figure6). In these conditions we observe that the amount of NP in the cells was dramatically reduced confirming that NP are highly exocytosed. In order to determine if cholesterol depletion might impair NP exocytosis, cells were treated with filipin after pre-incubation with NPs and the medium was regularly replaced. This treatment totally blocked the exocytosis (Figure6).

Discussion and conclusion

Discussion

Drug delivery via the airway epithelium using nanoparticles is a promising field of research [19]. In this study we used maltodextrin NPs which showed potential as an antigen delivery system via the airways. After nasal administration they were found to induce both mucosal, humoral and cellular immune responses against the associated antigens [13-15], or to efficiently deliver IL2 stimulating T-cells rejection of implanted tumors [20]. However, the mechanisms involved in NP epithelial cells interaction allowing are still unknown. Our aim was to study the dynamics of NP endocytosis and exocytosis in order to understand how these particles interact with the cells. These studies are a prerequisite to defining improved vectors for the delivery of drugs via the airway epithelium. In this study data clearly show that the endocytosis of these cationic NPs is very fast and occurs only after 3 minutes of incubation (Figure2). Moreover, we observed that only a small amount of nanoparticles was found on the luminal phase suggesting that NP endocytosis was faster than NP binding. This finding is consistent with what has already been observed with viral particles such as influenza, SFV and vesicular stomatitis virus using transmission electron microscopy [21-23]. After binding to membrane receptors, viruses use either the clathrin and/or the caveolae pathways to enter the cells. Therefore a strong similarity between viral NP and synthetic NP is observed. Among the possible endocytosis pathways, the most commonly used is the clathrin-mediated endocytosis route. It transports incoming viruses together with their receptors into early and late endosomes. Clathrin-mediated endocytosis is a continuous process, and, for virus entry, it is usually rapid and efficient [8]. Polycationic vectors represent important classes of carriers for the entry and delivery of drugs in the cells. They are generally found to be internalized via adsorption mediated endocytosis after binding to cell membrane anionic sites such as glycosaminoglycans or asialoglycoprotein receptors [24]. In order to determine if the endocytosis of these cationic nanoparticles was mediated via anionic interactions cells were treated with protamine [25]. Protamine is known to inhibit adsorptive mediated endocytosis by suppressing the anionic cell-surface charge [26]. Pretreatment of the cells with protamine strongly inhibited NP endocytosis in this study (Figure5), suggesting that NP binding to anionic sites is a prerequisite before inducing their endocytosis. Indeed, airway epithelia are rich in anionic sites such as

proteoglycans and these receptors are generally targeted by virus to allow their endocytosis [27]. When the cells are treated at 4°C we observed a large amount of NP on the luminal phase of the cells and it was difficult to conclude that there is no particle uptake (Figure3). In fact these cells are ciliated and the adsorption of the NP was found on a large area (probably due to cilium binding) and as the slices of the cells start from the luminal phase the first slices include mainly the cilium area: on the other hand, experiments performed at 37°C showed that most of the NP are endocytosed and found mainly in areas around the nuclei (Figs. 1 and 2). Furthermore, the partial decrease of nanoparticle uptake observed after energy depletion (NaN3 treatment) suggests an endocytotic uptake process [28]. Nanoparticle endocytosis reached a plateau after 40 minutes incubation (Figure1B), a result which could be explained by an equilibrium being reached between endocytosis and exocytosis as this equilibrium was displaced when the cellular medium of the luminal phase was discarded (Figure6). In contrast, Carteria et al. [29] found that for 95 nm PLGA NP no saturation limit was reached in human bronchial respiratory epithelial cells even after 24h, though as these NP are anionic their endo/exocytosis pathways may differ from our study. In another study in vascular smooth muscle cells, Panyam et al. 2003 [6] showed that PLGA NP were quickly endocytosed and exocytosed. These results show that endo and exocytosis is dependent on the type of cells used. In our study increased endocytosis was observed after cholesterol depletion (Figure4). This finding could be due to at least two mechanisms: (i) caveolae disruption, by cholesterol depletion, could increase NP uptake via clathrin pathway by compensation, or; (ii) cholesterol could be implied in NP exocytosis. To attempt to resolve this question we analyzed NP exocytosis. Filipin treatment of cells pretreated with NP clearly demonstrated that cholesterol was implied in their exocytosis (Figure6). Exocytosis allows fluid-filled vesicles to fuse with the plasma membrane and to release their content into the extracellular milieu. Lipid rafts and more particularly cholesterol are involved in the regulation of exocytosis [30]. Chintigary et al. [31] have shown that cholesterol was implied, via the lipid rafts, to exocytose surfactant in alveolar type II epithelial cells. Further studies are planned to fully characterize their exocytosis process to see whether or not caveolae or lipid rafts or other cholesterol dependent mechanism are involved. Cholesterol depletion may have pleiotropic effects on membrane structure, more particularly on lipid rafts and caveolae that affect cellular function. We observed that filipin or

nystatin treatment induced a more than 2 fold increase in endocytosis (Figure4). This increase suggests that the blockage of NP exocytosis favors accumulation in the cells underlining the importance of exocytosis in regulating NP loading and potential toxicity. The toxicity (cyto and genotoxicty) of these nanoparticles was evaluated in the presence and absence of serum and no toxicity was found even at the highest dose tested (manuscript in preparation). This result might be due to the high level of exocytosis which regulates nanoparticle loading. Uptake of particulate systems could occur using different processes such as by phagocytosis, fluid phase pinocytosis, receptor mediated endocytosis (RME) or adsorptive mediated endocytosis (AME) [8]. Phagocytosis is the main process involved in microparticulate systems endocytosis by phagocytic cells such as macrophages [32], but epithelial cells are not known to use this pathway. Receptor mediated endocytosis (RME) is mediated either via the clathrin or caveolae pathway after binding of the ligand to its receptor [33, 34]. RME has already been described in airway epithelial cells [35, 36], while adsorptive mediated endocytosis is the general pathway of entry for cationic macromolecules [37, 38]. Clathrin inhibitors strongly reduced NP endocytosis by up to 40% in our study (Figure5), suggesting that this pathway is involved. Clathrin-mediated endocytosis was also found to be involved in the uptake of influenza virus, the polyomavirus JC virus and the picornavirus parechovirus type 1 [39]. In our study chlorpromazine and phenylarsine oxide treatment inhibited NP entry suggesting clathrin-pathway entry. Moreover, protamine also inhibits their endocytosis. These results suggest that binding of the nanoparticles to anionic sites is a prerequisite to allow endocytosis via the clathrin pathway. The airway epithelium is a complex physicochemical barrier that plays a pivotal role in host defense. It is perhaps not surprising therefore that these cells, which come into contact with airborne nanoparticles, reject those nanoparticles which are endocytosed and exocytosed to avoid nanoparticle accumulation inside the cells.

Conclusion

This study shows that the polysaccharide cationic NPs quickly interact with airway epithelial cells via anionic surface receptors before rapid endocytosis via the clathrin pathway and subsequent exocytosis via a cholesterol dependent pathway. They were found to mimic virus endocytosis such as

influenza. The ability of the nanoparticles to deliver proteins within these cells is now under evaluation.

References

[1] Sakagami M. In vivo, in vitro and ex vivo models to assess pulmonary absorption and disposition of inhaled therapeutics for systemic delivery. Adv Drug Deliv Rev 2006; 58:1030- 1060.

[2] Azarmi S, Roa WH, Lobenberg R. Targeted delivery of nanoparticles for the treatment of lung diseases. Adv Drug Deliv Rev 2008; 60:863-875.

[3] Cone RA. Barrier properties of mucus. Adv Drug Deliv Rev 2009; 6:75-85.

[4] Lai SK, Wang YY, Hanes J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. Adv Drug Deliv Rev 2009; 61:158-171.

[5] Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V, Patel P, Aminabhavi TM. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. J Control Release 2008; 125:193-209.

[6] Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. Adv Drug Deliv Rev 2003; 55:329-347.

[7] Couvreur P, Vauthier C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. Pharm Res 2006; 23:1417-1450.

[8] Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. Cell Mol Life Sci 2009; 66:2873-2896.

[9] Nam HY, Kwon SM, Chung H, Lee SY, Kwon SH, Jeon H, et al. Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles. J Control Release 2009; 135:259-267.

[10] Loiseau PM, Imbertie L, Bories C, Betbeder D, De Miguel I. Design and antileishmanial activity of amphotericin B-loaded stable ionic amphiphile biovector formulations. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46:1597-1601.

[11] Major M, Prieur E, Tocanne JF, Betbeder D, Sautereau AM. Characterization and phase behaviour of phospholipid bilayers adsorbed on spherical polysaccharidic nanoparticles. Biochim Biophys Acta 1997; 1327:32-40.

[12] Paillard A, Passirani C, Saulnier P, Kroubi M, Garcion E, Benoit JP, et al. Positively-Charged, Porous, Polysaccharide Nanoparticles Loaded with Anionic Molecules Behave as 'Stealth' Cationic Nanocarriers. Pharm Res 2009; 27:126-133.

[13] Baudner BC, Balland O, Giuliani MM, Von Hoegen P, Rappuoli R, Betbeder D, et al. Enhancement of protective efficacy following intranasal immunization with vaccine plus a nontoxic LTK63 mutant delivered with nanoparticles. Infect Immun 2002; 70:4785-4790.

[14] Debin A, Kravtzoff R, Santiago JV, Cazales L, Sperandio S, Melber K, et al. Intranasal immunization with recombinant antigens associated with new cationic particles induces strong mucosal as well as systemic antibody and CTL responses. Vaccine 2002; 20:2752-2763.

[15] Razafindratsita A, Saint-Lu N, Mascarell L, Berjont N, Bardon T, Betbeder D, et al. Improvement of sublingual immunotherapy efficacy with a mucoadhesive allergen formulation. J Allergy Clin Immunol 2007; 120:278-285.

[16] Prieur E, Betbeder D, Niedergang F, Major M, Alcover A, Davignon JL, et al. Combination of human cytomegalovirus recombinant immediate-early protein (IE1) with 80 nm cationic biovectors: protection from proteolysis and potentiation of presentation to CD4+ T-cell clones in vitro. Vaccine 1996; 14:511-520.

[17] Forsten KE, Wang N, Robinson RM, Nugent MA. A simple assay for evaluating inhibitors of proteoglycan-ligand binding. Ann Biomed Eng 2000; 28:119-127.

[18] Sieczkarski SB, Whittaker GR. Dissecting virus entry via endocytosis. J Gen Virol 2002; 83:1535-1545.

[19] Sung JC, Pulliam BL, Edwards DA. Nanoparticles for drug delivery to the lungs. Trends Biotechnol 2007; 25:563-570.

[20] El mir S, Casanova A, Betbeder D, Triebel F. A combination of interleukin-2 and 60 nm cationic supramolecular biovectors for the treatment of established tumours by subcutaneous or intranasal administration. Eur J Cancer 2001; 37:1053-1060.

[21] Marsh M, Helenius A. Adsorptive endocytosis of Semliki Forest virus. J Mol Biol 1980; 142:439-454.

[22] Matlin KS, Reggio H, Helenius A, Simons K. Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. J Cell Biol 198; 91:601-613.

[23] White J, Matlin K, Helenius A. Cell fusion by Semliki Forest, influenza, and vesicular stomatitis viruses. J Cell Biol 1981; 89:674-679.

[24] Poon GM, Gariepy J. Cell-surface proteoglycans as molecular portals for cationic peptide and polymer entry into cells. Biochem Soc Trans 2007; 35:788-793.

[25] Sai Y, Kajita M, Tamai I, Wakama J, Wakamiya T, Tsuji A. Adsorptive-mediated endocytosis of a basic peptide in enterocyte-like Caco-2 cells. Am J Physiol 1998; 275:514-520.

[26] Sai Y, Kajita M, Tamai I, Kamata M, Wakama J, Wakamiya T, et al. Intestinal absorption of fluorescence-derivatized cationic peptide 001-C8-NBD via adsorptive-mediated transcytosis. Bioorg Med Chem 1998; 6:841-848.

[27] O'Donnell CD, Shukla D. The Importance of Heparan Sulfate in Herpesvirus Infection. Virol Sin 2008; 23:383-393.

[28] Torchilin VP, Rammohan R, Weissig V, Levchenko TS. TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98:8786-8791.

[29] Cartiera MS, Johnson KM, Rajendran V, Caplan MJ, Saltzman WM. The uptake and intracellular fate of PLGA nanoparticles in epithelial cells. Biomaterials 2009; 30:2790-2798.

[30] Salaun C, James DJ, Chamberlain LH. Lipid rafts and the regulation of exocytosis. Traffic 2004; 5:255-264.

[31] Chintagari NR, Jin N, Wang P, Narasaraju TA, Chen J, Liu L. Effect of cholesterol depletion on exocytosis of alveolar type II cells. Am J Respir Cell Mol Biol 2006; 34:677-687.

[32] Shan X, Liu C, Yuan Y, Xu F, Tao X, Sheng Y, et al. In vitro macrophage uptake and in vivo biodistribution of long-circulation nanoparticles with poly(ethylene-glycol)-modified PLA (BAB type) triblock copolymer. Colloids Surf B Biointerfaces 2009; 72:303-311.

[33] Feger J, Gil-Falgon S, Lamaze C. Cell receptors: definition, mechanisms and regulation of receptor-mediated endocytosis. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 1994; 40:1039-1061.

[34] Benmerah A, Lamaze C. Clathrin-coated pits: vive la difference? Traffic 2007; 8:970-982.

[35] Zheng Y, Cai Z, Song X, Yu B, Bi Y, Chen Q, et al. Receptor mediated gene delivery by folate conjugated N-trimethyl chitosan in vitro. Int J Pharm 2009; 382:262-269.

[36] Tahara K, Sakai T, Yamamoto H, Takeuchi H, Hirashima N, Kawashima Y. Improved cellular uptake of chitosan-modified PLGA nanospheres by A549 cells. Int J Pharm 2009;382:198-204.

[37] Hartig SM, Greene RR, Carlesso G, Higginbotham JN, Khan WN, Prokop A, et al. Kinetic analysis of nanoparticulate polyelectrolyte complex interactions with endothelial cells. Biomaterials 2007; 28:3843-3855.

[38] Console S, Marty C, Garcia-Echeverria C, Schwendener R, Ballmer-Hofer K. Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) "protein transduction domains" promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. J Biol Chem 2003; 78:35109-35114.

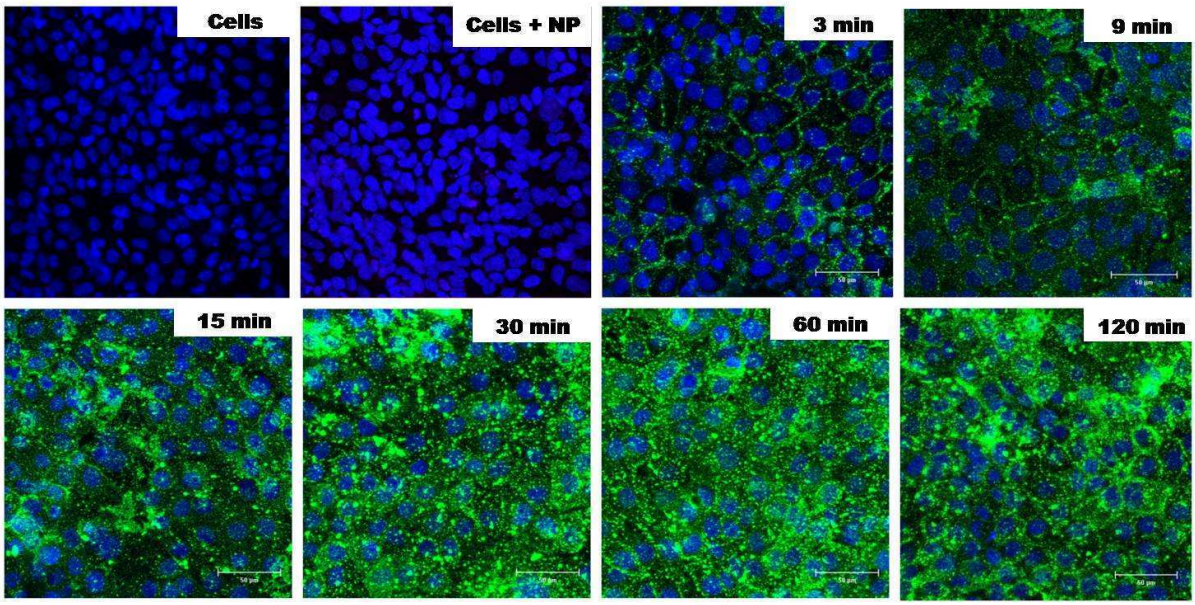
[39] Joki-Korpela P, Marjomaki V, Krogerus C, Heino J, Hyypia T. Entry of human parechovirus 1. J Virol 2001; 75:1958-1967.

Table 1

Size (Mean±S.D.)	PDI	Zeta potential	Structure	Fluorescent dye
60nm ± 13.1	0.22	+25 mV ± 1.5	Porous nanosphere	FITC

Figures

(a)


Cells
Cells + NP
3 min
9 min
15 min
30 min
60 min
120 min

(b)

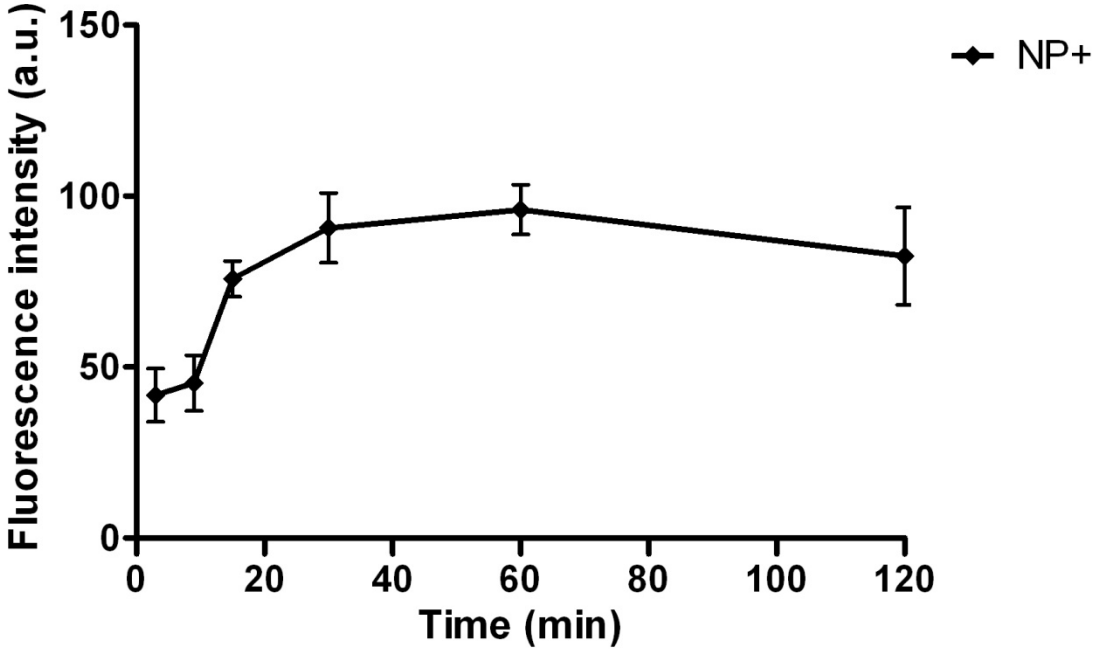

Fluorescence intensity (a.u.)
150
100
50
0
0
20
40
60
80
100
120
Time (min)
NP+

Figure 1. Uptake kinetic of NP+ in 16HBE cells visualized by confocal microscopy. Cells were incubated at 37°C with 10 µg of FITC labeled NP+, for 3, 9, 15, 30, 60 or 120 minutes, fixed with 4% PFA and nuclei were stained with TOPRO-3 (blue). Endocytosis in each condition was visualized by confocal microscopy (A). Scale bar = 50 µm. Amount of endocytosis was then quantified from pictures by measuring fluorescence intensities (B). Experiments were performed in quadruplet and error bars represent the standard deviation of measurements in each condition.

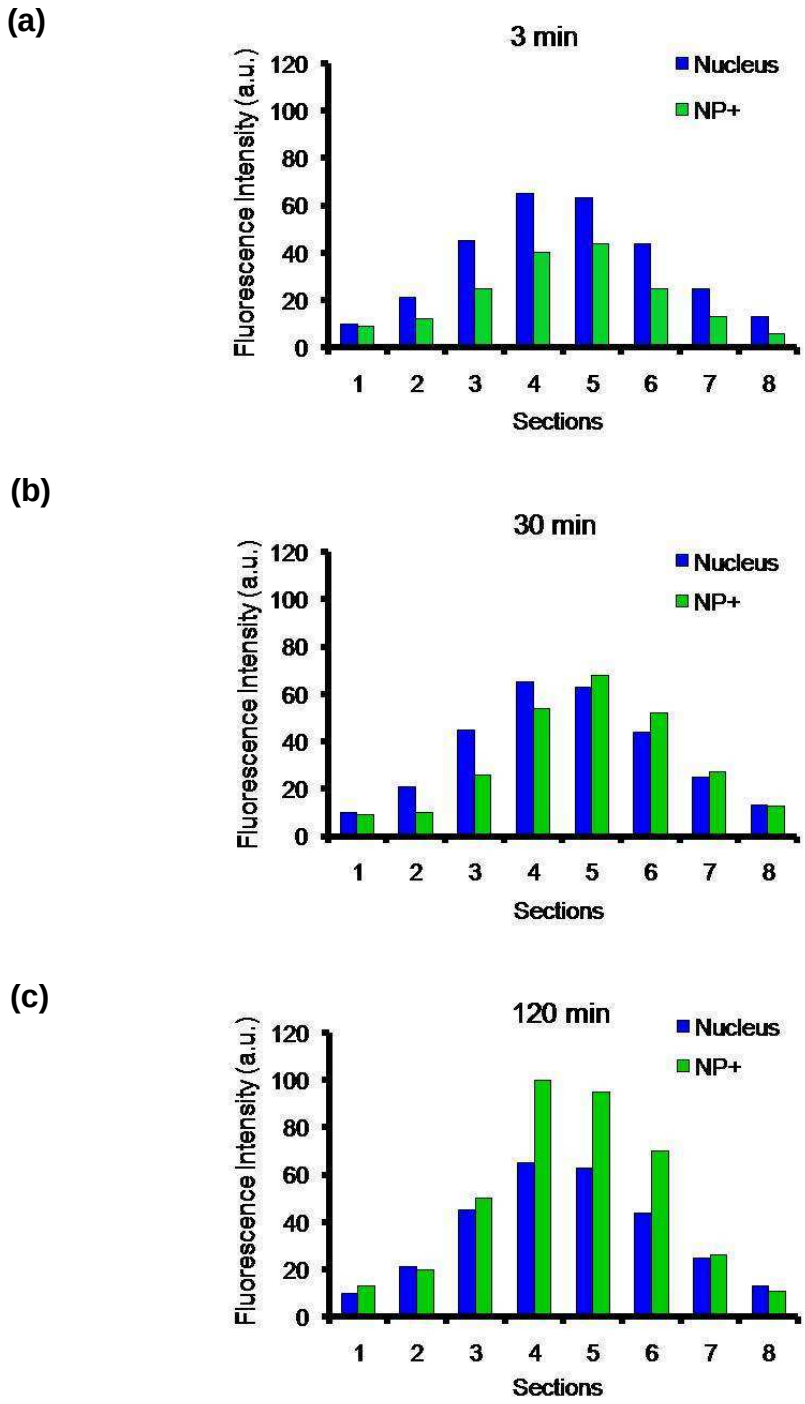


Figure 2. Confocal characterization of NP+ endocytosis in 16HBE cells. Cells were incubated at 37°C with 10 µg of FITC labeled NP+, for 3 (A), 30 (B), or 120 minutes (C), fixed with 4% PFA and nuclei were stained with TOPRO-3 (blue), before being visualized using confocal microscopy. Optical slice sections of 2.5µm from the luminal to the basal pole of the cells (1-8) were made and in each

section NP and nuclei fluorescence was quantified. Each analysis was made on at least 100 cells and is representative of 4 different experiments.

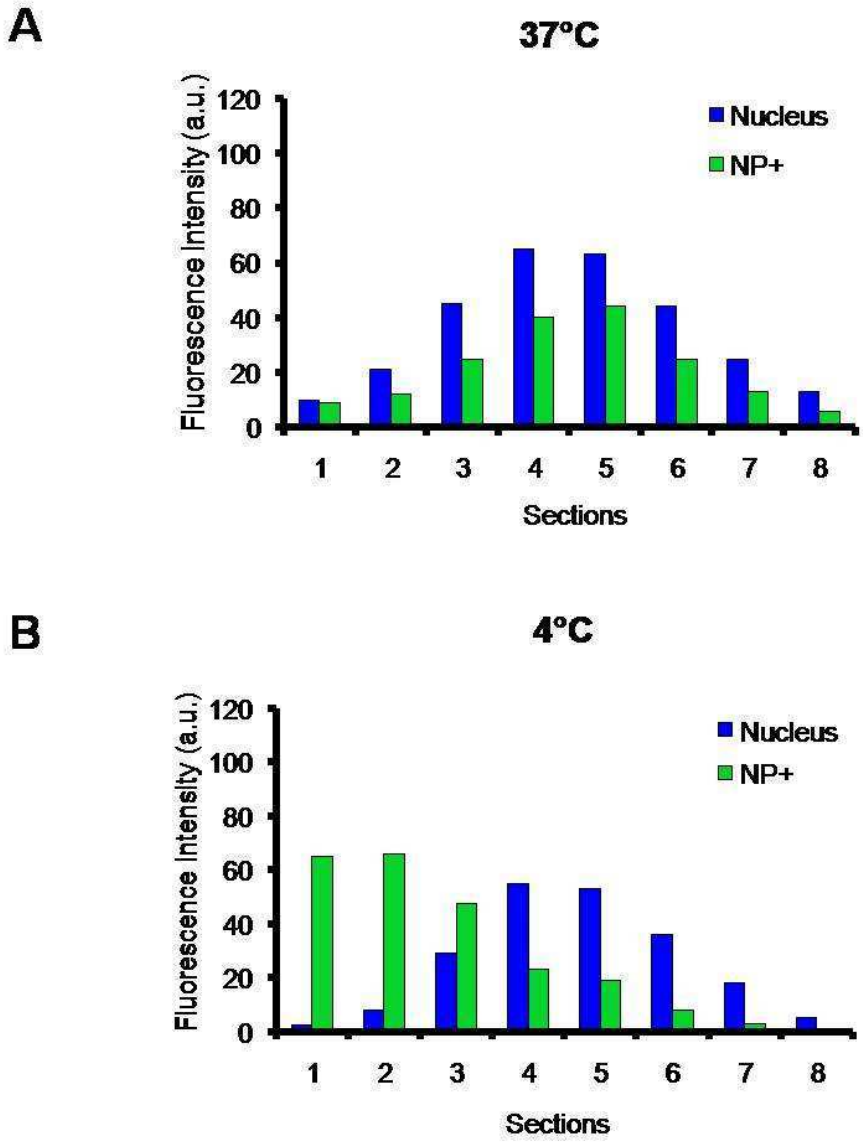


Figure 3. Confocal characterization of NP+ endocytosis in 16HBE cells at 37°C and 4°C. Cells were incubated at with 10 µg of FITC labeled NP+, for 30 minutes at 37°C (A) or 4°C (B), fixed with PFA 4% and nuclei were stained with TOPRO-3 (blue), before being visualized using confocal microscopy. Optical slice sections of 2.5µm from the luminal to the basal pole of the cells (1-8) were made and in each section NP and nuclei fluorescence was quantified. Each analysis was made on at least 100 cells and is representative of 4 different experiments.

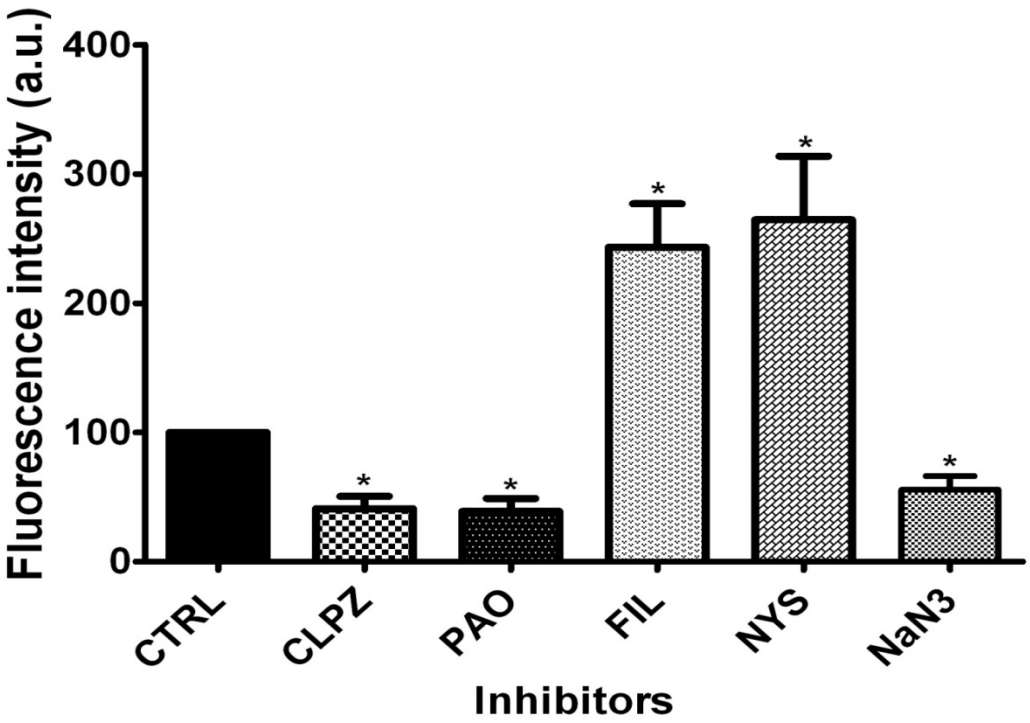


Figure 4. Analysis of the endocytosis pathway of NP+. Cells were pre-treated or not with various inhibitors for 20 min before incubation with 10 µg of NPs for 30 min. Filipin (FIL, 10 µg/ml), chlorpromazine (CLPZ, 5 µg/ml), nystatin (Nys,10 µg/ml), phenylarsine oxide (PAO, 10 µg/ml), sodiumazide (150 µg/ml), control (0.4 ml of KRB). Cells were then washed twice with KRB, fixed by 10 min incubation with 4% PFA at room temperature and rinsed twice in PBS. Finally, the slides were mounted on glass with glycerol, visualized and photographed with a confocal fluorescence microscope. The amount of internalized NPs was evaluated by measuring fluorescence intensity for each sample. Fluorescence intensity of treated cells was represented as a percentage of control. Experiments were performed in quadruplet, error bars representing the standard errors calculated for all values. The mean scores were statistically significant when evaluated using one-way ANOVA, $p < 0.05$ (Dunnet test).

