



**HAL**  
open science

# Étude de la biodistribution de nanoparticules de poly(acide lactique) chez le poisson-zèbre après administration muqueuse et intraveineuse

Julien Rességuier

► **To cite this version:**

Julien Rességuier. Étude de la biodistribution de nanoparticules de poly(acide lactique) chez le poisson-zèbre après administration muqueuse et intraveineuse. Biotechnologie. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1023 . tel-01587788

**HAL Id: tel-01587788**

**<https://theses.hal.science/tel-01587788>**

Submitted on 14 Sep 2017

**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.



N°d'ordre NNT : xxx

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**  
opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale N° 205**  
**(Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences Santé)**

**Spécialité de doctorat** : Biologie, médecine et santé  
**Discipline** : Ingénierie biologique et médicale, Biotechnologie

Soutenue publiquement le 31/01/2017, par :  
**Mr. RESSEGUIER Julien**

---

**Etude de la biodistribution de nanoparticules de poly(acide lactique) chez le poisson-zèbre après administration muqueuse et intraveineuse**

---

Devant le jury composé de :

Pr.VINCIGUERRA, Christine	PU-PH	Université de Lyon 1	<b>Présidente</b>
Dr.GREF, Ruxandra	DR	Université de Paris-Sud	<b>Rapporteuse</b>
Dr.LUTFALLA, Georges	DR	Université de Montpellier 2	<b>Rapporteur</b>
Dr.BOUDINOT, Pierre	DR	INRA	<b>Rapporteur</b>
Dr.LEVRAUD, Jean-Pierre	DR	Institut Pasteur	<b>Examineur</b>
Pr.LE GUELLEC, Dominique	PU	Université de Lyon 1	<b>Directeur de thèse</b>
Dr.DELAUNE, Émilie	MCU	Université de Lyon 1	<b>Co-encadrante</b>

*« C'est avec la logique que nous prouvons et avec l'intuition que nous trouvons »*

Henri Poincaré (1854-1912)

*« La génétique dessine l'échelle des possibles, l'environnement en imprime la réalité et le contexte permet d'en saisir l'essence »*

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie  
Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

## **M. le Professeur Frédéric FLEURY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

## **COMPOSANTES SANTE**

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud –  
Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C.  
VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la  
Réadaptation

Directeur : M. X. PERROT

Département de formation et Centre de Recherche  
en Biologie Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

## **COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE**

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme C. FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

## REMERCIEMENTS

*Je tiens tout d'abords à remercier **Mme. Ruxandra GREF**, **Mr. Pierre BOUDINOT**, **Mr. Georges LUTFALLA** d'avoir accepté de rapporté mon travail de thèse, **Mme. Christine VINCIGUERRA** d'avoir accepté de présider mon jury de thèse et **Mr. Jean-Pierre LEVRAUD** d'avoir accepté de participer à la soutenance de thèse en tant qu'examinateur et pour m'avoir guidé durant les comités de suivi de thèse. Je tiens aussi à remercier **Mme. Dominique SIGAUDDO-ROUSSEL** de m'avoir également guidé durant les comités de suivi de thèse.*

*Je souhaite aussi remercier mon directeur de thèse, **Mr. Dominique LE GUELLEC**, de m'avoir encadré depuis ma deuxième année de Master, pour ses conseils pour que j'apprenne à me canaliser et son soutien lors de ma maladie. Merci également de m'avoir permis de m'épanouir dans mon sujet de thèse, d'avoir toujours défendu mon indépendance et de toujours avoir été joignable lorsque je rencontrais des difficultés. J'espère un jour être capable de m'exprimer par écrit et par oral aussi majestueusement que toi !*

*Je tiens également à remercier **Mme. Emilie DELAUNE** pour m'avoir encadré, pour tous ses conseils durant ces 3 années de thèse et nos discussions dans le bureau.*

*Enfin, je tiens à remercier mon directeur de laboratoire, **Mr. Bernard VERRIER**, pour tellement de choses que j'ai peur d'en oublier. Merci d'avoir cru en moi et mes idées toutes ces années, d'avoir financé mon projet de thèse, d'avoir toujours trouvé du temps pour m'écouter malgré un emploi du temps très chargé, pour m'avoir soutenu durant mes problèmes de santé et d'avoir facilité mon retour au sein du laboratoire. J'espère plus tard être capable moi aussi de fournir du travail et d'aider autant de personnes d'une manière aussi efficace et humaine que toi.*

*Je tiens à remercier encore une fois **Mr. Pierre BOUDINOT** et **Mr. Jean-Pierre LEVRAUD** et leurs équipes de m'avoir aiguillé et appris tant de chose sur le poisson-zèbre et le système immunitaire. Vous m'avez tant appris et permis de me former sur des techniques clés. Vous avez pris beaucoup de temps pour répondre à mes questions même lorsque j'étais seulement de passage à Paris et même accueilli au sein de vos laboratoires pour me former. Merci également à **Mme. Elina ALEKSEJEVA** d'avoir pris du temps pour m'apprendre à réaliser des dissections et de la cytométrie en flux et pour nos discussions.*

*Je tiens aussi à remercier **Mme. Bérangère FROMY** pour ses conseils sur les analyses statistiques, **Mr. Thibault ANDRIEU** et **Mr. Sébastien DUSSURGEY** pour leur accompagnement au sein de la plateforme ANIRA de cytométrie en flux, aux différents membres de la plateforme d'imagerie PLATIM et de la plateforme d'histologie PRIMATISS. Je remercie également **Mme. Laure BERNARD** et **Mr. Robert RENARD** responsables du PRECI et **Mme. Marielle PASDELOUP** pour ses conseils sur les analyses de qPCR.*

*Je remercie aussi toutes les stagiaires que j'ai pu, au moins en partie, encadrer : **Claire, Amandine, Anne-Sophie, Sofia et Anne-Line**. **Mme. Anne-Sophie REGENT** m'a beaucoup apporté avec son expertise sur la qPCR et **Mme. Anne-Line COOLEN** sur l'imagerie du*

poisson-zèbre. Je ne me fais aucun doute sur les nombreux succès qui vous attendent durant de vos carrières respectives. **Anne-Line**, je suis convaincu que tu réaliseras une thèse magnifique.

Je tiens également à remercier l'ensemble de l'équipe. **Mme. Céline TERRAT** et **Mme. Céline LACROIX-GIMON**, expertes dans la formulation des nanoparticules, qui ont vaillamment supporté mon rire, ma musique et mes blagues enfantines :) Je remercie également **Mme. Perrine MERCIER** pour sa patience et son calme malgré le rangement « très ordonné » de ma paillasse et de mon bureau. Je remercie aussi **Mme. Charlotte PRIMARD**, pour m'avoir encadré durant mon master et pour ses conseils. Merci aussi à tous mes collègues et ex-collègues dont certains sont maintenant des amis : **Alice, Morgane, Capucine, Agathe, Simon, Damien, Yves, Jean-Yves, Claire, Loris, Naïma, Evelyne, Corinne, Gina, Gloria, Ioana, Maxime, Bastien, Séverine, Myriam, Christelle** et tous les autres.

Je remercie spécialement **Soso la girafe**, pour tous les moments passés ensemble, **les vincents** pour leur solidarité masculine au sein du laboratoire, m'avoir enseigné les joies de la carboglace, les parties de pêche et la randonnée magique ! Un grand merci aussi à **Annefaufisse**, voisine de bureau qui a eu une mauvaise influence sur moi malgré mon innocence et bienveillance naturelle, et qui n'eut absolument pas à me supporter toutes ces années. Merci pour tous ces moments de détente et soirées jeux.

Un grand merci également à tous les autres collègues de l'IBCP pour la bonne ambiance, les compétitions de G-Switch et les Happy Hours. Merci également à **Alexis** pour son soutien informatique et pour m'avoir aidé à donner des coups de pelle dans une rivière.

Je souhaite remercier **Mr. Jean-François DORE** pour m'avoir aiguillé vers la recherche scientifique, **Mr. Jonathan POL** qui m'a encadré durant mon séjour au Canada et transmis une partie de sa passion pour la recherche. Je tiens à chaleureusement remercier le professeur **Gilles SALLES**, le docteur **Emmanuel BACHY** et l'ensemble du service d'hématologie et de l'équipe soignante des Hôpitaux Lyon-Sud pour m'avoir accompagné et soigné.

Un grand merci à tous mes amis proches pour m'avoir soutenu et plus particulièrement **Bertrand, Soleilmane** et **Lucas** que je considère comme mes frères.

Je remercie également toute ma famille pour son soutien et pour veiller sur moi et plus particulièrement mes parents, **Lucette et Didier**, mes frères, **Florent et Valentin** et ainsi que mon filleul, **Justin**.

Et enfin, un grand merci à toi **Aurélie** dont l'amour m'accompagne depuis maintenant plus de 6 ans, pour m'avoir soutenu et pour t'être occupé de moi, avec **Gargamel** ton chat infirmier, et ce même dans les moments les plus difficiles alors que tu réalisais ta propre thèse.

# **Etude de la biodistribution de nanoparticules de poly(acide lactique) chez le poisson-zèbre après administration muqueuse et intraveineuse.**

---

## **RÉSUMÉ**

L'utilisation des nanobiotechnologies dans le domaine de la santé est en plein essor. Les nanoparticules de poly(acide lactique) (PLA) constituent des nanovecteurs biocompatibles et biodégradables capables d'accroître la spécificité et l'efficacité de traitements thérapeutiques et vaccinaux administrables par voie muqueuse et intraveineuse. Toutefois, l'optimisation de ces nanosystèmes se heurte à une caractérisation incomplète de leur biodistribution *in vivo*, en particulier à l'échelle cellulaire.

L'objectif de ce travail de thèse a été d'enrichir les connaissances sur la biodistribution des nanoparticules de PLA *in vivo* après administration muqueuse ou intraveineuse, dans le but d'élargir les perspectives d'optimisation et d'utilisation de ces nanoparticules. Ce travail a été réalisé sur le modèle du poisson-zèbre (*Danio rerio*), un vertébré très adapté pour des études sur organisme entier.

Par une méthodologie d'analyse de la biodistribution des nanoparticules de PLA, j'ai montré que les nanoparticules de PLA administrées par balnéation franchissent efficacement les muqueuses et ont un fort tropisme naturel vers les cellules dendritiques muqueuses. Ces données ont servi à élaborer des stratégies de ciblage, utilisant diverses lectines afin d'augmenter la prise en charge des nanoparticules de PLA par diverses muqueuses. Enfin, l'étude du devenir de ces nanoparticules après injection intraveineuse a révélé de nombreuses interactions avec le système circulatoire.

Ce travail a permis d'approfondir la connaissance des interactions des nanoparticules de PLA avec le vivant, soulignant le potentiel prometteur de ces nanoparticules pour la vaccination muqueuse

---

## **MOTS-CLÉS**

Nanoparticule de PLA – Poisson-zèbre – Vectorisation de vaccins – Administration muqueuse – Injection intraveineuse – Biodistribution – Cellules présentatrices d'antigène – Ciblage – Lectine agglutinine de cacahuète

*Vecteurs colloïdaux et transport tissulaire – LBTI (UMR5305)  
Institut de Biologie et Chimie des Protéines – 7 passage du Vercors – 69367 Lyon Cedex 07*

# **Poly(lactic acid) nanoparticles biodistribution study in the zebrafish after mucous and intravenous administration.**

---

## **ABSTRACT**

Nanobiotechnologies raise a growing interest in the medical field. Poly(lactic acid) (PLA) nanoparticles, constitute biocompatible and biodegradable nanovectors able to increase the specificity and efficacy of diverse therapeutic and vaccine treatments, following mucosal and intravenous administration. However, further optimization of these nanosystems has been limited by the lack of information regarding their *in vivo* biodistribution, especially at the cellular level.

The main objective of this PhD work was to better document the *in vivo* biodistribution of PLA nanoparticles, after mucous and intravenous administration, to help optimizing these nanovectors and further expand their field of potential applications. This work was performed using zebrafish, a Vertebrate model particularly well suited for whole-body approaches.

Using a methodology to analyze the PLA nanoparticles biodistribution, I showed that PLA nanoparticles efficiently crossed mucosae following bath administration, and display a strong natural tropism toward mucous dendritic cells. These data led to examining targeting strategies based on various lectins, to enhance the uptake of nanoparticles by specific mucosae. Finally, the study of PLA nanoparticles biodistribution following intravenous injection, revealed numerous interactions with the circulatory system.

Overall, this work has been able to strengthen our understandings of PLA nanoparticles among living organisms, furthermore highlighting their promising potential as nanovehicles for mucosal vaccines.

---

## **KEY-WORDS**

PLA nanoparticle – Zebrafish – Vaccines Carrier – Mucosal delivery – Intravenous injection – Biodistribution – Antigen-presenting cells – Targeting – Peanut agglutinin

*Colloidal vectors and tissue transport – LBTI (UMR5305)  
Institut de Biologie et Chimie des Protéines – 7 passage du Vercors – 69367 Lyon Cedex 07*

# TABLE DES MATIERES

<b>Abreviation .....</b>	<b>10</b>
<b>1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>13</b>
<b>Nanoparticules .....</b>	<b>13</b>
<b>1. Généralités .....</b>	<b>13</b>
1.1. Définition .....	13
1.2. Différentes familles de nanoparticules .....	15
1.3. Les nanoparticules dans notre environnement.....	17
1.4. Les nanoparticules pour la vectorisation .....	20
1.5. Biodistribution générale des nanoparticules .....	21
<b>2. Les nanoparticules de PLA .....</b>	<b>28</b>
2.1. Polymère d'acide lactique .....	28
2.2. Propriétés des nanoparticules de PLA .....	29
2.3. Applications thérapeutiques.....	33
2.1. Biodistribution des nanoparticules de PLA et PLGA.....	43
<b>Poisson-zebre (<i>danio rerio</i>) .....</b>	<b>69</b>
<b>1. Généralités .....</b>	<b>69</b>
1.1. Informations générales.....	69
1.2. Intérêts pratiques et scientifiques .....	70
1.3. Modèle animal .....	71
<b>2. Anatomie .....</b>	<b>73</b>
2.1. Généralités.....	73
2.2. Bulbe olfactif (Narines) .....	73
2.3. Tube digestif.....	75
2.4. Branchies.....	77
2.5. Peau.....	79
2.6. Thymus .....	81
2.7. Organes internes : Reins, foie et rate .....	83
2.8. Système circulatoire .....	85
<b>3. Système immunitaire .....</b>	<b>88</b>
<b>4. Etat de l'art concernant la biodistribution des nanoparticules chez les poissons .....</b>	<b>94</b>
4.1. Biodistribution chez les téléostéens .....	94
4.2. Administration de nanoparticules chez le poisson-zèbre .....	96

<b>2. OBJECTIFS DE THESE .....</b>	<b>100</b>
<b>3. RESULTATS .....</b>	<b>102</b>
<b><i>Biodistribution muqueuse .....</i></b>	<b>102</b>
<b>1. Publication scientifique .....</b>	<b>102</b>
<b>2. Discussion et résultats complémentaires.....</b>	<b>133</b>
2.1. Méthodologie et développement des marquages.....	133
2.2. Thymus.....	135
2.3. Analyse préliminaire transcriptomique .....	136
2.4. Co-distribution NP-PLA nues et NP-PLA-p24 .....	140
2.5. Devenir des nanoparticules de PLA.....	141
<b>3. Matériels et méthodes complémentaires.....</b>	<b>142</b>
<b>4. Conclusion.....</b>	<b>144</b>
<b><i>Stratégies de ciblage .....</i></b>	<b>145</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>145</b>
1.1. Choix de la stratégie de ciblage .....	147
1.2. Lectine agglutinine de Lotus tetragonolobus.....	148
1.3. Lectine agglutinine d'Arachys hypogaea.....	149
1.4. Objectifs .....	150
<b>2. Résultats.....</b>	<b>151</b>
2.1. Adsorption de la lectine LTA sur les nanoparticules de PLA.....	151
2.2. Adsorption de la lectine PNA sur les nanoparticules de PLA .....	152
2.3. Evaluation préliminaire de la biodistribution.....	154
Muqueuse intestinale .....	154
Muqueuse branchiale.....	157
Muqueuse cutanée.....	159
Conclusion partielle .....	161
2.4. Evaluation par cytométrie en flux de la prise en charge des nanoparticules de PLA-PNA.....	161
Muqueuse Branchiale .....	162
Muqueuse cutanée.....	163
Conclusion partielle.....	165
2.5. Evaluation préliminaire par microscopie confocale du devenir de la lectine PNA .....	165
Muqueuse Branchiale .....	166
Muqueuse cutanée.....	168
Conclusion partielle.....	168