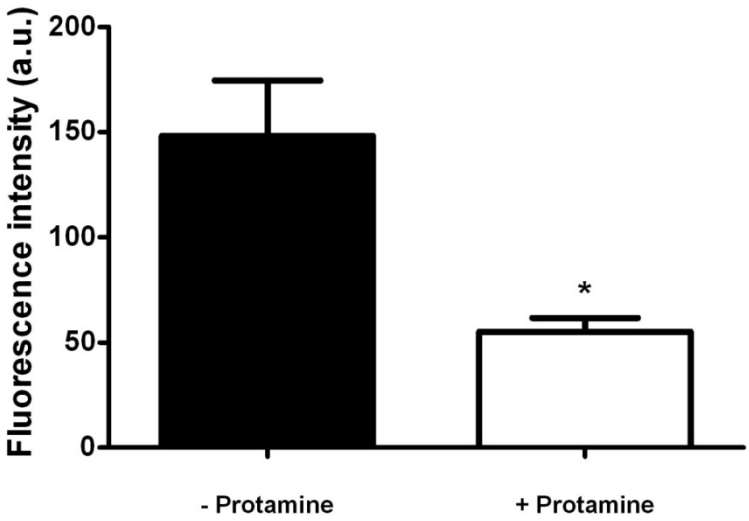


Figure 5. Effect of protamine on NP+ endocytosis. 16HBE14o- cells were first incubated with protamine (150 µg in KRB per well) for 5 min, and 10 µg of NP+ in KRB solution were added to the media. Cells were then incubated for 30 min at 37°C. After rinsing and fixation with 4% PFA, the slides were mounted on glass with glycerol, visualized and photographed with a fluorescence microscope. The amount of internalized NPs was evaluated by measuring fluorescence intensity for each sample. Experiments were performed in duplicate, error bars representing the standard errors calculated for all values. The mean scores were statistically significant when evaluated using one-way ANOVA, $p < 0.05$ (Dunnet test).

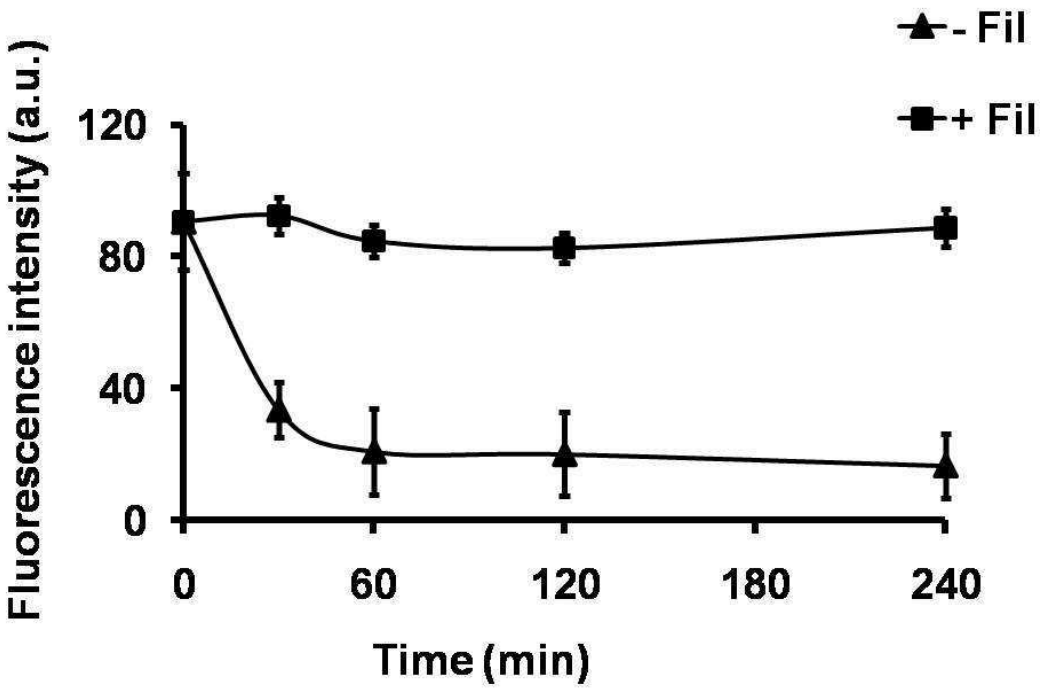


Figure 6. Filipin effect on NP+ exocytosis. Cells were incubated at 37°C with 10 µg of FITC labeled NP+ for 30 minutes, then washed twice and the media replaced with a new media without nanoparticles, then incubated for 30, 60, 120, 180 or 240 minutes at 37°C. After incubation, cells were fixed with 4% PFA and visualized by confocal microscopy. Fluorescence intensities of each condition were then measured. To investigate the effect of filipin in the exocytosis after 30 min incubation with nanoparticles KRB containing 10 µg of filipin was added and the medium was changed every 30 minutes. At each time point NP endocytosis was quantified. Experiments were performed in quadruplet and error bars represent the standard deviation of measurements in each condition.

Acknowledgment

The authors would like to thanks mike Howsam for proof reading and Philippe Gosset for critically reading the manuscript. We also thank Thierry Bardon from Ceva santé animale for his help and funding.

Conclusion

Cette étude a permis de décrire les mécanismes impliqués dans l'internalisation des NP^+ avec les cellules épithéliales bronchiques humaines. Les résultats montrent que les NP^+ pénètrent dans les cellules 16HBE par endocytose. C'est un mécanisme actif, rapide et saturable. La fixation sur les cellules se fait par des interactions électrostatiques entre les charges cationiques des NP^+ et des récepteurs anioniques à la surface des cellules. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques des différentes voies d'endocytose montre que les NP^+ pénètrent dans les cellules en empruntant la voie des clathrines. De façon intéressante, nous avons observé une importante exocytose des NP^+ qui a lieu parallèlement à l'endocytose, suggérant que la saturation d'endocytose observée résulte d'un équilibre entre endocytose et exocytose des nanoparticules. De plus, cette exocytose est un mécanisme cholestérol dépendant. Ces résultats confirment les résultats obtenus sur des modèles animaux, montrant le potentiel des NP^+ comme vecteurs de molécules d'intérêt thérapeutique et vaccinal, par les voies respiratoires.

CHAPITRE 2

ETUDE DE LA GENOTOXICITE DES NANOPARTICULES

Présentation de l'étude

Evaluer les risques résultants de l'exposition des voies respiratoires aux nanoparticules est une préoccupation de santé publique, qui concerne aussi bien les nanoparticules naturelles qu'anthropiques. Dans le chapitre précédent, nous avons montré que les NP^+ interagissent très rapidement et très fortement avec les cellules bronchiques humaines. Evaluer le potentiel toxique des NP^+ sur ces cellules constitue donc un pré-requis pour envisager leur utilisation comme vecteurs des voies respiratoires. Par ailleurs, chaque nanoparticule étant une entité particulière aux propriétés uniques, il est important de comprendre l'importance des mécanismes mis en œuvre et l'implication des caractéristiques physicochimiques des nanoparticules dans ces mécanismes. De plus, la toxicité peut avoir des conséquences importantes sur la physiologie cellulaire sans pour autant entraîner la mort des cellules. Dans cette études nous nous somme plus particulièrement intéressés à l'étude de la génotoxicité des NP^+, c'est-à-dire leur capacité à induire des lésions réversibles ou non sur l'ADN. Nous avons étudié l'influence des conditions expérimentales et plus particulièrement la composition du milieu de culture sur les caractéristiques physicochimiques des nanoparticules (taille, charge), et les conséquences sur les mécanismes d'endocytose, de cytotoxicité et de génotoxicité.

Ce travail initié avec le Pr Frank Le-Curieux et le Dr Fabrice Nesslany a été réalisé en collaboration avec le laboratoire de toxicologie génétique de l'Institut Pasteur de Lille. Les résultats présentés ont fait l'objet d'une publication parue en 2011 dans le journal International Journal of Pharmaceutics (Merhi et al., 2011).

STUDY OF SERUM INTERACTION WITH A CATIONIC NANOPARTICLE: IMPLICATIONS FOR *IN VITRO* ENDOCYTOSIS, CYTOTOXICITY AND GENOTOXICITY

Maysaloun Merhi[1,2,¤] and Christophe Youta Dombu[1,3,¤], Alizée Brient[1,2], Jiang Chang[1,3], Anne Platel[1,2,4], Frank Le Curieux[1,2,4,#], Daniel Marzin[1,2,4], Fabrice Nesslany[2] and Didier Betbeder[1,3,5*]

1. Université Lille Nord de France, F-59000 Lille, France
2. IPL, EA 4483, Laboratoire de Toxicologie, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille, France
3. CHU Lille, EA 4483, IMPRT, IFR 114, Faculté de Médecine pôle recherche, Université de Lille 2, 59000 Lille, France
4. UDSL, EA 4483, Département Toxicologie-Santé Publique-Environnement, Faculté de Pharmacie, 59000 Lille, France
5. Université d'Artois, 9 rue du temple, 62030 Arras, France

[¤] These authors have equal contributions to the manuscript

[#] Present address: European Chemicals Agency, Annankatu 18, FIN-00121 Helsinki, Finland.

[*] Corresponding author: Didier Betbeder, CHU Lille, EA 4483, IMPRT, IFR 114, Faculté de Médecine pôle recherche, Université de Lille 2, 59000 Lille, France

Phone: +33 320 62 68 83 Email: dbetbeder@aol.com

Abstract

We used well-characterized and positively charged nanoparticles (NP^+) to investigate the importance of cell culture conditions, specifically the presence of serum and proteins, on NP^+ physicochemical characteristics, and the consequences for their endocytosis and genotoxicity in bronchial epithelial cells (16HBE14o-). NP^+ surface charge was significantly reduced, proportionally to NP^+/serum and NP^+/BSA ratios, while NP^+ size was not modified. Microscopy studies showed high endocytosis of NP^+ in 16HBE14o-, and serum/proteins impaired this internalization in a dose-dependent manner. Toxicity studies showed no cytotoxicity, even for very high doses of NP^+. No genotoxicity was observed with classic comet assay while primary oxidative DNA damage was observed when using the lesion-specific repair enzyme, formamidopyrimidine DNA-glycosylase (FPG). The micronucleus test showed NP^+ genotoxicity only for very high doses that cannot be attained *in vivo*. The low toxicity of these NP^+ might be explained by their high exocytosis from 16HBE14o- cells. Our results confirm the importance of serum and proteins on nanoparticles endocytosis and genotoxicity.

Keywords: cationic nanoparticles; endocytosis; genotoxicity; human bronchial epithelial cells; Comet assay; micronucleus test; serum, proteins

1. Introduction

Understanding the potential risks associated with human exposure to nanoparticles (NPs) is a major public health concern which has intensified with the increasing manufacturing and the wider use of NPs, inevitably leading to potentially greater exposure of humans to NPs. In the field of nanomedicine, NPs are currently being investigated for numerous applications, including diagnostic, drug delivery, vaccines, medical imaging, nanoarrays, implants and prostheses (Couvreur and Vauthier, 2006; Pinaud et al., 2006; Riehemann et al., 2009). It is therefore necessary to better understand the impact of such exposure in order to be aware of the potential risks for the human health and to ensure the appropriately controlled application of nanotechnologies. The airway route of exposure, extending from the oral and nasal cavities to the lungs, constitutes a very large area of potential interaction with airborne NPs. The airway epithelium nevertheless constitutes a highly-regulated and impermeable barrier of tight junctions and this physical and physiological barrier effectively limits airborne NPs entry. However, both natural and manufactured NPs have been reported to be able to cross this barrier by strongly interacting with airway epithelial cells (Kreyling et al., 2009), though the details of the mechanisms involved remain poorly understood. According to some authors, exposure to NPs was related to toxic effects in the lungs such as chronic obstructive pulmonary diseases (Fanizza et al., 2007), fibrosis, oxidative stress and inflammation, genotoxicity and mutagenesis (Shvedova et al., 2009), as well as toxicity in distal organs (Oberdorster et al., 2005). However, these toxic effects probably related to their high surface reactivity were observed at very high doses of NPs. Other studies have shown that, at high concentrations and in the presence of serum, NPs form large aggregates which are unlikely to reach the deeper lungs (Oberdorster, 2010).

Owing largely to the great diversity of NPs in the environment, encompassing a wide range of different characteristics and physicochemical properties, it is difficult to reliably predict the intrinsic toxicity of NPs in general. Each NP can indeed be described by a set of physicochemical properties (*i.e.* size, surface charge, shape, aggregation and composition ...), all likely to influence their fate and actions in the human airway (Yang et al., 2009). Therefore, assessing the importance of each parameter is a key step towards understanding their potential toxicity. Another difficulty in studying the toxicity of NPs is the lack of widely accepted methods and relevant models. Because of some of the specific properties of NPs, it is thought that current *in vitro* toxicity assays validated for “common” chemicals could be inappropriate for studying NPs (Kroll et al., 2009). Finally, most of the toxicity studies published to date have focused on the investigation of cytotoxic effects and have overlooked the more subtle cellular alterations, such as genotoxicity (Singh et al., 2009), which might contribute to human health risks posed by NPs.

Here we present results from a study of a 60 nm cationic NP (NP^+) which can be used at high concentrations without aggregation in the presence or absence of serum proteins. *In vitro* studies are performed in absence of mucus, therefore increasing nanoparticles contact with cells for evaluating their potential toxicity. The aim of our work was to investigate the importance of cell culture

conditions, specifically the presence of serum and proteins in the culture media, on the physicochemical characteristics of NP^+ (size and zeta potential), and the consequences on this NP^+ endocytosis and genotoxicity in a human bronchial epithelial cell line (16HBE14o-). For genotoxicity testing, we used the comet assay (primary DNA damage) and the micronucleus test (chromosomal aberration assay).

2. Methods

2.1 Reagents and Chemicals

The reagents and chemicals used in the experiments were purchased from the following suppliers: maltodextrin from Roquette (Roquette, France); glycidyl-trimethyl-ammonium chloride (GTMA), minimum essential media (MEM), foetal calf serum (FCS), phosphate buffered saline (PBS) and DAPI from GIBCO Invitrogen SARL, Cergy-Pontoise, France; giemsa reagent, penicillin, streptomycin, mitomycin C (MMC, CAS No. 50-07-7), methyl methanesulfonate (MMS, CAS No. 66-27-3), cytochalasin B, Triton X-100, EDTA, trizma base, hepes, RNase, propidium iodide, 5-[4,6-dichlorotriazin-2-yl] amino fluorescein isothiocyanate (FITC), epichlorhydrin (1-chloro-2,3-epoxypropane), KCl, NaCl and bovine serum albumin (BSA) from Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France; methanol from Panreac Quimica, Barcelona, Spain; trypsin from Biochrom AG, Berlin, Germany; normal melting point and low melting point agaroses from Biorad, Marnes la Coquette, France; repair endonuclease formamidopyrimidine glycosylase (Fpg) from New England Bio-Labs via Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France; acetic acid from VWR, Fontenay-sous-bois, France; DMSO from Acros Organics, Noisy le Grand, France; $NaBH_4$ from Acros Organics, Noisy-le-Grand, France; NaOH, Na_2HPO_4 and absolute ethanol from Merck, Darmstadt, Germany.

2.2 Nanoparticles

2.2.1Preparation of polysaccharide cationic nanoparticles from maltodextrin and characterization

Polysaccharide cationic NPs (NP^+) were prepared from maltodextrin as described previously (Major et al., 1997; Paillard et al., 2010). Briefly, 100 g of maltodextrin was dissolved in 2N sodium hydroxide with magnetic stirring at room temperature. Addition to the crude mixture of epichlorhydrin and glycidyl-trimethyl-ammonium chloride (hydroxycholine, cationic ligand) yielded cationic polysaccharide gel. The gel was then neutralized with acetic acid and crushed with a high pressure homogenizer (Emulsiflex C3, France). The NP^+ obtained were purified by tangential flow ultra-filtration (Centramate Minimum II, PALL, France) using a 300 kDa membrane (PALL, France) to remove oligosaccharides, low-molecular weight reagents and salts. Whenever necessary, NP^+ labelling was achieved by covalently binding fluorescein isothiocyanate (FITC) to the polysaccharide core (Prieur et al., 1996). These labelled particles were washed and purified by tangential flow ultra-filtration (Centramate Minimum II, PALL, France) using a 100 kDa membrane (PALL, France) with demineralised water until no free marker was detected in the ultra-filtrate. All NP^+ solutions were stored in sterile tubes after filtration through a 0.2-µm filter. We also checked the stability of FITC-NP^+ labeling and confirmed that no free FITC was released from NP^+ after storage for 6 months at 4°C: moreover, the labeling was stable after 24 hours incubation at 37°C in complete medium or in PBS.

2.2.2 Protein loading to NP^+

BSA was loaded onto nanoparticles by mixing NP^+ (original concentration= 5 mg/ml) and BSA (original concentration= 1 mg/ml) in PBS for 10 min at room temperature, under stirring, using different ratios of NP^+/BSA (*i.e.* 1/0.3; 1/1; 1/3 and 1/5, w/w). In these conditions the loading was quantitative as assessed by Paillard et al (2010).

2.2.3 Size and zeta potential analysis

The average hydrodynamic diameter and the zeta potential of NP^+ were measured in 15mM NaCl, using the Malvern nanoZS (Malvern Instruments, France). The analyses were performed in triplicate. In order to determine the size and the zeta potential in presence of serum, the NP^+ were first diluted in MEM containing different concentrations of FCS (0, 2.5, 5 and 10%, v/v).

2.3 Cell line and culture conditions

The human bronchial epithelial cell line 16HBE14o- was obtained from Dr. Gruenert D.C. (Colchester, Vermont, USA) and their doubling time was assessed as approximately 22 hours (data not shown).

2.3.1 Endocytosis study

The cells were seeded on 8-well glass chamber slides (LabTek® II, Thermo Scientific Nunc Lab, UK) at a density of 3×10^5 cells per well (0.8 cm²). Chamber slides were first coated with a mixture of collagen and fibronectin (4/1, v/v). Cells were incubated until confluence at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere. The cell culture medium (MEM supplemented with 10% decomplemented FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 1% L-glutamine) was renewed every 2 days. After 4 days in culture, the cells were confluent with a density of approximately $1x10^6$ cells per well (0.8 cm²).

2.3.2 Genotoxicity assessment

16HBE14o- cells were maintained at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere in MEM growth medium supplemented with 200 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin and 10% of decomplemented FCS. Cells were seeded at a density of 4×10^5 cells/well (3 ml culture medium/well) in 6-well cell culture plates (9.6 cm²; Falcon™, Becton Dickinson Biosciences, France) and incubated for 22 h prior to exposure to the NP^+ in order to allow exponential cell growth and maximum cell attachment.

2.4 Confocal microscopy analysis

Cells were washed twice with PBS and incubated with 10 µg of NP^+ (corresponding to approximately 12.5 µg of NP^+ for 1 cm² of cells) in 0.4 ml PBS for 30 min at 37°C, then washed twice with PBS. Cells were fixed with 200 µl of 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature, then washed

twice with PBS and incubated for 10 min with 80 µL of DAPI (1/1000^{e} v/v diluted in demineralised water). The slide-attached monolayer cells were photographed under confocal microscope (Leica, Wetzlar, Germany). All experiments were performed in quadruplet and four pictures of each condition were taken in different fields of the slides (about 100 cells per field). Fluorescence intensity of each picture was measured using the software SigmaScan Pro 5 (Systat software, Inc., Point Richmond, CA, USA). Calculations were performed using the statistical software program GraphPad Prism 5 (GraphPad Softwares, Inc., La Jolla, CA,. USA). For statistical analyses we used a one-way analysis of variance (ANOVA) and Student t-test. The results were considered significant when $p < 0.05$.

2.5 Genotoxicity assays (Comet assay and Micronucleus Test)

2.5.1 Cell treatment

NP^+ were dispersed in PBS at the highest initial concentration of 50 mg/ml. Successive suspensions were then made in PBS in order to obtain the following concentrations: 25, 12.5, 6.25, 3.125 and 1.5625 mg/ml. All the NP^+ suspensions were vortexed for 2 min and sonicated for 10 min at room temperature (Ultrasonic water bath, 550 W, Advantage lab GmbH, Belgium). Each concentration was then diluted at 10% in the culture medium (MEM with or without 10% FCS) giving the final NP^+ concentrations used for cell treatment of: 5000, 2500, 1250, 625, 312.5 and 156.25 µg/ml (corresponding to 2604, 1302, 651, 326, 163 and 81 µg/cm^2).

In order to determine if serum influenced NP^+ behaviour, two types of treatment were carried out: cells were incubated for 3 h with the NP^+ dispersed either in serum-free MEM medium or in MEM supplemented with 10% FCS. Positive controls (Mitomycine C (MMC) 2.5 µg/ml and Methyl methanesulphonate (MMS) 20 µg/ml) were included in the micronucleus test and comet assay, respectively. Negative control was PBS diluted at 10% in the culture medium (MEM with or without 10% FCS). After the treatment, the cells were washed twice with PBS and immediately harvested (for the comet assay) or incubated in complete medium (MEM + 10% FCS) for 40 h before harvesting (for the micronucleus test). Each treatment was coupled to an assessment of cytotoxicity as described below.

2.5.2 Assessment of cytotoxicity

For the comet assay, cytotoxicity was first assessed at harvest using the Trypan Blue dye exclusion assay. Viable cells appeared refringent and dead cells incorporated Trypan Blue (0.4 %). Cells were observed and scored using a Malassez hemacytometer. Results were expressed as percent of cell survival, *i.e.*, the percent ratio of viable (unstained) cells in treated *vs.* control groups. Concentrations which led to more than 70% of viability were submitted to a genotoxicity assessment.

Cytotoxicity was also evaluated by performing the halo assay as described by Sestili and co-workers (Sestili et al., 2006). Indeed, it has been shown that Alkaline-Halo Assay (AHA) may be more sensitive than the comet assay in detecting apoptotic and necrotic processes (Bacso and Eliason, 2001).

For the micronucleus test, cytotoxicity was evaluated by calculating the percentage of Relative Population Doubling (RPD), where Population Doubling = [log (post-treatment cell number ÷ initial cell number)] ÷ log (2), as recommended by OECD guidance[14]. NP^+ concentrations leading to a RPD of more than 55 ± 5 % were considered as of low or no cytotoxicity, and were submitted to genotoxicity assessment.

2.5.3 Assessment of Genotoxicity

2.5.3.1 Comet assay protocol

The comet assay was performed under alkaline conditions (pH > 13) as described by Singh and co-workers (Singh et al., 1988). Slight modifications were employed in order to detect specifically the oxidative DNA damage, based on Collins' procedures (Collins et al., 1993). Formamidopyrimidine glycosylase (Fpg) was used to detect oxidative DNA base damage, as recommended by the European Standards Committee on Oxidative DNA damage (ESCODD, 2003).

At the end of the treatment, 2.10^4 cells from each well were mixed with 75 µl of 0.5% low-melting point agarose kept at 37°C before rapidly transferring onto pre-coated slides (two layers of normal agarose (1.5% and 0.8%). Five slides were prepared for each dose: 2 slides treated with Fpg (Fpg (+)), 2 slides without Fpg (Fpg (-)), and 1 slide corresponding to the halo assay. All the following steps were sheltered from daylight to prevent the occurrence of additional DNA damage.

Fpg (-) and Fpg (+) slides were immersed for at least 1 h at 4°C in a cold lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Trizma Base, pH 10, supplemented with 1% Triton X-100 and 10% DMSO). After lysis, slides were washed and equilibrated for 2 x 5 min in enzyme buffer (40 mM HEPES, 100 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 0.2 mg/ml BSA; pH 8). Fpg (-) slides were washed immediately in water; Fpg (+) slides received 75 µl of Fpg solution (0.6 U Fpg/slide) and coverslips, and were incubated at 37°C for 35 min. At the end of this enzymatic step, slides were quickly rinsed with cold PBS.

All the slides were then placed in a horizontal gel electrophoresis tank previously filled with fresh electrophoresis solution (1 mM EDTA and 300 mM NaOH, pH>13) for 20 min to allow DNA unwinding and expression of single-strand breaks and alkali-labile sites. Next, electrophoresis was performed for 20 min using an electric current of 20 V and 25 mA. Slides were then placed for 2 x 5 min in neutralization solution (0.4 M Trizma base, pH 7.5) and gels were dehydrated by immersion in absolute ethanol for 5 min. Finally, slides were air-dried and stored at room temperature.

2.5.3.2 Cells scoring in the Comet assay

Slides were coded and analysed blind. We added 25 µl of propidium iodide solution (20µg/ml in distilled water) and a coverslip on each slide. Slides were then examined at 250x magnification using a fluorescence microscope (Leica Microscopy and Scientific Instruments Group, Heerbrugg, Switzerland) equipped with an excitation filter of 515-560 nm and a 590 nm barrier filter, connected through a gated CCD camera to Comet Image Analysis System software, version 4.0 (Perceptive Instruments Ltd., Haverhill, United Kingdom).

We scored 100 randomly selected cells per test condition (50 cells from each of the two replicate slides). The Olive Tail Moment (OTM), recommended by Olive and co-workers (Olive et al., 1990), was used to evaluate DNA damage. OTM is calculated as a product of two factors: the percentage of DNA in the tail (% Tail DNA) and the distance between the intensity centroids (centres of gravity) of the head and the tail along the x-axis of the comet.

In the halo assays, 100 randomly selected cells per slide were analysed and manually enumerated using a counter.

2.5.3.3 *In vitro* Micronucleus Test (MNT)

At the end of the recovery period (40 h), 16HBE14o- cells were collected by trypsinization, washed with MEM, transferred to 15 ml polypropylene tubes and centrifuged at 165 G for 6 min. Cells were then treated for 4 min with a hypotonic solution (MEM diluted 1:1 v/v in distilled water, 10 ml/tube). At the end of the hypotonic shock, a pre-fixation step was performed by adding 1 ml/tube of cold Carnoy I mixture (methanol/acetic acid, 3:1 v/v). Cells were then centrifuged and fixed with 10 ml of cold Carnoy I for at least 10 min at room temperature. After another centrifugation, cells were spread on glass slides, air-dried at room temperature (at least over-night), stained for 10 min with 4% Giemsa water solution, rinsed with distilled water and dried at room temperature. For each concentration, 2 slides were prepared for analysis.

The slides were finally coded and analysed blind. Micronuclei (MN), identified according to criteria recommended by Fenech and co-workers (Fenech et al., 2003), were scored at 500× magnification in 1000 intact mononuclear cells per slide. For each concentration, the frequency of MN was obtained for 2000 mononuclear cells.

2.5.4 Statistical analysis

The OTM frequencies did not follow a Gaussian distribution (Bauer et al., 1998). Thus, the non-parametric Mann-Whitney U-test was used to evaluate the statistical difference between groups (*i.e.* each dose) and the difference between each dose versus the negative control in the Comet assay. Differences with a $p < 0.05$ were considered statistically significant. All statistical analyses were

performed with StatView® Software (version 5.0, SAS Institute Inc., SAS Campus Drive, Cary, North Carolina 27513, USA).

For the micronucleus test, the statistical significance of difference between groups was determined using the CHI^2-test. Differences with a $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1 Characterization of NP^+

The size of the NP^+ was measured by dynamic light scattering and their zeta potential measured using the Malvern nanoZS. The mean diameter of the NP^+ studied here was 64 ± 13 nm, with a polydispersity index (PdI) value of 0.22 and their mean zeta potential was $+25 \pm 1.5$ mV. They were also found to be spherical by transmission electron microscopy (Dombu et al., 2009). NP^+ size and zeta potential analyses were performed under each test condition in order to investigate the impact of serum on these parameters and to check if the assays were actually performed on NP^+ in their nanoscale form rather than on aggregates and/or agglomerates of NP^+ (Figures 1 and 2). As observed in Figure 1A, for a constant amount of NP^+, the zeta potential gradually decreased when FCS concentration was increased in the medium. In addition, at the concentration of 1250 µg/ml of NP^+, the zeta potential of NP^+ was reduced by up to 50% when FCS concentration was increased from 0 to 10 % in the medium. Interestingly, when similar measurements were performed using 5000 µg/ml of NP^+, the zeta potential remained unchanged even at a maximum FCS concentration of 10%. These results strongly suggest that, rather than the presence of FCS in the medium, it is mostly the ratio NP^+/FCS which modulates the zeta potential of NP^+. Similar results were observed when different amounts of BSA were associated with NP^+ (Figure 1B), and a sharp decrease in zeta potential was observed when NP^+/BSA ratio decreased. Interestingly, the measurements of NP^+ size performed under these conditions showed that neither serum nor BSA significantly modified the size of the NP^+ (Figure 2), even at the highest amounts of serum or BSA tested.

3.2 Effect of serum and proteins on NP^+ endocytosis

We investigated the ability of NP^+ to be endocytosed by 16HBE14o- cells. Figure 3 shows confocal microscopy slices of cells after 30 minutes incubation with NP^+. As observed, NP^+ were endocytosed by cells and found in cytoplasm as punctuated forms, characterizing an endosomal uptake.

We studied the influence of serum and BSA on NP^+ endocytosis (Figure 4). The endocytosis of NP^+ in presence of 10% FCS was significantly reduced in both PBS and MEM (respectively 60% and 40% decrease), suggesting that FCS partially inhibited the endocytosis of NP^+ (Figure 4A). Similar results were obtained when NP^+ were associated with BSA (major protein of serum) (Figure 4B), and 40% inhibition of NP^+ endocytosis was observed with an NP^+/BSA ratio of 1/5 (w/w). Moreover, this reduction seemed to be directly dependent on the NP^+/BSA ratio, as endocytosis decreased proportionally with the BSA increase. These results show that the presence of serum or proteins in the culture medium can significantly reduce NP^+ endocytosis.

3.3 Cytotoxicity studies

NP^+ did not induce significant cytotoxic effects in these cells up to the highest tested concentration of 2604 µg/cm^2 as assessed by the trypan blue dye exclusion assay (data not shown). Indeed, whatever the test conditions, no indication of an increase in apoptotic or necrotic cells was noted using the halo assay. In fact, our results showed roughly 4% of necrotic cells and 1% of apoptotic cells for both the treated concentrations and controls (Table 1).

3.4 Comet assay

Both standard and Fpg modified tests were performed in presence or in absence of serum. In the absence of Fpg none of the OTM values was statistically significantly different when compared to the negative control, either with or without serum (Figure 5A). When Fpg was added, statistically significant increases in DNA damage were observed without serum (81 and 1302 µg/cm^2), when compared to the negative control (Figure 5B). When serum was added during the treatment, OTM values described a bell shape curve, excepting the higher concentration tested of 2604 µg/cm^2. Moreover, statistically significant increases in DNA damage were noted at the concentrations of 163, 326 and 2604 µg/cm^2. Furthermore, a statistically significant difference between FCS (-) and FCS (+) was observed at the three dose levels 81, 163 and 1302 µg/cm^2.

3.5 *In vitro* Micronucleus Test

The MNT was used to assess the induction of chromosomal aberrations after exposure to the NP^+. The tested concentrations led to RPD values ≥ 55 ± 5% and were considered as of low or no cytotoxicity (data not shown). The frequency of micronucleated cells in 1000 mononuclear cells in Giemsa-stained specimens are shown in Figure 6. We observed significant increases in MN formation when cells were treated at concentrations > 326 µg/cm^2 either in presence or not of FCS.

4. Discussion

Nanoparticles can be described by their physicochemical properties (size, surface charge, shape, aggregation and composition...), all of which are likely to have an influence on their fate and behaviour in the human airway (Yang et al., 2009). Understanding the role of NP's physicochemical properties in their interactions with airway epithelial cells is a key step in evaluating its eventual toxicity to people exposed via inhalation. Therefore it is necessary to develop specific *in vitro* models that take into account NPs physicochemical properties and that study their toxicity in a manner relevant to potential exposure conditions (Gul et al., 2009).

Numerous studies have shown that several types of particles form aggregates when diluted in culture medium. For example, Hackenberg and co-workers showed that 15-30 nm titanium dioxide (TiO_2) NPs had a strong tendency to aggregate in aqueous solution and formed micro-sized complexes up to a size of 285 nm (and in a few cases 2 µm), in spite of intense sonication of the suspensions (Hackenberg et al., 2010). Similar observations were made in our laboratory with SiO_2 and TiO_2 NPs in PBS (data not shown). Such aggregations can significantly modify the experimental outcome by leading to a heterogenic population of nano- and microparticles with different physicochemical characteristics and behaviours from that of the NPs at their nanoscale. The size of NPs in suspension seems to be a key parameter as most of the published studies so far started with NPs but ended up studying aggregates which are not only expected to be different in their interactions with cells, but are not expected to reach the deep into the lungs once inhaled (Lamprecht et al., 2001).

In the present study, we tested a 60 nm polysaccharide cationic NP (NP^+), the composition, size, shape and surface charge of which are well characterized and controllable. The aim of this work was to investigate the importance of cell culture conditions, specifically the presence of serum and proteins in the culture media on the physicochemical characteristics of NP^+ and also to establish the conditions under which the NP^+ could be studied purely in their nanoscale form in order to assess their endocytosis and genotoxicity. For this purpose, we used the human bronchial epithelial cell line 16HBE14o- (Cozens et al., 1994). These cells are highly similar to the primary bronchial epithelium, which make them suitable for mechanistic studies of bronchial epithelium, including transport regulation (Ehrhadt et al., 2003), drug delivery (Forbes, 2000) and toxicology studies (Hussain et al., 2009).

Studies performed *in vivo* have demonstrated the ability of these cationic NP^+ to efficiently deliver proteins after sublingual or nasal administration (Debin et al., 2002; El mir et al., 2001; Razafindratsita et al., 2007). We recently described that these NP^+ were endocytosed via the clathrin pathway and were highly exocytosed by human epithelial airway via a cholesterol dependent pathway (Dombu et

al., 2010). Despite the increasing number of studies performed on NPs administered via the airway (*e.g.* Roy and Vij, 2010), their potential genotoxicity remains poorly investigated. A more complete understanding of NPs' toxicity is a prerequisite for further preclinical development and eventual use in humans. However, to date, there is no validated or widely accepted model to assess this issue. In the present study, we have tried to better define an experimental approach for the *in vitro* study of cationic NPs (NP^+) cytotoxicity and genotoxicity by examining the implications of cell culture conditions on their endocytosis, cytotoxicity and genotoxicity to a human bronchial cell line.

Effect of FCS and BSA interactions on NP^+ size, surface charge and endocytosis

NPs for nanomedicine applications should be tested in the presence of proteins, particularly in the light of recent findings that the interaction of proteins with NPs modifies NPs size, size distribution and zeta potential (Rausch et al., 2010). We first investigated the effect of FCS and BSA on NP^+ size and surface charge. Neither FCS nor BSA modified NP^+ size at any of the concentrations tested, even with a NP^+/BSA ratio of 1/5 (w/w). In addition, we observed that FBS didn't modify NP+ endocytosis pathway (data not shown). However, we observed that FCS and BSA can sharply reduce NP^+ surface charge and that this reduction was proportional to NP^+/FCS and NP^+/BSA ratios. These results may be explained by associations between the cationic surface charges of NP^+ and anionic serum compounds such as BSA. Similar results have previously been described by Ehrenberg *et al.* (Ehrenberg et al., 2009), who showed that polystyrene NPs immersed in culture medium were quickly coated by serum proteins with maximum coating occurring in a matter of seconds to minutes. These results suggest that studies performed using NPs should be performed at low concentration.

We were also interested in investigating the ability of NP^+ to penetrate 16HBE14o- cells. Our results showed that NP^+ were endocytosed after 30 minutes of incubation, as demonstrated by confocal microscopy studies, but that their endocytosis was greatly reduced in the presence of FCS or BSA. Moreover, pre-incubation of the NP^+ with BSA in PBS prior to the endocytosis study also reduced their endocytosis and this inhibition was correlated with the NP^+/BSA ratio during incubation. This reduced endocytosis could be explained by the decrease in nanoparticle surface charge due to protein adsorption (Osaka et al., 2009).

Interestingly, cytotoxicity studies showed that these NP^+ were not cytotoxic even at the highest dose tested, a result that might be explained by the high level of NP^+ exocytosis observed (Dombu et al., 2010).

Comet assay interpretation

In the present study, the comet assay was used both for its sensitivity in assessing DNA damage and for its usefulness as a first approach in understanding the NP^+ mechanisms of action. In addition, the realisation of a modified assay using the enzyme Fpg, enables to both increase the specificity and

sensitivity of the assay by making detectable a wide range of damage (such as 8-oxo-dG, AP-sites, oxidized purines and pyrimidines…) not detected in the classic comet assay.

The results obtained without Fpg did not show any statistically significant increase in DNA damage compared to the negative control over the range of NP^+ doses tested in the current study, with or without the addition of serum (+/- FCS). In parallel, when Fpg was used, our results showed higher, statistically significant median OTM values and the presence of serum partially decreased this effect. This could be explained by the reduced endocytosis of the NP^+ observed in presence of serum. These results tend to indicate that using Fpg permitted the identification of oxidative damage in the absence of FCS. However, since these effects were not clearly dose-related, it may be that they were caused by different phenomena. One hypothesis is that damage observed at high NP^+ doses may be related to other damage such as lipid peroxidation or the formation of MDA, 4-HNE. It is noteworthy that these DNA lesions were probably not induced by secondary apoptotic or necrotic phenomenon, considering the negative results obtained with the halo assay. On the other hand, a different trend was observed when serum was added to culture medium: a bell–shaped response curve was observed with the first statistically significant OTM value at 163µg/cm^2. It is interesting to note that, comparing the serum treatments, the presence of serum had an effect on the response of 16HBE14o- cells.

Our findings confirm the results obtained in some studies which suggested that various nanoparticles are able to induce oxidative stress. It has been reported that nanoparticles may generate ROS and this mechanism is thought to play a major role in their observed cytotoxic and genotoxic effects and in addition that nanoparticles could indirectly induce oxidative stress by disturbing the balance between oxidant and anti-oxidant processes such as the glutathione system (Stone et al., 1998). Furthermore, some studies have suggested that nanoparticles may activate intracellular pathways, also leading to ROS generation (*e.g.*, synthesis of pro-inflammatory cytokines and chemokines) (Oberdorster et al., 2005). Nevertheless, the precise mechanisms activated by nanoparticles to induce ROS generation and cytotoxicity remain unknown.

Micronucleus test results interpretation

Preliminary assays showed that significant and prohibitive mortality was repeatedly observed when 16HBE14o- cells were exposed to cytochalasin B (CytoB) (data not shown). Thus, all following assays were carried out without CytoB. Significant increases in the number of micronuclei in 16HBE14o- cells were observed in presence or absence of FCS. These effects may be explained by the generation of ROS that induce lipid adducts and cells membrane degradation which could not be observed after a 3-h treatment (as used in the comet assay), but that appeared only after 40 h of recovery (applied in the micronucleus test). Finally, the increase in the number of micronuclei at concentrations that did not show primary DNA damage in the comet assay may be related to secondary mechanisms leading to indirect alterations of the mitotic apparatus. However, the results obtained in the presence of FCS showed that the lowest genotoxic effect was detected at 163µg/cm^2

(modified comet assay) and 326µg/cm^2 (MNT). These concentrations correspond to a deposition of 0.228 kg and 0.456 kg of nanoparticles in the lungs, respectively, assuming that the lungs' absorptive surface is about 140 m² (Sakagami, 2006), and that all the NPs crossed the mucus barrier, and such exposures are considered to be unrealistic.

5. Conclusion

Results revealed the importance of cell culture conditions on NP^+ physicochemical characteristics, uptake and genotoxicity on 16HBE14o- cells. Toxicity studies showed that, even at very high concentrations, the studied NP^+ were neither cytotoxic or genotoxic as measured by the classical Comet assay. The use of a Fpg-modified comet assay allowed the observance of primary DNA damage that are normally repaired by the cells. This modified assay, showed that primary damage occurred but that the presence of serum partially protected the cells, possibly by lowering NP^+ uptake by cells. In addition, the micronucleus test showed that NP^+ were genotoxic at high doses. The low observed toxicity observed of these cationic nanoparticles could be explained by their high exocytosis that lowers cell burden. These results confirm the importance of fully characterizing nanoparticles' behaviour under different cell culture conditions and confirm the role of serum protein on nanoparticles' interaction with, and genotoxicity toward cells

ACKNOWLEDGMENTS:

This work was supported by the grants from Institut de Recherche en Environnement Industriel (IRENI) and the Conseil Régional du Nord-Pas-de-Calais. The authors would also like to thank Mike Howsam for the critical reading of the manuscript.

Figures legends

Table 1 Halo assay in 16HBE14o- : Percentage of necrotic and apoptotic cells at different concentrations of NP^+ and in the presence and the absence of serum (FCS(+) and (-)).

Figure 1 Analysis of NP^+ zeta potential in presence of FCS and BSA. NP^+ (5000, 2500 and 1250 µg/ml) were diluted in MEM medium containing FCS at different concentrations (0, 2.5, 5 or 10 %) (A), or diluted at 1 mg/mL in 15mM NaCl containing different amounts of BSA (w/w) (B). Experiments were performed in triplicate and the mean values are represented on the graph. Error bars represent the standard deviations between triplicate analyses with the NanoZetasizer.

Figure 2 Measurements of NP^+ size in presence of FCS and BSA. Size analysis of different concentrations (5000, 2500, 1250 µg/mL) of NP^+ diluted in MEM medium containing 0, 2.5, 5 or 10 % FCS (A) ; (B): 1000 µg/ml NP^+ diluted in PBS containing different amounts of BSA (w/w). Experiments were performed in triplicate and the mean values are represented on the graph. Error bars represent the standard deviations between triplicate analyses with the NanoZetasizer.

Figure 3 Study of NP^+ uptake by confocal microscopy. Cells were incubated 30 minutes at 37°C with 10 µg of FITC labeled NP^+ (12,5 µg/cm²), they were washed twice with PBS and fixed for 10 min at room temperature with 4% PFA. Endocytosis was visualized by confocal microscopy; pictures represent slices taken every 3 µm from the luminal to the abluminal side (1-10). Scale bar 50 µm.

Figure 4 Quantification of NP^+ endocytosis. Cells were incubated 30 minutes at 37°C with 10 µg of FITC labeled NP^+ (corresponds to 12.5 µg/cm²), associated with BSA at the ratios indicated, then washed twice with PBS and fixed for 10 min at room temperature with 4% PFA. Internalized NP^+ was observed under confocal microscopy and endocytosis was evaluated by measuring fluorescence intensities under each condition. Experiments were performed in triplicate and the mean values (and standard deviations) are represented on the graph.

Figures 5 DNA damage on 16HBE14o- cells treated by NP^+ in MEM (complemented or not by FCS). Median OTM values are presented for the classic and modified comet assays (figures 5a and 5b, respectively). Mann-Whitney test was used for statistical comparison of OTM values between the treatments (with or without FCS; † $p<0.05$; †† $p<0.001$) and for each dose *versus* negative control (* $p<0.05$)

Figure 6 Micronucleus test of NP^+ in 16HBE14o- cells. 16HBE14o- cells were treated for 3h under increasing concentrations of NP^+ added to MEM in the presence or absence of FCS. Positive control was Mitomycin C (2.5 µg/ml) and negative control consisted of cells treated with the vehicle (PBS). After a recovery period of 40 h the micronucleus test was performed as described in "Materials and Methods". Micronuclei (MN) were scored at 500x magnification for 2000 mononuclear cells in each concentration. MN frequency is expressed for 1000 mononuclear cells. CHI_2 test was used for statistical comparison of the micronuclei °/°° in treated *versus* control cells; * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$, and between each treatment condition (with or without FCS); †† $p<0.01$.

References

Bacso, Z., Eliason, J.F., 2001. Measurement of DNA damage associated with apoptosis by laser scanning cytometry. Cytometry. 45, 180-186.

Bauer, E., Recknagel, R.D., Fiedler, U., Wollweber, L., Bock, C., Greulich, K.O., 1998. The distribution of the tail moments in single cell gel electrophoresis (comet assay) obeys a chi-square (chi2) not a gaussian distribution. Mutat Res. 398, 101-110.

Collins, A.R., Duthie, S.J., Dobson, V.L., Direct enzymic detectionof endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. Carcinogenesis. 14, 1733-1735.

Couvreur, P., Vauthier, C., 2006. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. Pharm Res. 23, 1417-1450.

Cozens, A.L., Yezzi, M.J., Kunzelmann, K., Ohrui, T., Chin, L., Eng, K., Finkbeiner, W.E., Widdicombe, J.H., Gruenert, D.C., 1994. CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 10, 38-47.

Debin, A., Kravtzoff, R., Santiago, J.V., Cazales, L., Sperandio, S., Melber, K., Janowicz, Z., Betbeder, D., Moynier M., 2002. Intranasal immunization with recombinant antigens associated with new cationic particles induces strong mucosal as well as systemic antibody and CTL responses. Vaccine. 20, 2752-2763.

Dombu, C.Y., Kroubi, M., Zibouche, R., Matran, R., Betbeder, D., 2010. Characterization of endocytosis and exocytosis of cationic nanoparticles in airway epithelium cells. Nanotechnology. 21, 355102.

Ehrenberg, M.S., Friedman, A.E., Finkelstein, J.N., Oberdorster, G., McGrath, J.L., 2009. The influence of protein adsorption on nanoparticle association with cultured endothelial cells. Biomaterials. 30, 603-610.

Ehrhardt, C., Kneuer, C., Laue, M., Schaefer, U.F., Kim, K.J., Lehr, C.M., 2003. 16HBE14o- human bronchial epithelial cell layers express P-glycoprotein, lung resistance-related protein, and caveolin-1. Pharm Res. 20, 545-551.

El mir, S., Casanova, A., Betbeder, D., Triebel, F., 2001. A combination of interleukin-2 and 60 nm cationic supramolecular biovectors for the treatment of established tumours by subcutaneous or intranasal administration. Eur J Cancer. 37, 1053-1060.

ESCODD, European Standards Comittee on Oxidative DNA damage, 2003. Measurement of DNA oxidation in human cells by chromatographic and enzymic methods. Free Rad. Biol. Med. 34, 1089-99.

Fanizza, C., Ursini, C.L, Paba, E., Ciervo, A., Di Francesco, A., Maiello, R., De Simone, P., Cavallo, D., 2007. Cytotoxicity and DNA-damage in human lung epithelial cells exposed to respirable alpha-quartz. Toxicol In Vitro. 21, 586-594.

Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E., 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. Mutat Res. 534, 65-75.

Forbes, B., 2000. Human airway epithelial cell lines for in vitro drug transport and metabolism studies. Pharm Sci Technolo Today. 3,18-27.

Gul, M.O., Jones, S.A., Dailey, L.A., Nacer, H., Ma, Y., Sadouki, F., Hider, R., Araman, A., Forbes, B., 2009. A poly(vinyl alcohol) nanoparticle platform for kinetic studies of inhaled particles. Inhal Toxicol. 21, 631-640.

Hackenberg, S., Friehs, G., Froelich, K., Ginzkey, C., Koehler, C., Scherzed, A., Burghartz, M., Hagen, R., Kleinsasser, N., 2010. Intracellular distribution, geno- and cytotoxic effects of nanosized titanium dioxide particles in the anatase crystal phase on human nasal mucosa cells. Toxicol Lett. 195, 9-14.

Hussain, S., Boland, S., Baeza-Squiban, A., Hamel, R., Thomassen, L.C., Martens, J.A., Billon-Galland, M.A., Fleury-Feith, J., Moisan, F., Pairon, J.C., Marano, F., 2009. Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: role of particle surface area and internalized amount. Toxicology. 260, 142-149.

Kreyling, W. G., M. Semmler-Behnke, J. Seitz, W. Scymczak, A. Wenk, P. Mayer, S. Takenaka, and G. Oberdorster, 2009. Size dependence of the translocation of inhaled iridium and carbon nanoparticle aggregates from the lung of rats to the blood and secondary target organs. Inhal Toxicol 21 Suppl 1:55-60.

Kroll, A., Pillukat, M.H., Hahn, D., Schnekenburger, J., 2009. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges. Eur J Pharm Biopharm. 72, 370-377.

Lamprecht, A., Schäfer, U., Lehr, C.M., 2001. Size-dependent bioadhesion of micro- and nanoparticulate carriers to the inflamed colonic mucosa. Pharm. Res. 18, 788-9318

Major, M., Prieur, E., Tocanne, J.F., Betbeder, D., Sautereau, A.M., 1997. Characterization and phase behaviour of phospholipid bilayers adsorbed on spherical polysaccharidic nanoparticles. Biochim Biophys Acta. 1327, 32-40.

Oberdorster, G., Oberdorster, E., Oberdorster, J., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. Environ Health Perspect. 113, 823-839.

Oberdorster, G., 2010. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. J Intern Med. 267, 89-105.

OECD. Guideline for the testing of chemicals, In Vitro mammalian Cell Micronucleus Test Organization for Economic Co-operation and Development 2010.

Olive, P.L., Banath, J.P., Durand, R.E., 1990. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. Radiat Res. 122, 86-94.

Osaka, T., Nakanishi, T., Shanmugam, S., Takahama, S., Zhang, H., 2009. Effect of surface charge of magnetite nanoparticles on their internalization into breast cancer and umbilical vein endothelial cells. Colloids Surf B Biointerfaces. 71, 325-3

Paillard, A., Passirani, C., Saulnier, P., Kroubi, M., Garcion, E., Benoit, J.P., Betbeder, D., 2007. Positively-charged, porous, polysaccharide nanoparticles loaded with anionic molecules behave as 'stealth' cationic nanocarriers. Pharm Res. 27, 126-133.

Pinaud, F., Michalet, X., Bentolila, L.A., Tsay, J.M., Doose, S., Li J.J., Iyer, G., Weiss, S., 2006. Advances in fluorescence imaging with quantum dot bio-probes. Biomaterials. 27, 1679-1687.

Prieur, E., Betbeder, D., Niedergang, F., Major, M., Alcover, A., Davignon, J.L., Davrinche, C., 1996. Combination of human cytomegalovirus recombinant immediate-early protein (IE1) with 80 nm cationic biovectors: protection from proteolysis and potentiation of presentation to CD4+ T-cell clones in vitro. Vaccine. 14, 511-520.

Rausch, K, Reuter, A, Fischer, K and Schmidt, M, 2010. Evaluation of Nanoparticle Aggregation in Human Blood Serum. Biomacromolecules. 11, 2836-2839

Razafindratsita, A., Saint-Lu, N., Mascarell, L., Berjont, N., Bardon, T., Betbeder, D., Van Overtvelt, L., Moingeon, P., 2007. Improvement of sublingual immunotherapy efficacy with a mucoadhesive allergen formulation. J Allergy Clin Immunol. 120, 278-285.

Riehemann, K., Schneider, S.W., Luger, T.A., Godin, B., Ferrari, M., Fuchs, H., 2009. Nanomedicine--challenge and perspectives. Angew Chem Int Ed Engl. 48, 872-897.

Roy, I., Vij, N., 2010. Nanodelivery in airway diseases: challenges and therapeutic applications. Nanomedicine. 6, 237-244.

Sakagami, M., 2006. In vivo, in vitro and ex vivo models to assess pulmonary absorption and disposition of inhaled therapeutics for systemic delivery. Adv Drug Deliv Rev. 58, 1030-1060.

Sestili, P., Martinelli, C., Stocchi, V., 2006. The fast halo assay: an improved method to quantify genomic DNA strand breakage at the single-cell level. Mutat Res. 607, 205-214.

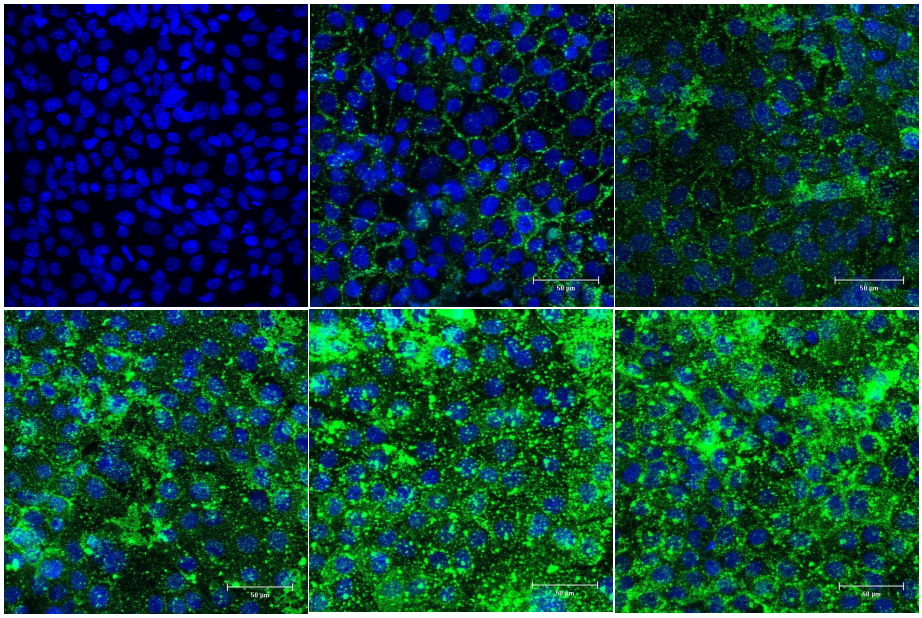
Shvedova, A.A., Kisin, E.R., Porter, D., Schulte, P., Kagan, V.E., Fadeel, B., Castranova, V., 2009. Mechanisms of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanotubes: Two faces of Janus?. Pharmacol Ther. 121, 192-204.

Yang H., Liu C., Yang D., Zhang H., Xi Z., 2009. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. J Appl Toxicol. 29, 69-78.

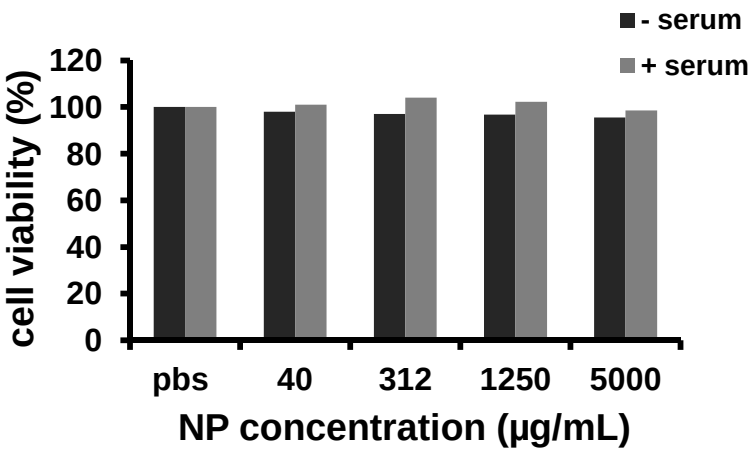
Size (Mean±S.D.)	PDI	Zêta potential	Structure	Fluorescent dye
60nm ± 13.1	0.22	+25 mV ± 1.5	Porous NP	FITC

Table 1: Characterization of NP+ nanoparticles

<u>Figure 1:</u> Endocytosis of NP+ in human bronchial epithelial cells

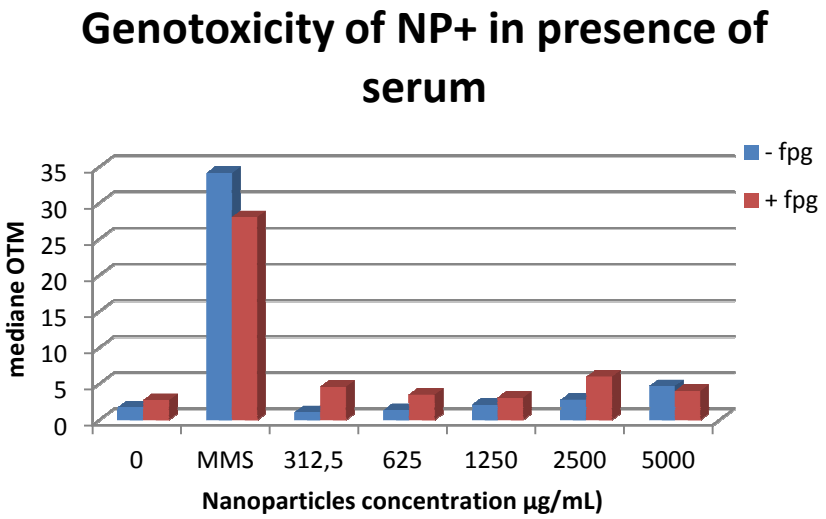


<u>Figure 2:</u> Cytotoxicity of NP+

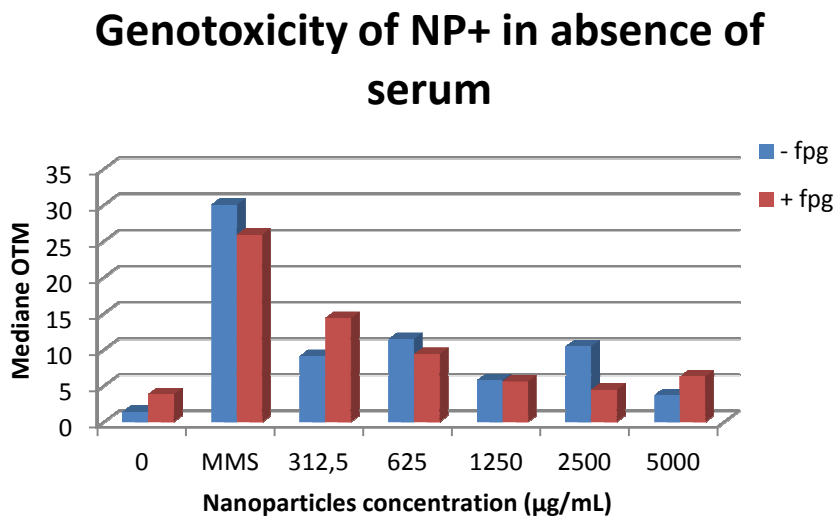


<u>Figure 2:</u> Fig. comet assay with fpg, determination of oxidative lesions on DNA

A

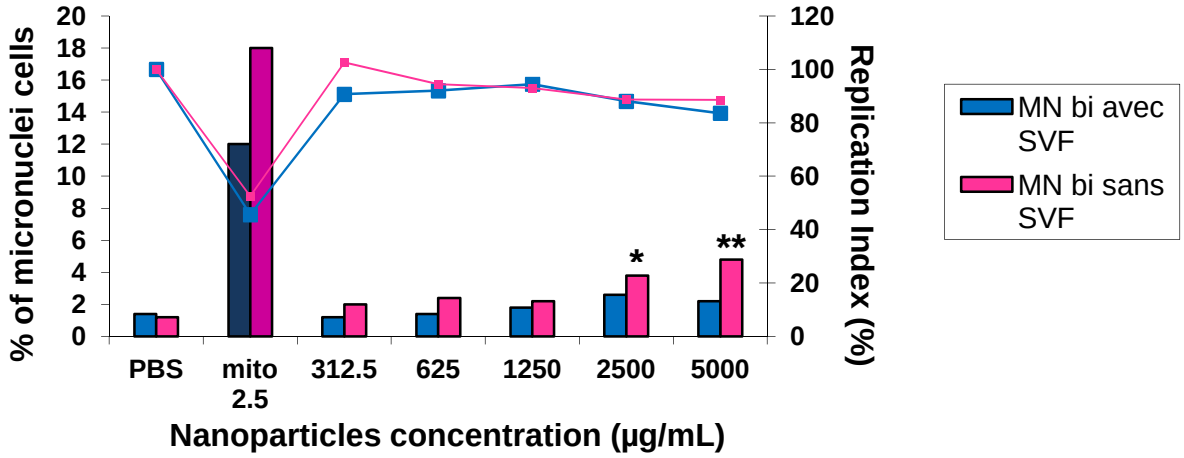


B



Cell viability > 95 %

<u>Figure 3:</u> Micronuclei assay



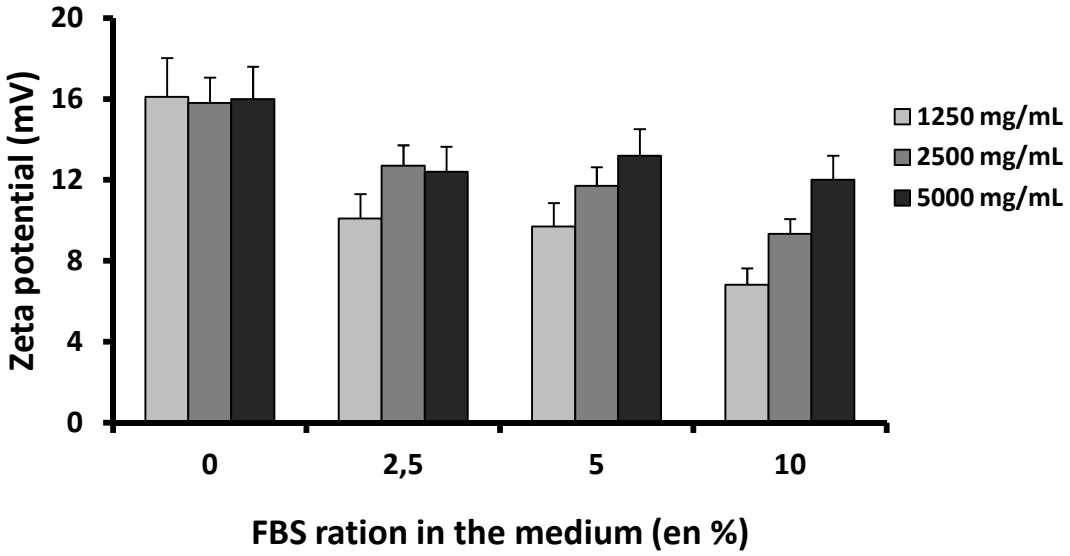
Micronoyaux

Traitement 3h/+ 40 h

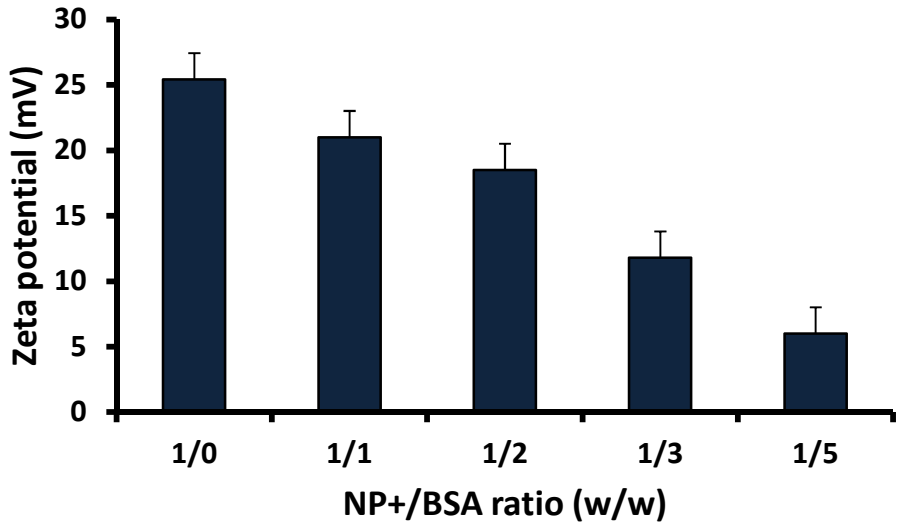
<u>Figure 4:</u> Effect of FBS and BSA on nanoparticles surface charge

A

.