3. Matériels et méthodes.....	170
4. Conclusion.....	172
<b>Biodistribution intraveineuse .....</b>	<b>173</b>
1. Introduction .....	173
2. Résultats.....	174
2.1. Internalisation par les cellules endothéliales et les macrophages .....	174
2.2. Cinétique de la prise en charge des nanoparticules de PLA.....	176
2.3. Devenir des nanoparticules de PLA par Microscopie électronique .....	178
2.4. Cinétique de la prise en charge des nanoparticules de PLA par les macrophages par cytométrie en flux.....	182
2.5. Transfert de nanoparticules de PLA entre cellules endothéliales et macrophages.....	184
2.6. Conclusion partielle .....	186
2.7. Devenir des nanoparticules de PLA dans le système réticulo-endothélial chez le poisson adulte .....	186
3. Matériels et méthodes.....	189
4. Conclusion.....	194
<b>4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>195</b>
<b>5. CONCLUSION .....</b>	<b>209</b>
<b>6. ANNEXE .....</b>	<b>211</b>
<i>Revue scientifique</i> .....	211
<b>7. BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>232</b>

# ABREVIATION

**3D** : 3 dimensions

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADNc** : Acide désoxyribonucléique  
complémentaire

**APC** : Cellules présentatrice d'antigène

**ARN** : Acide ribonucléique

**ARNsi** : Petit acide ribonucléique interférant

**BM** : Lame basale

**BSA** : Albumine de sérum bovin

**CLR** : récepteur aux lectine de type C

**CS** : Chitosane

**DAPI** : 4',6-diamidino-2-phénylindole

**DPH** : 1,6-diphenyl-1,3,5hexatriene

**DTPA** : Acide diethylenetriamine pentaacétique

**EC** : Cellule endothéliale vasculaire

**EPR** : Effet de perméabilité et de rétention  
tissulaire

**FDMV** : Virus de la maladie des pieds et de la  
bouche

**FGF** : Facteur de croissance des fibroblastes

**FITC** : Isothiocyanate de fluorescéine

**GA** : Acide gambigique

**GALT** : Tissu lymphoïde associé aux intestins

**GiALT** : Tissu lymphoïde associé aux branchies

**HBsAg** : Antigène de l'hépatite B

**HGF** : Facteur de croissance des hépatocytes

**IgA** : Immunoglobuline A

**IgD** : Immunoglobuline D

**IgM** : Immunoglobuline M

**IgT** : Immunoglobuline T

**IgZ** : Immunoglobuline Z

**IHNV** : Virus infectieux à nécroses  
hématopoïétiques

**Ip** : Indice de polydispersité

**IRM** : Imagerie à Résonance Magnétique

**ISO/TC** : Comité technique de l'organisation  
internationale de normalisation

**ISO/TS** : Spécification technique provenant de  
l'organisation internationale de normalisation

**KAg** : Antigène du virus du syndrome respiratoire  
et reproducteur porcin.

**kDA** : kilo Dalton

**KPV** : tripeptide lysine-Proline-Valine

**LDH** : Lactate déshydrogénase

**LP** : *Lamina Propria*

**LPS** : Lipopolysaccharide

**LTA** : Lectine agglutinine de pois carré

**M (cellule)** : Cellule microfold

**MG** : Intestin intermédiaire antérieur

**MPX** : Myéloperoxydase

**mPEG** : méthoxy-polyéthylène glycol

**NALT** : Tissu lymphoïde associé aux narines

**NK (cellule)** : Tueuse naturelle

**NP** : Nanoparticules

**OCDE** : Organisation de Coopération et de Développement Economiques

**ODN** : oligodeoxynucleotides

**OMC** : Canal marginal extérieur

**PBS** : Tampon phosphate salin

**PC** : Cellule pilier

**PEG** : polyéthylène glycol

**PF68** : Agent pluronique F-68

**PFA** : Paraformaldéhyde

**pH** : potentiel Hydrogène

**PHEA** :  $\alpha,\beta$ -poly(N-2-hydroxyethyl)-DL-aspartamide

**PLA**: Acide poly(lactique)

**PLGA** : Acide poly(lactique-co-glycolique)

**PLL** : Poly(L-lysine)

**pMG** : Intestin intermédiaire postérieur

**PNA** : Lectine agglutinin de cacahuète

**PRRS** : virus du syndrome respiratoire et reproducteur porcin

**PVA** : Alcool polyvinyle

**PVC** : Cellules pavimenteuses

**qPCR** : Réaction en chaîne de la polymérase quantitative

**RBC** : érythrocyte

**RGD** : Séquence peptidique d'arginine-Glycine-Acide aspartique

**ROS** : Spécimen réactif à l'oxygène

**SALT** : Tissu lymphoïde associé à la peau

**SVF** : Sérum de veau fœtal

**TA** : Température ambiante

**TLR** : toll-like-recepteur

**TPGS** :  $\alpha$ -tocophéryl-polyéthylène glycole-1000 succinate

**TRITC** : Tetramethylrhodamine isothiocyanate

**UV-A** : Rayonnement ultraviolet de type A

**UV-B** : Rayonnement ultraviolet de type B

**VIH** : Virus de l'immunodéficience humaine

**VSVC** : Virus de la virémie printanière de la carpe



# 1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

## NANOPARTICULES

### 1. Généralités

#### 1.1. Définition

Les nanoparticules, dans le sens commun sont des objets à l'échelle nanométrique, une dimension de l'ordre de un milliardième de mètre. Afin de se donner une idée, un agave mesure de 1 à 2 m, là où un flocon de neige va mesurer environ 4 mm, un cheveu 0,1 mm, une cellule 0,02 mm, 0,001 mm pour les bactéries et enfin 200 nm pour une nanoparticule représente 0,0002 mm. D'une autre manière pour imaginer la différence de grandeur, la comparaison entre une orange de 10 cm et notre planète a un ordre de grandeur identique à celle entre cette même orange et une particule de 1 nm.

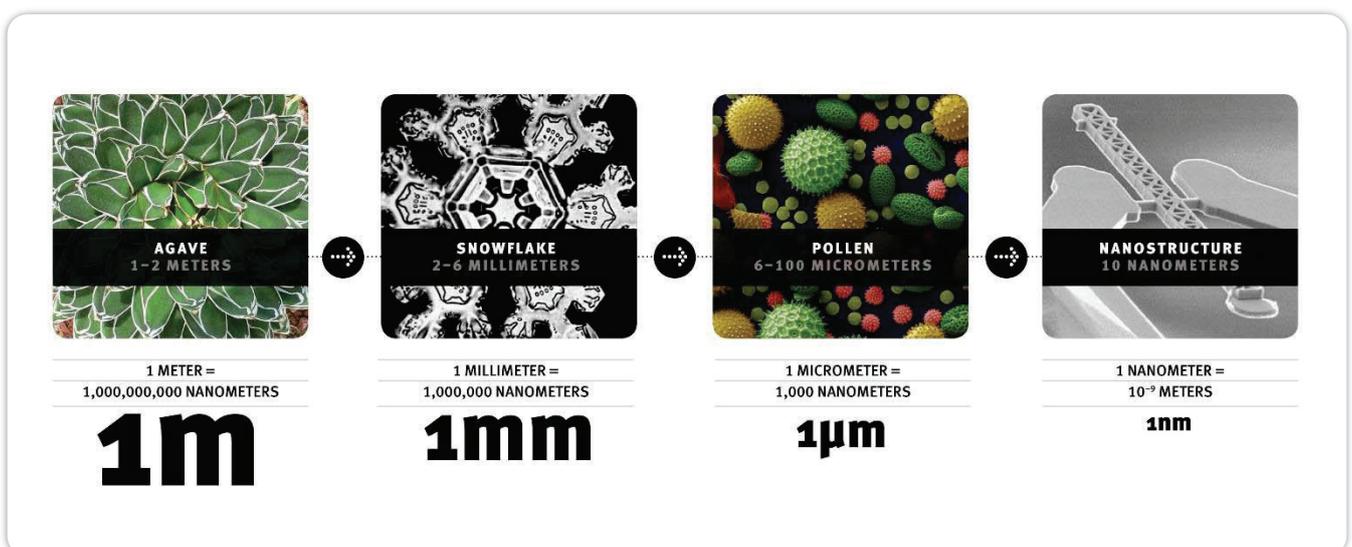
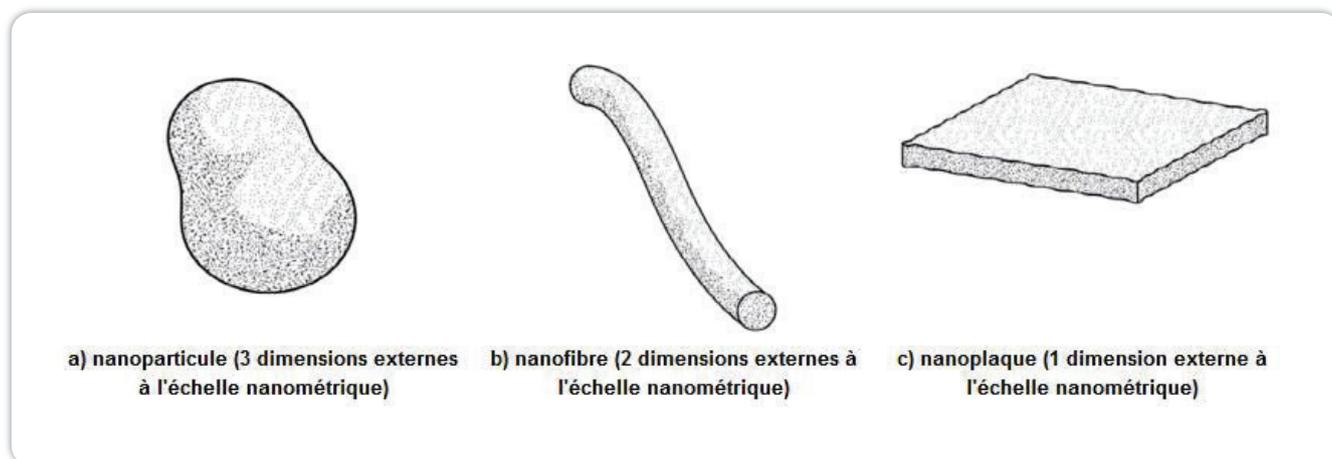


Figure 1 : Echelle de grandeur (352)

Une définition plus stricte a été formulée par l'Organisation Internationale de Normalisation par le biais de son comité ISO/TC 229 *Nanotechnologies* sous la norme ISO/TS27687 :2008. Récemment, en 2015 cette norme fut annulée et remplacée par l'ISO/TS 80004-2. Il est signifié qu'une nanoparticule est un objet dont les 3 dimensions externes sont comprises entre 1 et 100 nm, et dont les longueurs du plus grand et du plus petit axe ne sont pas significativement différentes (ratio inférieur ou égale à 3) (*Figure 2*).

Cependant, d'une manière plus générale, est considérée comme nanoparticule toute particule sub-micronique dont le diamètre est suffisamment petit pour voir apparaître l'émergence de nouvelles propriétés physico-chimiques par rapport aux matériaux dit « conventionnels », 100 nm représentant la limite critique où s'observe fréquemment l'acquisition de ces nouvelles propriétés. Néanmoins, certaines propriétés comme le changement de turbidité ou encore l'acquisition d'un état colloïdal apparaissent à de plus grandes tailles, c'est ainsi que l'Union International de Chimie Pure et Appliquée préconise l'extension de cette limite jusqu'à 500 nm (1). Ainsi en biologie le préfixe « nano » est toléré pour des particules de plusieurs centaines de nanomètres, de même l'appellation de particules semi-fine peut aussi être employée.



*Figure 2* : Définition des nano-objets (353)

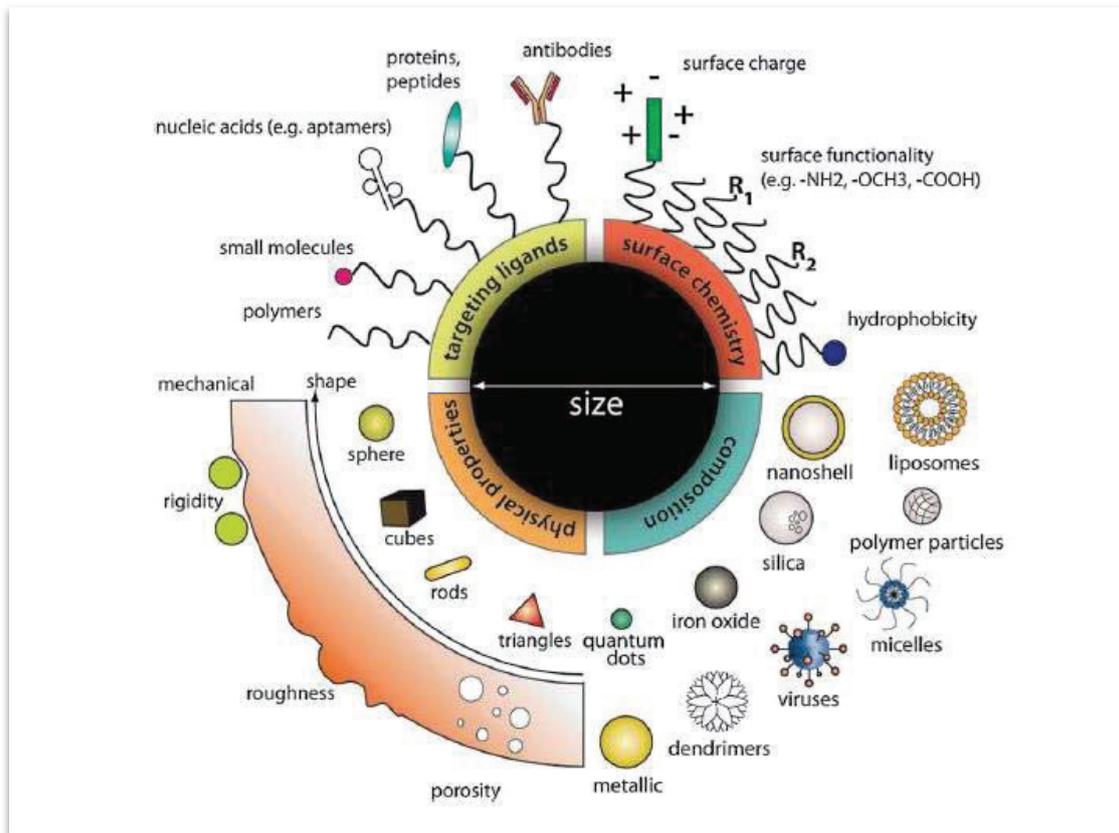
## 1.2. Différentes familles de nanoparticules

Les nanoparticules se déclinent sous une immense variété de familles en fonction de leurs caractéristiques. Brièvement, les principales familles de nanoparticules vont tout d'abord se distinguer en fonction de leur composition et structure. Une première dichotomie va faire apparaître deux grandes superfamilles : les nanovecteurs inorganiques et leurs équivalents organiques.