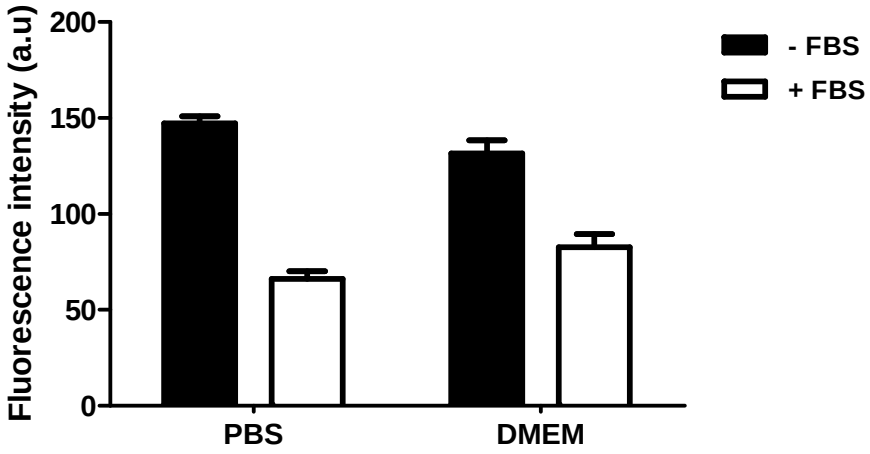


B

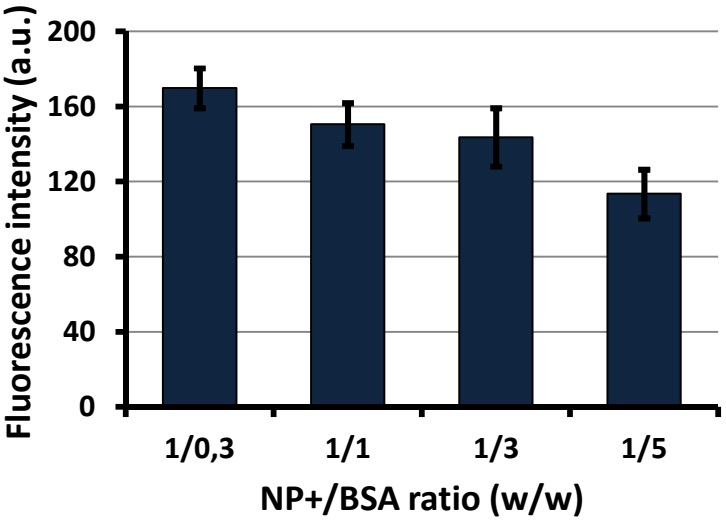


<u>Figure 5:</u> Effect of FBS and BSA on nanoparticles endocytosis

A



B



Conclusion

Notre étude montre que les NP^+ ne sont ni cytotoxiques ni génotoxiques sur les cellules épithéliales bronchiques humaines, même à des concentrations très élevées non réalistes in vivo. L'étude révèle également un effet protecteur du sérum sur la survie cellulaire et la génotoxité des cellules 16HBE. Par ailleurs, le sérum est capable de modifier les caractéristiques physicochimiques des NP^+ (charge de surface) ce qui se traduit par une diminution de leur endocytose. Cette étude souligne également l'importance de mettre au point des méthodologies adaptées à l'étude de la toxicité des nanoparticules sur les épithéliums respiratoires. Les résultats montrent en effet que les conditions expérimentales et notamment la composition du milieu de culture peut significativement modifier l'interaction des nanoparticules avec les cellules. Dans le cas du sérum, cet effet s'explique par la fixation des protéines sériques sur les nanoparticules, entraînant une modification de leurs caractéristiques physicochimiques et donc de leur interaction avec les cellules respiratoires (endocytose, toxicité). Ces résultats confirment l'importance des conditions expérimentales sur l'évaluation de la toxicité des nanoparticules.

CHAPITRE 3

DELIVRANCE DE PROTEINES

Présentation de l'étude

Dans ce chapitre, nous avons évalué le potentiel des NP^+ comme vecteurs intracellulaires de protéines dans les voies respiratoires. Ces nanoparticules ont montré leur capacité comme vecteurs de protéines pour de nombreuses applications in vivo. Cependant, les mécanismes impliqués à l'échelle cellulaire sont encore mal connus. Dans ce travail, nous nous proposons d'étudier et de décrire les mécanismes mis en jeu dans le transport et la délivrance intracellulaire de protéines par les nanoparticules. Pour cela, nous avons également étudié des nanoparticules $DGNP^+$ qui sont une forme modifiée de NP^+ dans laquelle a été inséré un cœur lipidique anionique à base de DPPG. L'utilisation des $DGNP^+$ nous permettra d'étudier l'importance de la structure interne des nanoparticules (hydrophobicité, charge anionique) sur l'association et la libération intracellulaire de protéines. Dans un premier temps, nous avons étudié l'endocytose des deux types de nanoparticules par les cellules épithéliales bronchiques humaines et la localisation de ces nanoparticules dans les cellules. Nous avons étudié la capacité des nanoparticules à associer de l'ovalbumine dans différentes conditions, et l'influence sur leurs caractéristiques physicochimiques. Enfin, nous avons étudié la délivrance intracellulaire d'ovalbumine, les sites de libération et le devenir des nanoparticules et des protéines après libération. Pour chacune de ces études, l'utilisation des deux types de nanoparticules (NP^+ et $DGNP^+$) nous a permis d'étudier l'importance de la structure interne des nanoparticules sur les mécanismes impliqués.

Influence of surface charge and inner composition of nanoparticles on intracellular delivery of proteins in airway epithelial cells

Christophe Dombu, Rodolphe Carpentier, Didier Betbeder*

EA4483, IMPRT, IFR 114, Faculté de médecine pôle recherche, Université de Lille Nord de France, 1 place Verdun, 59000 Lille, France

* Corresponding author:

E-mail address: didier.betbeder@univ-lille2.fr

Phone number: + (33) 320 62 68 83

Fax number: + (33) 320 62 69 93

ABSTRACT

The delivery of protein in the airway using nanoparticles (NP) is an emerging strategy that shows encouraging results *in vivo* for several applications. However, the mechanisms by which NP deliver proteins to the inside of cells remain poorly understood. In this study, we investigated the intracellular delivery of ovalbumin (OVA) in human airway cells by two porous cationic polysaccharides nanoparticles. These NP have the same surface charge density but differ in that their inner core contains either cationic or anionic charges (respectively: NP^+ and $DGNP^+$). Confocal microscopy showed a rapid uptake of both NP by human airway cells, followed by a significant accumulation in clathrin vesicles and early endosomes. Both NP were found to associate OVA in a quantitative manner, and this association was stable even in presence of serum proteins. We observed that the two NP greatly increased OVA uptake by human airway cells, meanwhile FRET studies using FITC-labeled NP and TRITC-labeled OVA showed a gradual release of OVA from NP within cells, and this was much faster with $DGNP^+$ than NP^+. These results were confirmed using OVA-DQ to follow OVA degradation fragments within cells. Both NP increased intracellular proteolysis of OVA, however $DGNP^+$ facilitated OVA escape from endosomes. Studies with trypsin and pepsin at different pH strongly suggested that both NP can protect (in the extracellular medium) or promote (in acidic endosomes) protein proteolysis, depending on the environment. Interestingly, the mechanisms involved could be explained as a function of protein global charge at different pH. All these results confirm the importance of not only the surface charge but also the inner composition of NP in determining their efficacy as tools for the delivery of proteins to different cellular compartments.

KEYWORDS: porous nanoparticle; endocytosis; protein delivery; airway epithelium; cell trafficking

1. Introduction

The strategy of employing nanoparticles (NP) to administer drugs via the respiratory tract is receiving significant attention as an alternative to the more common oral or intravenous methods. Indeed, delivery via the airway is an easily accessible and non-invasive route of drug administration which allows molecules to avoid the first-pass effect in the liver and/or gut. Moreover, the respiratory tract constitutes a very large surface for drug absorption, with a vast underlying vascularization, a relatively thin epithelial barrier and a low proteolysis activity compared to other administration routes [1]. All these characteristics make the airway potentially suitable for both local and systemic delivery. However, the airway's mucosa also constitutes a tight, selective barrier which complicates the delivery of macromolecules. Nanoparticles have a proven ability to overcome this barrier by passing through the mucus and strongly interacting with airway epithelial cells. The association of drug molecules with NP is therefore a promising strategy for efficient drug delivery via this route. Nanoparticles as protein carriers are expected to provide many advantages such as improved protein stability, protection from proteases, cell targeting, deeper airway deposition, and higher uptake and bioavailability [2, 3]. However, the mechanisms involved in NP interactions with airway epithelial cells, their endocytosis and their ability to deliver proteins within cells still remain unknown. We recently developed porous nanoparticles with different inner core compositions, and found that they were able to be loaded with large amounts of proteins, and are thus interested in evaluating their behavior after mucosal administration [4].

The aim of this study was to characterize the mechanisms of endocytosis and protein delivery of two cationic nanoparticles that differ in their inner core composition and hence evaluate their potential as drug delivery systems.

1. Materials and methods

1.1 Materials

Maltodextrin was purchased from Roquette (Roquette, France), NaBH4 from Acros Organics and DPPG (1,2-dipalmitoyl-snglycero-3-phosphatidylglycerol) from Lipoid (Germany). Epichlorhydrin (1-chloro-2, 3-epoxypropane), PFA (paraformaldehyde), FITC (5-[4,6-dichlorotriazin-2-yl] amino) fluorescein, TRITC (tetramethyl rhodamine isothiocyanate), chloroquin, trypsin, pepsin, ovalbumin and DQ-ovalbumin were purchased from Sigma Aldrich. DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole), DiI (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate), GTMA (Glycidyl-trimethyl-ammonium chloride), lysotracker red DND, triton-X100, DMEM, PBS (Phosphate buffered Saline), rat tail type I Collagen, calf foetal serum, Penicillin/Streptomycin antibiotics mixture and L-glutamine were purchased from Invitrogen-Life Technologies. Mouse primary antibodies to LAMP-1 and CD63, rabbit primary antibodies to GP130 and Calnexin were from Ozyme. Secondary anti-mouse and anti-rabbit antibodies coupled with Alexa Fluor 555 were from Molecular probe (Invitrogen, France). The Human bronchial epithelial cell line 16HBE14o- (16HBE) was obtained from Dr. Gruenert D.C. (Colchester, Vermont, USA).

1.2 Preparation and characterization of polysaccharides cationic nanoparticles

Polysaccharide cationic nanoparticles (NP^+) were prepared from maltodextrin as described previously [4, 5]. Briefly, 100g of maltodextrin were dissolved in 2N sodium hydroxide with magnetic stirring at room temperature. Addition to the crude mixture of epichlorhydrin and GTMA (cationic ligand) yielded cationic polysaccharide gel. The gel was then neutralized with acetic acid and crushed with a high pressure homogenizer (Emulsiflex C3, France). The NP^+ thus obtained were purified by tangential flow ultra-filtration (Centramate Minim II, PALL, France) using a 300 kDa membrane (PALL, France) to remove oligosaccharides, low-molecular weight reagents and salts. Whenever necessary, NP^+ labelling was achieved by covalently binding FITC to the polysaccharide core [6]. These labelled particles were washed and purified by tangential flow ultra-filtration (Centramate Minim II, PALL, France) using a 100kDa membrane (PALL, France) with demineralised water until no free marker was detected in the ultra-filtrate. The labelled NP^+ (1mg/ml) were stored in sterile tubes after filtration through a 0.2µm filter.

$DGNP^+$ are NP^+ with anionic phospholipids incorporated in their core. They were prepared by mixing NP^+ and DPPG above the gel-to-liquid phase transition temperature of the phospholipid [7]. Polysaccharide and phospholipid concentrations were 10 and 7mg/ml, respectively. The fluorescent labelling of $DGNP^+$ was performed by mixing $DGNP^+$ with 1% (DiI/lipid; w/w). The labeled $DGNP^+$ were further purified by gel permeation chromatography on a PD10 Sephadex desalting column (GE healthcare).

1.3 Size and zeta potential measurements

The average hydrodynamic diameter of NP was measured by dynamic light scattering and the zeta potential was measured in 15mM NaCl by photon correlation spectroscopy using the Malvern nanoZS (Malvern Instruments, France). Three measurements were carried out in order to ensure the reproducibility of the results.

1.4 Labelling of ovalbumin with a fluorescent probe

To label ovalbumin, 20µl of FITC or TRITC (50mg/ml in DMSO) were added to 10mg of ovalbumin solubilised in 2ml of 0.1M bicarbonate buffer, and the solution was mixed for 5 hours in the dark at room temperature. The preparation was filtered by gel filtration on a PD-10 Sephadex desalting column. Repeated gel filtration was performed to assess the total elimination of free FITC.

1.5 Characterization of ovalbumin binding to NP

Fluorescent ovalbumin (FITC-OVA) (original concentration = 1mg/ml) and NP (original concentration = 5mg/ml) were mixed under gentle stirring in PBS for 10min at room temperature, at the ratio of NP/OVA (3/1, w/w). In order to determine the percentage of ovalbumin associated to nanoparticles, the preparation was filtered twice on 100K Nanosep® device (Pall Life Sciences), and the fluorescence intensity was measured in the filtrate. The percentage of association was calculated as a percentage of total fluorescence obtained from filtration of FITC-OVA alone. Experiments were performed in triplicate and the values presented below represent the mean measurement obtained from the three experiments.

1.6 Cell culture

16HBE cells (Passage 9 to 19) were seeded on 8-well glass chamber slides (LabTek® II, Thermo Scientific Nunc Lab, UK) at a density of 3×10^5 cells per well (0.8cm²). Chamber slides were previously coated with a mixture of collagen and fibronectin (4/1: v/v), and cells were incubated at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere in DMEM complete medium (DMEM supplemented with 10% decomplemented FCS, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml streptomycin and 1 % L-glutamine). The medium was renewed every other day and after 3-4 days of culture, the cells were confluent with a density of about $1x10^6$ cells per wells (0.8cm²).

1.7 Immune labelling of endosomes

Intracellular localization of NP was investigated in 16HBE cells using immune labelling of organelles. Cells were incubated 30min at 37°C with 10µg of fluorescent-NP (NP^+FITC or $DGNP^+$DiI) diluted in 0.4ml PBS, then washed twice with PBS and fixed for 10min at room temperature with 200µl of 4% PFA. For immune labelling, cells were permeabilized for 10 min with 3% triton X100 (in PBS), saturated with PBS containing 0.1% saponin and 2% FCS, then incubated with specific primary antibodies (dilution : 1/100) against: early endosomes (EEA1), late endosomes and multi-vesicular bodies (CD63), lysosomes (LAMP-1), endoplasmic reticulum (calnexin) or cis-golgi (GP130). After 2h of incubation, cells were washed and incubated for 2 hours in darkness with secondary antibodies coupled with Alexa Fluor 555 diluted to 1/400. Finally, cells were washed and nuclei were labelled with DAPI (dilution 1/1000 in PBS for 10min).

1.8 Delivery of ovalbumin by NP

Ovalbumin (OVA) was associated to NP at the NP/OVA ratio of (3/1, w/w) as described above. Different types of fluorescent ovalbumin were used: FITC-OVA, TRITC-OVA and DQ-OVA. Cells were washed twice and incubated at 37°C for 3, 30 or 120min, with 10µg NP/OVA in 0.4 ml PBS per well (corresponding to 10µg of NP and 3µg of OVA per well). Cells were then washed twice, fixed with 4% PFA and nuclei were labelled with DAPI (1/1000 in PBS for 10min). Finally, slides were mounted on glass microscope slides with glycerol (50% in PBS) before confocal microscopy study.

1.9 Study of intracellular Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

In order to investigate NP and ovalbumin separation inside cells, we used FITC coupled with NP (FITC-NP) and TRITC coupled with OVA (TRITC-OVA) as donor and acceptor fluorescent probes (respectively) for FRET. Cells were washed twice with PBS and incubated for different times at 37°C with NP/OVA formulation. After incubation, cells were washed twice with PBS, fixed with 4% PFA then slides were mounted on glass microscope slides with glycerol. Cells were visualized under a Zeiss LSM 710 (confocal microscope, Zeiss, France). Control settings were performed on a microscope with each fluorophore (FITC: λ_{ex}=488nm, λ_{em}=538nm; TRITC: λ_{ex}=540nm, λ_{em}=580nm) to verify that emission spectra were not overlapping. We used cells incubated with double labelled-NP (TRITC-FITC-NP) as a positive control to set FRET excitation and emission wavelengths (FRET: $\lambda_{ex(FITC)}$=488nm, $\lambda_{em(TRITC)}$=580nm), and cells incubated separately with FITC-NP and with TRITC-NP as negative

controls. Finally, cells incubated with FITC-NP/TRITC-OVA formulations were observed under confocal microscopy and photographed with a magnification of 40x, at $\lambda_{ex(FITC)}$=488nm, $\lambda_{em(TRITC)}$=580nm. Eight confocal slices were taken every 4 µm from the apical to the basal side of the cells (corresponding to a total height of 28µm in cells), and z-stacked to one image. Experiments were performed in quadruplet and fluorescence intensities were measured from z-stacked images using the software SigmaScan Pro 5 (Systat software, Inc.).

1.10 DQ-OVA degradation in presence of proteases

In order to investigate the proteolysis of OVA associated or not with NP, 10µg NP/DQ-OVA (3/1, w/w) were diluted in 200ml of PBS (150mM; pH 7.2) and disposed in a 96 MicroWell™ Plates (Nunc, US). For trypsin treatment, 50µl of trypsin (0.2mg/ml in PBS) was added to each well and the plate was incubated for 120min at 37°C in a microplate fluorometer (Fluoroscan Ascent, Thermo Scientific, France) and fluorescence from DQ-OVA hydrolysis was measured (λ_{ex}=488nm, λ_{em}=527nm) at different incubation times. For pepsin treatment, the same experiment was performed using 50µl of enzyme (0.2mg/ml) in acetate buffer (150mM; pH 4.5). Experiments were performed in triplicate and the fluorescence values presented below represent the mean fluorescence intensities of each condition.

1.11 Treatment with chloroquin

In order to investigate whether the degradation of DQ-OVA was performed in acidic endosomes, the cells were first incubated for 30 minutes at 37°C with 50µM chloroquin. 16HBE cells were then incubated for 30min at 37°C with 0.4ml PBS containing 3µg of DQ-OVA, associated or not to NP (3/1, w/w). The cells were finally washed, fixed and the nuclei stained with DAPI.

1.12 Confocal microscopy and data analysis

The glass chamber slides were mounted with glycerol and photographed under a fluorescence confocal microscope (Zeiss LSM710, Zeiss, France). All experiments were performed in quadruplicate and four pictures of each condition were taken in random fields of the slides (about 100 cells per field). The fluorescence intensity of each picture was measured using the SigmaScan Pro 5 software (Systat software, Inc.).

2. Results

2.1 Characterization of NP^+ and $DGNP^+$

A schematic representation of NP^+ and $DGNP^+$ nanoparticles is given figure 1. NP^+ are made of porous cationic nanoparticles and lipids are inserted into NP^+ to produce $DGNP^+$. The mean diameters of NP^+ and $DGNP^+$ were 61 and 63nm and their poly-dispersity indices were 0.21 and 0.19, respectively (Table 1). They were both highly cationic as their zeta potentials were +25 and +21.7mV, respectively. These measurements show that the insertion of the anionic phospholipids into the NP^+ core did not significantly modify their size and their zeta potential, suggesting that these lipids were inserted into their core [4].

2.2 Kinetics of endocytosis of NP^+ and $DGNP^+$

We analyzed the kinetics of endocytosis of NP^+ and $DGNP^+$ in epithelial cells. Interestingly, even if both NP have the same size and surface charge, we observed that the kinetics of endocytosis differed (Figure 2). Indeed, faster uptake and saturation of uptake is observed for NP^+ after 20 minutes of incubation while uptake of $DGNP^+$ was slower and only reached saturation after 60min.

2.3 Intracellular localization of NP

We investigated the NP intracellular localization, after 30min of incubation, by immunofluorescence. Confocal microscopy did not show any co-localization of NP^+ with a marker of late endosomes (LE: CD63), lysosomes (LAMP-1) or in Golgi (GP130) (figure 3). Co-localization was observed with clathrin-coated vesicles and early endosomes. Experiments performed with $DGNP^+$ showed exactly the same results, indicating that the localization of both NP was identical and suggesting that both follow the same intra-cellular traffic (data not shown).

2.4 Intracellular delivery of ovalbumin by NPs

2.4.1 Characterization of NP/OVA formulations

The characterization of OVA binding to NP is given in Table 2. The formulations were made by mixing prepared NP and FITC-OVA in a ratio of 3/1. Binding of OVA to NP was evaluated by measuring fluorescence in eluate after two consecutive filtrations on a 100K Nanosep® membrane. We observed that protein loading did not change NP size or zeta potential suggesting that OVA was successfully inserted into the NP cores. Interestingly, the loading of OVA within both the NP studied here was quantitative at pH 7.2 even when the formulation was mixed with 10% serum. Furthermore, at acidic pH association remained stable (NP^+: 78%, $DGNP^+$: 94%) and only 22 % release was observed with NP^+.

2.4.2 Ovalbumin delivery in cells

We investigated the ability of both NP to deliver ovalbumin into cells. Cells were incubated with NP/FITC-OVA and the quantification of intracellular delivery of FITC-OVA by NP was investigated using confocal microscopy. As shown in figure 4, both NP^+ and $DGNP^+$ efficiently delivered FITC-OVA into cells, even after only 3min of incubation. Furthermore, compared with FITC-OVA alone, after 30min FITC-OVA delivery was at least 20 times higher using both NP. However, despite our observation that intracellular localization of NP^+ and $DGNP^+$ was the same, some qualitative differences in OVA intracellular localization were observed. The FITC-OVA fluorescence pattern appeared punctuated in cells when associated with NP^+, characterizing a vesicular localization. By contrast, the fluorescence pattern of FITC-OVA delivered by $DGNP^+$ appeared as a mix of punctuated and diffuse fluorescence (figure 5). This apparent difference in distribution could suggest that NP^+ delivery is mostly restricted to vesicular compartments while $DGNP^+$ deliver proteins into cytoplasm.

In order to understand the intracellular fate of the NP/OVA formulations, we used Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) analysis using FITC coupled with nanoparticles and TRITC coupled with OVA as FRET based donor-acceptor fluorescence. The emission spectra of the FITC overlaps with the excitation spectra of TRITC, therefore when both fluorescent probes are close enough (<10nm), excitation of FITC (at 488nm) induces emission and energy transfer to TRITC (see figure 6A). As observed in figure 6B, intracellular FRET gradually decreased over time with both NP, showing a progressive release of OVA from the NP. Interestingly, the kinetics of OVA release differed regarding the NP used (figure 6C). Indeed, compared with $DGNP^+$, OVA remains associated to NP^+ for a longer time, and a significant decrease in intracellular FRET was observed after 6h of incubation (figure 6B). On the other hand, this decrease was more accentuated with $DGNP^+$ as a significant fall of FRET was observed as soon as 4h incubation, suggesting that OVA was released faster from $DGNP^+$ (figure 6C). Regardless of the NP used, no plateau in fluorescence was observed after 24 hours of incubation.

3.1. Intracellular degradation of ovalbumin delivered by NP

To evaluate OVA degradation within cells, we used DQ-OVA coupled with NP: DQ-OVA is a modified, self-quenched ovalbumin that exhibits a bright green fluorescence upon proteolytic degradation [9] and is conjugated to BODIPY FL dye (λ_{ex}=505nm, λ_{em}=515nm), a photostable and pH insensitive fluorochrome in a pH range of 3-9. When the degradation fragments of DQ-OVA are accumulated at high concentration in organelles, they form excimers that emit at λ_{em}=622nm (red) by fluorescence resonance energy transfer (FRET). This red fluorescence is therefore characteristic of degraded DQ-OVA entrapped in vesicles. Non-fluorescent NP were associated with DQ-OVA and we performed a kinetic study of DQ-OVA delivery in cells using DQ-OVA associated or not with NP. Confocal microscopy showed that both NP^+ and $DGNP^+$ greatly improved DQ-OVA internalization and degradation in cells (figure 7A, compared with DQ-OVA alone). Indeed, after only 3 minutes, a significant amount of proteins was hydrolyzed within cells. Moreover, while hydrolyzed DQ-OVA delivered by NP^+ appeared more punctuated, it seemed more diffuse when associated with $DGNP^+$. The quantification of DQ-OVA fluorescence at 515nm showed higher fluorescence intensity at 30min

with $DGNP^+$ compared to NP^+, suggesting a faster proteolysis of DQ-OVA when associated with $DGNP^+$. After 120min of incubation, both NP exhibited equivalent amounts of DQ-OVA degradation in cells, suggesting a saturation of the degradation (figure 7B). However, quantification of fluorescence intensity at 622nm showed differences between the NP since OVA-DQ fluorescence observed with $DGNP^+$ was maximal after 30 minutes while keep on increasing with NP^+ (figure 7C).

3.2. Chloroquin treatment

To demonstrate the involvement of acidic endosomes in DQ-OVA degradation, we used chloroquin, an inhibitor of endosomal acidification [10] (Figure 8A). Chloroquin treatment inhibited 70% of OVA-DQ delivered by NP^+ and 75 % of OVA-DQ delivered by $DGNP^+$ (Figure 8B). These results suggest that DQ-OVA is mainly degraded in acidic endosomes.

3.3. Influence of NP association on ovalbumin degradation by proteases

In order to understand whether protein formulation with NP could influence their degradation by proteases, we used DQ-OVA associated or not in NP^+ and $DGNP^+$. Trypsin was used as a model of physiological protease found in the airway mucosa [11] and pepsin as an acidic protease, an homologue to cathepsins which are important proteases in acidic endosomes [12, 13]. Fluorescence intensity of DQ-OVA degradation was measured over time at 37°C. As observed in figure 9A, DQ-OVA alone was more sensitive to trypsin hydrolysis compared to DQ-OVA associated with NP, showing a protective effect of NP toward proteases at pH 7.2. Moreover, this protection was more effective with NP^+ than with $DGNP^+$. In contrast, at acidic pH, formulation of DQ-OVA in NP^+ and $DGNP^+$ highly increased DQ-OVA degradation in the presence of pepsin (figure 9B). Interestingly, NP with an anionic lipid core ($DGNP^+$) exhibited increased OVA degradation, up to 2.5 fold compared with NP^+ and 11 fold compared with free DQ-OVA, after 120min incubation. These findings strongly suggest that both NP can protect or stimulate protein proteolysis, depending on the surrounding conditions.

4. Discussion

In the search for new drugs, protein and peptides are increasingly seen as promising candidates for the development of new therapeutic molecules for several applications, including cancer, diabetes, inflammatory diseases, allergies or vaccines. However, their efficient clinical use remains problematic due to several limitations such as their poor ability to cross biological barriers, poor stability including spatial conformation and proteolysis, and premature clearance by the kidneys. These limitations result in low bioavailability of therapeutic proteins and a short lifespan in blood. Pulmonary administration is a noninvasive route of administration, which allows local and systemic therapies with a rapid onset of action and avoids the first-pass effect [1]. It allows accessing the systemic circulation via a relatively thin epithelium with a relatively high surface area for absorption (75–

150m^2). However, at cellular level, the delivery of large peptides and proteins is generally limited by their macromolecular size which prevents diffusion through membranes, and mostly requires the presence of specific transporters in the plasma membrane [14]. To overcome these difficulties, the use of colloid vectors, especially nanoparticles, is one of the most promising strategies. Indeed it has been shown that the nanoencapsulation of macromolecules in colloidal particles protects them and enhances their transmucosal passage [15, 16]. This property highlights the interest of using colloids to protect proteins against proteolytic degradation [17]. The aim of this work was to evaluate two porous polysaccharide cationic NPs, differing from their inner core, as protein carriers and delivery systems in airway epithelial cells.

We first investigated their endocytosis focusing on their intracellular localization and their ability to deliver proteins in cellular compartments. Nanoparticles of size < 100nm are generally endocytosed via the clathrin or caveolae pathways [18]. Confocal analysis showed that both NP studied here are partially co-localized with clathrin vesicles suggesting an endocytosis via the clathrin pathway (figure 3). This result confirms our previous study where we found that clathrin inhibitors impaired endocytosis of NP$^+$ [8]. Clathrin endocytosis is the most common endocytosis pathway of NP [19]. Interestingly we observed different kinetics of endocytosis between the two NP examined (figure 2). This emphasizes the importance of not only the surface charge but also the composition of the inner core of the NP in determining not only the extent, but also the mechanism of endocytosis. In general, after detachment of the clathrin-coated vesicles from plasma membrane, the resulting vesicles referred to as pinosomes deliver their cargo to early endosomes and then to multivesicular bodies, late endosomes and finally to lysosomes [20]. Interestingly after 30 minutes of incubation, NP$^+$ appeared as punctuated forms characterizing endosomal localization. However, experiments with immune labeling did not show any co-localization with the endoplasmic reticulum, the golgi apparatus, the late endosomes and even the lysosomes. These results suggest that these NP can escape the lysosomal degradation pathway (figure 3). Intracellular delivery of ovalbumin using both NP was highly efficient (figure 4). However, the mechanisms involved seem to be different between the NP: while the distribution pattern of OVA delivered by NP$^+$ appeared punctuated in cells, characterizing endosomal localization, OVA delivered with DGNP$^+$ was diffused throughout the cytoplasm (figure 5). This observation was further confirmed by FRET studies that demonstrated an accumulation of delivered proteins in vesicular compartments with NP$^+$ (increase of 622nm FRET, figure 7C) while DGNP$^+$ appeared more efficient in the delivery of proteins (faster decrease of FRET, figure 6).

We then addressed the stability of endocytosed proteins carried by nanoparticles. We used OVA-DQ, a non-fluorescent protein which turns fluorescent after proteolytic degradation [21]. We observed that NP protected OVA-DQ from degradation at pH 7.2 while promoting its degradation at acidic pH 4.5 (figure 9). This could be explained by the isoelectric point (pI) of the different proteins of the experiment, namely OVA (pI=4.7) and the representative proteases (trypsin: pI=10.6, pepsin: pI=3.2) (figure 10). At physiological pH, OVA is anionic and is attracted to the core of the cationic nanoparticles (stable zeta potential, Tables 1 and 2). In addition, trypsin is cationic at physiological pH, leading to electrostatic repulsions with cationic nanoparticles, and further protecting OVA from surrounding proteases. It is noteworthy that differences observed between the NP could be explained by the anionic lipidic core of DGNP$^+$ that either could interact with cationic trypsin to increase OVA degradation, or could impair OVA-DGNP$^+$ interactions (figure 9A). At acidic pH 4.5, behavior was very different (figure 9B): OVA has reached its pI meaning it is globally neutral, perhaps

weakening OVA-NP interactions, while on the other hand pepsin, a representative acidic protease, is anionic and interacts readily with the NP. Hence, more acidic conditions potentially favor OVA-protease interactions and the subsequent degradation of OVA. The double ionicity of DGNP+ (cationic nanoparticles with anionic lipidic core) could help NP-OVA interactions explaining higher degradation rate with DGNP+ than with NP+ (figure 9B). This property could be exploited to efficiently deliver therapeutic peptides obtained from proteins.

5. Conclusion

In summary, we observed that surface charge and inner composition of NP have an important role in protein delivery within epithelial cell compartments. Final location of the delivered protein appears to be dependent upon the inner core composition. NP^+ delivered proteins to the vesicular compartment whereas $DGNP^+$ favored a weak endosomal escape of the loaded protein. Interestingly, both NP appeared able to protect loaded proteins from proteolytic degradation at physiological pH (either outside cells or in cytoplasm), while they appeared to promote their degradation under acidic conditions. These results describe for the first time the influence of the NP inner core composition on intra-cellular protein degradation and delivery.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Meryem Tardivel from the BioImaging CEnter of Lille (BICEL) for confocal imaging. We also thank Philippe Gosset for his advice and Mike Howsam for checking the English.

REFERENCES

1. Agu RU, Ugwoke MI, Armand M, Kinget R, Verbeke N. The lung as a route for systemic delivery of therapeutic proteins and peptides. Respir Res 2001;2:198-209.

2. Dandekar P, Venkataraman C, Mehra A. Pulmonary targeting of nanoparticle drug matrices. J Aerosol Med Pulm Drug Deliv 2010; 23:343-53.

3. Klingler C, Müller BW, Steckel H. Insulin-micro- and nanoparticles for pulmonary delivery. Int J Pharm 2009;377:173-9.

4. Paillard A, Passirani C, Saulnier P, Kroubi M, Garcion E, Benoit JP, et al. Positively-charged, porous, polysaccharide nanoparticles loaded with anionic molecules behave as 'stealth' cationic nanocarriers. Pharm Res 2007;27:126-133.

5. Major M, Prieur E, Tocanne JF, Betbeder D, Sautereau AM. Characterization and phase behaviour of phospholipid bilayers adsorbed on spherical polysaccharidic nanoparticles. Biochim Biophys Acta 1997;1327:32-40

6. Prieur E, Betbeder D, Niedergang F, Major M, Alcover A, Davignon JL, et al. Combination of human cytomegalovirus recombinant immediate-early protein (IE1) with 80 nm cationic biovectors: protection from proteolysis and potentiation of presentation to CD4+ T-cell clones in vitro. Vaccine 1996;14:511-520.

7. Woodle MC, Papahadjopoulos D. Liposome preparation and size characterization. Methods Enzymol 1989;171:193-217.

8. Dombu CY, Kroubi M, Zibouche R, Matran R, Betbeder D. Characterization of endocytosis and exocytosis of cationic nanoparticles in airway epithelium cells. Nanotechnology 2010;21:355102.

9. Daro E, Pulendran B, Brasel K, Teepe M, Pettit D, Lynch DH, et al. Polyethylene glycol-modified GM-CSF expands CD11b (high) CD11c (high) but not CD11b (low) CD11c (high) murine dendritic cells in vivo: a comparative analysis with Flt3 ligand. J Immunol 2000;165:49-58.

10. Djehiche B, Segalen J, Chambon Y. Inhibition of autophagy of fetal rabbit gonoducts by puromycin, tunicamycin and chloroquin in organ culture. Tissue Cell 1996;28:115-21.

11. Chokki M, Yamamura S, Eguchi H, Masegi T, Horiuchi H, Tanabe H, et al. Human airway trypsin-like protease increases mucin gene expression in airway epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol 2004;30:470-8.

12. Turk B, Turk D, Turk V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. Biochim Biophys Acta 2000;1477:98-111.

13. Fruton JS. A history of pepsin and related enzymes. Q Rev Biol 2002;77:127-47.

14. Tan ML, Choong PF, and Dass CR. Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery. Peptides 2010;31:184-93.

15. Mathiowitz E, Jacob JS, Jong YS, Carino GP, Chickering DE, Chaturvedi P, et al. Biologically erodable microspheres as potential oral drug delivery systems. Nature 1997;386:410-4.

16. Tobío M, Gref R, Sánchez A, Langer R, Alonso MJ. Stealth PLA-PEG nanoparticles as protein carriers for nasal administration. Pharm Res 1998;15:270-5.

17. Simone EA, Dziubla TD, Colon-Gonzalez F, Discher DE, Muzykantov VR. Effect of polymer amphiphilicity on loading of a therapeutic enzyme into protective filamentous and spherical polymer nanocarriers. Biomacromolecules 2007;8:3914-21.

18. Canton I, Battaglia G. Endocytosis at the nanoscale. Chem Soc Rev 2012;41:2718-39.

19. Sahay G, Alakhova DY, Kabanov AV. Endocytosis of nanomedicines. J Control Release. 2010;145:182-95.

20. Mc Mahon HT and Boucrot E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. Nature Reviews Molecular Cell Biology 2012;517-533.

21. Emil Boonacker E and Cornelis JF Van Noorden CJF. Enzyme cytochemical techniques for metabolic mapping in living cells, with special reference to proteolysis. The Journal of Histochemistry & Cytochemistry 2001;49: 1473-1486.

FIGURES

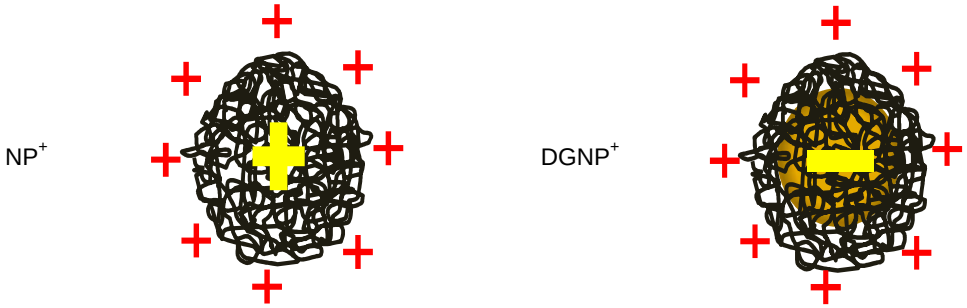


Fig.1. Schematic representation of NP^+ and $DGNP^+$.

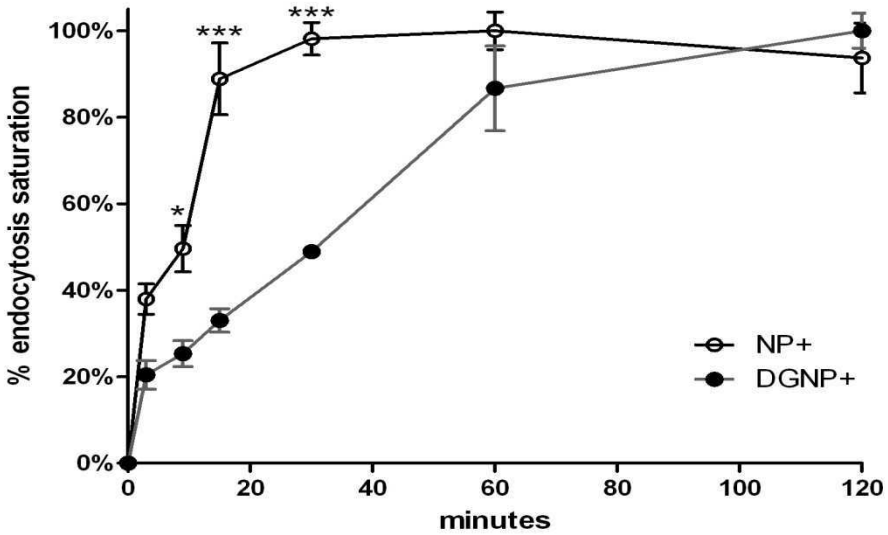


Fig.2. Kinetics of endocytosis of NP^+ and $DGNP^+$ in 16HBE cells.

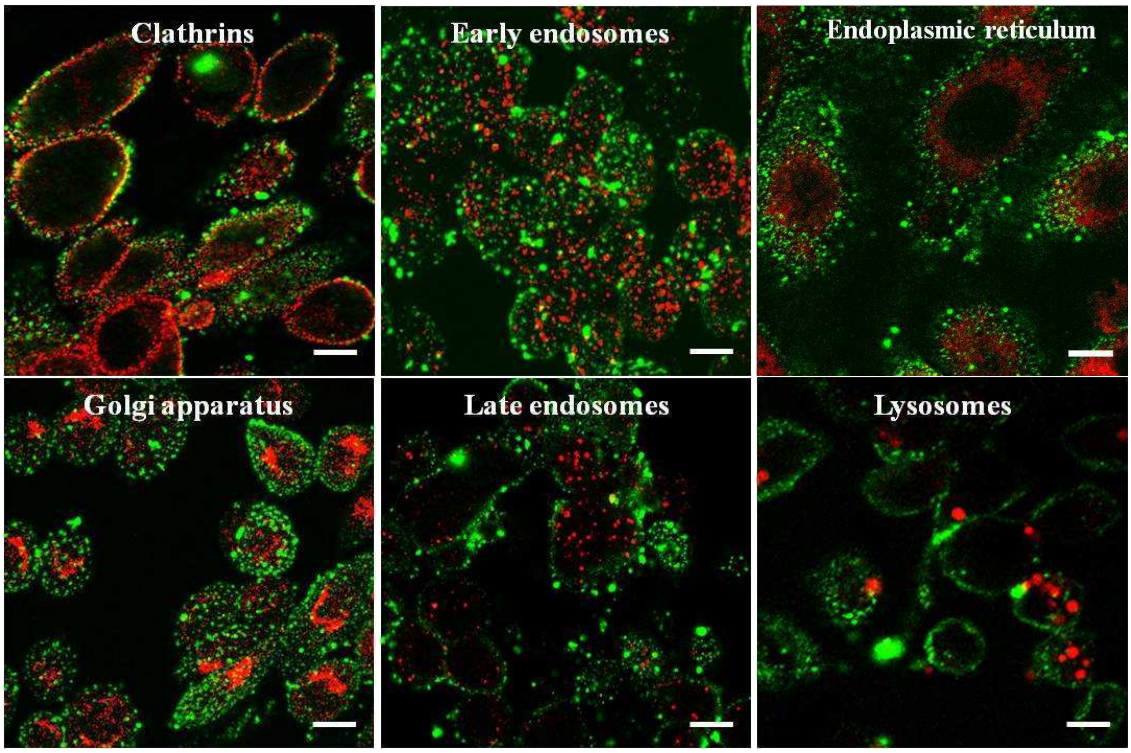


Fig.3. Intracellular localization of NP by immune labeling

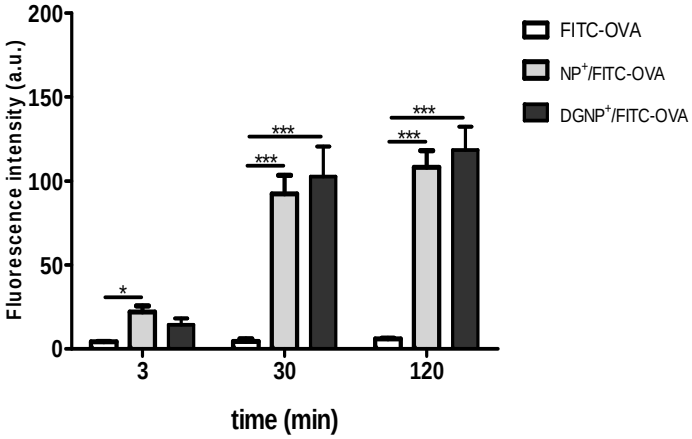


Fig.4. Intracellular delivery of OVA-FITC.

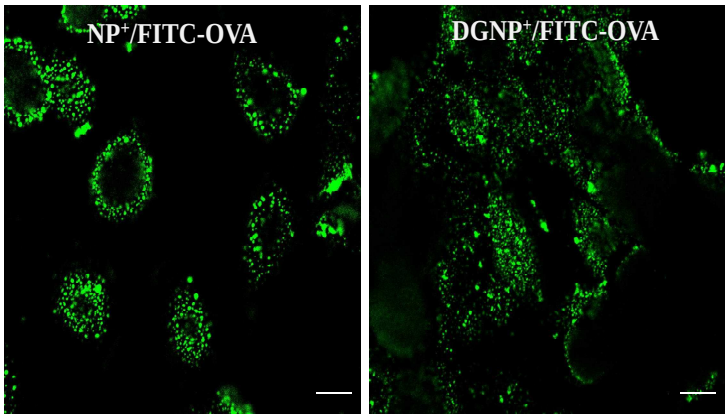
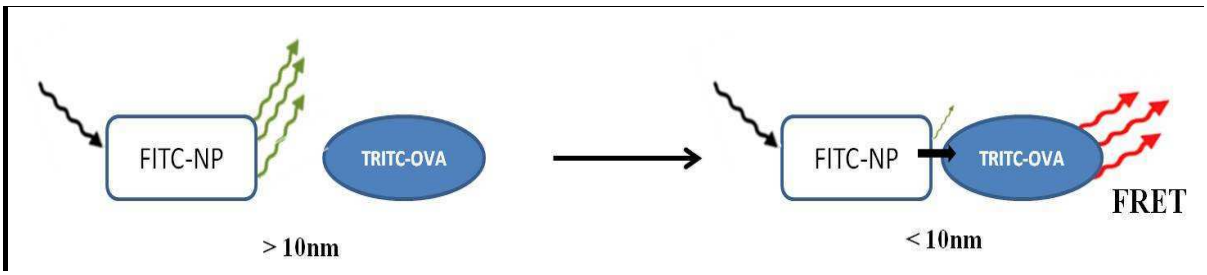
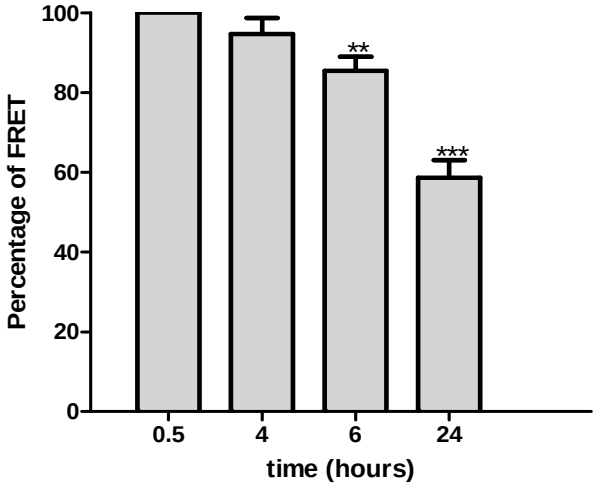


Fig.5. Comparison of ovalbumin intracellular delivery by NP+ and DGNP+ using confocal microscopy.

A



B



C

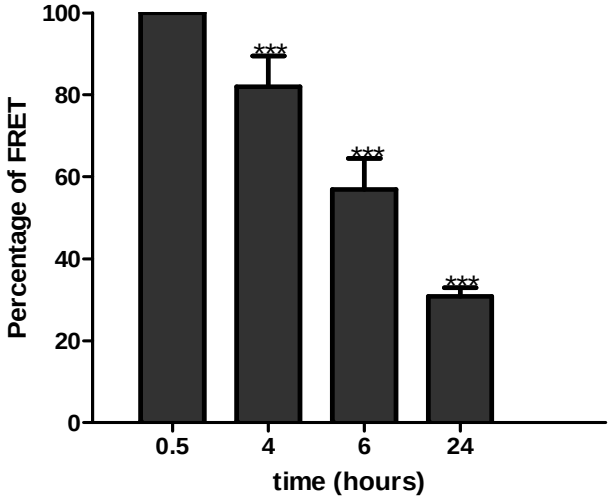
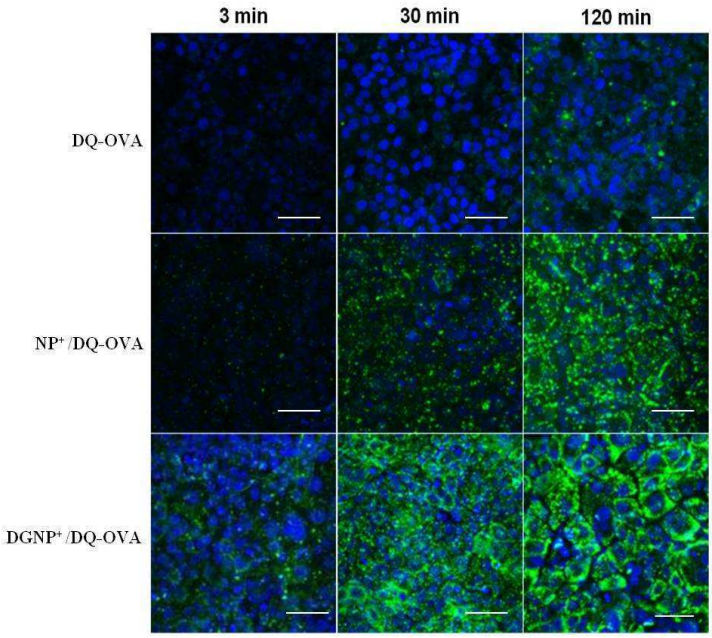
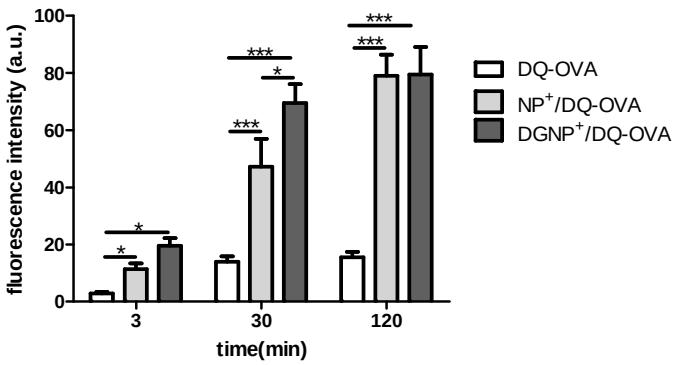


Fig.6. Comparative study of FRET between NP+ and DGNP+ nanoparticles loaded with OVA.

A



B



C

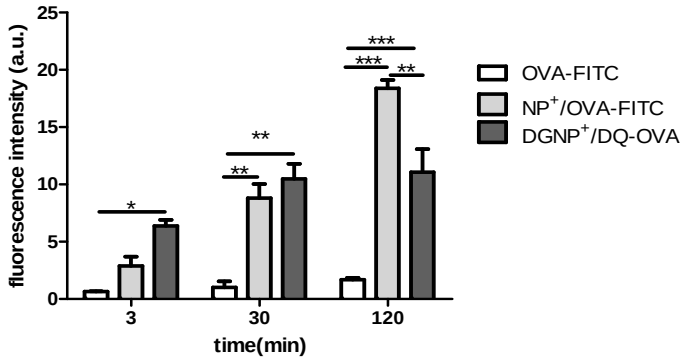
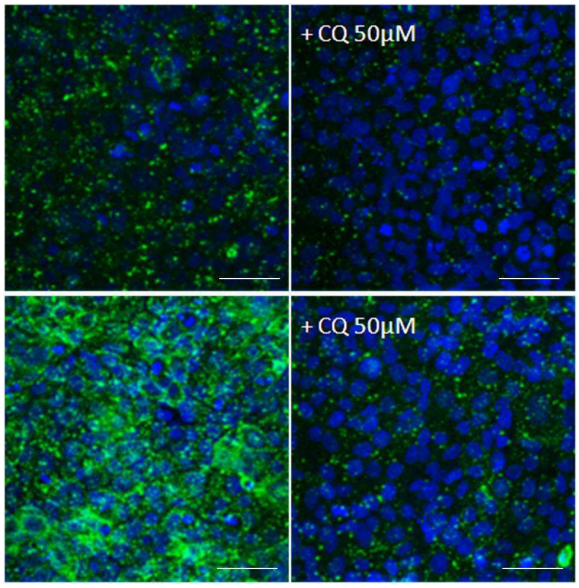


Fig.7. Comparison of intracellular delivery of DQ-OVA by NP+ and DGNP+ using confocal microscopy.

A



B

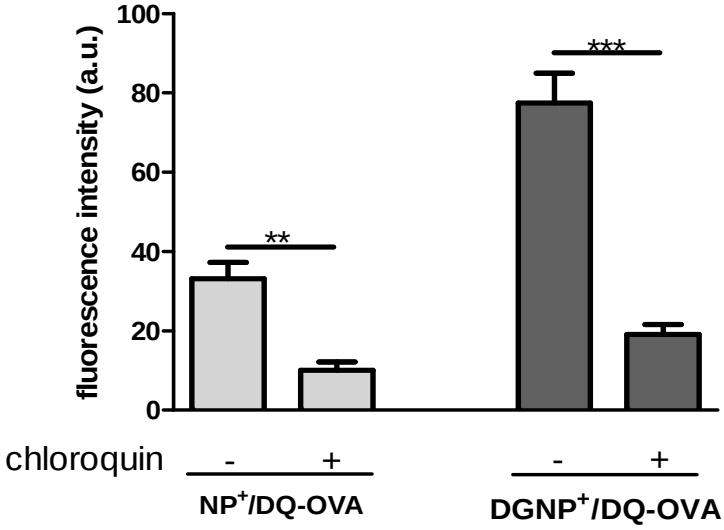
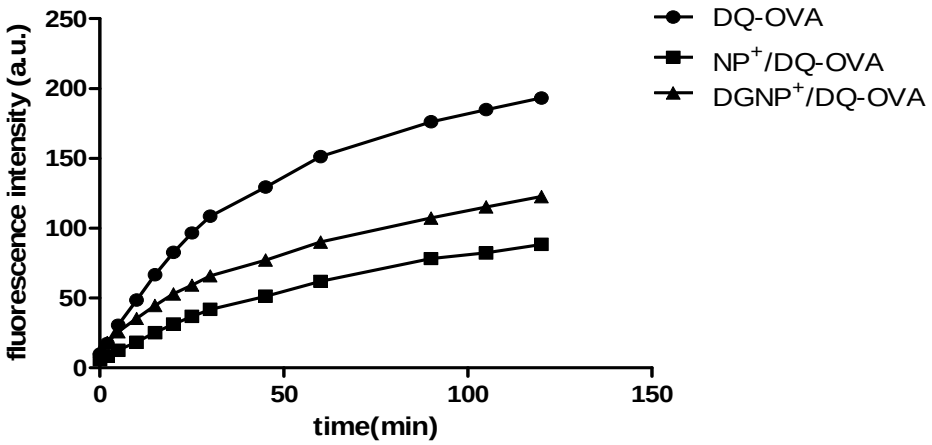


Fig.8. Effect of chloroquin on DQ-OVA delivery and degradation by NP.

A



B

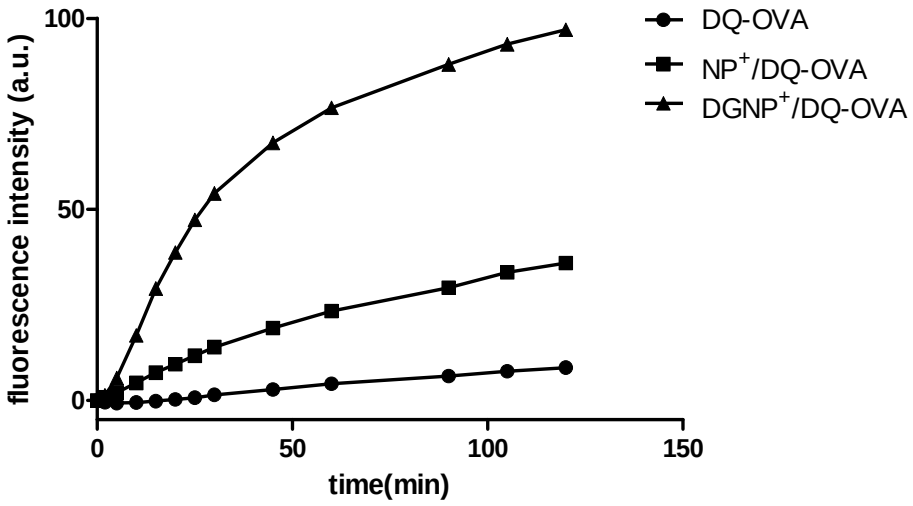


Fig.9. Effect of nanoparticles association on OVA-DQ degradation by proteases.

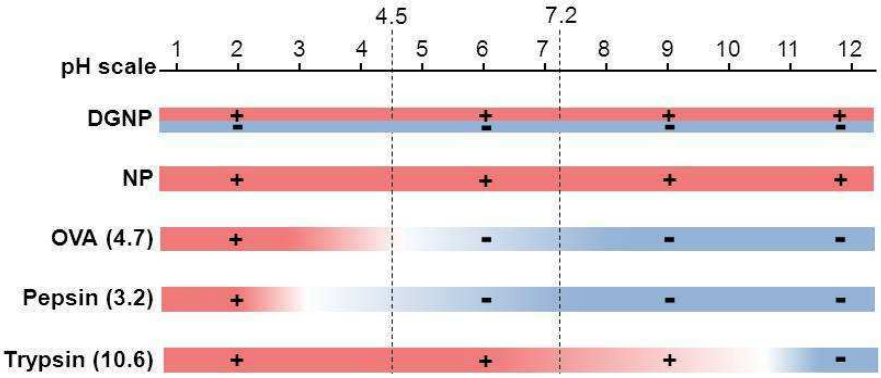


Fig.10. Effect of pH on protein isoelectric point. A: pH 7.0; B: pH 4.5; OVA pI= 4.5 – 4.7; pepsin pI=2.9 – 3.2; trypsin pI = 10.1 – 10.5

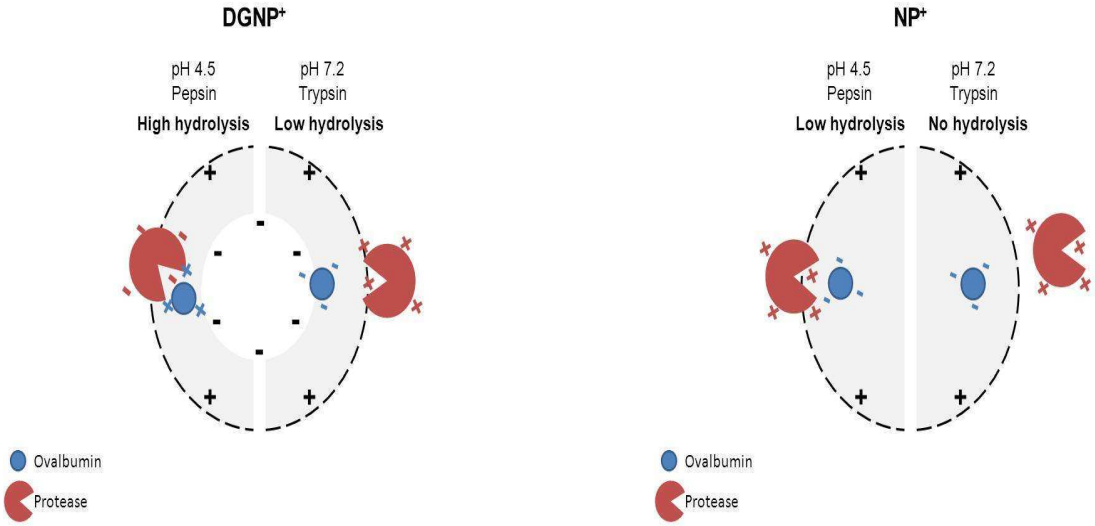


Figure 11 schematic representation of OVA delivery depending on pH

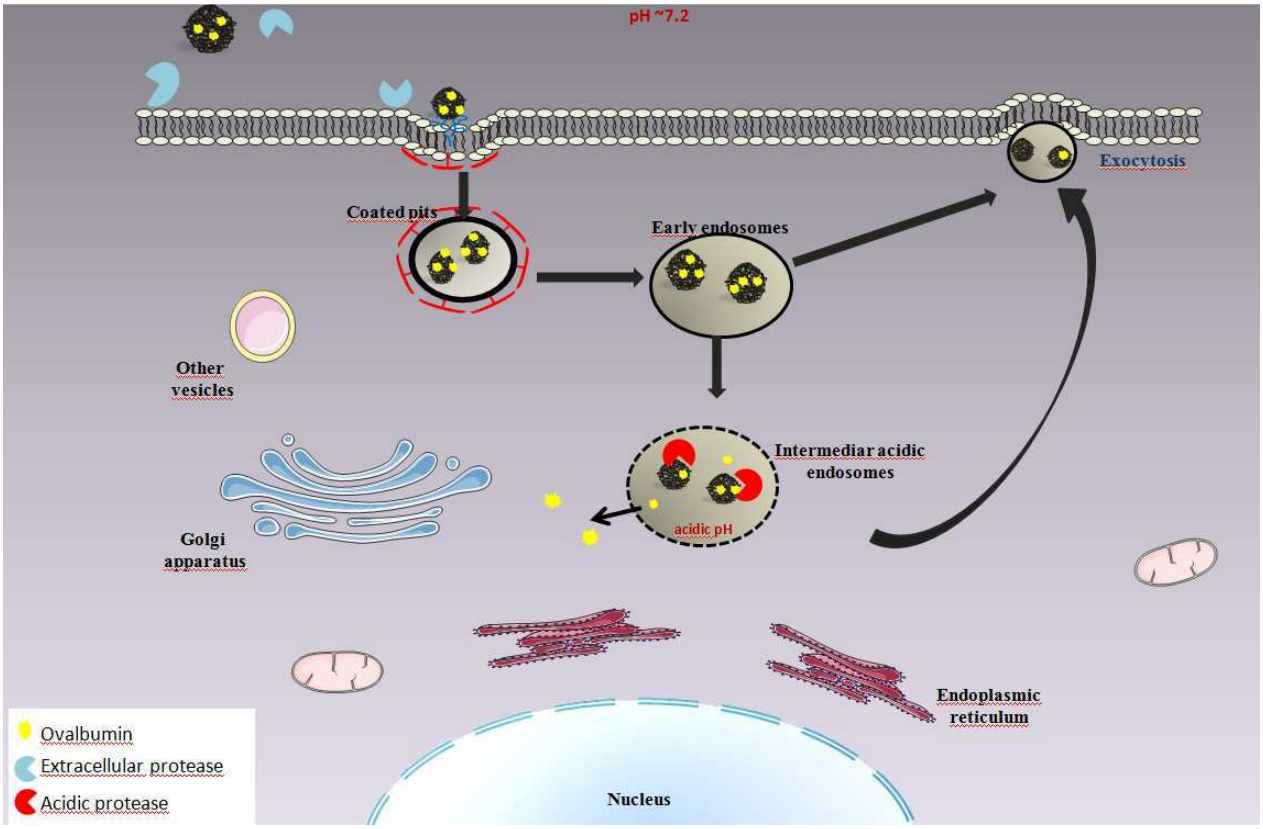


Figure 12: Schematic representation of ovalbumin intracellular delivery by NP^+ and $DGNP^+$

FIGURES CAPTIONS

Fig.1. Schematic representation of NP^+ and $DGNP^+$.

Fig.2. Kinetics of endocytosis saturation of NP in 16HBE cells. Cells were incubated at 37℃ with 10 µg of FITC-NP+ and diI-DGNP+ for 3, 9, 15, 30, 60 and 120 min, washed twice with PBS then fixed with 4% PFA. NP endocytosis was visualized and fluorescence quantified using confocal microscopy. Experiments were performed in quadruplet and error bars represent the standard deviation.

Fig.3. Confocal analysis of the vesicular localization of NP+ or DGNP+ in cells. Cells were incubated for 30 min at 37℃ with 10 µg FITC-NP then fixed with 4% PFA. Specifi ed cell endosomes were immune stained using specific antibodies: AP2 (Clathrin vesicles), EEA1 (early endosomes), CD63 (Late endosomes and multivesicular bodies, L.E.), LAMP-1 (lysosomes), calnexin (endoplasmic reticulum E.R.), and GMP 130 (Cis-golgi). Cells were visualized under confocal microscopy. The secondary antibodies were coupled with Alexa Fluor 555 and the nuclei with DAPI. Scale bar 10 µm.

Fig.4. Intracellular delivery of OVA-FITC. NP+ and DGNP+ were loaded with FITC-OVA (3NP/1OVA) and incubated for different periods with 16HBE cells. After, 3 min, 30 min and 120 min of incubation, cells were washed with PBS and fixed with 4% PAF. Intracellular FITC-OVA was quantified by confocal microscopy (*** $p<0.001$).

Fig.5. Comparison of ovalbumin intracellular delivery by NP+ and DGNP+ using confocal microscopy. NP+ and DGNP+ were loaded with FITC-OVA and incubated for different periods with 16HBE cells. After 30 min incubation, cells were washed with PBS and fixed with 4% PAF. Intracellular FITC-OVA was visualized by confocal microscopy. Scale bar = 10µm.