- ∴ Les nanovecteurs inorganiques font montre, d'une manière générale, d'une meilleure stabilité que leurs équivalents organiques (2), tandis que leurs applications sont fortement liées à des phénomènes physiques comme l'optique et les transferts d'énergie. Dans cette famille se retrouvent les nanoparticules métalliques comme celles à base d'oxyde de fer, d'or ou encore d'argent. La famille des nanoparticules nano-coquille (nanoshells) est caractérisée par une structure avec un cœur diélectrique recouvert par une couche métallique. Celle des boîtes quantiques, plus connues sous leur nom anglais « Quantum dots », englobe des cristaux semi-conducteurs de quelques nanomètres qui font montre d'une stabilité et intensité de fluorescence remarquable une fois excités par une longueur d'onde proche de l'ultraviolet. Les nanoparticules dites céramiques sont quant à elles composées de carbures, phosphates, carbonates ou encore oxydes de métaux et métalloïdes comme le titane et la silice.
- ∴ Les nanovecteurs organiques ont des applications beaucoup plus orientées vers le domaine du vivant de par leur tendance à faire montre d'une meilleure « dégradabilité » que les nanoparticules inorganiques, ainsi que par un potentiel d'interaction facilité avec les différentes molécules, protéines et autres composantes de l'organisme. Cette famille regroupe entre autres les systèmes nanométriques à base de micelles et de liposomes. Ces nanoparticules, formées d'une monocouche de molécules amphiphiles recouvrant un noyau liquide pour les premières (3) et d'une vésicule sphérique composée d'un noyau hydrophile, d'un compartiment hydrophobe et d'une ou plusieurs bicouches lipidiques (4) pour la deuxième, sont principalement utilisées dans la délivrance contrôlée de médicaments. Ces dernières années a vu apparaître le développement des

archéosomes, liposomes composés de lipides provenant de membranes d'archées et analogues synthétiques (5). Ces dernières bénéficient d'une grande résistance aux agressions environnementales extérieures. Dans les nanoparticules organiques se trouvent également les virosomes et Virus-Like-Particles, respectivement composés d'enveloppes virales vides et d'auto-assemblage de protéines capsidiques (6). Toujours dans cette famille, les dendrimères sont composés d'une arborescence de monomères, ces nanoparticules sont associées à un nombre de générations auquel correspond la quantité de ramifications. Ainsi des dendrimères de lysines de type G1 posséderont 8 groupes tandis que des G5 en posséderont 963. De par leur petite taille compatible avec le passage des pores nucléaires et leur charge de surface positive permettant de véhiculer des acides nucléiques, ces dendrimères possèdent un potentiel certain concernant la thérapie génique (7). Viennent enfin les nanoparticules polymériques, composées d'un ou plusieurs polymères organisés autour d'une chambre liquide, voire semi-liquide ou bien en tant que nanosphères matricielles (8). En fonction du ou des polymères utilisés, ces nanoparticules qui sont très modulables, peuvent associer les bénéfices d'une forte biodégradabilité avec ceux d'un contrôle avancé de relargage de principes actifs (9,10)

Au sein de ces deux grandes familles, de nombreuses dénominations peuvent ainsi être appliquées non seulement en fonction de leur composition et structure, mais aussi en fonction de leurs propriétés physiques comme la forme et l'élasticité, ainsi que leurs modifications post-élaboration comme l'adsorption d'agents de ciblage ou encore le couplage de fonctions chimiques (*Figure 3*). Développées plus récemment, des nanoparticules hybrides métalliques-organiques éco-compatibles pour véhiculer des principes actifs (11), illustrent parfaitement une volonté nouvelle dans les laboratoires d'utiliser des nanoparticules les plus biocompatibles et éco-compatibles possibles afin de réduire une certaine image de « nocivité » encore trop souvent associée au domaine des nanobiotechnologies.

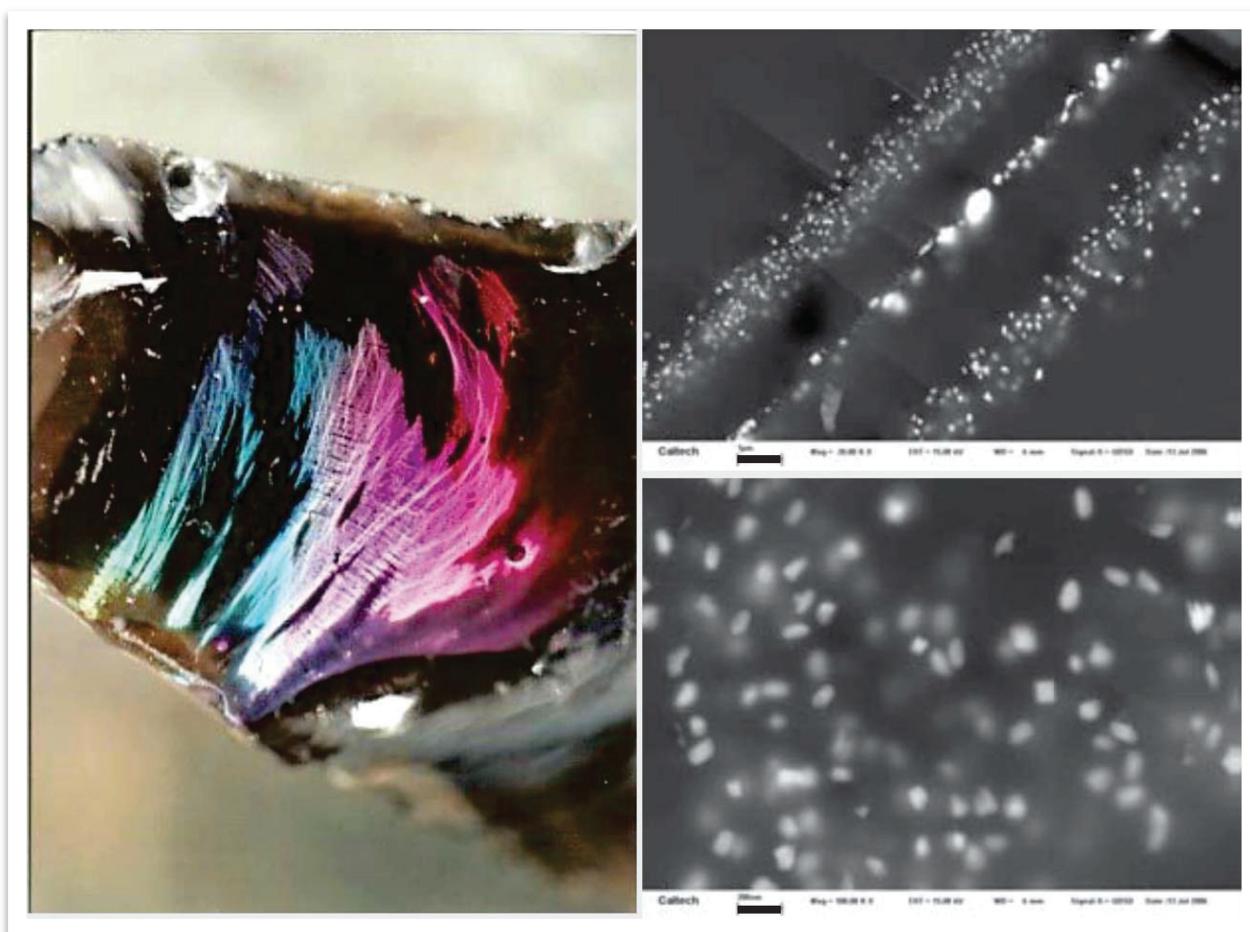


**Figure 3 :** Les nanoparticules se déclinent en une très grande variété de familles en fonction de leurs compositions, propriétés physiques et modifications post-élaborations (354)

### 1.3. Les nanoparticules dans notre environnement

Les nanoparticules disposent, par rapport à un matériau dit « conventionnel », d'une surface d'interaction beaucoup plus élevée avec les éléments extérieurs. L'illustration la plus usuelle est la comparaison de la surface d'échange à volume égal de  $1 \mu\text{m}^3$ . Ainsi des nanoparticules de 1 nm possèdent une surface spécifique mille fois supérieures à celle du matériau « conventionnel ». Cette particularité permet aux nanoparticules d'acquérir de nouvelles propriétés optiques, physiques, chimiques ou bien encore biologiques. L'identification de ces particularités a permis de faciliter la découverte de nanoparticules dans la nature et par mimétisme de nourrir le développement industriel des nanotechnologies.

Bien qu'étant très difficilement observables et détectables, les nanoparticules n'en sont pas moins fréquentes dans notre environnement. Leurs élaborations peuvent être la conséquence de processus naturels comme c'est le cas au sein de certaines obsidiennes, roches volcaniques vitrifiées riches en silice et d'un noir translucide, où s'alternent de multiples couches d'inclusion de nanoparticules de magnétite de 80-110nm. La présence de ces couches de nanoparticules permet une complexe réfraction de la lumière attribuant une chatoyance de mille-feux à ces obsidiennes (12) (*Figure 4*). Une autre illustration est l'aspect soyeux à la surface de certains saphirs, notamment ceux en provenance du Cachemire, causé par l'inclusion de multiples nanobâtonnets d'oxyde de titane (rutile).



**Figure 4 :** Obsidienne de feu. La présence alternée de multiple couche de nanoparticules de magnétites permet une chatoyance de la pierre en de multiples couleurs. Gauche : Obsidienne de feu. Droite : Inclusions de nanoparticules de magnétites observées en microscopie électronique à balayage. Barre d'échelle en haut à droite (2µm) et en bas à droite (200nm).

Figure modifiée à partir de (12)

L'homme quant à lui utilise les nanoparticules, tout d'abord sans en avoir connaissance, durant l'Antiquité, le Moyen-Age et ce jusqu'au XIX<sup>e</sup> siècle. A l'Age du Bronze (1100 ans av-JC) au sein du territoire correspondant à l'Italie actuelle, la fabrication de verres rouges utilisait la présence de nanoparticules de cuivres (13). De même de 400 à 100 ans av-JC, les celtes mirent au point l'irisation de l'émail, phénomène aussi expliqué par la présence de nanoparticules de cuivre, particularité qui se retrouvera également au sein de mosaïques romaines (14). Il en sera de même avec des nanoparticules d'argent et d'or dans l'irisation de vitraux et poteries du Moyen-Age et de la Renaissance. Au IX<sup>e</sup> siècle, un pigment bleu résistant à la corrosion appelé « Bleu Maya » a été créé grâce à des nanoparticules poreuses d'argile où se fixe le pigment indigo (15).

Il faudra attendre 1857 pour voir la première description des propriétés optiques de nanoparticules métalliques (16) par Michael Faraday. L'essor des nanotechnologies prend place un peu plus tard, du milieu du XX<sup>e</sup> siècle jusqu'à aujourd'hui. Le domaine d'application des nanoparticules est maintenant très vaste (*Figure 5*). De nombreuses nanoparticules, comme les boîtes quantiques, sont employées dans la conception de laser, écrans et autres technologies optiques avancées. Les nanoparticules d'or de quelques nanomètres servent de catalyseur chimique extrêmement efficace, supérieures au platine en « vrac », alors que dans son état normal, l'or reste neutre. Un autre exemple est la présence de nanoparticules d'oxyde de titane dans les crèmes solaires, le blocage des UV-A et UV-B étant dépendant de leurs tailles. Au niveau biologique, des nanoparticules d'argent sont utilisées comme bactéricide dans le textile et les pansements, alors que de nombreuses nanoparticules organiques sont utilisées afin de vectoriser des principes actifs comme les antigènes dans les vaccins, des drogues antirejet pour les greffes ou encore des produits anti-cancéreux afin de réduire les effets secondaires et favoriser le tropisme vers les tumeurs.



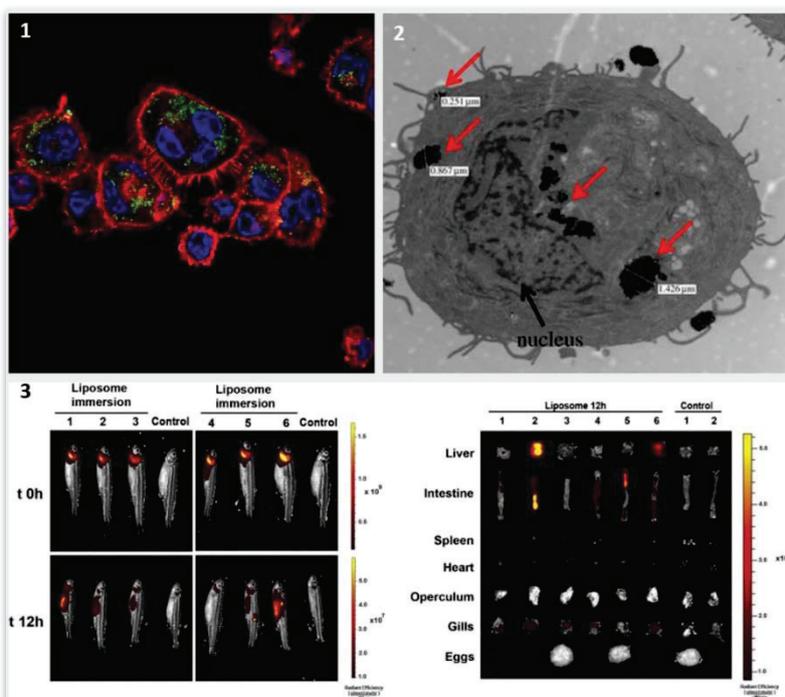
C'est à la fin des années 60 que le professeur Peter Paul Speiser et son équipe développent les premières nanoparticules, à base de polyacrylamides, pour la vectorisation de médicaments et de vaccins (20). Ces nanosystèmes ont l'avantage de posséder une taille adéquate pour d'éventuelles interactions avec différentes molécules biologiques comme les récepteurs et autres protéines. Bien qu'ayant fourni de prometteuses réponses immunitaires (21), le développement de ces nanoparticules a été abandonné. En effet, leur élaboration nécessitait une grande quantité de tensio-actif et les monomères d'acrylamide résiduels entraînaient une grande toxicité des formulations (20). Il faut attendre les années 80 pour voir apparaître les premières nanoparticules de poly(acide lactique) (PLA) pour la vectorisation de principes actifs (22). Enfin, en 1990 est obtenue la première autorisation de mise sur le marché pour les nanosystèmes polymériques.

Au fur et à mesure de leurs développements, la grande diversité des nanosystèmes permet de véhiculer aussi bien l'ADN que l'ARN pour la thérapie génique (23) ou encore la vaccination (24), et d'être une des alternatives aux traitements anti-cancer (25). Cette diversité de nanosystèmes est très bien décrite dans le cadre de la vectorisation d'actifs antimicrobiens normalement insolubles et difficilement administrables sous forme libres (26). Pour finir, la co-administration d'antigènes et d'immunostimulants avec des nanoparticules peut posséder un pouvoir adjuvant supérieur à celui que procure l'utilisation de sels d'aluminium, qui est l'adjuvant usuel pour la vaccination humaine (27,28).

## **1.5. Biodistribution générale des nanoparticules**

L'étude de la biodistribution correspond à analyser la distribution biologique d'un élément d'intérêt dans un organisme. De telles études permettent de comprendre comment interagit cet élément avec les différentes composantes biologiques, aussi bien au niveau des organes que des tissus et des cellules. C'est une étape primordiale pour mieux comprendre les effets thérapeutiques obtenus, dans le but d'élaborer des stratégies adéquates et permettre de pousser l'amélioration des formulations à leur paroxysme. Sans recours aux études de la biodistribution, il manque un élément important le développement des nanovecteurs.

Néanmoins, en partie à cause de la détection difficile des nanoparticules, la place accordée à la biodistribution au sein des études actuelles est fréquemment sommaire par rapport à l'évaluation des effets thérapeutiques. Les technologies les plus courantes, et aussi les moins complexes à mettre en œuvre, pour évaluer la biodistribution des nanoparticules sont la microscopie confocale et la cytométrie en flux. Toutefois, l'emploi conjoint de ces deux techniques au sein d'une même étude n'est malheureusement pas commune. Encore moins fréquemment sont employées les techniques capables d'analyser l'aspect cellulaire de la biodistribution comme la microscopie électronique et l'imagerie en flux (29). L'étude de la biodistribution a tout de même évolué au fil du temps, remplaçant par exemple l'usage de la radioactivité pour détecter les nanoparticules ou la drogue encapsulée par des études utilisant la détection de fluorescence, notamment dans l'infrarouge par tomographie. Néanmoins cette technique présente quelques inconvénients comme son utilisation complexe ou encore sa faible résolution (**Figure 6**) *in vivo*. Ces dernières années ont toutefois vu l'émergence de grandes avancées concernant la tomographie, en particulier avec le développement de la tomographie multiphotonique couplée à la génération de seconde harmonique, qui offre une excellente résolution en plus d'obtenir des acquisitions « live ». Pour finir, il est important de rappeler que la détection d'une nanoparticule isolée nécessite une résolution à l'échelle du nanomètre comme le permet la microscopie électronique. Une telle résolution est rarement obtenue avec l'utilisation de la fluorescence, à l'exception d'une intensité de fluorescence hors du commun qui dans ce cas pourrait éventuellement être détectée par microscopie confocale, un peu comme un phare à l'horizon illuminant le crépuscule.



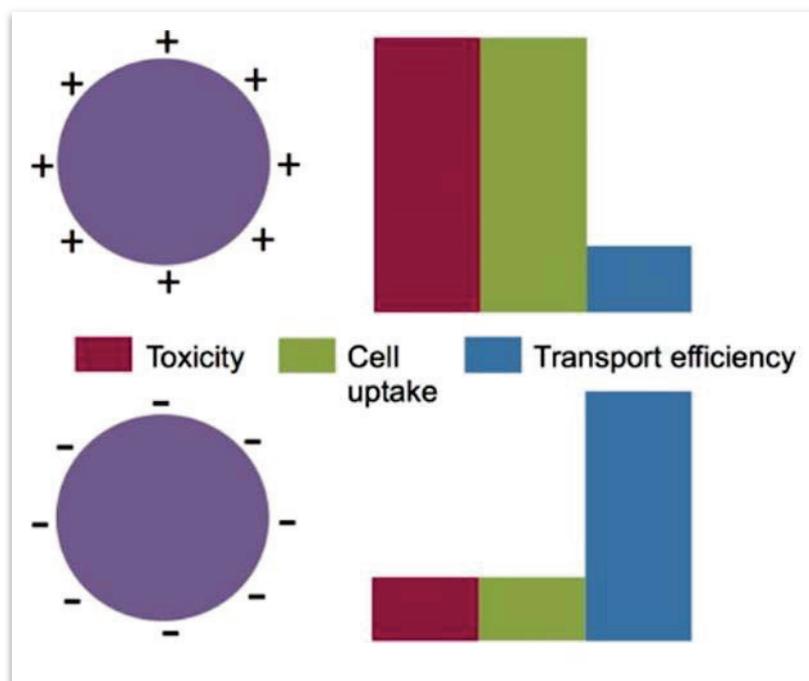
**Figure 6 :** Illustration de différentes techniques d'imagerie des nanoparticules. 1 : Microscopie confocale (356). 2 : Microscopie électronique à transmission (357). 3 : Tomographie (282).

La biodistribution des nanoparticules à visées « délivrance de principes actifs » bénéficie toutefois de nombreuses études effectuées ces cinquante dernières années, notamment *in vitro*. Il en ressort que de nombreux paramètres vont influencer sur la biodistribution des nanoparticules comme la composition, la forme, la taille, la rigidité et les modifications post-élaboration. Chaque type de nanoparticule aura une biodistribution qui lui sera spécifique. Néanmoins il est possible de faire émerger de ces études quelques tendances généralisables.

La forme des nanoparticules par exemple, aura pour effet d'influer sur la prise en charge par les cellules. En effet celles qui auront une forme ovoïde ou elliptique seront plus facilement internalisables que leurs équivalentes sphériques (30,31) . De même que la phagocytose par les macrophages semble être favorisée par la rigidité des nanoparticules (32).

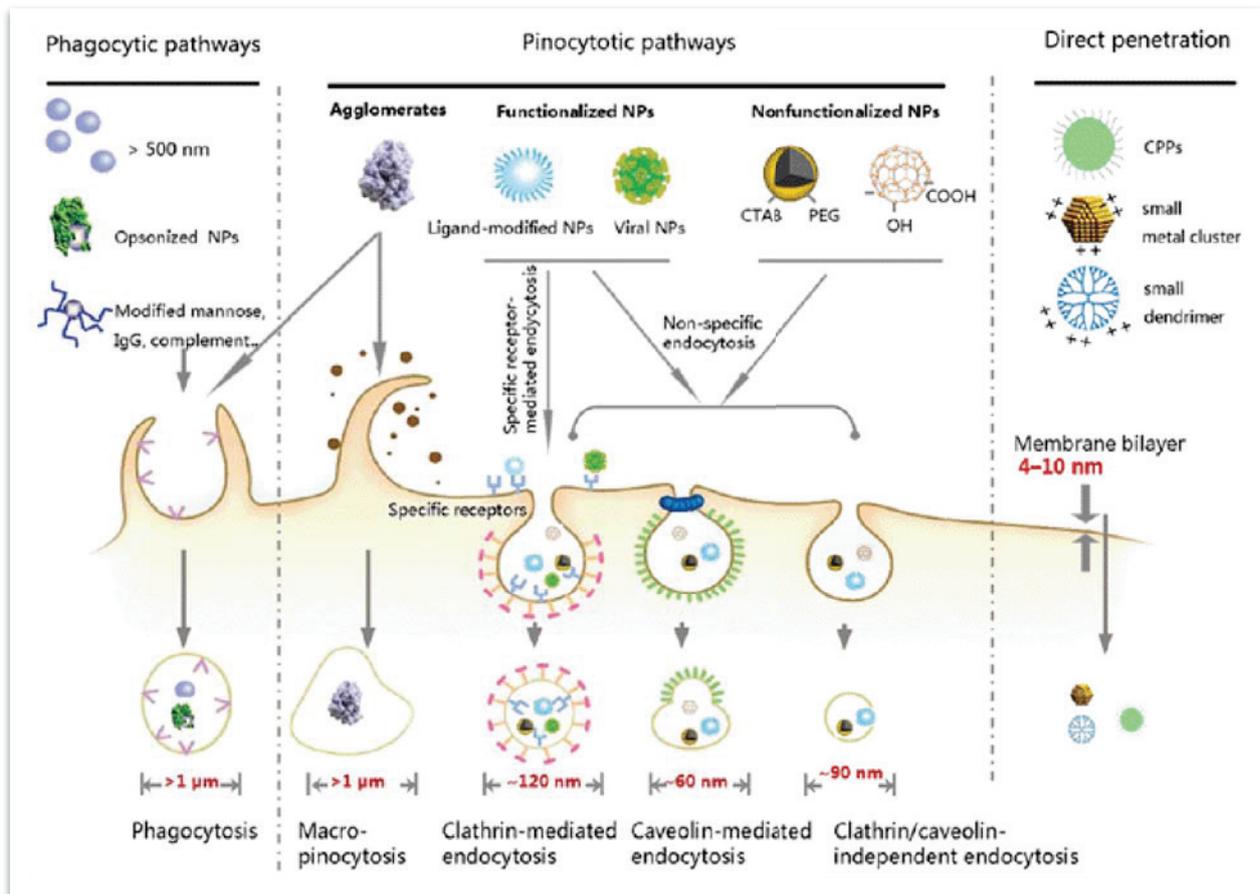
Au regard de la charge électrostatique de surface des nanoparticules, celle-ci va grandement impacter les différentes interactions entre les nanoparticules et leur environnement, notamment leur capacité à pénétrer différents compartiments biologiques, où des interactions non-spécifiques peuvent avoir lieu. Par exemple la liaison d'opsonines va favoriser l'élimination des nanoparticules par le système immunitaire tandis que l'adsorption de protéines d'adressage peut détourner les nanoparticules des organes où leur présence peut se révéler délétère, au niveau du cerveau par exemple (33). D'une manière générale, une charge de surface très positive va rendre les nanoparticules plus sensibles au phénomène d'opsonisation (34), de même qu'au niveau cellulaire, les nanoparticules neutres ou négatives seront moins internalisées que leurs équivalentes chargées positivement. Une des explications proposées serait une meilleure interaction avec les protéoglycanes qui sont chargés négativement à la surface de nombreuses cellules (35,36). Toutefois, ce sont les nanoparticules neutres qui semblent le moins facilement internalisables et non les nanoparticules chargées négativement. La prise en charge de ces dernières impliquant la participation de voies d'internalisation ne nécessitant pas de liaisons spécifiques (37,38). Il est néanmoins important de souligner que les nanoparticules chargées positivement, de par leur forte capacité à interagir avec les différents acteurs biologiques, vont faire montre d'une plus grande cytotoxicité, réduisant ainsi leur biocompatibilité et donc de leur emploi *in vivo* (35,39,40). De plus il a été montré *in vitro* (39), qu'à taille égale (100nm), des nanoparticules polymériques positives et négatives empruntent toutes deux la voie d'internalisation par endocytose, avec une préférence pour les voies dépendantes des clathrines pour les nanoparticules positives tandis que celles qui sont négatives favoriseront les voies dépendantes de la cavéoline. Bien que leur internalisation par les cellules soit plus faible, les nanoparticules négatives semblent en contrepartie plus aptes à traverser les

barrières épithéliales (*Figure 7*). Pour finir, comme vu précédemment, la voie d'internalisation *via* la clathrine va concerner une majorité des nanoparticules, quelle que soit leur taille.



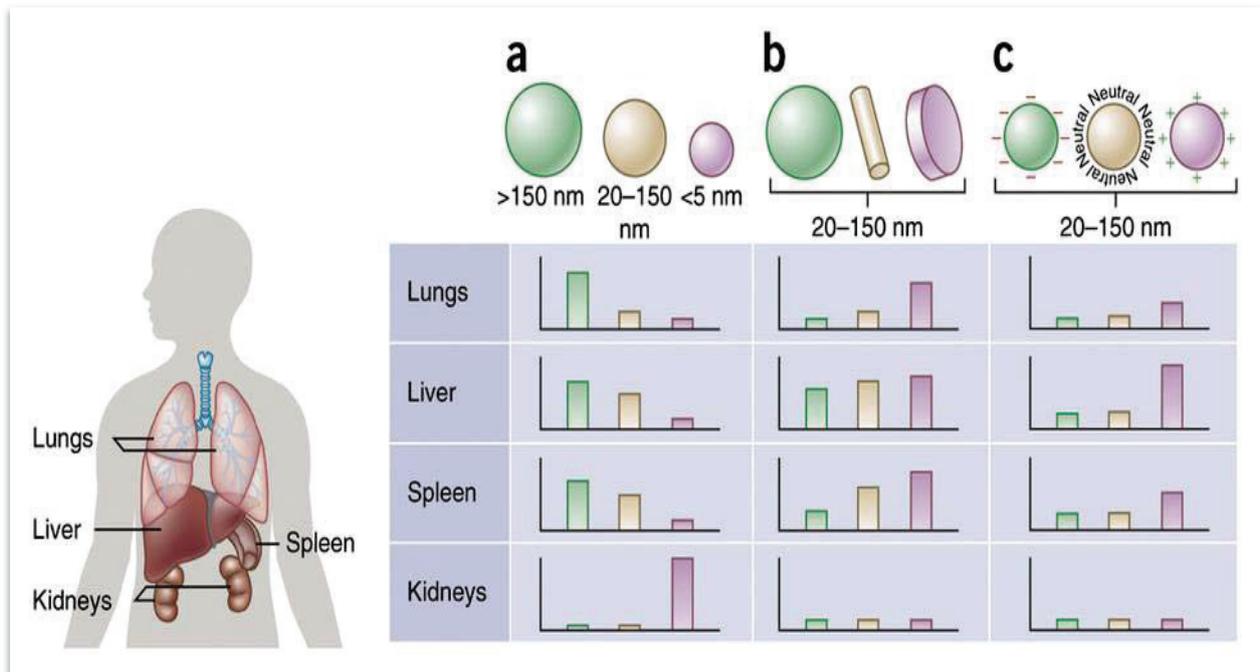
*Figure 7* : Influence de la charge de surface des nanoparticules sur la prise en charge par des cellules épithéliales. Modifiée à partir de (39)

Concernant la taille, celle-ci représente un autre paramètre exerçant une forte influence sur la biodistribution des nanoparticules. Nous aborderons tout d'abord cette influence sur les différentes voies d'internalisation cellulaires chez les mammifères, en gardant en mémoire qu'il existe une certaine flexibilité sur les intervalles de taille. Les nanoparticules les plus larges (>500 nm) vont ainsi préférentiellement impliquer la phagocytose. A noter que les nanoparticules polymériques de plus petite taille vont aussi entrer dans les cellules par phagocytose (35). Les nanoparticules de plus petites tailles (<500 nm) vont également favoriser l'implication des différentes voies d'internalisation liées à la pinocytose (41,42) et à l'endocytose (*Figure 8*). Les nanoparticules les plus petites (<10nm) vont pouvoir aisément traverser les différentes barrières biologiques, passant entre les jonctions cellulaires. Au niveau de leur pénétration au sein des cellules, celle-ci s'effectuera de manière non spécifique comme par le passage à travers les canaux membranaires, aussi bien plasmique que nucléaire. Enfin, au niveau de la reconnaissance par le système immunitaire, il a également été montré que les nanoparticules de 20-200 nm vont préférentiellement être prises en charge par les cellules dendritiques, tandis que les nanoparticules de 500-5000 nm sont préférentiellement prises en charge par les macrophages (43).



**Figure 8 :** Les cellules internalisent les nanoparticules via différents mécanismes cellulaires en fonction de la taille de celles-ci. (358)

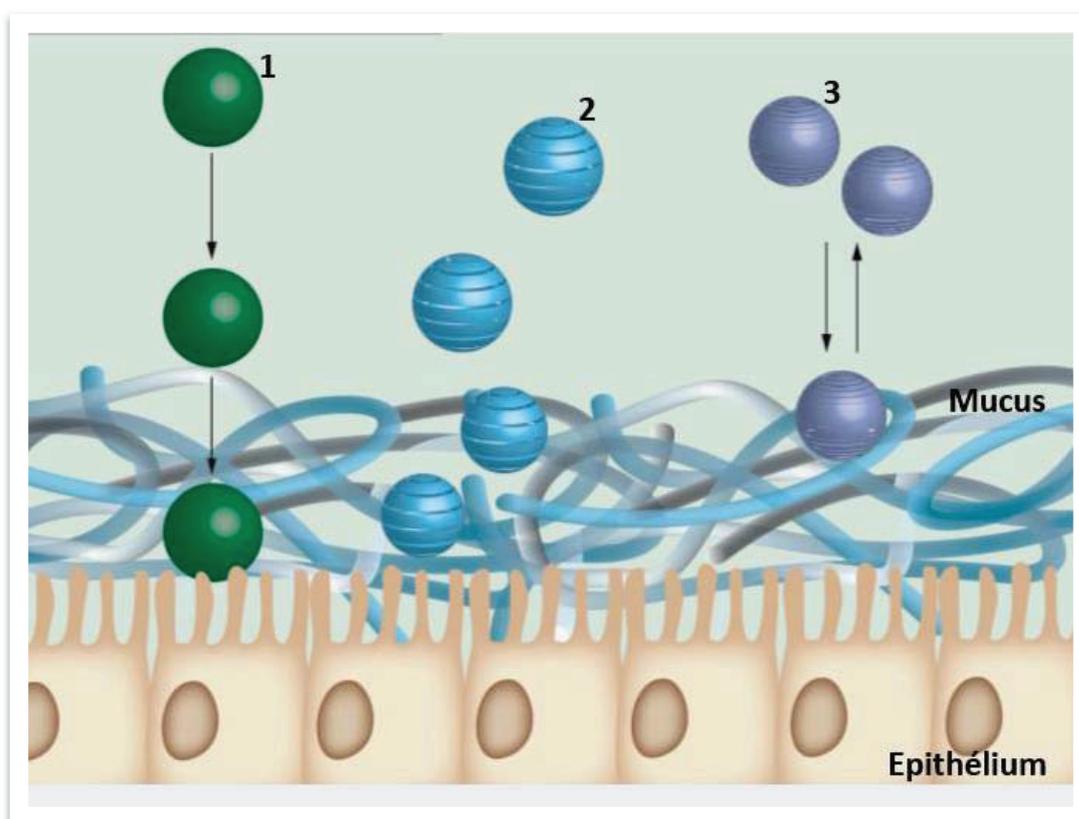
Une fois dans l'appareil circulatoire, l'élimination des nanoparticules est également influencée par la taille. Les nanoparticules de quelques nanomètres sont rapidement éliminées par la clairance rénale (44,45), tandis que les nanoparticules au-delà de 200nm s'accumulent principalement dans la rate et le foie (**Figure 9**). La biodistribution des nanoparticules dans le flux sanguin peut également être affectée par ce qui s'appelle l'effet EPR (Enhancement Permeation Retention). Au niveau de certaines tumeurs ainsi que dans des régions en état d'inflammation, l'endothélium vasculaire qui est normalement jointif va devenir fenestré et donc plus perméable vis-à-vis du passage de nanoparticules. Cela a pour conséquence de réduire la capture des nanoparticules par les différentes cellules réticulaires, macrophages, cellules endothéliales et autres composants du système réticulo-endothélial (46).