Fig.6. Comparative study of FRET between NP+ and DGNP+ nanoparticles loaded with OVA. 16 HBE cells were incubated for different periods with NP-FITC/OVA-TRITC or DGNP-FITC/OVA–TRITC: schematic representation of FRET (A). FRET was analyzed at 590 nm after irradiation of NP+ (B) and DGNP+ (C) at 530 nm.

Fig.7. Comparison of intracellular delivery of DQ-OVA by NP+ and DGNP+ using confocal microscopy. 16HBE cells were incubated for 3, 30 and 120 min with 3µg DQ-OVA associated or not with non fluorescent NP+ and DGNP+. Fluorescence intensities of degraded DQ-OVA in cells were observed (A) and measured at 515 nm (A and B) and 622 nm (C) using confocal microscopy. Scale bar= 10 µm (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

Fig.8. Effect of chloroquin on DQ-OVA degradation. Cells were pre-incubated 30 min at 37℃ with 50 µM chloroquin then incubated for 30 min with NP/DQ-OVA (10 µg NP containing 3 µg DQ-OVA). The degradation of DQ-OVA was observed by confocal microscopy (A) and quantified at 515nm (B). Scale bar= 10µm (** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

Fig.9. Effect of NP association on OVA-DQ degradation by proteases. NP+ and DGNP+ loaded with DQ-OVA were incubated at 37°C in presence of trypsin at pH 7.2 (A) or pepsin (B) at pH 4.5. DQ-OVA degradation was quantified at 530 nm.

Fig.10. Effect of pH on protein isoelectric point. A: pH 7.0; B: pH 4.5; OVA pI= 4.5 – 4.7; pepsin pI=2.9 – 3.2; trypsin pI = 10.1 – 10.5

Figure 11: Schematic representation of ovalbumin intracellular delivery by NP^+ and $DGNP^+$.

TABLES

Table 1

Characterization of NP

	Size (Mean)	PDI	Zeta potential	Lipid (DPPG)	Structure
NP^+	61nm	0.21	+25 mV	0%	Porous nanosphere
$DGNP^+$	63nm	0.19	+24 mV	70%	Porous nanosphere with lipid core

Table 2

Characterization of NP/OVA formulations

	Characterization				Percentage of association (%)		
	NP/OVA (*w/w*)	Size	PdI	Zeta potential	pH 7.2	Serum	pH 4.5
NP^+	3/1	60nm	0.15	+25 mV	100	100	78
$DGNP^+$	3/1	61nm	0.17	+23 mV	100	100	94

Conclusion

Cette étude souligne l'importance des caractéristiques physicochimiques des nanoparticules pour la vectorisation intracellulaire de protéines. Les résultats montrent que les deux particules pénètrent massivement dans les cellules tout en échappant à l'adressage lysosomal. L'étude de l'association avec les protéines montre que les deux nanoparticules associent de façon quantitative les protéines, et cette association reste stable même en présence de protéines du sérum. Les études de délivrance intracellulaire d'ovalbumine montrent que ces nanoparticules sont capables de protéger les protéines de l'action des protéases du milieu extracellulaire, tout en favorisant leur dégradation intracellulaire au niveau des compartiments acides. Nos résultats suggèrent qu'en modifiant la structure interne des nanoparticules par incorporation d'un phospholipide anionique ($DGNP^+$), nous augmentons la protéolyse dans les endosomes acides et l'échappement des protéines vers le cytosol. Ces résultats démontrent que la structure interne des nanoparticules poreuses influence significativement les mécanismes d'association, de transport et de la délivrance intracellulaire de protéines.

PARTIE IV

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

Le choix du modele cellulaire

Etudier *in vitro* l'interaction des nanoparticules avec les épithéliums des voies respiratoires (VR) nécessite la mise au point de méthodologies fiables, prédictives et reproductibles, adaptées aux nanoparticules. Les conditions expérimentales définies ainsi que le modèle cellulaire choisi doivent pouvoir être prédictifs d'une exposition réelle chez l'homme. Bien qu'intéressante, l'utilisation de cultures primaires d'épithéliums respiratoires pose des problèmes de reproductibilité et de stabilité. Par ailleurs, les VR sont composées de plusieurs types cellulaires aux caractéristiques spécifiques et aux proportions variables. Il est donc important de choisir une lignée cellulaire la plus proche possible des cellules primaires et suffisamment représentative des types cellulaires rencontrés dans les VR. Plusieurs lignées cellulaires d'épithélium respiratoire humain ont été développées (Sakagami, 2006). Parmi celles-ci, nous avons choisi la lignée cellulaire 16HBE14o- (ou 16HBE), une lignée cellulaire d'épithélium bronchique humain. Elles ont été isolées, immortalisées et caractérisées par l'équipe du Dr D. Gruenert (Gruenert et al., 1988). Elles sont issues de la transformation de cellules primaires d'épithélium bronchique humain (HBE pour Human Bronchial Epithelial cells) à l'aide d'un plasmide (pSVori) contenant l'antigène T du virus Sv40. Le chiffre 16 représente le numéro du clone isolé et le chiffre 14 désigne le numéro de l'échantillon de tissu utilisé. La notation o- (pour ori-) désigne l'origine de réplication inactive du plasmide (Cozens et al., 1994).

Les cellules 16HBE présentent des caractéristiques de différenciation morphologique et fonctionnelle très conservées par rapport à l'épithélium bronchique primaire: forme, polarité, microvillosités apicales, transports ioniques, jonctions adhérentes et serrées, enzymes de métabolisme des xénobiotiques, et la production de nombreuses molécules de communication cellulaire (Cozens et al., 1994; Ehrhardt et al., 2002; Forbes, 2000). Elles forment un diamètre moyen à confluence de 23µm (*Wan et al, 2000*) et se caractérisent par l'expression de nombreuses jonctions serrées à confluence, une résistance électrique trans-épithéliale (TEER) élevée, et une faible perméabilité para-cellulaire (Ehrhardt et al., 2003; Forbes et al., 2003). Dans l'appareil respiratoire, les cellules pseudo-stratifiées représentent la majorité des cellules de l'arbre trachéobrochique, elles sont également présentes en grand nombre dans les bronchioles et les bronchioles terminales, et participent aux mécanismes de protection des VR (Chilvers and O'Callaghan, 2000; Wanner et al., 1996). Le choix de ce modèle est donc pertinent pour l'étude de l'interaction des nanoparticules avec les cellules des VR.

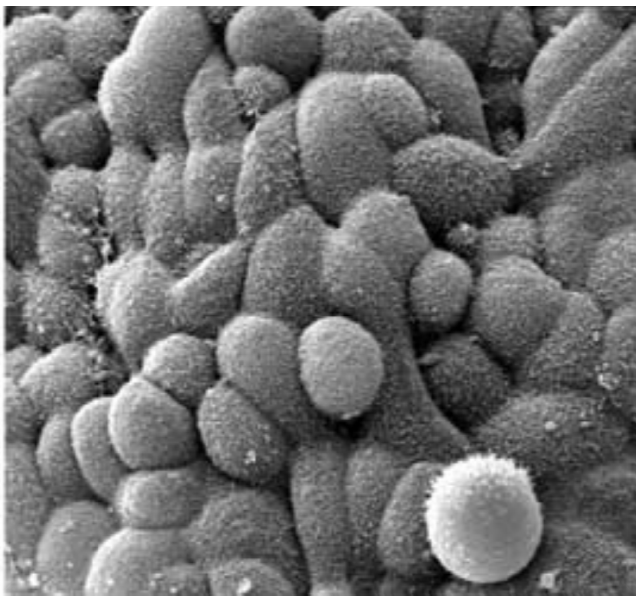


Figure 16. Cellules 16HBE au microscope électronique à balayage (Forbes and Ehrhardt, 2005)

Pour nos expériences, nous avons opté pour un mode de culture en immersion. Pour cela, les cellules sont cultivées dans un milieu complet composé de milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal, 1% de L-glutamine et 1% d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine). Avant ensemencement, les supports sont recouverts d'un mélange de collagène et de fibronectines humaines (rapport 4:1, respectivement). Ainsi cultivées, les cellules 16HBE sont dans des conditions optimales pour l'expression de leurs marqueurs de différenciation (Cozens et al., 1992).

Des études montrent en effet que la densité d'ensemencement, le type de milieu et surtout le mode de culture, influencent fortement la différenciation des cellules 16HBE. Ainsi, Ehrhardt et ses collaborateurs ont montré que la présence d'un fluide apical est nécessaire à la différenciation des cellules 16HBE en une barrière épithéliale fonctionnelle. Leur travaux montrent notamment que la culture des cellules 16HBE en mode de culture en immersion (LCC pour Liquid Covered Culture) favorise l'expression de nombreux marqueurs de différenciation caractéristiques de la barrière épithéliale respiratoire, par rapport à un mode de culture à interface air-liquide (AIC Air interface Culture) (Ehrhardt et al., 2002).

Les nanoparticules polysaccharidiques cationiques poreuses comme vecteurs de molécules dans les voies respiratoires

Evaluer le potentiel d'une nanoparticule comme vecteur, revient à étudier son interaction avec les cellules de l'organisme, sa capacité à délivrer une molécule d'intérêt, et sa potentielle toxicité sur l'organisme. Cela revient donc à comprendre les mécanismes d'interaction des nanoparticules avec l'environnement biologique. Ces mécanismes dépendent du type d'environnement biologique (cellule, sang, muqueuses…) et des propriétés de chaque nanoparticule. En effet une nanoparticule est définie par un ensemble de caractéristiques physicochimiques (taille, forme, propriétés de surface, porosité, composition, hydrophobicité…) chacune susceptible d'influencer significativement ses mécanismes d'interaction avec l'environnement. De plus, comprendre l'influence de ces caractéristiques sur le comportement des nanovecteurs permettrait de concevoir des vecteurs de plus en plus performants, adaptés aux spécificités de chaque type d'application (ciblage, type d'application, mode d'administration…). Dans la première partie de ce travail, nous avons étudié les mécanismes d'endocytose et d'exocytose de nanoparticules non associées à des principes actifs. Ces nanoparticules sont bien caractérisées et ont été utilisées avec succès sur des modèles animaux comme vecteurs mucosaux dans de nombreuses applications: cancer (El mir et al., 2001), allergie (Razafindratsita et al., 2007), vaccination (Baudner, 2002). Cependant, les mécanismes impliqués dans l'interaction cellulaire, le transport des molécules et leur délivrance restent mal compris. L'intérêt de ce travail est donc de comprendre ces mécanismes et l'importance des caractéristiques physicochimiques dans ceux-ci.

Notre étude montre une endocytose importante des NP^+ par les cellules 16HBE, après une cythoadhésion rapide à la surface des cellules. Cette cythoadhésion se fait par des interactions électrostatiques avec des récepteurs anioniques de surface. Ce sont probablement des molécules de la famille des héparanes sulfates protéoglycannes (HSPGs) qui sont des molécules membranaires extrinsèques et anioniques, très nombreuses à la surface des cellules (Poon and Gariepy, 2007). Ils sont impliqués dans l'endocytose de nombreux ligands endogènes et exogènes tels que des facteurs de croissance, des peptides cationiques, des virus, des nanoparticules et des bactéries (Cooper and Shaul, 2006; Couchman and Woods, 1996). Ils participent à plusieurs fonctions cellulaires dont la reconnaissance antigénique, la signalisation, l'adhésion, la différenciation et la migration cellulaire (Lambrecht and Hammad, 2009). Parmi les principaux HSPGs on compte le syndécan, Glypican, le bêta-glycan et le perlecan. Les proportions et la densité des HSPGs exprimés sur la membrane dépendent de l'état physiologique de la cellule (stress, différenciation, interaction cellulaires…) (Poon and Gariepy, 2007). La fixation de ligand sur les HSPG induits des cascades de signalisation cellulaire aboutissant à des mécanismes tels que l'endocytose. Les HSPG peuvent initier plusieurs voies d'endocytose, y compris la voie des clathrines, la voie des cavéoles, la voie des radeaux lipidiques, la

macropinocytose et les voies clathrines/cavéoles indépendantes (Lambaerts et al., 2009). Les mécanismes par lesquels les HSPG initient des voies spécifiques d'endocytose sont mal connus. Il semble toutefois que le type de mécanisme initié dépende du type de HSPG activé. En effet, les HSPG interagissent avec différentes protéines adaptatrices caractéristiques des voies d'endocytose. De plus, elles sont exprimées sur la membrane à des proportions dépendant de l'état physiologique de la cellule, et dans des zones spécifiques de la membrane. Ainsi, le glypican qui interagit avec les GPI-coupled proteins est préférentiellement exprimé dans les régions de la membrane riches en lipid raft (figure 17). De même le syndécan possède un domaine cytoplasmique qui intéragit avec de nombreuses protéines adaptatrices dont des protéines liant l'actine du cytosquelette (Poon and Gariepy, 2007). Par ailleurs, il existe différentes sous-catégories de HSPG, participant à des mécanismes différents (Paris et al., 2008). Des travaux montrent par exemple qu'une surexpression du syndécan-1 dans des cellules HEK293 augmente l'endocytose de nanoparticules de PEI, tandis qu'une surexpression de syndécan-2 inhibe cette endocytose (Paris et al., 2008). De même, une étude montre que la fixation de l'intégrine sur la syndecan-4 entraîne son internalisation par la voie des cavéoles (Bass et al., 2011), tandis que le Syndécan-4 est responsable de la macropinocytose du FGF-2 (Tkachenko et al., 2004). Ces résultats montrent la complexité des mécanismes d'endocytose initiés par fixation sur les HSPGs. Les déterminants moléculaires ainsi que l'influence des caractéristiques physicochimiques des nanoparticules sont encore peu connus.

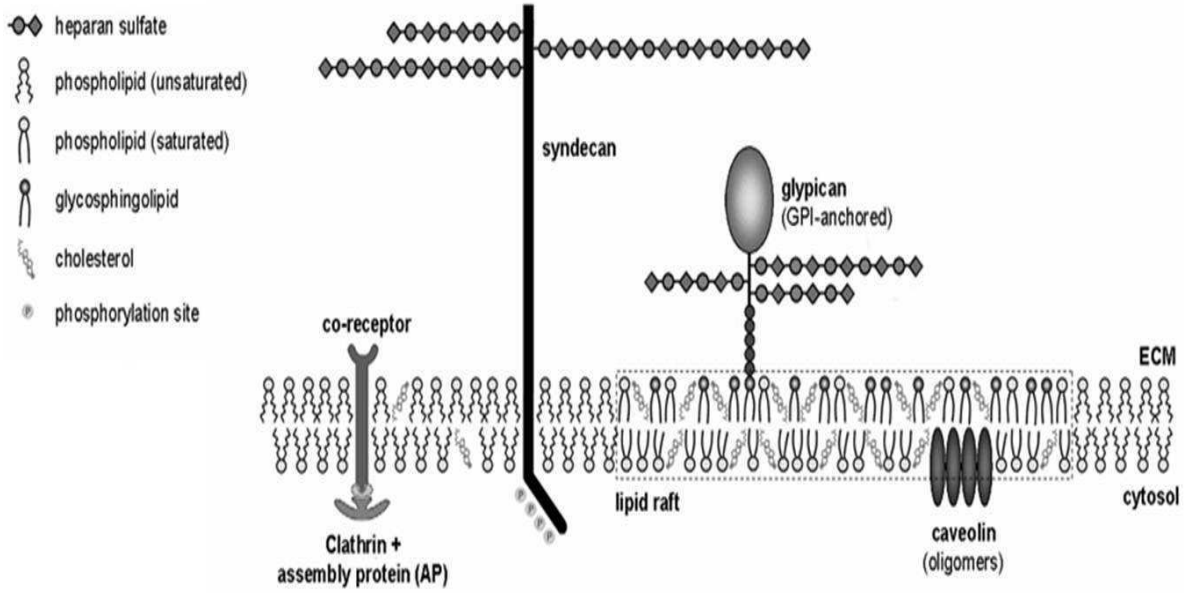


Figure 17. Expression membranaire des HSPGs (Poon and Gariepy, 2007).

L'endocytose des nanoparticules étudiées est un phénomène rapide, qui présente une saturation aux environs de la 30ème minute d'incubation. La rapidité des phénomènes d'endocytose des NP^+ est un atout important pour leur développement comme vecteurs des VR car une endocytose rapide devrait permettre d'éviter les mécanismes de clairance des voies respiratoires (phagocytose, clairance mucociliaire). L'endocytose est un mécanisme qui exige une réorganisation locale du cytosquelette membranaire, pour permettre la formation d'une cavité par invagination, puis d'une vésicule d'endocytose contenant les molécules d'intérêt. C'est donc un mécanisme cellulaire actif. Notre étude montre en effet que l'internalisation des NP^+ est fortement inhibée en présence d'azide de sodium, une substance chimique qui bloque la production d'ATP par la mitochondrie et donc l'ensemble des mécanismes actifs de la cellule. Ces résultats sont similaires à de nombreuses données de la littérature et s'explique par la taille des nanoparticules qui ne peuvent franchir la membrane plasmique par simple diffusion passive, nécessitant la formation de vésicules d'endocytose par invagination de la membrane plasmique (Fazlollahi et al., 2011; Kim et al., 2006).

Afin de déterminer la voie d'endocytose empruntée par ces nanoparticules, nous avons utilisé des inhibiteurs chimiques spécifiques de différentes voies d'endocytose. L'endocytose des NP^+ est fortement inhibée par la chlorpromazine et la phénylarsine oxyde, suggérant que leur internalisation se fait via la voie des clathrines. En effet, ces deux molécules désorganisent la formation des manteaux de clathrines, empêchant les mécanismes d'internalisation par la voie des clathrines. De plus, les expériences d'immunomarquage (chapitre 4) montrent que non seulement les NP^+ mais également les $DGNP^+$ sont localisées dans les vésicules de clathrines après leur internalisation. La voie d'endocytose dépendante des clathrines (EDC) est un mécanisme rapide (quelques secondes), et majeur de la cellule, qui participe à 40 à 50% de l'endocytose des phases fluides (Benmerah and Lamaze, 2007). Son implication dans l'internalisation des NP^+ et des $DGNP^+$ pourrait donc expliquer que ces particules soient internalisées rapidement et en grande quantité. En effet, l'EDC est impliquée dans l'internalisation de plusieurs nanoparticules, l'EDC participe à l'internalisation de nombreuses nanoparticules telles que les PLGA (Tahara et al., 2009), les nanoparticules de polystyrène (Fazlollahi et al., 2011), les liposomes (Crowther and Schlesinger, 2006) et les dendrimères (Perumal et al., 2008) et de nombreux virus (Mercer et al., 2010). Dans les cellules des VR, de nombreuses nanoparticules telles que les nanoparticules de chitosan (Huang et al., 2002), les nanoparticules de silice (Liu et al., 2011a), les nanoparticules d'or (Brandenberger et al., 2010) et les nanoparticules de PLGA (Rajapaksa et al., 2010) sont internalisées par ce mécanisme. C'est donc une voie majeure utilisée par les cellules épithéliales respiratoires.

Dans la cellule, les vésicules d'endocytose fusionnent avec les endosomes précoces, à partir desquels les molécules internalisées sont triées puis envoyées vers leur compartiment de destination. A ce stade, trois grandes orientations sont possibles: l'adressage vers un organite cellulaire (noyau, appareil de golgi, réticulum endoplasmique, cytosol…), l'exocytose (recyclage, transcytose) ou la dégradation

(dans les lysosomes). Le lieu de destination est notamment déterminé par la voie d'endocytose empruntée. La plupart des molécules empruntant la voie des clathrines sont dirigées vers les lysosomes où elles sont dégradées par des hydrolases acides. Cependant, cette destination peut être différente, en fonction de la nature chimique de la molécule et du type de partenaires avec lesquels elle interagit dans les endosomes intermédiaires. Ainsi, de nombreuses molécules endogènes sont internalisées de façon fonctionnelle par la voie des clathrines (transferrine, LDL,…). De même, certains virus empruntant la voie des clathrines sont capables de s'échapper des endosomes et de passer dans le cytosol. La voie d'endocytose seule ne suffit donc pas à prévoir la destinée intracellulaire d'une molécule. Plus que celle-ci, ce sont les propriétés de la molécule internalisée qui déterminent son devenir intracellulaire. Nous avons par des techniques de colocalisation par immunomarquage recherché quels étaient les sites de destination des NP^+ et des $DGNP^+$ à l'intérieur des cellules 16HBE. Nos expériences montrent que ces deux nanoparticules suivent le même trajet intracellulaire et sont localisées dans les vésicules de clathrines et dans les endosomes précoces et dans d'autres vésicules après 30 minutes d'incubation que nous n'avons pas encore pu identifier. De façon intéressante, nous n'avons pas observé de nanoparticules dans les endosomes tardifs, ni dans les lysosomes, suggérant qu'elles pourraient échapper à la voie lysosomale. Ces données sont intéressantes pour leur utilisation comme vecteur intracellulaires de molécules, dans la mesure où l'un des principaux challenges de la vectorisation nanoparticulaire est d'échapper à l'hydrolyse dans les lysosomes (Couvreur and Vauthier, 2006).

Des stratégies permettant aux nanoparticules d'échapper à l'adressage lysosomal sont étudiées. Celles-ci reposent principalement sur deux grandes approches : (i) la mise au point de formulations nanoparticulaires capables de sortir des endosomes; (ii) le passage par des voies d'endocytose qui n'orientent pas vers les lysosomes. Dans le premiers cas, il existe par exemple des nanoparticules dites fusiogènes, capables de déstabiliser la membrane endosomale pour se retrouver dans le cytosol (Hatakeyama et al., 2009). Dans le second, il s'agit de développer des nanoparticules empruntant des mécanismes qui n'aboutissent pas aux lysosomes. Cependant, cette stratégie reste difficile à mettre en œuvre, car la plupart des mécanismes de phagocytose et de pinocytose, y compris la macropinocytose et la voie des cavéoles mènent vers les lysosomes. Le développement de nanoparticules capables de transporter des molécules biologiquement actives à l'intérieur des cellules reste donc l'un des principaux challenges de la vectorisation nanoparticulaire. De façon intéressante, une étude montre que le développement de nanoparticules capables d'emprunter simultanément plusieurs voies d'entrée augmente les chances d'échapper aux lysosomes (Lai et al., 2008; Lai et al., 2007). Dans le cas des NP^+ et $DGNP^+$, les mécanismes d'échappement aux lysosomes restent encore mal compris. Il semble que ces nanoparticules interagissent avec des partenaires moléculaires intracellulaires qui orientent leur adressage vers d'autres compartiments. Elles sont dirigées vers dans les endosomes de tri puis vers d'autres endosomes non encore identifiés, tandis qu'une fraction est exocytosée.

L'exocytose est un mécanisme actif qui implique la fusion d'une vésicule intracellulaire avec la membrane plasmique afin de libérer son contenu dans le milieu extracellulaire. Elle peut être constitutive (homéostasie membranaire, contrôle endocytose) ou régulée par des signalisations cellulaires (sécrétion, composition membranaire) ou par l'action de protéines endosomales (SNARE, Rab, annexine…) (Jahn, 2004). C'est un processus qui participe à plusieurs fonctions vitales de la cellule telles que la sécrétion, la communication cellulaire et l'homéostasie membranaire. Les molécules exocytosées peuvent être produites par la cellule (sécrétion); renvoyées vers l'extérieur après endocytose (recyclage) ou bien transportées à l'extérieur de la cellule après endocytose du côté opposé (transcytose). L'exocytose des nanoparticules reste encore peu étudiée.

Nous avons mis en évidence une exocytose importante des NP^+ (60% d'exocytose après 30 minutes d'incubation), se déroulant parallèlement à leur endocytose. De plus, nos résultats montrent que la saturation de l'endocytose observée correspond à un équilibre entre l'endocytose et l'exocytose de ces nanoparticules. En effet quand le milieu extracellulaire est régulièrement remplacé par du milieu ne contenant pas de nanoparticules, cet équilibre est rompu et se traduit par une diminution progressive de la quantité de nanoparticules dans les cellules. Il existe deux flux de nanoparticules, l'un entrant et l'autre sortant (figure 18). De façon intéressante, si cette expérience est menée pendant 24h, nous constatons que l'exocytose ne permet pas d'exclure la totalité des nanoparticules, et il reste toujours une quantité résiduelle à l'intérieur des cellules (figure 19). Bien plus, nous n'observons pas de diminution significative de la quantité de nanoparticules entre 4h et 24h d'incubation. Ces résultats suggèrent que l'exocytose des NP^+ est un phénomène rapide, qui ne concerne pas la totalité des nanoparticules internalisées.

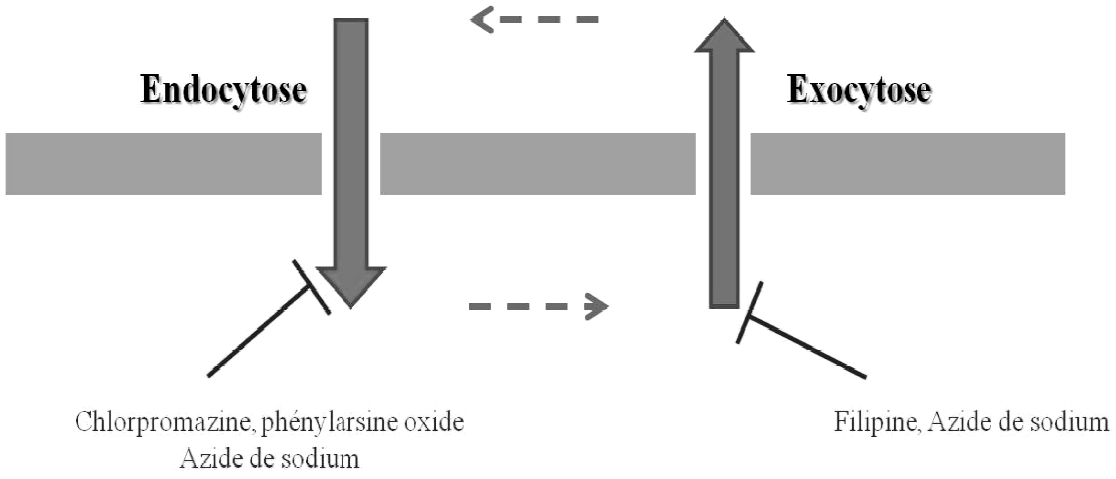


Figure 18. Equilibre entre l'endocytose et l'exocytose des NP^+

Deux mécanismes pourraient justifier cette exocytose importante des nanoparticules. Dans le premier cas, l'exocytose agirait comme un mécanisme de protection cellulaire résultant de l'endocytose massive des NP^+ et $DGNP^+$. Afin d'éviter un encombrement cellulaire et la perturbation de leur fonctionnement, les cellules éliminent rapidement les nanoparticules en les renvoyant vers l'extérieur. Dans le second mécanisme, le phénomène d'exocytose permet le renouvellement des récepteurs membranaires. L'endocytose massive et continue des nanoparticules requiert l'implication de grandes quantités de récepteurs membranaires. De nombreux récepteurs sont séparés de leurs ligands au niveau des endosomes tardifs et renvoyés à la surface des cellules en suivant par la voie de recyclage. Les nanoparticules qui interagissent fortement avec les récepteurs de surface sont alors renvoyées à la surface des cellules en même temps que ceux-ci. La grande quantité de récepteurs internalisés expliquerait donc l'importance de l'exocytose. De plus, les mécanismes de recyclage se déroulent rapidement après l'endocytose, au niveau des endosomes précoces. Ils pourraient donc expliquer la rapidité de l'exocytose. Dans tous les cas, ces deux mécanismes hypothétiques sont des conséquences de l'endocytose massive des nanoparticules et ne sont pas mutuellement exclusifs. Ils pourraient participer à des proportions variables à leur exocytose.

Enfin, il serait intéressant de noter qu'une étude similaire de Panyam et Labhasetwar montrait en 2003 que l'exocytose de nanoparticules de PLGA par des cellules musculaires lisses est un phénomène actif (inhibée par l'azide de sodium) et rapide (65% d'exocytose observée après 30 minutes) (Panyam and Labhasetwar, 2003). Il semble donc que les phénomènes d'exocytose bien qu'encore peu étudiés sont des mécanismes majeurs dans l'interaction des nanoparticules avec les cellules. L'importance de la physiologie cellulaire, des caractéristiques physicochimiques des nanoparticules et les implications sur l'efficacité des nanoparticules comme vecteurs intracellulaires restent mal compris. Nos résultats montrent que l'exocytose des NP^+ est un mécanisme dépendant du cholestérol, et l'utilisation d'agent pharmacologique déplétant le cholestérol (filipine) entraîne une accumulation des nanoparticules dans les cellules. Bien que l'exocytose des nanoparticules et l'importance du cholestérol dans les phénomènes d'exocytose aient été décrits en littérature, ces résultats sont à notre connaissance les premiers travaux décrivant l'importance du cholestérol dans l'exocytose des nanoparticules. Par ailleurs, ces résultats sont en accord avec des données de la littérature et il a par exemple été montré qu'une déplétion en cholestérol est capable d'inhiber l'efflux apical de nombreuses molécules, entrainant leur accumulation dans les endosomes précoces (Nyasae et al., 2003; van Meer and Sprong, 2004). En effet, le cholestérol en interagissant avec de nombreuses protéines responsables du tri des vésicules et leur adressage à la membrane apicale, joue un rôle important dans le trafic des vésicules d'exocytose (Chamberlain et al., 2001; Waseem et al., 2006).

Pour être un vecteur performant dans les VR, une nanoparticule doit répondre à de nombreuses exigences : échapper aux mécanismes de clairance (macrophages, clairance mucociliaire), protéger la molécule d'intérêt de l'action des hydrolases et être capable d'endocytose par les cellules de la muqueuse respiratoire. Dans la cellule, la nanoparticule doit permettre la libération de la protéine sous sa forme biologiquement active, et dans son compartiment cellulaire de destination. Autant de difficultés constituent donc les différents challenges à envisager pour permettre la conception d'un vecteur performant. Les nanoparticules NP^+ sous leur forme phospholipidée ou non ($DGNP^+$ ou NP^+) ont montré qu'elles peuvent être des systèmes performants de délivrance de protéines par les voies respiratoires pour de nombreuses applications (vaccin, cancer, allergie). Dans ce travail nous avons voulu comprendre quels étaient les mécanismes impliqués, et l'importance des caractéristiques des nanoparticules, pour le transport et la délivrance de protéines à l'intérieur de ces cellules.

Notre étude montre une association forte, rapide et quantitative entre les nanoparticules et les protéines étudiées. Cette association qui se fait par des interactions électrostatiques avec les charges cationiques de ces nanoparticules est très stable, même en présence de protéases et de protéines sériques. De plus la structure poreuse de ces nanoparticules permet d'incorporer les protéines associées, sans modifier leur taille. Comme nous l'avons montré, les nanoparticules délivrent les protéines transportées aussitôt après leur endocytose (dès 3 minutes). Cette propriété est un atout intéressant pour leur utilisation comme vecteurs des VR. En effet, *in vitro* les cellules sont continuellement mises en présence de nanoparticules et malgré les flux d'endocytose/exocytose, la délivrance intracellulaire des protéines augmente avec le temps. Dans un organisme vivant, les nanoparticules sont progressivement transportées tout au long des conduits respiratoires. L'utilisation de vecteurs nanoparticulaires capables de libérer rapidement les protéines à l'intérieur des cellules permettrait donc d'améliorer leur biodisponibilité dans ces cellules. Une expérience complémentaire montre en effet que malgré les cycles d'endocytose/exocytose, la libération des protéines se fait plus rapidement que l'exocytose des nanoparticules (figure 19). Ces données montrent que malgré une exocytose rapide, les nanoparticules ont le temps de libérer leur contenu dans les cellules. Cet effet est visible après 2h d'incubation avec les deux nanoparticules.