**Figure 9 :** Clairance des nanoparticules selon leur taille, forme et charge. (359)

Un autre point qu'il est important d'aborder est celui concernant la biodistribution des nanoparticules au sein des organes muqueux, qui est fortement dépendante du comportement des nanoparticules envers le mucus. En effet, les muqueuses représentent la voie privilégiée d'administration de principes actifs, comme par exemple la prise de gélules ou de vaccins par voie orale (anti-polio). Les muqueuses, représentant également les sites d'infections privilégiés par les pathogènes, représentent ainsi une cible de choix pour les traitements à base de nanoparticules (47–49). Le mucus est un hydrogel viscoélastique et adhésif qui assure un rôle de protection des épithéliums muqueux dont il recouvre la surface (50). Constitué principalement d'un maillage de mucines, protéines fortement glycosylées chargées négativement et comportant de nombreux domaines hydrophobes (51), le mucus est constamment renouvelé ce qui permet d'éliminer tout ce qu'il a piégé. Trois paramètres vont principalement jouer sur la capacité des nanoparticules à atteindre l'épithélium : la charge électrostatique de surface, l'hydrophobicité et la taille. Les nanoparticules positives sont fortement piégées par les mucines à cause d'interactions électrostatiques freinant grandement leur progression dans le mucus. Les nanoparticules négatives sont capables de rester mobiles au sein du mucus qu'elles vont plus aisément pénétrer pour ensuite atteindre l'épithélium, à condition que leur taille soit suffisamment petite pour permettre le déplacement à travers les

mailles du mucus. Pour exemple, la taille des pores dans le mucus cervicovaginal humain est de 340 nm (52). Les nanoparticules négatives et hydrophobes, comme celles à base de poly(acide lactique) (PLA) disposeront d'une adhérence relative au mucus par les liaisons hydrophobes, améliorant la rétention au niveau de la muqueuse, et cela sans restreindre pour autant toute mobilité dans le mucus grâce aux répulsions fortes entre les charges électrostatiques. Cela confère à ces nanoparticules rétention et capacité de traverser le mucus (53). L'adhésivité (54) ou la muco-pénétration (55) peuvent être recherchées en fonction de l'effet thérapeutique désiré (*Figure 10*).



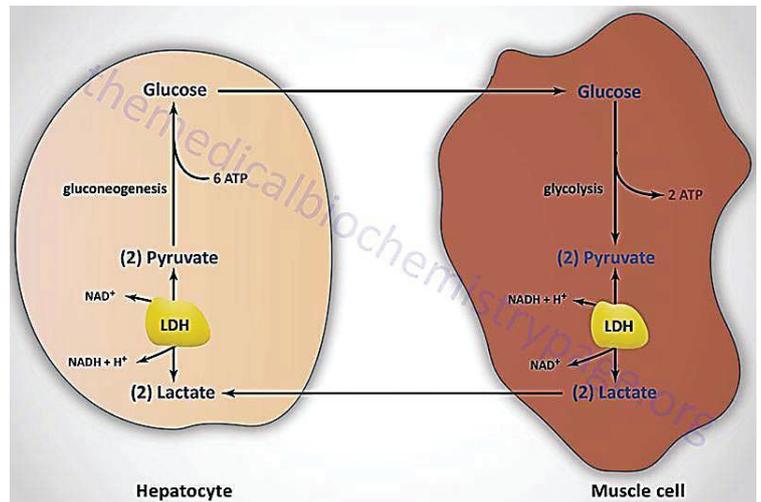
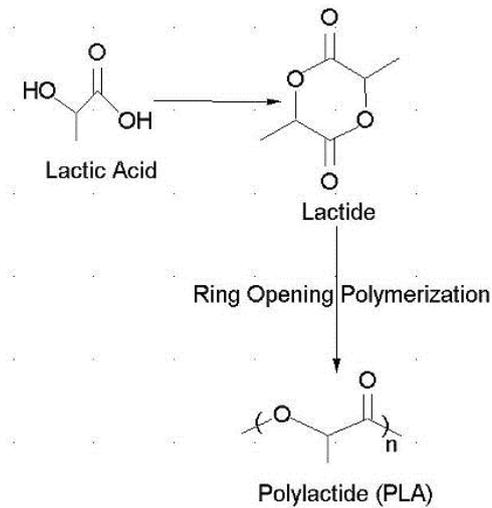
**Figure 10** : Différents comportements des nanoparticules au sein d'un mucus. 1 : Pénétration du mucus. 2 : Adhésion au mucus. 3 : Répulsion et blocage stérique. Modifié à partir (360)

## 2. Les nanoparticules de PLA

Le laboratoire d'accueil possède un savoir-faire historique concernant l'élaboration et l'utilisation, chez les mammifères, de nanoparticules éco-compatibles et biorésorbables à base de poly(acide lactique) (PLA), principalement à visée vaccinale (anti-VIH) et plus récemment pour la délivrance d'agents thérapeutiques. Mon travail de thèse se focalise sur la biodistribution de ces nanoparticules dont les caractéristiques, multiples avantages et limites, seront abordées dans les paragraphes suivants.

### 2.1. Polymère d'acide lactique

Comme son nom l'indique, ce polymère (polyester) est constitué d'un assemblage d'unité d'acide lactique. L'acide lactique est principalement obtenu à partir de ressources renouvelables comme l'amidon et le sucre de canne pour ensuite être dimérisé en lactide. L'étape de polymérisation est effectuée par ouverture du cycle des lactides sous l'effet de catalyseurs métalliques, les chaînes de polymère ainsi créées sont hydrophobes de par la longueur de la chaîne apolaire et ce malgré des fonctions terminales carboxyliques (-COOH) et hydroxyles (-OH). Cette méthode permet d'obtenir un polymère racémique (dextrogyre et lévogyre) (56) stable pour une période de 12 à 16 mois (57). En effet le PLA est un polymère biodégradable (hydrolyse en lactate) mais pas seulement, celui-ci est également biorésorbable. Le lactate qui résulte de la dégradation est ensuite métabolisé dans le cycle de Cori (58), dont le rôle est la formation au sein du foie de glucose en convertissant le lactate en pyruvate (**Figure 11**). Physiologiquement, le lactate provient entre autres de l'acide lactique produit par les muscles. Depuis les années 70, l'utilisation de ce polymère biocompatible chez l'Humain est approuvée par la Food and Drug Administration (USA) (59) pour la fabrication de fils de suture et de prothèses pour la chirurgie. Les différentes applications du PLA dans l'industrie ont été discutées par Jamshidian *et al* (2010) (60).



**Figure 11 :** Gauche - Polymérisation de l'acide lactique par « ring-opening » (361)

Droite – Métabolisation des résidus lactates par le cycle de Cori (362)

## 2.2. Propriétés des nanoparticules de PLA

Les nanoparticules à base de poly(acide lactique) ont été développées pour la délivrance de médicaments dans les années 80. Ce sont des nanoparticules polymériques matricielles hydrophobes où les chaînes de PLA sont enchevêtrées les unes avec les autres, à la manière d'une pelote. A l'extrémité de ces chaînes se trouvent des fonctions carboxyles et hydroxyles qui fournissent à la nanoparticule sa charge anionique. La matrice de PLA est dynamique sous l'influence de l'environnement auquel sont exposées les nanoparticules. Une grande énergie thermique agitera les chaînes de polymères ce qui peut augmenter la taille des nanoparticules et ce jusqu'à une température limite où la cohérence de la matrice sera perdue. C'est la température de transition vitreuse qui pour les nanoparticules de PLA racémique est d'environ 55°C (61).

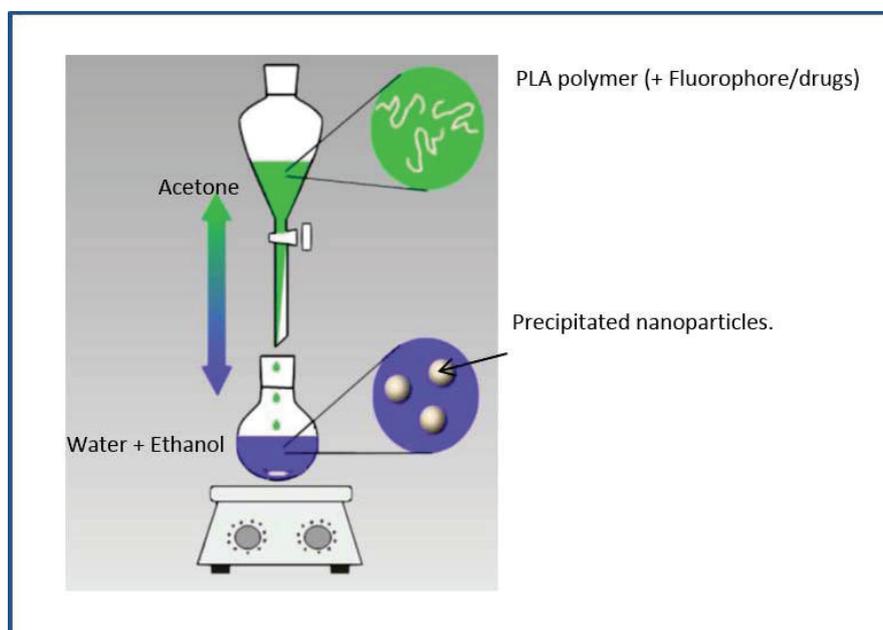


*Figure 12* : Vue d'artiste d'une nanoparticule de PLA encapsulant un fluorophore. Réalisée par Bastien Dalzon.

L'élaboration de ces nanoparticules peut nécessiter la présence de tensioactifs afin d'éviter l'agrégation des nanoparticules. En effet il est nécessaire de réduire ou contrebalancer leur tension de surface élevée dont dépend le risque de fusion des matrices hydrophobes des nanoparticules en cas de contact. Néanmoins l'utilisation de tensioactifs diminue la biocompatibilité des nanoparticules à cause de la toxicité liée aux tensioactifs, et peut altérer certaines interactions entre les nanoparticules et leur environnement (62,63). Cela représente un inconvénient car la principale qualité de ces nanoparticules concerne leur innocuité de par l'utilisation d'un polymère biocompatible, biorésorbable et biodégradable ayant déjà obtenu une autorisation de mise sur le marché.

L'élaboration des nanoparticules de PLA peut être réalisée selon différentes méthodes en fonction du solvant utilisé pour dissoudre le polymère. Brièvement, l'élaboration peut se réaliser par : émulsion-évaporation, double émulsion eau/huile/eau dans le cas où le solvant n'est pas miscible dans l'eau ; émulsion-diffusion pour les solvants semi-miscibles dans l'eau, la diafiltration, l'émulsion-changement de solubilité et la nanoprécipitation pour les solvants miscibles dans l'eau.

L'équipe du Dr. Verrier utilise le procédé de nanoprécipitation pour l'élaboration des nanoparticules de PLA, procédé qui est le plus couramment utilisé (64). Celui-ci consiste à dissoudre le polymère dans un solvant organique miscible dans l'eau, le plus souvent de l'acétone, puis à l'introduire avec un débit contrôlé dans une phase aqueuse (mélange eau/éthanol) où le solvant organique est miscible et cela sous agitation mécanique. Lors de ce processus, les chaînes de polymères hydrophobes se retrouvent en milieu aqueux et vont se rassembler afin de former des sanctuaires hydrophobes formant ainsi les nanoparticules matricielles. Il ne reste plus qu'à évaporer les solvants résiduels (acétone/éthanol) pour obtenir la solution de nanoparticules (53,65).



*Figure 13* : Illustration du procédé de nanoprécipitation.

Ce procédé possède de nombreux avantages, outre le fait qu'il soit simple, rapide, peu coûteux et surtout facilement reproductible. Il permet de contrôler la taille des nanoparticules en influençant divers paramètres :

- La température : plus l'énergie thermique est forte, plus rapide sera la dispersion du solvant organique obligeant les chaînes du polymère à se rassembler plus rapidement, créant ainsi des nanoparticules plus petites.

- Le débit de coulé de la phase organique dans la phase aqueuse. En augmentant l'apport en solvant organique dans la phase aqueuse, cela augmente également le temps nécessaire à la dispersion de suffisamment de solvant pour forcer l'assemblage des nanoparticules, accroissant ainsi le nombre de chaînes par particules et donc leur taille.
- La même chose se produit en diminuant le ratio éthanol/eau. Cela réduit la miscibilité de l'acétone dans la phase aqueuse et donc augmente la taille des nanoparticules.
- De même pour l'agitation mécanique, un meilleur brassage de la phase aqueuse permet au solvant organique de diffuser plus rapidement.

Néanmoins les avantages les plus précieux concernent l'innocuité des nanoparticules. En effet, l'étape d'évaporation permet de se débarrasser des solvants résiduels, qui dans le cas du laboratoire d'accueil sont inférieurs aux normes fixées par la pharmacopée européenne (<5000 ppm pour les solvants de classe 3 « faible potentiel toxique » comme l'acétone et l'éthanol) (66). De plus, en utilisant une certaine taille de chaîne de polymère (50 000 g.mol<sup>-1</sup>), la quantité de chaînes par particule permet d'avoir une quantité d'extrémités polaires chargées négativement assez importante pour conférer une charge de surface d'environ -60mV. Une telle négativité va entraîner une forte répulsion des nanoparticules entre-elles et ce avec une force suffisamment puissante pour annihiler les risques de fusion. Ce mécanisme est abordé par Treuel *et al* (67). Ainsi, en plus d'un très faible taux de solvant résiduel, les nanoparticules produites par le laboratoire ne requièrent pas l'usage de tensioactif pour maintenir la stabilité colloïdale. Un atout considérable au regard de leur innocuité et pour réduire les interférences non-désirées avec les environnements biologiques (68). Le laboratoire d'accueil favorise l'utilisation de nanoparticules de 200nm.

Plusieurs modifications sont réalisables sur les nanoparticules dans le but de transporter des principes actifs. Ces modifications peuvent intervenir lors de la synthèse du polymère afin de coupler les principes actifs comme des cristaux métalliques afin de rendre le polymère dense aux électrons pour la microscopie électronique (69). Il est également possible d'encapsuler des substances hydrophobes au sein même de la matrice de PLA tout simplement en ajoutant les principes actifs hydrophobes à encapsuler dans la phase organique. Lors de la diffusion du solvant dans la phase aqueuse, les principes actifs hydrophobes se retrouvent piégés dans la

matrice des nanoparticules de PLA. C'est ainsi que sont encapsulés les différents fluorophores utilisés par le laboratoire d'accueil afin de pouvoir détecter les nanoparticules par fluorescence (70). En ce qui concerne la vectorisation de substances hydrophiles, il est possible de les adsorber à la surface des nanoparticules en s'appuyant principalement sur d'éventuelles interactions électrostatiques et hydrophobes entre certains domaines du principe actif et la nanoparticule. C'est ainsi que le laboratoire d'accueil vectorise des antigènes hydrophiles (71). Il est aussi possible d'utiliser des plateformes d'interface à la surface des nanoparticules afin de coupler certaines substances également anioniques comme les acides nucléiques ou le chitosan(72).