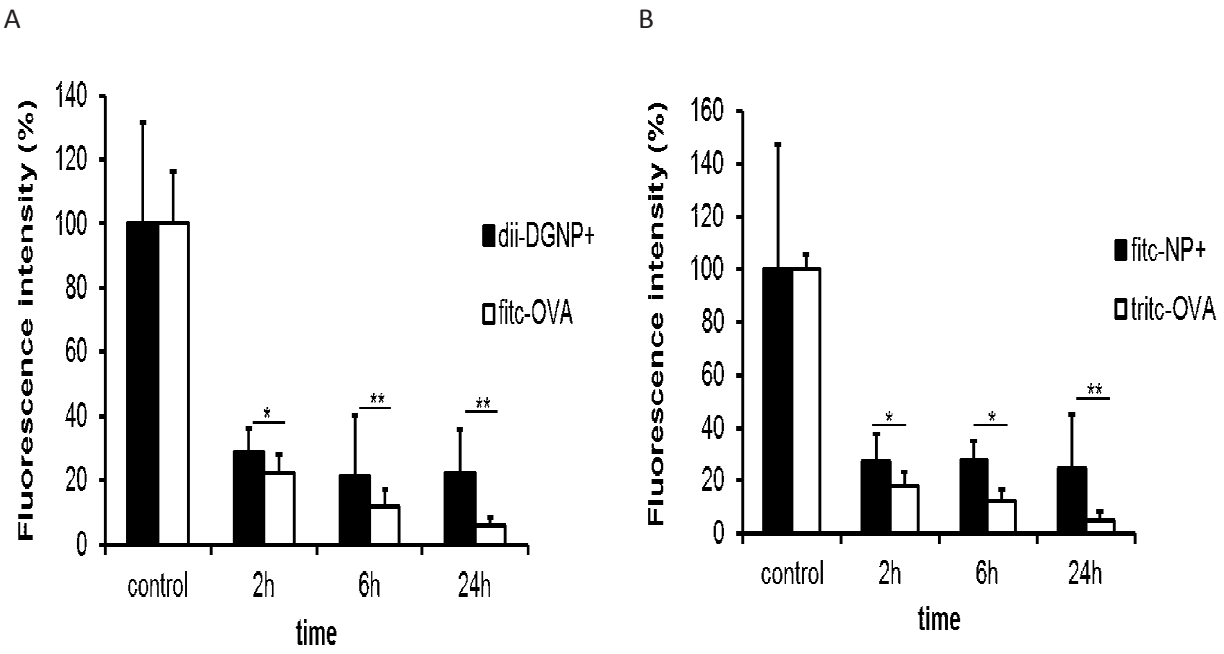


Figure 19. Etude cinétique de l'exocytose des nanoparticules DGNP$^+$ (A) et NP$^+$ (B) associées à l'ovalbumine (OVA). Les cellules 16HBE à confluence dans des chambres de culture stériles (Labtek-II, Nunc) ont été incubées pendant 30min à 37°C avec 400µl de milieu complet contenant 10µg de NP fluorescentes associées à 3µg d'OVA fluorescente (fitc-NP$^+$/tritc-OVA et diI-DGNP$^+$/fitc-OVA). Les cellules ont ensuite été rincées avec du PBS puis incubées à 37°C avec du milieu complet dépourvu en NP et OVA, pendant 2h, 6h, et 24h. Le milieu a été remplacé régulièrement pendant toute la durée de l'expérience. Enfin, les cellules ont été rincées au PBS, fixées à température ambiante avec 200µl de para-formaldéhyde 4%, montées entre lame et lamelle avec du glycérol-PBS ½. Les cellules ont été observées et photographiées au microscope confocal à fluorescence (Zeiss LSM710; Zeiss, France). Pour chacune des conditions, la quantité de NP et d'OVA restante dans les cellules a été mesurée par fluorescence à partir des images, en utilisant le logiciel Sigma Scan Pro 5 (Systat software, Inc.). Les expériences ont été réalisées en quadruplets, les graphiques et l'analyse statistique des données ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

L'utilisation de protéases à différents pH montre que les deux nanoparticules réduisent significativement la protéolyse des protéines à pH physiologique (pH~ 7,2) tandis qu'elles favorisent leur dégradation à pH acide (pH~ 4,5). Ces résultats ont en effet été confirmés par des expériences cellulaires montrant qu'en présence de chloroquine, la dégradation de protéines transportées se fait principalement dans des endosomes acides. En effet la chloroquine est agent lysosomotrophique qui s'accumule dans les compartiments cellulaires acides et inhibe l'activité des protéases présentes dans ces compartiments (de Duve et al., 1974). Ces expériences montrent que les deux nanoparticules délivrent les protéines en grande partie dans des endosomes acides de la cellule. De façon intéressante, ces pH correspondent respectivement aux pH de la lumière des conduits respiratoires humains et des endosomes acides des cellules. Ces résultats suggèrent que les deux nanoparticules pourraient protéger les protéines transportées de l'action des protéases extracellulaires, tandis qu'elles favoriseraient leur interaction avec des protéines intracellulaires à pH acide; telles que des protéases ou d'autres protéines cibles présentes dans les endosomes. L'hydrolyse observée à pH acide est due au changement de la charge globale de la protéine. La présence de lipides anioniques dans la structure des nanoparticules semble favoriser cette hydrolyse.

Si les protéines transportées sont majoritairement localisées dans des endosomes, les expériences de FRET suggèrent qu'une partie des protéines transportées pourrait être délivrée dans le cytosol. Par ailleurs, cette libération cytosolique semble plus importante avec les $DGNP^+$. Ces résultats sont importants dans la mesure où l'un des principaux challenges de la vectorisation est d'éviter la dégradation des molécules d'intérêt dans les lysosomes. Reste cependant la question de savoir si les fragments protéiques observés dans le cytosol sont issus de la dégradation des protéines directement dans le cytosol ou de leur dégradation à l'intérieur des endosomes acides. Les expériences menées ne nous permettent pas de déterminer avec certitude si les nanoparticules étudiées échappent aux endosomes puis libèrent leurs protéines dans le cytosol ou si les protéines sont dégradées dans les endosomes acides avant d'arriver dans le cytosol. Répondre à cette question permettra de savoir si les protéines sont délivrées dans le cytosol sous forme biologiquement active. L'utilisation d'une protéine active à activité cytosolique telle que la luciférase ou la béta-galactosidase, devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes mis en œuvre.

➢ *Importance de la structure interne des nanoparticules poreuses*

Notre étude apporte un début de compréhension sur l'influence des propriétés internes des nanoparticules poreuses, sur leur endocytose et les mécanismes d'association et libération de protéines. Tout d'abord, la structure interne (présence de DPPG) ne semble pas modifier la voie d'endocytose et la localisation intracellulaire. Cependant, elle modifie la cinétique d'endocytose,

montrant un temps de saturation plus important avec les $DGNP^+$. Si les mécanismes impliqués n'ont pas encore été mis en évidence, le retardement de la saturation peut s'expliquer par la nature anionique du DPPG, qui pourrait perturber les interactions électrostatiques avec les récepteurs anioniques de surface. Les expériences en présence de protéines montrent également des effets importants de la structure interne. La modification de la charge globale des protéines en fonction de leur point isoélectrique fait que la stabilité de l'association nanoparticule/protéine dépend du pH. Ainsi, l'association des NP^+ avec la protéine est moins stable aux environs du point isoélectrique de la protéine. Dans le cas des $DGNP^+$, le DPPG qui est un phospholipide anionique interagit différemment avec la protéine. L'association se fait à la fois par des interactions électrostatiques et par des interactions hydrophobes. Cela se traduit par une libération d'ovalbumine à pH acide beaucoup plus importante avec les nanoparticules NP^+ (22%) qu'avec les $DGNP^+$ (2%). Cette propriété a un impact direct sur la protection des protéines transportées. Les $DGNP^+$ qui d'une part libèrent moins de protéines et d'autre part associent plus fortement les protéases du milieu, protègent moins les protéines de l'action des protéases que les NP^+ aussi bien à pH neutre qu'à pH acide. Enfin, ces différences de libérations s'observent à l'intérieur de la cellule. Les protéines sont ainsi plus rapidement dégradées dans la cellule quand elles sont associées aux $DGNP^+$. Par ailleurs, les $DGNP^+$ semblent favoriser l'échappement des protéines dégradées vers le cytosol. Cependant, les mécanismes impliqués sont mal compris et nos expériences ne nous permettent pas de comprendre les mécanismes d'échappement aux endosomes.

Toxicité des NP^+ sur les cellules épithéliales des voies respiratoires

Pour évaluer la toxicité des nanoparticules il est important de bien comprendre les notions de risque et de danger. Le danger d'une substance est sa capacité à produire un dommage ou un préjudice donné. Le risque quant à lui désigne la probabilité qu'un dommage survienne réellement suite à l'exposition à un danger (Mason et al., 1986). L'évaluation du risque introduit donc une troisième notion qui est l'exposition, c'est-à-dire la manière d'être soumis à l'action d'un danger. Evaluer les risques d'une substance pour la santé revient donc à identifier les dommages que celle-ci est capable de produire, comprendre les mécanismes d'interaction de cette substance avec l'organisme et enfin à évaluer les chances d'être réellement exposé à cette substance d'une manière susceptible de produire un effet nocif. Les études de toxicité menées permettent donc en réalité de déterminer les dangers résultants d'une exposition de cellules épithéliales bronchiques humaines à des concentrations croissantes de NP^+. A cause de leur utilisation croissante dans de nombreuses industries, la recherche s'interroge sur les conséquences de l'exposition aux nanoparticules sur notre santé. Les recherches se sont longtemps limitées à l'étude des mécanismes primaires de toxicité entrainant la mort cellulaire (nécrose, apoptose). Il existe toutefois des altérations plus subtiles, non cytotoxiques, mais qui modifient

significativement la physiologie cellulaire (métabolisme, mutation, division cellulaire, sécrétion…). Dans cette étude nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la génotoxicité, qui est la capacité qu'a une substance à induire dommages sur l'ADN. Ces dommages peuvent survenir de manière directe ou indirecte (figure 20).

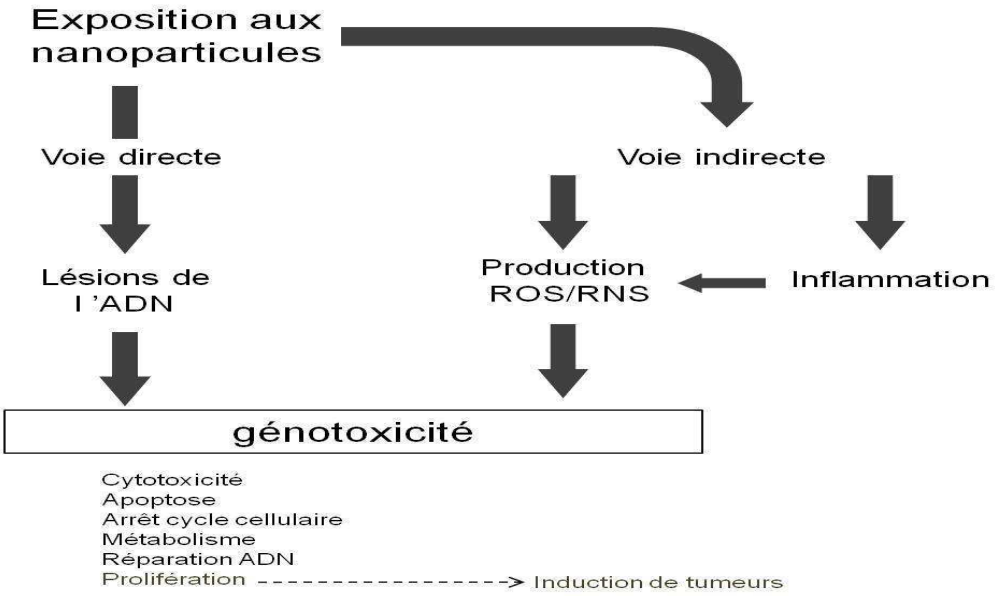


Figure 20. Mécanismes d'action possibles de dommages de l'ADN (Schins and Knaapen, 2007)

Notre étude montre une génotoxicyté des NP^+ sur les cellules 16HBE pour des doses à partir de 326µg/cm². Il est intéressant de préciser que ces résultats sont obtenus dans des conditions expérimentales « extrêmes » favorisant le stress cellulaire (exposition chronique, absence de clairance mucociliaire, absence de mucus, contact direct avec les cellules). Les NP^+ ne génèrent donc pas d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), en quantité suffisante pour provoquer des lésions sur l'ADN ou la mort de la cellule. Cette hypothèse pourra être vérifiée par des expériences de détection de d'espèces réactives (ROS, RNS) ou d'enzymes de réponse au stress oxydant, couplées aux tests de cyto/génotoxicité. Nous pensons que cette absence de toxicité des NP^+ malgré leur forte endocytose, pourrait s'expliquer d'une part par la faible production d'espèces radicalaire dans les cellules et d'autre part, par leur forte exocytose qui évite l'encombrement cellulaire et donc le stress. Ces résultats confirment l'intérêt de développer ces nanoparticules comme vecteurs de molécules dans les voies respiratoires humaines.

Enfin, les études de toxicité soulignent l'importance des conditions expérimentales et notamment la composition du milieu de culture sur la toxicité des nanoparticules étudiées. Nous observons une inhibition de la toxicité des NP^+ en présence de sérum. Doak et ses collaborateurs ont montré dans une étude que la présence de sérum dans le milieu de culture diminue significativement la toxicité des nanoparticules (Doak et al., 2009). Cependant les mécanismes impliqués n'avaient pas été décrits. Notre étude apporte un début d'explication à ceux-ci. Nous montrons en effet que les protéines du sérum en s'associant rapidement à la surface des nanoparticules sont capables de modifier leurs caractéristiques physicochimiques et de diminuer significativement leur endocytose par les cellules. De plus, l'effet du sérum est directement lié au ratio entre la quantité de nanoparticules et la quantité de protéines dans le sérum. Ces résultats sont intéressants car il existe dans le mucus respiratoire de nombreuses protéines sécrétées (hydrolases, immunoglobulines, surfactant, molécules du complément…) susceptibles d'interagir avec les nanoparticules (figure 21). Cet effet du sérum sur l'endocytose des NP^+ se traduit par un effet protecteur sur la génotoxicité.

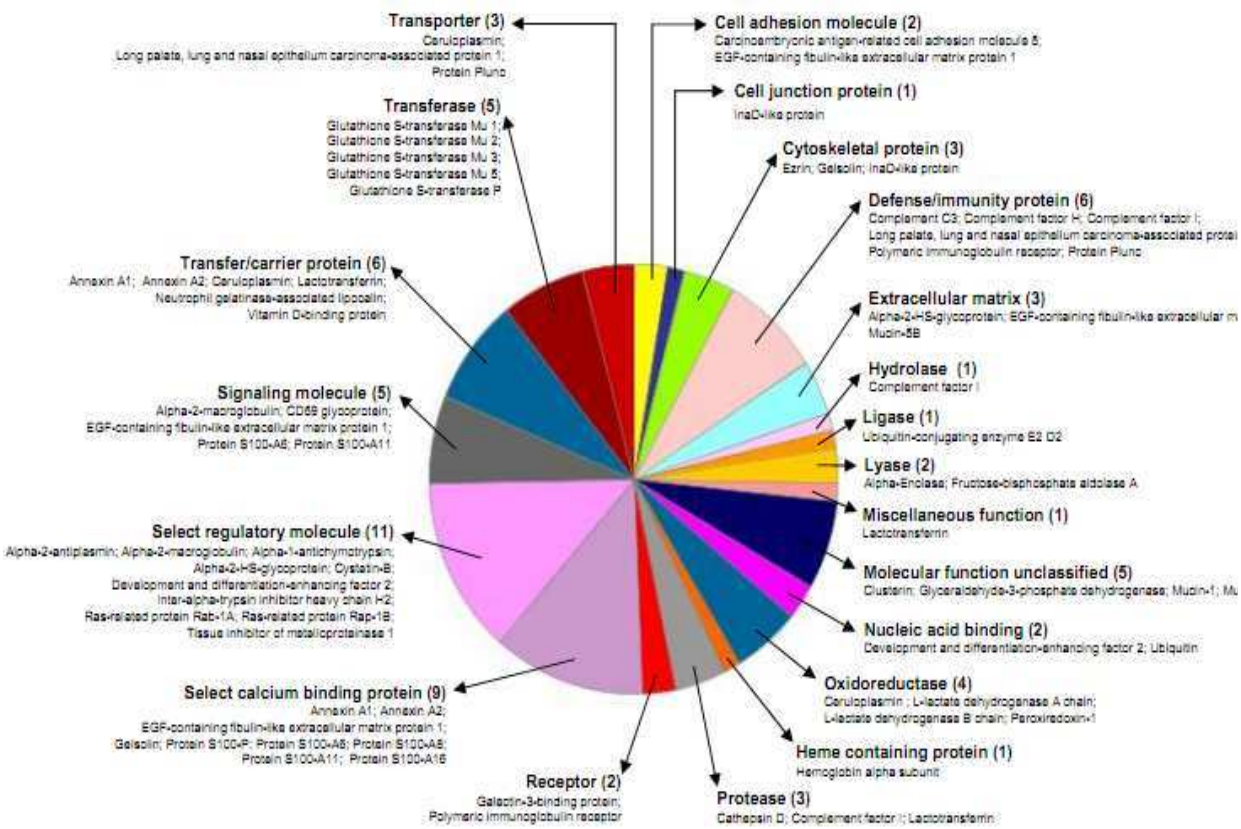


Figure 21. Identification fonctionnelle des protéines secrétées par les cellules bronchiques (*Ali et al, 2011*).

- *Intérêt de cette étude pour l'étude de la toxicité des nanoparticules en général, recommandations*

On désigne par particule ultrafine (PUF) l'ensemble des nanoparticules naturelles ou anthropiques présentes dans l'aérosol ambiant. Evaluer les dangers liés à l'inhalation des nanoparticules est un enjeu majeur de santé publique, qui concerne aussi bien les nanoparticules synthétiques à visée médicale que les nanoparticules naturelles et anthropogéniques présentes dans l'air. L'étude de la toxicité des PUF reste complexe du fait de la très large diversité des nanoparticules et de la difficulté de mettre au point des modèles expérimentaux fiables et consensuels qui rendent compte d'une exposition réaliste *in vivo* (type cellulaire, condition de culture, agrégation des nanoparticules, type de test). La toxicité des particules inhalées a longtemps été évaluée en termes de nanoparticules en quantité dans l'air ($\mu g/m^3$ d'air). Cependant, l'aérosol ambiant est un mélange hétérogène de particules poly-dispersées aux caractéristiques physicochimiques très variables (taille, composition, forme, agrégation, réactivité…). Oberdorster et ses collaborateurs ont par exemple montré qu'à charge massique égale, des particules de dioxyde de titane génèrent une plus forte réaction inflammatoire sur des poumons de rat lorsqu'elles sont de taille nanométrique que des particules plus grandes (Oberdörster G et al., 1990). Dans un mélange ambiant, il serait donc difficile de comprendre qu'elle est l'importance de la fraction nanoparticulaire proprement dite. De plus, cette approche ne montre pas l'influence des caractéristiques physicochimiques sur les mécanismes de toxicité. Avec les NP^+, nous avons disposé d'un modèle nanoparticulaire bien connu et caractérisé sur plusieurs paramètres : taille, structure, forme, composition et charge de surface. Les mécanismes d'endocytose et d'interaction par les cellules bronchiques sont en partie décrits et la possibilité qu'offrent ces nanoparticules de leur associer des marqueurs fluorescents permet l'étude en imagerie des mécanismes intracellulaires. Enfin de nombreuses nanoparticules mises en présence de milieu biologique ont généralement tendance à s'agréger, ce qui modifie significativement leurs propriétés. Les NP^+, par leur capacité à ne pas former d'agrégats en présence de sérum sont un outil pertinent. Nos travaux, nous suggèrent des recommandations qu'il serait intéressant de prendre en considération lors de l'étude de la toxicité des nanoparticules en général.

- **Le milieu de culture.** Indépendamment de l'influence qu'il peut avoir sur les cellules, le sérum peut modifier les propriétés des nanoparticules. Il est important de bien étudier et caractériser les nanoparticules mises en présence de sérum.

- **L'intérêt d'utiliser des particules dont la taille ne varie pas.** Les nanoparticules étant susceptibles de former des agrégats et agglomérats de tailles variables en solution, ceux-ci peuvent avoir des interactions très différentes avec le vivant. De plus, la formation et la nature des agrégats/agglomérats peut varier d'un milieu de culture à l'autre, rendant peu prédictible les tests de

toxicité. Il est important d'évaluer quel est l'impact de la fraction nanoparticulaire proprement dite (non agrégée).

- **Importance d'utiliser des doses réalistes.** Il n'est pas nécessaire d'utiliser des concentrations importantes de nanoparticules surtout si celles-ci ne reflètent pas des concentrations réalistes *in vivo*.

- **Distinguer le risque du danger.** La majorité des tests de toxicité met en évidence des dangers liés à une exposition aux nanoparticules. L'évaluation des risques nécessite de prendre en compte des conditions d'exposition réalistes.

- **Valider les résultats des tests des comètes et micronoyaux**. Les nanoparticules peuvent interagir avec des réactifs présents dans les tests de toxicité et modifier leurs résultats (Doak et al., 2009). Dans ce travail, montrons que les tests de comètes et micronoyaux utilisés en génotoxicité pour des molécules chimiques traditionnelles, peuvent êtres transposés à l'étude de la génotoxicité de ces nanoparticules.

PARTIE V

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

L'objet de ce travail était d'étudier les mécanismes d'interaction des nanoparticules polysaccharidiques cationiques et poreuses de maltodextrines à cœur lipidique interne ou non, avec les cellules épithéliales bronchiques humaines, et d'en comprendre les implications sur leur potentiel comme système de délivrance de molécules dans les voies respiratoires. Les études d'endocytose montrent que ces nanoparticules pénètrent rapidement et massivement dans ces cellules en empruntant la voie des clathrines. Cette endocytose se fait après fixation des nanoparticules par des interactions électrostatiques sur des récepteurs anioniques à la surface des cellules. Les nanoparticules internalisées sont fortement exocytosées et une saturation de la quantité de nanoparticules est observée, laquelle correspond à un équilibre entre l'endocytose et l'exocytose. Les expériences d'immunomarquage montrent que les nanoparticules sont internalisées dans des vésicules de clathrines, puis sont dirigées dans les endosomes précoces et d'autres endosomes non encore identifiés. De façon intéressante, nous n'observons pas de co-localisation avec les endosomes tardifs, ni avec les lysosomes.

Les NP^+ que les $DGNP^+$ associent de façon stable et quantitative les protéines modèles étudiées, même en présence de protéines sériques. L'utilisation de ces nanoparticules permet d'augmenter de façon significative l'endocytose et la délivrance intracellulaire des protéines. Cette délivrance est rapide (dès 3 minutes) et se fait majoritairement dans des endosomes acides, et partiellement dans le cytosol. Ces expériences ne nous permettent cependant pas de savoir si les protéines présentes dans le cytosol se trouvent sous forme biologiquement active. Par ailleurs nos travaux suggèrent fortement que ces nanoparticules de par leurs caractéristiques pourraient protéger les protéines transportées de l'action des protéases à pH physiologique, tandis qu'elles faciliteraient leur interaction avec d'autres protéines à l'intérieur des cellules. La présence d'un cœur lipidique et anionique à base de DPPG à l'intérieur de leur structure modifie les propriétés d'interaction de ces nanoparticules avec les protéines et semble faciliter la délivrance de celles-ci dans le cytosol par des mécanismes encore mal connus.

Enfin, les études de toxicité montrent que ces nanoparticules ne sont pas cytotoxiques ni génotoxiques sur les cellules 16HBE, dans nos conditions expérimentales. Ces études montrent par ailleurs l'importance des conditions expérimentales et notamment la présence de sérum dans le milieu de culture, sur l'étude de la toxicité des nanoparticules. Par ailleurs, elles soulignent l'importance de mieux adapter les tests de toxicité traditionnels à l'étude de la génotoxicité, en prenant en compte les caractéristiques physicochimiques des nanoparticules.

Ces résultats confirment l'intérêt de développer ces nanoparticules comme systèmes de délivrance de molécules dans les voies respiratoires.

PERSPECTIVES

Cette étude pose plusieurs questions sur les mécanismes d'interaction des nanoparticules avec les épithéliums des voies respiratoires. Sur l'endocytose, des expériences de localisation des nanoparticules à des temps variables (temps courts, temps longs) devraient permettre de mieux comprendre leur trafic intracellulaire. De nombreuses questions restent encore non résolues sur les mécanismes de délivrance intracellulaire des protéines. Il est important de savoir si les NP+ et les DGNP+ délivrent des protéines sous des formes entières ou biologiquement actives. La délivrance d'enzymes ou de protéines actives dans le cytosol devrait permettre de répondre à cette question.

Par ailleurs, les études sur l'importance des caractéristiques physicochimiques (taille, charge, porosité), et de la structure interne en utilisant notamment des phospholipides de natures variables pourraient potentiellement modifier les mécanismes de délivrance de protéines.

Plusieurs questions restent également sur l'étude de la toxicité. Plus particulièrement, sur la production d'espèces radicalaires (ROS, RNS) par les nanoparticules, l'influence des caractéristiques physicochimiques (taille, charge, structure interne), de la composition, et de l'endo/exocytose sur la toxicité. Il sera nécessaire de comparer les résultats obtenus sur ce modèle cellulaire, à d'autres types cellulaires et à des cultures primaires. Enfin, les résultats obtenus deront être validés sur des modèles animaux. *In vivo veritas*.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Agarwal, A., Lariya, N., Saraogi, G., Dubey, N., Agrawal, H., and Agrawal, G.P. (2009). Nanoparticles as novel carrier for brain delivery: a review. Curr Pharm Des *15*, 917-925.

Agu, R.U., Ugwoke, M.I., Armand, M., Kinget, R., and Verbeke, N. (2001). The lung as a route for systemic delivery of therapeutic proteins and peptides. Respir Res *2*, 198-209.

Ahlstrom, K.H., Johansson, L.O., Rodenburg, J.B., Ragnarsson, A.S., Akeson, P., and Borseth, A. (1999). Pulmonary MR angiography with ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles as a blood pool agent and a navigator echo for respiratory gating: pilot study. Radiology *211*, 865-869.

Alam, M.I., Beg, S., Samad, A., Baboota, S., Kohli, K., Ali, J., Ahuja, A., and Akbar, M. (2010). Strategy for effective brain drug delivery. Eur J Pharm Sci *40*, 385-403.

Alfoldy B, Giechaskiel B, Hofmann W, and Y, D. (2009). Size-distribution dependent lung deposition of diesel exhaust particles. Journal of Aerosol Science *40*, 652-663.

Amstutz, B., Gastaldelli, M., Kalin, S., Imelli, N., Boucke, K., Wandeler, E., Mercer, J., Hemmi, S., and Greber, U.F. (2008). Subversion of CtBP1-controlled macropinocytosis by human adenovirus serotype 3. EMBO J *27*, 956-969.

Arayne, M.S., and Sultana, N. (2006). Porous nanoparticles in drug delivery systems. Pak J Pharm Sci *19*, 158-169.

Asgharian, B., Pricea, O.T., and Hofmann, W. (2006). Prediction of particle deposition in the human lung using realistic models of lung ventilation. Journal of Aerosol Science *37*, 1209-1221.

Asif, M., Arayne, M.S., Sultana, N., and Hussain, F. (2006). Fabrication of nanoparticles within polymeric pores for controlled release of drug. Pak J Pharm Sci *19*, 73-84.

Azarmi, S., Roa, W.H., and Lobenberg, R. (2008). Targeted delivery of nanoparticles for the treatment of lung diseases. Adv Drug Deliv Rev *60*, 863-875.

Bangham, A.D. (1993). Liposomes: the Babraham connection. Chem Phys Lipids *64*, 275-285.

Bangham, A.D., Standish, M.M., and Watkins, J.C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. J Mol Biol *13*, 238-252.

Bass, M.D., Williamson, R.C., Nunan, R.D., Humphries, J.D., Byron, A., Morgan, M.R., Martin, P., and Humphries, M.J. (2011). A syndecan-4 hair trigger initiates wound healing through caveolin- and RhoG-regulated integrin endocytosis. Dev Cell *21*, 681-693.

Baudner, B.C. (2002). Enhancement of Protective Efficacy following Intranasal Immunization with Vaccine Plus a Nontoxic LTK63 Mutant Delivered with Nanoparticles. INFECTION AND IMMUNITY *70*.

Baudner, B.C., Balland, O., Giuliani, M.M., Von Hoegen, P., Rappuoli, R., Betbeder, D., and Del Giudice, G. (2002). Enhancement of protective efficacy following intranasal immunization with vaccine plus a nontoxic LTK63 mutant delivered with nanoparticles. Infect Immun *70*, 4785-4790.

Benmerah, A., and Lamaze, C. (2007). Clathrin-coated pits: vive la difference? Traffic *8*, 970-982.

Betbeder, D., Sperandio, S., Latapie, J.P., de Nadai, J., Etienne, A., Zajac, J.M., and Frances, B. (2000). Biovector nanoparticles improve antinociceptive efficacy of nasal morphine. Pharm Res *17*, 743-748.

Boisselier, E., and Astruc, D. (2009). Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. Chem Soc Rev *38*, 1759-1782.

Bonnemain, B. (1998). Superparamagnetic agents in magnetic resonance imaging: physicochemical characteristics and clinical applications. A review. J Drug Target *6*, 167-174.

Brandenberger, C., Muhlfeld, C., Ali, Z., Lenz, A.G., Schmid, O., Parak, W.J., Gehr, P., and Rothen-Rutishauser, B. (2010). Quantitative evaluation of cellular uptake and trafficking of plain and polyethylene glycol-coated gold nanoparticles. Small *6*, 1669-1678.

Brown, L.R. (2005). Commercial challenges of protein drug delivery. Expert Opin Drug Deliv *2*, 29-42.

Cannon, G.J., and Swanson, J.A. (1992). The macrophage capacity for phagocytosis. J Cell Sci *101 (Pt 4)*, 907-913.

Cartiera, M.S., Johnson, K.M., Rajendran, V., Caplan, M.J., and Saltzman, W.M. (2009). The uptake and intracellular fate of PLGA nanoparticles in epithelial cells. Biomaterials *30*, 2790-2798.

Castignolles, N., Betbeder, D., Ioualalen, K., Merten, O., Leclerc, C., Samain, D., and Perrin, P. (1994). Stabilization and enhancement of interleukin-2 in vitro bioactivity by new carriers: supramolecular biovectors. Vaccine *12*, 1413-1418.

Chaloupka, K., Malam, Y., and Seifalian, A.M. (2010). Nanosilver as a new generation of nanoproduct in biomedical applications. Trends Biotechnol *28*, 580-588.

Chamberlain, L.H., Burgoyne, R.D., and Gould, G.W. (2001). SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 5619-5624.

Champion, J.A., Katare, Y.K., and Mitragotri, S. (2007). Making polymeric micro- and nanoparticles of complex shapes. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 11901-11904.

Chang, J., Jallouli, Y., Kroubi, M., Yuan, X.B., Feng, W., Kang, C.S., Pu, P.Y., and Betbeder, D. (2009). Characterization of endocytosis of transferrin-coated PLGA nanoparticles by the blood-brain barrier. Int J Pharm *379*, 285-292.

Chang, J., Paillard, A., Passirani, C., Morille, M., Benoit, J.P., Betbeder, D., and Garcion, E. (2012). Transferrin Adsorption onto PLGA Nanoparticles Governs Their Interaction with Biological Systems from Blood Circulation to Brain Cancer Cells. Pharm Res *29*, 1495-1505.