Les nanoparticules de PLA sont ainsi des nanovecteurs versatiles, peu onéreux et surtout offrant une grande innocuité, surtout en absence d'utilisation de tensioactifs, garantissant ainsi une délivrance de principes actifs particulièrement adaptée au vivant.

## **2.3. Applications thérapeutiques**

Grâce à tous les avantages vus précédemment, l'administration de nanoparticules de poly(acide lactique), et de leurs proches cousines à base de poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA) dont l'hydrolyse et le relargage de principe actif sont plus prompts (73), a fait l'objet de vastes recherches à visées thérapeutiques. L'emploi de ces nanoparticules est principalement axé sur l'amélioration de la biodisponibilité des principes actifs hydrophobes, le ciblage spécifique pour notamment le traitement de nombreux cancers et enfin la possibilité de moduler les interactions avec les acteurs du système immunitaire. De plus, ces nanoparticules sont adaptées à de nombreuses voies d'administration selon l'application thérapeutique désirée.

Les muqueuses représentent la voie privilégiée d'administration de principes actifs, non seulement parce que la méthode est aisée mais surtout parce que les muqueuses sont les principales entrées des pathogènes et des drogues dans l'organisme.

- Parmi elles, une des voies d'administration la mieux acceptée par les patients est l'administration par voie orale (comprimés / gélules / poudres ...). Des solutions, gélules, enrobages véhiculant des nanoparticules peuvent aisément être bus et ainsi directement interagir avec le système digestif. Par voie orale, ces nanoparticules sont étudiées aussi bien pour véhiculer antigènes et immuno-modulateurs pour la vaccination

(74,75), que pour des traitements localisés comme contre *H.pylori* (76) et les inflammations intestinales chroniques (77,78) , ou encore l’obtention d’une meilleure biodisponibilité comme pour le traitement de certaines tumeurs (79) et du diabète (80)

Tableau 1 : Administrations orales de nanoparticules de PLA et PLGA

Administration	Nanoparticules	Application	Investigation	Référence
<b>Orale</b> <b>Inj.sous cutanée</b> <b>Nasale</b>	PLA-p24 (NODs agonists)	Vaccin anti-VIH	R (2016)	(74)
<b>Orale</b>	PEG-PLA-PEG (HBsAg)	Vaccin anti-hépatite B	R (2010)	(81)
<b>Orale</b>	PLA (Clindamycin) PLGA (Clindamycin)	Antibactérien	R (2016)	(82)
<b>Orale</b>	PLA (insulin)	Diabète	R (2015)	(80)
<b>Orale</b>	PLA ( $\beta$ -galactosidase)	Intolérance lactose	R (2014)	(83)
<b>Orale</b>	PLA-siRNA	Inflammation chronique intestinale	R (2012)	(77)
<b>Orale</b>	PLA-KPV	Inflammation chronique intestinale	R (2010)	(78)
<b>Orale</b> <b>Inj. intraveineuse</b>	PLGA-mPEG-HA (risedronate)	Traitement et prévention Ostéoporose	R (2016)	(84)
<b>Orale</b>	PLGA (curcumin) PLA-b-PEG (curcumin)	Réduction de la tolérance Morphine	R (2013)	(85)
<b>Orale</b>	PLA-PCL (TPGS)	Anti-cancer (poumon)	R (2013)	(79)
<b>Orale</b>	PLGA (acétyl-puerarin)	Maladie cérébro-vasculaire	R (2016)	(86)
<b>Orale</b>	PLGA (clarithromycin)	Antibactérien <i>H.pylori</i>	R (2015)	(76)

- Pour les pathologies touchant l'œil, l'administration oculaire est une alternative prometteuse aux traitements administrés par voie orale, ces derniers nécessitant de fortes doses administrées sur une longue période pour obtenir une action efficace au niveau des yeux. Néanmoins, l'administration de drogues non-vectorisées au niveau topique souffre d'une clairance rapide due au drainage par le conduit nasolacrimal et la surproduction de larmes. L'emploi de nanovecteurs mucoadhésifs permet de prolonger le temps de rétention au contact de la barrière cornéenne dans le cas d'une administration topique, tandis que l'administration par injection oculaire augmente la dose de principes actifs atteignant la partie postérieure de l'œil. L'administration oculaire de nanoparticules de PLA et PLGA se focalise principalement sur la délivrance d'anti-inflammatoires, le plus souvent encapsulés dans des nanoparticules elles-mêmes incorporées au sein de gouttes pour les yeux ainsi que diverses solutions gélifiantes (87).

Tableau 2 : Administrations oculaires de nanoparticules de PLA et PLGA

Administration	Nanoparticules	Application	Investigation	Référence
<b>Oculaire</b>	PLA (celecoxib)	Anti-inflammatoire	R (2013)	(87)
<b>Oculaire</b>	PLA (budesonide)	Anti-inflammatoire	R (2003)	(88)
<b>Oculaire</b>	PLGA (flurbiprofen)	Anti-inflammatoire	R (2009)	(89)

- L'administration de principes actifs au niveau de la muqueuse vaginale permet d'obtenir un effet thérapeutique local hautement recherché dans le cas de la prévention et traitement des maladies sexuellement transmissibles. Néanmoins, bien que de plus en plus acceptées par les patientes, les administrations actuelles souffrent de problèmes de temps de rétention couplés à une tendance à ressortir de la cavité vaginale (90). L'incorporation des nanoparticules de PLA et PLGA, facilitant la pénétration des principes actifs dans la muqueuse vaginale, au sein d'hydrogels thermo-sensibles ou bien de films biodégradables, a permis leur utilisation sur la muqueuse vaginale sans l'inconvénient des phénomènes de « pertes ». L'application principale qui en découle est l'administration locale d'antirétroviraux afin de prévenir la transmission du VIH (91).

Tableau 3: Administrations vaginales de nanoparticules de PLA et PLGA

Administration	Nanoparticules	Application	Investigation	Référence
<b>Vaginale</b>	PLGA (IQP-0528)	Prévention VIH	R (2016)	(92)
<b>Vaginale</b>	PLGA (tenofovir)	Prévention VIH	R (2016)	(91)
<b>Vaginale</b>	PLGA (maraviroc) PLGA (etravirine) PLGA (raltegravir)	Traitement VIH	R (2015)	(93)
<b>Vaginale</b>	PLGA (rilpivirine)	Prévention VIH	R (2015)	(94)
<b>Vaginale</b>	PLGA-PEG-siRNA	Prévention VIH	R (2015)	(90)

- La muqueuse pulmonaire expose une surface d'interaction avec l'environnement extrêmement grande et dont la fonction principale est vitale à l'organisme. Cette muqueuse est plus connue concernant l'absorption de particules fines polluantes dans l'atmosphère, néanmoins la nébulisation de nanoparticules de PLA et PLGA par aérosol dans un but thérapeutique n'a rien de polluant et permet une grande variété d'applications. Les laboratoires pratiquant cette administration se focalisent principalement sur la vaccination (95), le traitement d'inflammations chroniques (96,97), de cancer (98) ou bien encore la prévention de lésions hyperoxiques (99).

Tableau 4: Administrations pulmonaires de nanoparticules de PLA et PLGA

Administration	Nanoparticules	Application	Investigation	Référence
<b>Pulmonaire</b>	PLA-PHEA (beclomethasone dipropionate)	Asthme Inflammation chronique	R (2016)	(96)
<b>Pulmonaire</b>	PLA-HBsAg PLGA-HBsAg	Vaccin anti-hépatite B	R (2011)	(95)
<b>Pulmonaire</b>	PLGA (naringin) PLGA (celecoxib)	Anti-cancer (poumon)	R (2016)	(98)
<b>Pulmonaire</b>	PLGA-cDNA	Prévention hyperoxie (poumon)	R (2016)	(99)
<b>Pulmonaire</b>	PLGA-Chitosan (tacrolimus)	Traitement fibrose pulmonaire	R (2016)	(100)
<b>Pulmonaire</b>	PLA (budesonide)	Anti-inflammatoire	R (2014)	(97)

- La nébulisation de nanoparticules de PLA et PLGA pour l'administration de principes actifs par voie nasale présente de nombreux intérêts. Au regard des applications vaccinales, en plus d'être très performant, le système immunitaire associé à la muqueuse nasale peut avoir une influence sur les systèmes immunitaires associés aux muqueuses pulmonaire et vaginale (101). Néanmoins, la principale particularité de ce mode d'administration est de posséder un accès direct au cerveau, s'affranchissant de la barrière hémato-encéphalique (102). Cet accès particulier, inconvénient certain en ce qui concerne la délivrance de vaccins, ouvre toutefois de grandes et prometteuses perspectives pour le traitement de diverses pathologies cérébrales. De plus, cette méthode d'administration a le bénéfice d'être peu invasive. L'application de nanoparticules de PLA et PLGA par voie nasale se focalise ainsi principalement sur l'administration de drogue à destination du cerveau afin d'obtenir des effets analgésiques (103,104) ou le traitement des maladies neurodégénératives comme Parkinson (105) et Alzheimer (106), et sur la vaccination aussi bien humaine que vétérinaire (107,108).

Tableau 5: Administrations intra-nasales de nanoparticules de PLA et PLGA

Administration	Nanoparticules	Application	Investigation	Référence
<b>Intra-nasale</b>	PLA-aniracetam	Alzheimer	R (2016)	(106)
<b>Intra-nasale</b>	PLGA-PEG-STL (bFGF)	Alzheimer	R (2014)	(109)
<b>Intra-nasale</b>	PLA-Chitosan (neurotoxin)	Analgésique	R (2013)	(104)
<b>Intra-nasale</b>	PLA-PEG-maleimide- OX26 ( $\alpha$ -cobrotoxine)	Analgésique	R (2013)	(103)
<b>Intra-nasale</b>	PLGA-PEG-lectin (urocortine)	Parkinson	R (2011)	(105)
<b>Intra-nasale</b>	PLA (zidovudine) PLA-PEG (zidovudine)	Traitement VIH	R (2010)	(110)
<b>Intra-nasale</b>	PLGA (KAg)	Vaccin anti-PRRS (Cochon)	R (2014)	(108)
<b>Intra-nasale</b>	PLGA-Chitosan (HBsAg)	Vaccin anti-hépatite B	R (2013)	(107)
<b>Intra-nasale</b>	PLGA-Chitosan (imiquimod-BSA)	Vaccin	R (2013)	(111)
<b>Intra-nasale</b>	PLGA-DNA	Vaccin anti-FMDV (Bovins)	R (2011)	(112)

- L'administration par voie rectale fait partie des administrations muqueuses marginales, utilisée principalement pour les affections topiques comme pour la voie oculaire. Les nanoparticules y sont principalement utilisées afin de réduire les inflammations intestinales (113) ou bien dans le traitement d'infections bactériennes comme par la salmonelle entérique (25193467)

Tableau 6: Administrations rectales de nanoparticules de PLA et PLGA

Administration	Nanoparticules	Application	Investigation	Référence
<b>Rectale</b> <b>Orale</b>	PLGA (Meselamine)	Inflammation chronique intestinale	R (2011)	(113)
<b>Rectale</b>	PLGA (Venin d'abeille)	Anti-bactérien (salmonelle entérique)	R (2014)	25193467

Une autre manière de faire va concerner l'injection de nanoparticules de PLA et PLGA directement dans la circulation sanguine. L'administration par intraveineuse de ces nanoparticules va surtout concerner les pathologies systémiques, c'est-à-dire où il est nécessaire que les principes actifs atteignent des cibles diffuses ou bien dispersées dans différentes localisations de l'organisme. Cette voie d'administration est aussi fréquemment utilisée pour le traitement des organes qui sont en contact étroit avec le sang comme le foie et le cœur. De même bien que plus délicate, l'administration intraveineuse de nanoparticules peut aussi cibler le cerveau grâce à l'utilisation de stratégie de ciblage permettant de traverser la barrière hémato-encéphalique. Enfin, bénéficiant de l'effet EPR, l'utilisation des nanoparticules de PLA et PLGA est très développée pour le traitement contre les cancers vascularisés. De plus, les autorités sanitaires accordent une mise en place de tests cliniques moins contraignante pour les traitements contre le cancer, c'est en partie pour cette raison que les tests cliniques les plus récents avec ces nanoparticules impliquent la voie intraveineuse.

Tableau 7: Administrations intraveineuses de nanoparticules de PLA et PLGA

Administration	Nanoparticules	Application	Investigation	Référence
<b>Inj. intraveineuse</b>	PLA-PEG-Ag.ciblage (docetaxel) PLGA-PEG-Ag.ciblage (docetaxel)	Anti-cancer (prostate/métastase pulmonaire/cervix)	C2	(114)
<b>Inj. intraveineuse</b>	PLA-b-mPEG (paclitaxel)	Psoriasis	C2 (Paxceed)	(115)
<b>Inj. intraveineuse</b>	PLA-b-PEG (paclitaxel)	Anti-cancer (poumon)	C3 (Genexol- PM)	(116)

<b>Inj. intraveineuse</b>	PLGA-PEG (paclitaxel)	Anti-cancer	R (2009)	(117)
<b>Inj. intraveineuse</b>	PLA (betamethasone)	Autoimmunité Uveoretinite	R (2006)	(118)
<b>Inj. intraveineuse</b>	PLA-PEG-iRGD (vandetanib)	Anti-cancer	R (2016)	(119)
<b>Inj. intraveineuse</b>	PLA-PEG (cy-S-camptothecin)	Théranostique Anti-cancer	R (2016)	(120)
<b>Inj. intraveineuse</b>	PLA-b-mPEG (itraconazole)	Anti-fongique	R (2016)	(121)
<b>Inj. intraveineuse</b>	PLA-mPEG (difluorobon beta- diketonate)	Imagerie oxydation tumeurs	R (2015)	(122)
<b>Inj. intraveineuse</b>	PLA-PEG (lychnopholide)	Anti-parasitaire Maladie de Chagas	R (2014)	(123)
<b>Inj. intraveineuse</b>	PLA-Chitosan (HGF)	Régénération hépatique	R (2013)	(124)
<b>Inj. intraveineuse</b>	PLGA ( $\beta$ -carotène)	Anti-oxydant	R (2015)	(125)
<b>Inj. intraveineuse</b>	PLGA (irbesartan)	Traitement des lésions reperfusion-ischemiques du myocarde	R (2016)	(126)
<b>Inj. intraveineuse</b>	PLGA-PEG (héparine)	Anti-thrombose	R (2016)	(127)
<b>Inj. intraveineuse</b>	PLGA-PEG-siRNA	Anti-inflammatoire	R (2016)	(128)
<b>Inj. Intraveineuse Intra-nasale</b>	PLGA (midazolam)	Hypnotique	R (2016)	(129)

L'administration de nanoparticules par voie cutanée peut se réaliser de différentes manières. La réalisation d'une application topique permet d'obtenir un effet localisé capable de soulager différentes pathologies cutanées, de faire parvenir des médicaments sur la durée comme des hormones ou bien de favoriser l'apparition d'effets cosmétiques. Néanmoins, le passage du *stratum corneum* n'est pas aisé pour les nanoparticules. De nombreuses études vont donc se focaliser sur la délivrance sous-cutanée et transcutanée de nanoparticules de PLA et PLGA, notamment pour la vaccination en jouant sur le réseau de cellules sentinelles de Langherans et sur l'effet dépôt de nanoparticules qui permet une interaction avec les cellules immunitaires sur la durée. Les nanoparticules sont ici injectées avec des seringues classiques, des microseringues ou bien par iontophorèse.