Chaudhuri, A., Battaglia, G., and Golestanian, R. (2011). The effect of interactions on the cellular uptake of nanoparticles. Phys Biol *8*, 046002.

Chilvers, M.A., and O'Callaghan, C. (2000). Local mucociliary defence mechanisms. Paediatr Respir Rev *1*, 27-34.

Chonn, A., Cullis, P.R., and Devine, D.V. (1991). The role of surface charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes. J Immunol *146*, 4234-4241.

Cone, R.A. (2009). Barrier properties of mucus. Adv Drug Deliv Rev *61*, 75-85.

Cooper, A., and Shaul, Y. (2006). Clathrin-mediated endocytosis and lysosomal cleavage of hepatitis B virus capsid-like core particles. J Biol Chem *281*, 16563-16569.

Couchman, J.R., and Woods, A. (1996). Syndecans, signaling, and cell adhesion. J Cell Biochem *61*, 578-584.

Couvreur, P., and Vauthier, C. (2006). Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. Pharm Res *23*, 1417-1450.

Coyne, C.B., Shen, L., Turner, J.R., and Bergelson, J.M. (2007). Coxsackievirus entry across epithelial tight junctions requires occludin and the small GTPases Rab34 and Rab5. Cell Host Microbe *2*, 181-192.

Cozens, A.L., Yezzi, M.J., Kunzelmann, K., Ohrui, T., Chin, L., Eng, K., Finkbeiner, W.E., Widdicombe, J.H., and Gruenert, D.C. (1994). CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol *10*, 38-47.

Cozens, A.L., Yezzi, M.J., Yamaya, M., Steiger, D., Wagner, J.A., Garber, S.S., Chin, L., Simon, E.M., Cutting, G.R., Gardner, P., *et al.* (1992). A transformed human epithelial cell line that retains tight junctions post crisis. In Vitro Cell Dev Biol *28A*, 735-744.

Crowther, J.E., and Schlesinger, L.S. (2006). Endocytic pathway for surfactant protein A in human macrophages: binding, clathrin-mediated uptake, and trafficking through the endolysosomal pathway. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol *290*, L334-342.

Damke, H., Baba, T., van der Bliek, A.M., and Schmid, S.L. (1995). Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin. J Cell Biol *131*, 69-80.

de Duve, C., de Barsy, T., Poole, B., Trouet, A., Tulkens, P., and Van Hoof, F. (1974). Commentary. Lysosomotropic agents. Biochem Pharmacol *23*, 2495-2531.

De Miguel, I., Imbertie, L., Rieumajou, V., Major, M., Kravtzoff, R., and Betbeder, D. (2000). Proofs of the structure of lipid coated nanoparticles (SMBV) used as drug carriers. Pharm Res *17*, 817-824.

De Temmerman, M.L., Rejman, J., Demeester, J., Irvine, D.J., Gander, B., and De Smedt, S.C. (2011). Particulate vaccines: on the quest for optimal delivery and immune response. Drug Discov Today *16*, 569-582.

Debin, A., Kravtzoff, R., Santiago, J.V., Cazales, L., Sperandio, S., Melber, K., Janowicz, Z., Betbeder, D., and Moynier, M. (2002). Intranasal immunization with recombinant antigens associated

with new cationic particles induces strong mucosal as well as systemic antibody and CTL responses. Vaccine *20*, 2752-2763.

Desjardins, M. (2003). ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. Nat Rev Immunol *3*, 280-291.

Di Marco, M., Sadun, C., Port, M., Guilbert, I., Couvreur, P., and Dubernet, C. (2007). Physicochemical characterization of ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles (USPIO) for biomedical application as MRI contrast agents. Int J Nanomedicine *2*, 609-622.

Discher, D.E., and Eisenberg, A. (2002). Polymer vesicles. Science *297*, 967-973.

Doak, S.H., Griffiths, S.M., Manshian, B., Singh, N., Williams, P.M., Brown, A.P., and Jenkins, G.J. (2009). Confounding experimental considerations in nanogenotoxicology. Mutagenesis *24*, 285-293.

Doherty, G.J., and McMahon, H.T. (2009). Mechanisms of endocytosis. Annu Rev Biochem *78*, 857-902.

Donaldson, J.G., Porat-Shliom, N., and Cohen, L.A. (2009). Clathrin-independent endocytosis: a unique platform for cell signaling and PM remodeling. Cell Signal *21*, 1-6.

Dong, Z., Katsumi, H., Sakane, T., and Yamamoto, A. (2010). Effects of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers on the nasal absorption of poorly absorbable drugs in rats. Int J Pharm *393*, 244-252.

Ehrhardt, C., Kneuer, C., Fiegel, J., Hanes, J., Schaefer, U.F., Kim, K.J., and Lehr, C.M. (2002). Influence of apical fluid volume on the development of functional intercellular junctions in the human epithelial cell line 16HBE14o-: implications for the use of this cell line as an in vitro model for bronchial drug absorption studies. Cell Tissue Res *308*, 391-400.

Ehrhardt, C., Kneuer, C., Laue, M., Schaefer, U.F., Kim, K.J., and Lehr, C.M. (2003). 16HBE14o-human bronchial epithelial cell layers express P-glycoprotein, lung resistance-related protein, and caveolin-1. Pharm Res *20*, 545-551.

El mir, S., Casanova, A., Betbeder, D., and Triebel, F. (2001). A combination of interleukin-2 and 60 nm cationic supramolecular biovectors for the treatment of established tumours by subcutaneous or intranasal administration. Eur J Cancer *37*, 1053-1060.

Fazlollahi, F., Angelow, S., Yacobi, N.R., Marchelletta, R., Yu, A.S., Hamm-Alvarez, S.F., Borok, Z., Kim, K.J., and Crandall, E.D. (2011). Polystyrene nanoparticle trafficking across MDCK-II. Nanomedicine *7*, 588-594.

Felt, O., Buri, P., and Gurny, R. (1998). Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. Drug Dev Ind Pharm *24*, 979-993.

Fernandez-Urrusuno, R., Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J.L., and Alonso, M.J. (1999). Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. Pharm Res *16*, 1576-1581.

Feynman, R. (1960). There’s plenty of room at the bottom. Engineering and Science (CalTech) *23*, 22-36.

Forbes, B., and Ehrhardt, C. (2005). Human respiratory epithelial cell culture for drug delivery applications. Eur J Pharm Biopharm *60*, 193-205.

Forbes, B., Shah, A., Martin, G.P., and Lansley, A.B. (2003). The human bronchial epithelial cell line 16HBE14o- as a model system of the airways for studying drug transport. Int J Pharm *257*, 161-167.

Forbes, I.I. (2000). Human airway epithelial cell lines for in vitro drug transport and metabolism studies. Pharm Sci Technolo Today *3*, 18-27.

Galbiati, F., Razani, B., and Lisanti, M.P. (2001). Emerging themes in lipid rafts and caveolae. Cell *106*, 403-411.

Georgieva, J.V., Kalicharan, D., Couraud, P.O., Romero, I.A., Weksler, B., Hoekstra, D., and Zuhorn, I.S. (2011). Surface characteristics of nanoparticles determine their intracellular fate in and processing by human blood-brain barrier endothelial cells in vitro. Mol Ther *19*, 318-325.

Gonda, I. (2000). The ascent of pulmonary drug delivery. J Pharm Sci *89*, 940-945.

Grimmer, S., van Deurs, B., and Sandvig, K. (2002). Membrane ruffling and macropinocytosis in A431 cells require cholesterol. J Cell Sci *115*, 2953-2962.

Gruenert, D.C., Basbaum, C.B., Welsh, M.J., Li, M., Finkbeiner, W.E., and Nadel, J.A. (1988). Characterization of human tracheal epithelial cells transformed by an origin-defective simian virus 40. Proc Natl Acad Sci U S A *85*, 5951-5955.

Harush-Frenkel, O., Debotton, N., Benita, S., and Altschuler, Y. (2007). Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. Biochem Biophys Res Commun *353*, 26-32.

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.

Hatakeyama, H., Ito, E., Akita, H., Oishi, M., Nagasaki, Y., Futaki, S., and Harashima, H. (2009). A pH-sensitive fusogenic peptide facilitates endosomal escape and greatly enhances the gene silencing of siRNA-containing nanoparticles in vitro and in vivo. J Control Release *139*, 127-132.

Heyder, J., Gebhart, J., Rudolf, G., Schiller, C., and Stahlhofen, W. (1986). Deposition of particles in the human respiratory tract in the size range 0.005-15 mm. Journal of Aerosol Science *17*, 811-825.

Hillaireau, H., and Couvreur, P. (2009). Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. Cell Mol Life Sci *66*, 2873-2896.

Hinshaw, J.E. (2000). Dynamin and its role in membrane fission. Annu Rev Cell Dev Biol *16*, 483-519.

Hofmann, W. (2011). Modelling inhaled particle deposition in the human lung - A review Journal of Aerosol Science *42*, 693-724.

Horcajada, P., Serre, C., Ferey, G., Couvreur, P., and Gref, R. (2010). [Hybrid nanocarriers for controlled delivery of antitumour and retroviral drugs delivery]. Med Sci (Paris) *26*, 761-767.

Horcajada, P., Serre, C., Maurin, G., Ramsahye, N.A., Balas, F., Vallet-Regi, M., Sebban, M., Taulelle, F., and Ferey, G. (2008). Flexible porous metal-organic frameworks for a controlled drug delivery. J Am Chem Soc *130*, 6774-6780.

Houtmeyers, E., Gosselink, R., Gayan-Ramirez, G., and Decramer, M. (1999). Regulation of mucociliary clearance in health and disease. Eur Respir J *13*, 1177-1188.

Huang, H.C., Barua, S., Sharma, G., Dey, S.K., and Rege, K. (2011). Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy. J Control Release *155*, 344-357.

Huang, M., Ma, Z., Khor, E., and Lim, L.Y. (2002). Uptake of FITC-chitosan nanoparticles by A549 cells. Pharm Res *19*, 1488-1494.

Illum, L. (1998). Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. Pharm Res *15*, 1326-1331.

Illum, L. (2007). Nanoparticulate systems for nasal delivery of drugs: a real improvement over simple systems? J Pharm Sci *96*, 473-483.

Jabbari, E. (2009). Targeted delivery with peptidomimetic conjugated self-assembled nanoparticles. Pharm Res *26*, 612-630.

Jahn, R. (2004). Principles of exocytosis and membrane fusion. Ann N Y Acad Sci *1014*, 170-178.

Jallouli, Y., Paillard, A., Chang, J., Sevin, E., and Betbeder, D. (2007). Influence of surface charge and inner composition of porous nanoparticles to cross blood-brain barrier in vitro. Int J Pharm *344*, 103-109.

Johannes, L., and Lamaze, C. (2002). Clathrin-dependent or not: is it still the question? Traffic *3*, 443-451.

Jones, K.S. (2008). Biomaterials as vaccine adjuvants. Biotechnol Prog *24*, 807-814.

Jovic, M., Sharma, M., Rahajeng, J., and Caplan, S. (2010). The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. Histol Histopathol *25*, 99-112.

Kabanov, A.V., and Alakhov, V.Y. (2002). Pluronic block copolymers in drug delivery: from micellar nanocontainers to biological response modifiers. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst *19*, 1-72.

Kataoka, K., Matsumoto, T., Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y., Fukushima, S., Okamoto, K., and Kwon, G.S. (2000). Doxorubicin-loaded poly(ethylene glycol)-poly(beta-benzyl-L-aspartate) copolymer micelles: their pharmaceutical characteristics and biological significance. J Control Release *64*, 143-153.

Kim, J.S., Yoon, T.J., Yu, K.N., Noh, M.S., Woo, M., Kim, B.G., Lee, K.H., Sohn, B.H., Park, S.B., Lee, J.K., *et al.* (2006). Cellular uptake of magnetic nanoparticle is mediated through energy-dependent endocytosis in A549 cells. J Vet Sci *7*, 321-326.

Kolter, T., and Sandhoff, K. (2009). Lysosomal degradation of membrane lipids. FEBS Lett *584*, 1700-1712.

Kroubi, M., Daulouede, S., Karembe, H., Jallouli, Y., Howsam, M., Mossalayi, D., Vincendeau, P., and Betbeder, D. (2010). Development of a nanoparticulate formulation of diminazene to treat African trypanosomiasis. Nanotechnology *21*, 505102.

Kumari, A., and Yadav, S.K. (2011). Cellular interactions of therapeutically delivered nanoparticles. Expert Opin Drug Deliv *8*, 141-151.

Kurzchalia, T.V., and Parton, R.G. (1999). Membrane microdomains and caveolae. Curr Opin Cell Biol *11*, 424-431.

Labiris, N.R., and Dolovich, M.B. (2003). Pulmonary drug delivery. Part I: physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. Br J Clin Pharmacol *56*, 588-599.

Lai, S.K., Hida, K., Chen, C., and Hanes, J. (2008). Characterization of the intracellular dynamics of a non-degradative pathway accessed by polymer nanoparticles. J Control Release *125*, 107-111.

Lai, S.K., Hida, K., Man, S.T., Chen, C., Machamer, C., Schroer, T.A., and Hanes, J. (2007). Privileged delivery of polymer nanoparticles to the perinuclear region of live cells via a non-clathrin, non-degradative pathway. Biomaterials *28*, 2876-2884.

Lai, S.K., Wang, Y.Y., and Hanes, J. (2009). Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. Adv Drug Deliv Rev *61*, 158-171.

Lambaerts, K., Wilcox-Adelman, S.A., and Zimmermann, P. (2009). The signaling mechanisms of syndecan heparan sulfate proteoglycans. Curr Opin Cell Biol *21*, 662-669.

Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2009). Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. Immunity *31*, 412-424.

Lawaczeck, R., Diekmann, F., Diekmann, S., Hamm, B., Bick, U., Press, W.R., Schirmer, H., Schon, K., and Weinmann, H.J. (2003). New contrast media designed for x-ray energy subtraction imaging in digital mammography. Invest Radiol *38*, 602-608.

Letchford, K., and Burt, H. (2007). A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. Eur J Pharm Biopharm *65*, 259-269.

Lewis, W. (1931). Pinocytosis. Johns Hopkins Hosp Bull *49*, 17-27.

Li, Z.H., Peng, J., and Chen, H.L. (2011). Bioconjugated quantum dots as fluorescent probes for biomedical imaging. J Nanosci Nanotechnol *11*, 7521-7536.

Liu, D., Chen, C., Hu, G., Mei, Q., Qiu, H., and Long, G. (2011a). Specific targeting of nasopharyngeal carcinoma cell line CNE1 by C225-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles with magnetic resonance imaging. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) *43*, 301-306.

Liu, Q., Shen, Y., Chen, J., Gao, X., Feng, C., Wang, L., Zhang, Q., and Jiang, X. (2011b). Nose-to-Brain Transport Pathways of Wheat Germ Agglutinin Conjugated PEG-PLA Nanoparticles. Pharm Res.

Liu, Q., Zhang, J., Xia, W., and Gu, H. (2012). Magnetic field enhanced cell uptake efficiency of magnetic silica mesoporous nanoparticles. Nanoscale *4*, 3415-3421.

Loerke, D., Mettlen, M., Yarar, D., Jaqaman, K., Jaqaman, H., Danuser, G., and Schmid, S.L. (2009). Cargo and dynamin regulate clathrin-coated pit maturation. PLoS Biol *7*, e57.

Loiseau, P.M., Imbertie, L., Bories, C., Betbeder, D., and De Miguel, I. (2002). Design and antileishmanial activity of amphotericin B-loaded stable ionic amphiphile biovector formulations. Antimicrob Agents Chemother *46*, 1597-1601.

Major, M., Prieur, E., Tocanne, J.F., Betbeder, D., and Sautereau, A.M. (1997). Characterization and phase behaviour of phospholipid bilayers adsorbed on spherical polysaccharidic nanoparticles. Biochim Biophys Acta *1327*, 32-40.

Martin, O.C., and Pagano, R.E. (1994). Internalization and sorting of a fluorescent analogue of glucosylceramide to the Golgi apparatus of human skin fibroblasts: utilization of endocytic and nonendocytic transport mechanisms. J Cell Biol *125*, 769-781.

Mascarell, L., Lombardi, V., Louise, A., Saint-Lu, N., Chabre, H., Moussu, H., Betbeder, D., Balazuc, A.M., Van Overtvelt, L., and Moingeon, P. (2008). Oral dendritic cells mediate antigen-specific tolerance by stimulating TH1 and regulatory CD4+ T cells. J Allergy Clin Immunol *122*, 603-609 e605.

Mason, J.O., Ogden, H.G., Berreth, D.A., and Martin, L.Y. (1986). Interpreting risks to the public. Am J Prev Med *2*, 133-139.

Mayor, S., and Pagano, R.E. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. Nat Rev Mol Cell Biol *8*, 603-612.

McKinlay, A.C., Morris, R.E., Horcajada, P., Ferey, G., Gref, R., Couvreur, P., and Serre, C. (2010). BioMOFs: metal-organic frameworks for biological and medical applications. Angew Chem Int Ed Engl *49*, 6260-6266.

Mercer, J., and Helenius, A. (2008). Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. Science *320*, 531-535.

Mercer, J., and Helenius, A. (2009). Virus entry by macropinocytosis. Nat Cell Biol *11*, 510-520.

Mercer, J., Schelhaas, M., and Helenius, A. (2010). Virus entry by endocytosis. Annu Rev Biochem *79*, 803-833.

Merhi, M., Dombu, C.Y., Brient, A., Chang, J., Platel, A., Le Curieux, F., Marzin, D., Nesslany, F., and Betbeder, D. (2011). Study of serum interaction with a cationic nanoparticle: Implications for in vitro endocytosis, cytotoxicity and genotoxicity. Int J Pharm *423*, 37-44.

Moghimi, S.M., and Szebeni, J. (2003). Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. Prog Lipid Res *42*, 463-478.

Mühlfeld, C., Geiser, M., Kapp, N., Gehr, P., and Rothen-Rutishauser, B. (2007). Re-evaluation of pulmonary titanium dioxide nanoparticle distribution using the "relative deposition index": Evidence for clearance through microvasculature. Particle and Fibre Toxicology *4*.

Neutra, M.R., and Kozlowski, P.A. (2006). Mucosal vaccines: the promise and the challenge. Nat Rev Immunol *6*, 148-158.

Neuwelt, E.A., Hamilton, B.E., Varallyay, C.G., Rooney, W.R., Edelman, R.D., Jacobs, P.M., and Watnick, S.G. (2009). Ultrasmall superparamagnetic iron oxides (USPIOs): a future alternative magnetic resonance (MR) contrast agent for patients at risk for nephrogenic systemic fibrosis (NSF)? Kidney Int *75*, 465-474.

Nicolas, J., and Couvreur, P. (2009). Synthesis of poly(alkyl cyanoacrylate)-based colloidal nanomedicines. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol *1*, 111-127.

Ninomiya, A., Ogasawara, K., Kajino, K., Takada, A., and Kida, H. (2002). Intranasal administration of a synthetic peptide vaccine encapsulated in liposome together with an anti-CD40 antibody induces protective immunity against influenza A virus in mice. Vaccine *20*, 3123-3129.

Nyasae, L.K., Hubbard, A.L., and Tuma, P.L. (2003). Transcytotic efflux from early endosomes is dependent on cholesterol and glycosphingolipids in polarized hepatic cells. Mol Biol Cell *14*, 2689-2705.

Oberdörster G, Ferin J, Finkelstein G, Wade P, and N, C. (1990). Increased Pulmonary Toxicity of Ultrafine Particles? II. Lung Lavage Studies. Journal of Aerosol Science *21*, 384-387.

Orth, J.D., Krueger, E.W., Weller, S.G., and McNiven, M.A. (2006). A novel endocytic mechanism of epidermal growth factor receptor sequestration and internalization. Cancer Res *66*, 3603-3610.

Owens, D.E., 3rd, and Peppas, N.A. (2006). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. Int J Pharm *307*, 93-102.

Paillard, A., Passirani, C., Saulnier, P., Kroubi, M., Garcion, E., Benoit, J.P., and Betbeder, D. (2010). Positively-charged, porous, polysaccharide nanoparticles loaded with anionic molecules behave as 'stealth' cationic nanocarriers. Pharm Res *27*, 126-133.

Panyam, J., and Labhasetwar, V. (2003). Dynamics of endocytosis and exocytosis of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles in vascular smooth muscle cells. Pharm Res *20*, 212-220.

Paris, S., Burlacu, A., and Durocher, Y. (2008). Opposing roles of syndecan-1 and syndecan-2 in polyethyleneimine-mediated gene delivery. J Biol Chem *283*, 7697-7704.

Park, W.Y., Park, J.S., Cho, K.A., Kim, D.I., Ko, Y.G., Seo, J.S., and Park, S.C. (2000). Up-regulation of caveolin attenuates epidermal growth factor signaling in senescent cells. J Biol Chem *275*, 20847-20852.

Parkar, N.S., Akpa, B.S., Nitsche, L.C., Wedgewood, L.E., Place, A.T., Sverdlov, M.S., Chaga, O., and Minshall, R.D. (2009). Vesicle formation and endocytosis: function, machinery, mechanisms, and modeling. Antioxid Redox Signal *11*, 1301-1312.

Parton, R.G., and Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. Nat Rev Mol Cell Biol *8*, 185-194.

Patil, S.B., and Sawant, K.K. (2008). Mucoadhesive microspheres: a promising tool in drug delivery. Curr Drug Deliv *5*, 312-318.

Pelkmans, L., Kartenbeck, J., and Helenius, A. (2001). Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. Nat Cell Biol *3*, 473-483.

Perrie, Y., Mohammed, A.R., Kirby, D.J., McNeil, S.E., and Bramwell, V.W. (2008). Vaccine adjuvant systems: enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. Int J Pharm *364*, 272-280.

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

Petecchia, L., Sabatini, F., Varesio, L., Camoirano, A., Usai, C., Pezzolo, A., and Rossi, G.A. (2009). Bronchial airway epithelial cell damage following exposure to cigarette smoke includes disassembly of tight junction components mediated by the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway. Chest *135*, 1502-1512.

Polette, M., Mestdagt, M., Bindels, S., Nawrocki-Raby, B., Hunziker, W., Foidart, J.M., Birembaut, P., and Gilles, C. (2007). Beta-catenin and ZO-1: shuttle molecules involved in tumor invasion-associated epithelial-mesenchymal transition processes. Cells Tissues Organs *185*, 61-65.

Poon, G.M., and Gariepy, J. (2007). Cell-surface proteoglycans as molecular portals for cationic peptide and polymer entry into cells. Biochem Soc Trans *35*, 788-793.

Potschka, H. (2010). Targeting the brain--surmounting or bypassing the blood-brain barrier. Handb Exp Pharmacol, 411-431.

Rajapaksa, T.E., Stover-Hamer, M., Fernandez, X., Eckelhoefer, H.A., and Lo, D.D. (2010). Claudin 4-targeted protein incorporated into PLGA nanoparticles can mediate M cell targeted delivery. J Control Release *142*, 196-205.

Razafindratsita, A., Saint-Lu, N., Mascarell, L., Berjont, N., Bardon, T., Betbeder, D., Van Overtvelt, L., and Moingeon, P. (2007). Improvement of sublingual immunotherapy efficacy with a mucoadhesive allergen formulation. J Allergy Clin Immunol *120*, 278-285.

Reddy, L.H. (2005). Drug delivery to tumours: recent strategies. J Pharm Pharmacol *57*, 1231-1242.

Reider, A., and Wendland, B. (2011). Endocytic adaptors--social networking at the plasma membrane. J Cell Sci *124*, 1613-1622.

Rice-Ficht, A.C., Arenas-Gamboa, A.M., Kahl-McDonagh, M.M., and Ficht, T.A. (2010). Polymeric particles in vaccine delivery. Curr Opin Microbiol *13*, 106-112.

Romberg, B., Hennink, W.E., and Storm, G. (2008). Sheddable coatings for long-circulating nanoparticles. Pharm Res *25*, 55-71.

Roney, C., Kulkarni, P., Arora, V., Antich, P., Bonte, F., Wu, A., Mallikarjuana, N.N., Manohar, S., Liang, H.F., Kulkarni, A.R., *et al.* (2005). Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood-brain barrier for Alzheimer's disease. J Control Release *108*, 193-214.

Roth, T.F., and Porter, K.R. (1964). Yolk Protein Uptake in the Oocyte of the Mosquito Aedes Aegypti. L. J Cell Biol *20*, 313-332.

Saha, R.N., Vasanthakumar, S., Bende, G., and Snehalatha, M. (2010). Nanoparticulate drug delivery systems for cancer chemotherapy. Mol Membr Biol *27*, 215-231.

Sahay, G., Alakhova, D.Y., and Kabanov, A.V. (2010). Endocytosis of nanomedicines. J Control Release *145*, 182-195.

Sahni, J.K., Doggui, S., Ali, J., Baboota, S., Dao, L., and Ramassamy, C. (2011). Neurotherapeutic applications of nanoparticles in Alzheimer's disease. J Control Release *152*, 208-231.

Sahoo, S.K., and Labhasetwar, V. (2003). Nanotech approaches to drug delivery and imaging. Drug Discov Today *8*, 1112-1120.

Sakagami, M. (2006). In vivo, in vitro and ex vivo models to assess pulmonary absorption and disposition of inhaled therapeutics for systemic delivery. Adv Drug Deliv Rev *58*, 1030-1060.

Salamat-Miller, N., Chittchang, M., and Johnston, T.P. (2005). The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. Adv Drug Deliv Rev *57*, 1666-1691.

Schaffazick, S.R., Pohlmann, A.R., de Cordova, C.A., Creczynski-Pasa, T.B., and Guterres, S.S. (2005). Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. Int J Pharm *289*, 209-213.

Schins, R.P., and Knaapen, A.M. (2007). Genotoxicity of poorly soluble particles. Inhal Toxicol *19 Suppl 1*, 189-198.

Serra, L., Domenech, J., and Peppas, N.A. (2009). Engineering design and molecular dynamics of mucoadhesive drug delivery systems as targeting agents. Eur J Pharm Biopharm *71*, 519-528.

Shapira, A., Livney, Y.D., Broxterman, H.J., and Assaraf, Y.G. (2011). Nanomedicine for targeted cancer therapy: towards the overcoming of drug resistance. Drug Resist Updat *14*, 150-163.

Sigismund, S., Argenzio, E., Tosoni, D., Cavallaro, E., Polo, S., and Di Fiore, P.P. (2008). Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. Dev Cell *15*, 209-219.

Slowing, II, Vivero-Escoto, J.L., Wu, C.W., and Lin, V.S. (2008). Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. Adv Drug Deliv Rev *60*, 1278-1288.

Slutter, B., Bal, S.M., Que, I., Kaijzel, E., Lowik, C., Bouwstra, J., and Jiskoot, W. (2010). Antigen-adjuvant nanoconjugates for nasal vaccination: an improvement over the use of nanoparticles? Mol Pharm *7*, 2207-2215.

Sonvico, F., Dubernet, C., Colombo, P., and Couvreur, P. (2005). Metallic colloid nanotechnology, applications in diagnosis and therapeutics. Curr Pharm Des *11*, 2095-2105.

Sowa, G., Pypaert, M., and Sessa, W.C. (2001). Distinction between signaling mechanisms in lipid rafts vs. caveolae. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 14072-14077.

Sung, J.C., Pulliam, B.L., and Edwards, D.A. (2007). Nanoparticles for drug delivery to the lungs. Trends Biotechnol *25*, 563-570.

Tahara, K., Sakai, T., Yamamoto, H., Takeuchi, H., Hirashima, N., and Kawashima, Y. (2009). Improved cellular uptake of chitosan-modified PLGA nanospheres by A549 cells. Int J Pharm *382*, 198-204.

Tai, W., Roberts, L., Seryshev, A., Gubatan, J.M., Bland, C.S., Zabriskie, R., Kulkarni, S., Soong, L., Mbawuike, I., Gilbert, B., *et al.* (2011). Multistrain influenza protection induced by a nanoparticulate mucosal immunotherapeutic. Mucosal Immunol *4*, 197-207.

Takenaka, S., Moller, W., Semmler-Behnke, M., Karg, E., Wenk, A., Schmid, O., Stoeger, T., Jennen, L., Aichler, M., Walch, A., *et al.* (2012). Efficient internalization and intracellular translocation of inhaled gold nanoparticles in rat alveolar macrophages. Nanomedicine (Lond).

Takeuchi, H., Yamamoto, H., Niwa, T., Hino, T., and Kawashima, Y. (1996). Enteral absorption of insulin in rats from mucoadhesive chitosan-coated liposomes. Pharm Res *13*, 896-901.

Taylor, M., Moore, S., Mourtas, S., Niarakis, A., Re, F., Zona, C., La Ferla, B., Nicotra, F., Masserini, M., Antimisiaris, S.G., *et al.* (2011). Effect of curcumin-associated and lipid ligand-functionalized nanoliposomes on aggregation of the Alzheimer's Abeta peptide. Nanomedicine *7*, 541-550.

Tkachenko, E., Lutgens, E., Stan, R.V., and Simons, M. (2004). Fibroblast growth factor 2 endocytosis in endothelial cells proceed via syndecan-4-dependent activation of Rac1 and a Cdc42-dependent macropinocytic pathway. J Cell Sci *117*, 3189-3199.

Torchilin, V.P. (2010). Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example. Handb Exp Pharmacol, 3-53.

van Meer, G., and Sprong, H. (2004). Membrane lipids and vesicular traffic. Curr Opin Cell Biol *16*, 373-378.

Vauthier, C., and Bouchemal, K. (2009). Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. Pharm Res *26*, 1025-1058.

Vauthier, C., Labarre, D., and Ponchel, G. (2007). Design aspects of poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles for drug delivery. J Drug Target *15*, 641-663.

Vllasaliu, D., Exposito-Harris, R., Heras, A., Casettari, L., Garnett, M., Illum, L., and Stolnik, S. (2010). Tight junction modulation by chitosan nanoparticles: comparison with chitosan solution. Int J Pharm *400*, 183-193.

Wang, J., Sui, M., and Fan, W. (2010). Nanoparticles for tumor targeted therapies and their pharmacokinetics. Curr Drug Metab *11*, 129-141.

Wang, M., and Thanou, M. (2010). Targeting nanoparticles to cancer. Pharmacol Res *62*, 90-99.

Wanner, A., Salathe, M., and O'Riordan, T.G. (1996). Mucociliary clearance in the airways. Am J Respir Crit Care Med *154*, 1868-1902.

Warheit, D.B., Sayes, C.M., Reed, K.L., and Swain, K.A. (2008). Health effects related to nanoparticle exposures: environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks. Pharmacol Ther *120*, 35-42.

Waseem, T.V., Kolos, V.A., Lapatsina, L.P., and Fedorovich, S.V. (2006). Influence of cholesterol depletion in plasma membrane of rat brain synaptosomes on calcium-dependent and calcium-independent exocytosis. Neurosci Lett *405*, 106-110.

Widdicombe, J.H. (2002). Regulation of the depth and composition of airway surface liquid. J Anat *201*, 313-318.

Wijagkanalan, W., Kawakami, S., and Hashida, M. (2011). Designing dendrimers for drug delivery and imaging: pharmacokinetic considerations. Pharm Res *28*, 1500-1519.

Winau, F., Westphal, O., and Winau, R. (2004). Paul Ehrlich--in search of the magic bullet. Microbes Infect *6*, 786-789.

Yang, H. (2010). Nanoparticle-mediated brain-specific drug delivery, imaging, and diagnosis. Pharm Res *27*, 1759-1771.

Ziello, J.E., Huang, Y., and Jovin, I.S. (2010). Cellular endocytosis and gene delivery. Mol Med *16*, 222-229.