Tableau 8: Administrations cutanée de nanoparticules de PLA et PLGA

Administration	Nanoparticules	Application	Investigation	Référence
<b>Topique (peau)</b>	PLGA (oestradiol)	Traitement symptômes périménopausals Ostéoporose	R (2012)	(130)
<b>Topique (peau)</b>	PLGA (uricase/acéclofenac)	Traitement de la goutte	R (2015)	(131)
<b>Topique (peau)</b>	PLGA (acide 5-aminolevulinique)	Anti-cancer (peau)	R (2015)	(132)
<b>Topique (peau)</b>	PLGA (dehydroepiandrosteron)	Anti-vieillessement	R (2014)	(133)
<b>Topique (peau)</b>	PLGA (protoporphyrin)	Anti-cancer (peau)	R (2013)	(134)
<b>Topique (peau)</b>	PLGA (betamethasone)	Anti-inflammatoire / Blanchiment	R (2013)	(135)
<b>Topique (peau)</b>	PLGA (ubiquinone)	Cosmétique	R (2013)	(136)
<b>Topique (peau)</b>	PLGA-acide oléique (spantide II / ketoprofen)	Anti-inflammatoire	R (2012)	(137)
<b>Sous-cutanée</b>	PLA-PEG-PLL-DTPA	Théranostique anti-cancer	R (2014)	(138)
<b>Sous-cutanée</b>	PLA-Ag.ciblage (docetaxel)	Anti-cancer (poumon - métastase hépatique)	R (2015)	(139)
<b>Sous-cutanée</b> <b>Intra-dermale</b> <b>Transcutanée</b>	PLA-p24	Vaccin anti-VIH	R (2011)	(140)
<b>Sous-cutanée</b>	PLA-aahG50 PLA-botG50	Vaccins anti-venins de scorpions	R (2016)	(141)
<b>Sous-cutanée</b>	PLGA- agonisteCD40 $\alpha$ mAb (antigen/polyIC)	Vaccin anti-cancer	R (2015)	(142)
<b>Sous-cutanée</b>	PLGA (MOG/IL-10)	Induction tolérance (Sclérose en plaque)	R (2014)	(143)

<b>Sous-cutanée Intraveineuse</b>	PLGA-mimétismeTNF $\alpha$ (sLiAg/MPLA)	Vaccin anti-leishmania	R (2016)	(144)
<b>Transcutanée</b>	PLA-p24	Vaccin anti-VIH	R (2014)	(145)
<b>Transcutanée</b>	PLGA (tranilast)	Arthrite	R (2014)	(146)
<b>Transcutanée</b>	PLA (ketoprofen)	Anti-inflammatoire	R (2013)	(147)
<b>Transcutanée</b>	PLGA (antigènes)	Vaccins / Immunothérapie	R (2013)	(148)
<b>Transcutanée</b>	PLGA-ADN	Vaccins	R (2012)	(149)
<b>Transcutanée</b>	PLGA (indométacine)	Anti-inflammatoire	R (2012)	(150)
<b>Intra-dermale</b>	PLGA-membrane erythrocyte (antigen/MPLA)	Immunothérapie (mélanome)	R (2015)	(151)

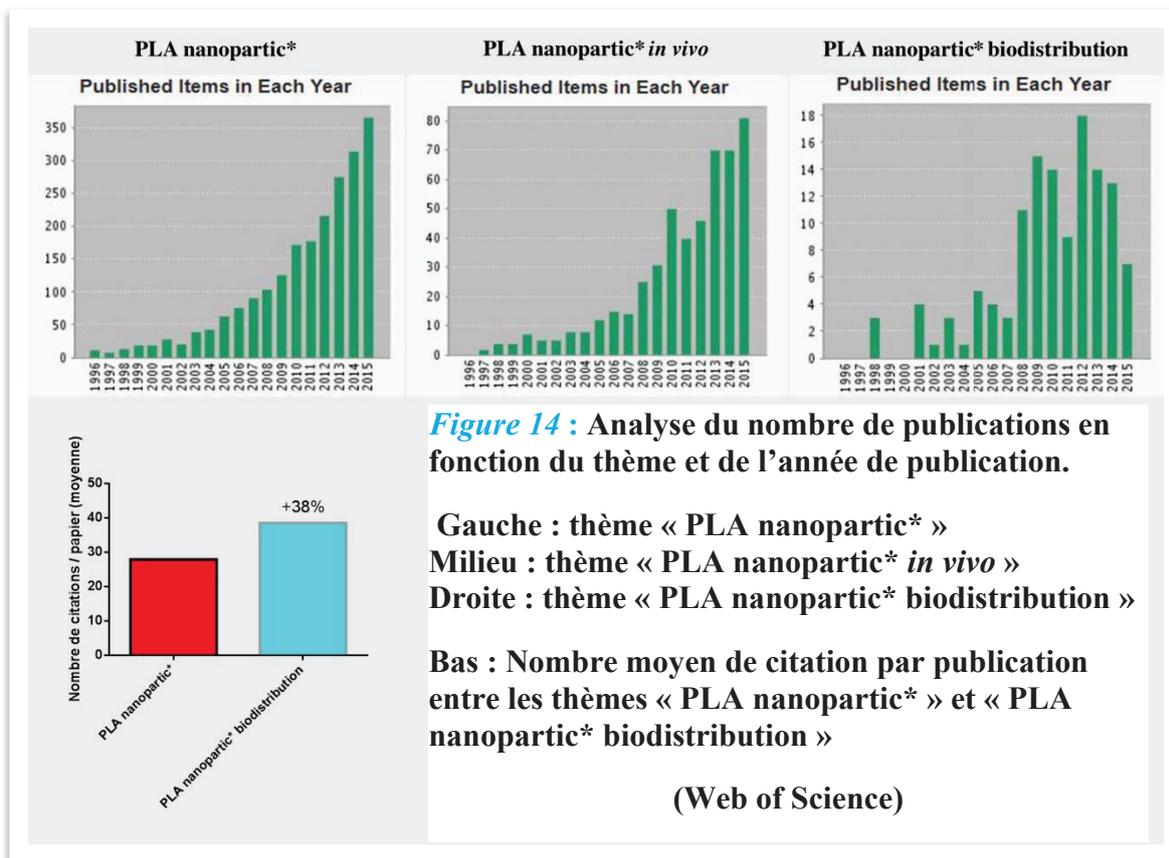
D'autres méthodes d'administration existent, bien que marginales par rapport aux voies d'administration décrites ci-dessus. Ainsi les nanoparticules de PLA et PLGA peuvent être injectées directement à proximité des os pour le traitement des infections osseuses (152) ou par administration intramusculaire pour les vaccins dont l'antigène est sous forme ADN (153). Un peu plus courantes en applications vétérinaire sont les injections intra-péritonéales (154,155), tandis que les injections intra-tumorales restent peu fréquentes à cause du délicat problème de dissémination de cellules cancéreuses (156).

Tableau 9: Administrations non-fréquentes de nanoparticules de PLA et PLGA

Administration	Nanoparticules	Application	Investigation	Référence
<b>Topique (Os)</b>	PLGA (gentamycine)	Infection osseuse	R (2016)	(152)
<b>Intramusculaire</b>	PLGA (Antigen/ODNs)	Vaccin anti-grippe aviaire (Volaille)	R (2016)	(153)
<b>Intra-péritonéale</b>	PLA-b-mPEG (paclitaxel)	Anti-cancer pulmonaire	R (1996)	(154)
<b>Intra-péritonéale</b>	PLGA (oxyde nitrique)	Traitement anti-leishmania	R (2016)	(155)
<b>Intra-tumorale</b>	PLGA-transferrine (paclitaxel)	Anti-cancer (prostate)	R (2004)	(156)

## 2.1. Biodistribution des nanoparticules de PLA et PLGA

Malgré les nombreuses études concernant l'application des nanoparticules de PLA et PLGA, la partie biodistribution reste dans la plupart des cas sous-développée ou bien inexistante. De même les articles scientifiques se focalisant sur la biodistribution sont peu nombreux, les informations disponibles sont pour la plupart fournies par les différentes études *in vivo*. Néanmoins, il convient également de garder à l'esprit que pour des nanoparticules composées du même polymère, la biodistribution n'est pas nécessairement identique.



Ainsi, selon les sources de « Web of Science », sur les 350 publications concernant les nanoparticules de PLA en 2015, seulement 80 sont appliquées à l'*in vivo* pour seulement entre 6 et 18 pour leur biodistribution (Figure 14). Néanmoins, les publications étudiant la biodistribution possèdent presque 40% de citations en plus en moyenne par rapport à l'ensemble des publications concernant les nanoparticules de PLA, soulignant ainsi le cruel besoin d'approfondir les études se focalisant sur la biodistribution des nanoparticules.

Selon les informations décrites dans le paragraphe biodistribution générale des nanoparticules, en théorie, les nanoparticules utilisées par le laboratoire en PLA, anioniques, 200 nm, sans tensioactifs, hydrophobes et sphéroïdes sont susceptibles de présenter la biodistribution suivante :

- L'absence de tensioactifs en surface va favoriser la formation d'une couronne de protéines en surface des nanoparticules une fois en milieu biologique. Il sera donc nécessaire de faire attention qu'il n'y ait pas de mauvais adressage des nanoparticules si elles atteignent le flux sanguin, vers le cerveau par exemple (33), de même il est possible que cela favorise leur prise en charge par des cellules du système immunitaire.

- Leurs charges de surface négatives devraient quant à elles non pas favoriser leur internalisation et accumulation par les cellules épithéliales mais plutôt leur prise en charge et transport à travers ces mêmes cellules (39).
- Le caractère anionique de ces nanoparticules et leur taille d'environ 200 nm, devraient favoriser leur internalisation par les cellules *via* des processus impliquant les radeaux lipidiques et la macropinocytose. De même qu'au niveau de la clairance, ces nanoparticules possèdent un diamètre hydrodynamique trop important pour être exfiltrées par les reins, mais sont susceptibles de particulièrement s'accumuler dans le foie et la rate
- Concernant leurs interactions avec le mucus, leur taille et charge devraient conférer un caractère muco-pénétrant modéré par de potentielles adhésions au mucus par des interaction hydrophobes.(39)(39)

Les articles sur la biodistribution des nanoparticules étant rares, la biodistribution des nanoparticules de PLGA, qui sont proches des nanoparticules de PLA, est également décrite dans ce manuscrit. De même l'objectif du travail de thèse étant focalisé principalement sur les muqueuses et le système circulatoire, nous allons particulièrement nous intéresser à la biodistribution des nanoparticules de PLA et PLGA après administrations muqueuses et intraveineuses.

Au regard de la biodistribution après administrations muqueuses, deux grands types de muqueuses sont particulièrement étudiés. Les muqueuses à épithélium prismatique (cellules en forme de colonne) qui composent le tube digestif, la cavité nasale et les parties hautes du poumon, et les muqueuses squameuses comme la cornée, la muqueuse buccale, la muqueuse alvéolaire, ainsi que la muqueuse vaginale et du cervix. Nous aborderons premièrement la biodistribution des nanoparticules de PLA et PLGA au sein des muqueuses prismatiques.

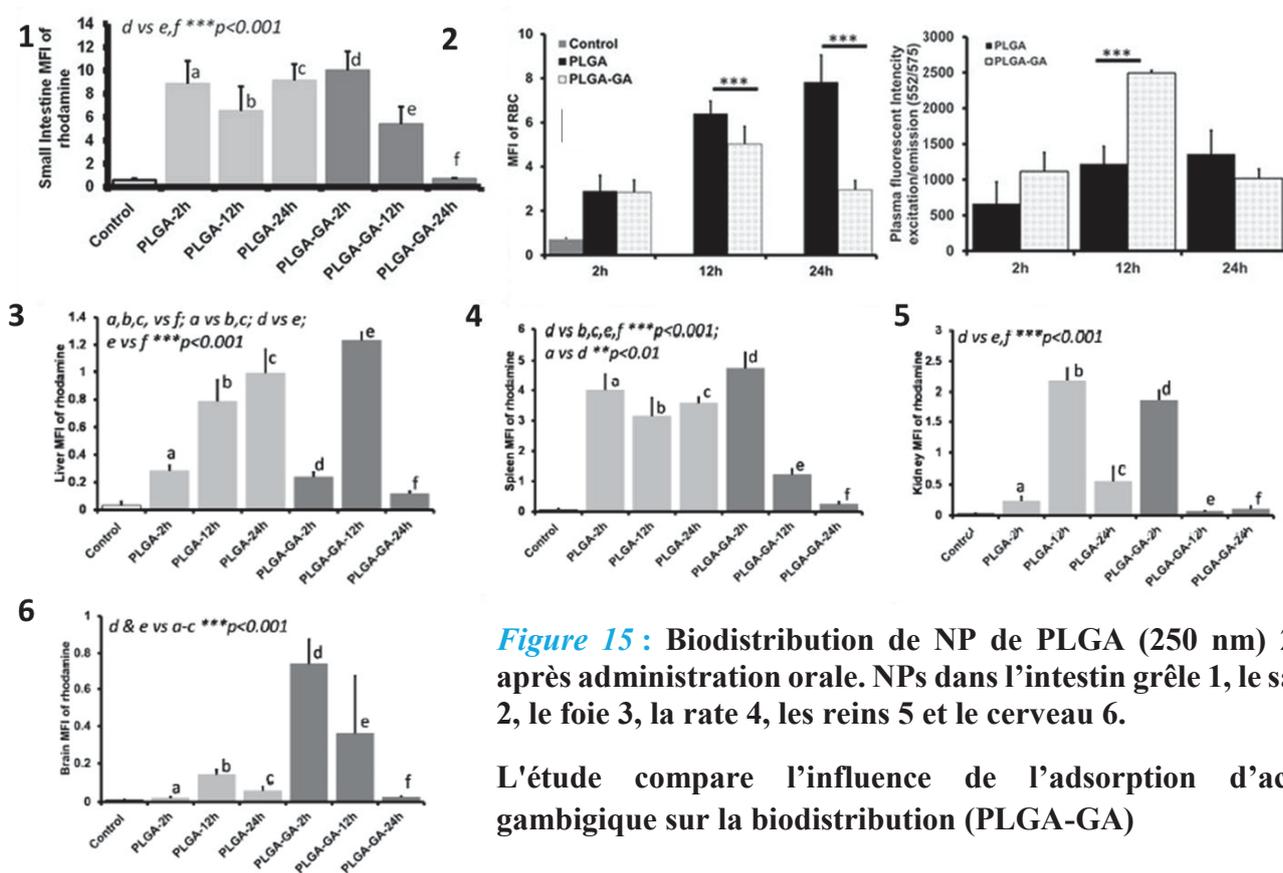
L'administration de nanoparticules de PLA et PLGA par voie orale permet d'atteindre les muqueuses stomacale et intestinale. Les principaux animaux modèles sont la souris et le rat. La principale difficulté de cette voie d'administration est le passage de l'estomac. Le fluide stomacal est très agressif pour les polymères de PLA et PLGA à cause d'un pH très bas (1,5 à

5 selon l'activité), menaçant aussi l'intégrité particulière des formulations et des principes actifs véhiculés. Cet obstacle peut être évité grâce à l'enrobage des nanoparticules par des substances résistantes aux pH acide de l'estomac pour ensuite se désagréger aux pH neutre et basique comme ceux de l'environnement intestinal, libérant ainsi les nanoparticules de PLA et PLGA dans un milieu biologique plus hospitalier. Les microcapsules d'eudragit encapsulant des nanoparticules de PLGA (420nm) ont ainsi permis à une équipe de cibler particulièrement le gros intestin où les nanoparticules ont d'ailleurs été prise en charge par des macrophages et des cellules dendritiques. En absence de l'enrobage, les nanoparticules ont été principalement détectées dans l'intestin grêle dans une moindre mesure (157). Une autre étude a pu *in vivo* décrire la dynamique de cet assemblage d'eudragit/PLGA. Deux heures après l'administration les assemblages sont visibles dans la lumière de l'estomac, tandis qu'entre 2h et 6h ceux-ci passent dans l'intestin grêle pour enfin atteindre le gros intestin et le colon entre 6h et 24h où un relargage massif des nanoparticules de PLGA a lieu. La pénétration des nanoparticules dans la muqueuse a été observée au niveau de l'iléum (fin de l'intestin grêle) avec un passage dans les plaques de Peyer (annexes lymphoïdes de la muqueuse intestinale spécialisées dans la détection des pathogènes intestinaux et principalement localisées dans l'iléum) 4h après l'administration. Pour finir, il est possible de modifier légèrement l'élaboration des microcapsules d'eudragit afin de favoriser la libération de nanoparticules de l'intestin grêle au colon.

Malgré l'obstacle que représente l'estomac, de nombreuses études ont été réalisées *ex vivo* et *in vivo* sur l'administration orale de nanoparticules de PLA et PLGA sans stratégie particulière pour éviter l'acidité de l'estomac. Ainsi la vectorisation de principes actifs par ces nanoparticules reste toujours bénéfique comme décrit par une étude sur des nanoparticules de PLGA de 260 nm ayant encapsulé de la cromolyne (158). Pour l'étude de la biodistribution, soit la drogue encapsulée est rendu radioactive, soit elle est remplacée par des fluorophores permettant la localisation des nanoparticules. Une étude s'est d'ailleurs intéressée à l'influence du fluorophore sur la biodistribution des nanoparticules par voie orale. Ainsi, selon les auteurs, le choix du fluorophore n'a pas d'impact sur la biodistribution. Il est toutefois nécessaire de faire attention aux fluorophores qui peuvent être libérés et qui, selon la molécule, peuvent s'accumuler dans les reins (rhodamine), le foie et les poumons (coumarin-6) (159).

La plupart des études vont préférentiellement étudier la biodistribution au niveau des organes. Dans les premières 24h après administration orale (**Figure 15**) (160), une majorité de nanoparticules de PLGA (250 nm) est retenue dans l'intestin grêle tandis qu'une quantité croissante pénètre dans la circulation sanguine. Les nanoparticules sont libres dans le plasma et accrochées aux érythrocytes. Une faible proportion atteint d'ailleurs le cerveau. Les

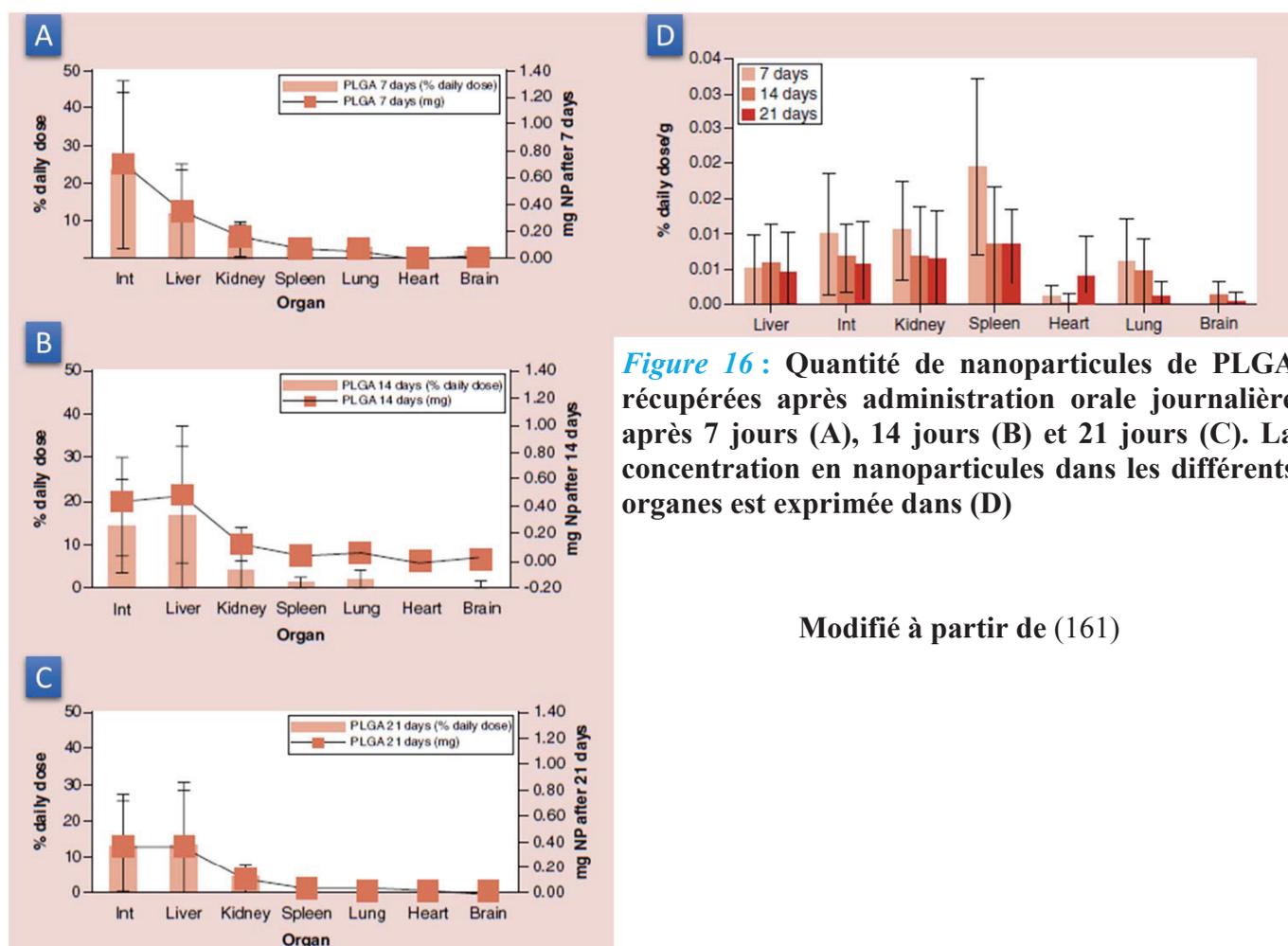
nanoparticules vont ensuite s'accumuler dans les organes de « nettoyage », d'une manière progressive dans le foie tandis que la rate fait montre d'une concentration de nanoparticules plus élevée mais constante. Une brève accumulation de nanoparticules a été observée dans les reins, celle-ci n'est visible qu'à 12h et laisse penser à un relargage soudain de fluorophore (le diamètre hydrodynamique maximum pour une filtration par les reins étant d'une dizaine de nanomètre).



Ces observations sont en accord avec l'étude portant sur l'influence des fluorophores dans la biodistribution (159), aux exceptions près que 24h après administration, les auteurs observent une proportion plus élevée de nanoparticules de PLGA (200-350 nm) dans le cerveau et beaucoup plus faible dans la rate. La quantité de nanoparticules par organe ne varie pas de manière significative même 1 semaine après l'administration.

Les effets d'une administration quotidienne ont été étudiés par une équipe (161) ayant administré des nanoparticules de PLGA neutre isoélectriquement (110nm – tensioactif PVA) d'une manière journalière pendant 7 jours, 14 jours et 21 jours (**Figure 16**). Durant la première

semaine, les nanoparticules vont principalement se localiser dans les intestins puis le foie, ainsi que très faiblement dans la rate, les poumons, le cerveau et le cœur. Durant la deuxième et troisième semaine, la différence viendra d'une plus grande quantité de nanoparticules retrouvées dans le foie. Les auteurs ont pu observer une infiltration de cellules immunitaires dans les intestins après 7 jours, qui selon eux augmente la dégradation des nanoparticules. Une inflammation y apparaît d'ailleurs à J14 et J21 tandis que le foie n'est inflammé qu'au quatorzième jour. L'administration journalière de nanoparticules augmente également le poids du foie et des intestins tout en diminuant transitoirement le poids des poumons.

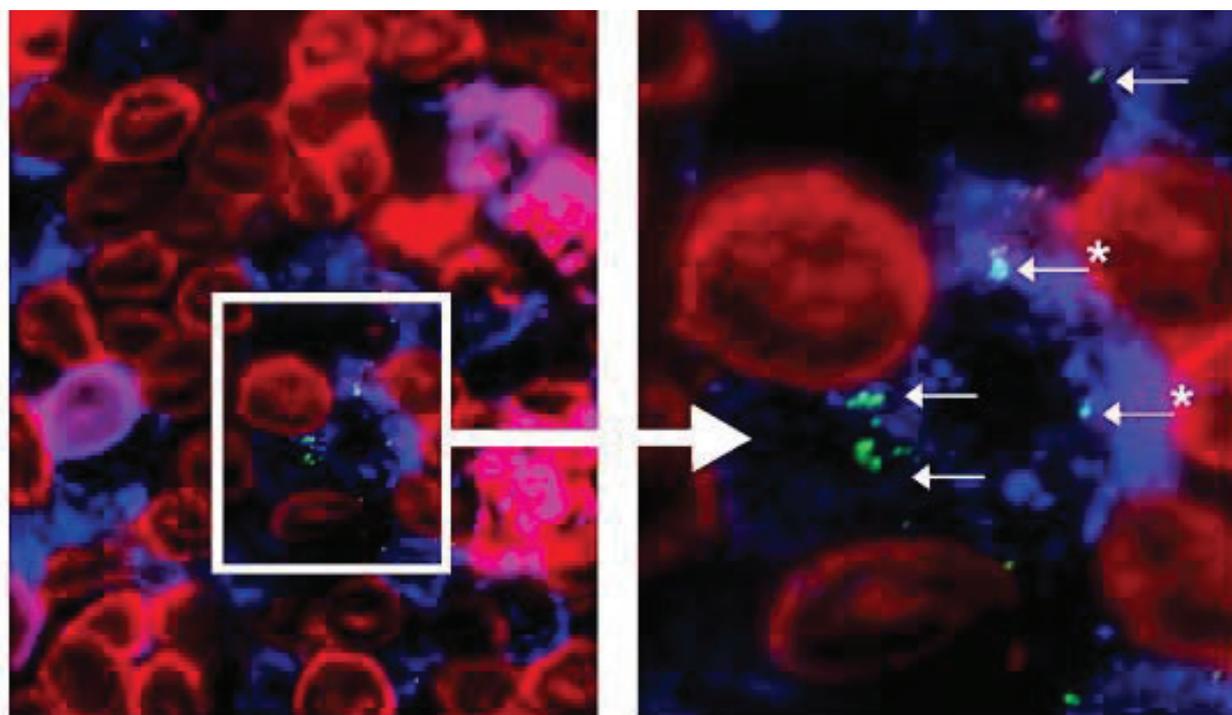


**Figure 16 :** Quantité de nanoparticules de PLGA récupérées après administration orale journalière après 7 jours (A), 14 jours (B) et 21 jours (C). La concentration en nanoparticules dans les différents organes est exprimée dans (D)

Modifié à partir de (161)

Dans la muqueuse intestinale, les nanoparticules de PLGA vont principalement pénétrer la muqueuse au niveau de l'intestin grêle et plus particulièrement dans l'iléum où elles sont prises en charge par les cellules M dans les régions riches en plaque de Peyer (158,162,163).

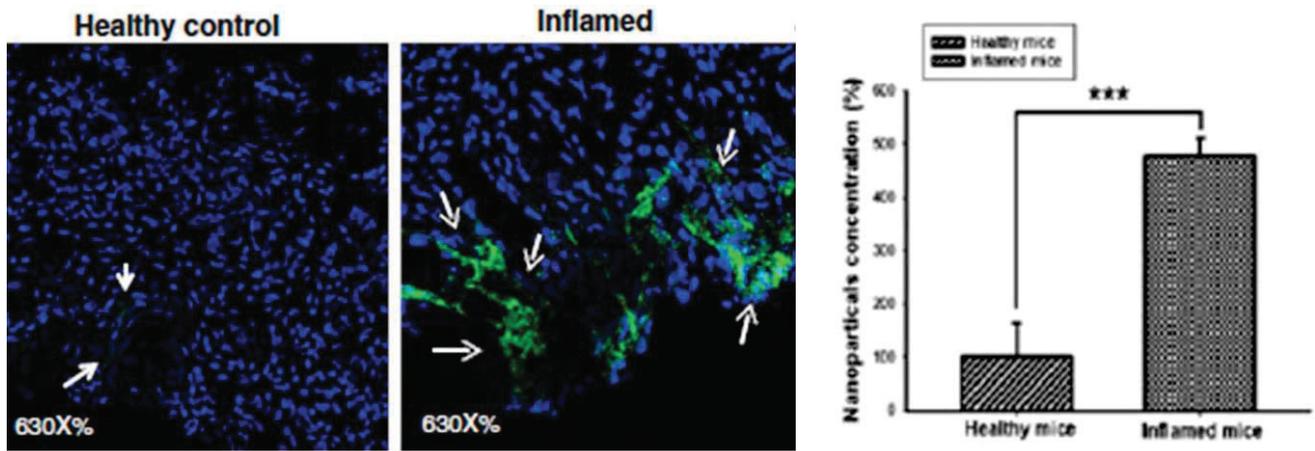
Une étude publiée par le laboratoire d'accueil (53) sur des nanoparticules de PLA anionique et sans tensioactifs (200-250 nm) administrées au sein d'anses iléales *ex vivo* et *in vivo*, a montré une rapide (15 mn) et forte pénétration de la muqueuse intestinale iléale *via* les cellules M sans que les entérocytes soient impliqués (**Figure 17**). Les nanoparticules interagissent également avec des cellules dendritiques et des lymphocytes B. Une administration par gavage a ensuite démontré le caractère muco-pénétrant de ces nanoparticules, bien qu'une partie des nanoparticules reste piégée dans du mucus. Les nanoparticules pénètrent le tissu folliculaire du duodénum et jéjunum, ainsi que les tissus lymphatiques de l'iléum.



**Figure 17 :** Prise en charge de nanoparticules de PLA par l'épithélium intestinal après administration dans une anse iléale. Internalisation des nanoparticules par les cellules M (bleu). Absence de prise en charge par les entérocytes (rouge) et cellules caliciformes (rose)

Modifié à partir de (53)

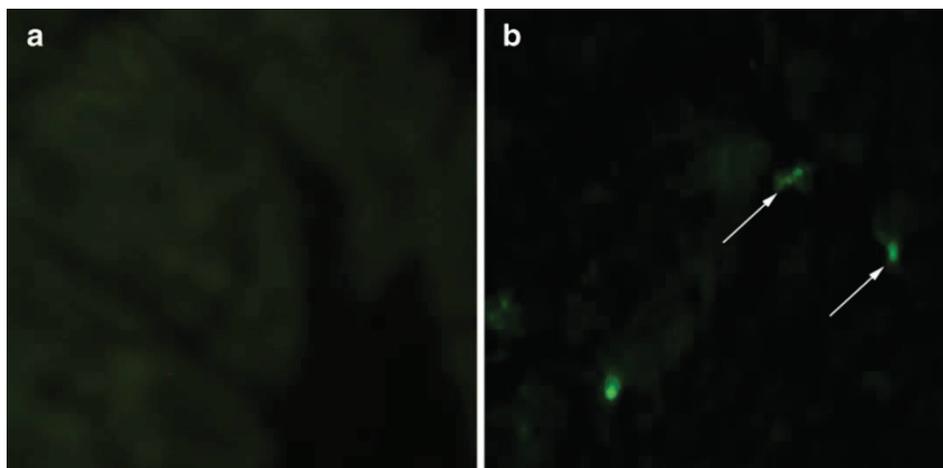
Pour finir, une étude (164) a démontré le tropisme inné de nanoparticules de PLGA (200 nm) envers des épithéliums intestinaux en état d'inflammation. Les auteurs ont remarqué que ces nanoparticules vont plus fortement interagir avec les épithéliums muqueux provenant de souris atteintes d'inflammations chroniques des intestins qu'avec l'équivalent dans un tissu sain (**Figure 18**).



**Figure 18** : Tropisme inné de nanoparticule de PLGA vers les épithéliums intestinaux en état d'inflammation.

Modifié à partir de (164)

Concernant la biodistribution de nanoparticules de PLA et PLGA dans la muqueuse nasale, beaucoup moins d'informations sont disponibles, cela pourrait s'expliquer par la délicatesse de prélever la cavité nasale sans l'endommager. Ces nanoparticules sont rapidement prises en charge par la muqueuse nasale 30 mn après administration, comme démontré par une étude (165) utilisant des nanoparticules de PLGA (400-500 nm) neutres. Cette même étude impute cette prise en charge aux diverses cellules épithéliales et cellules M de la cavité nasale (*Figure 19*).



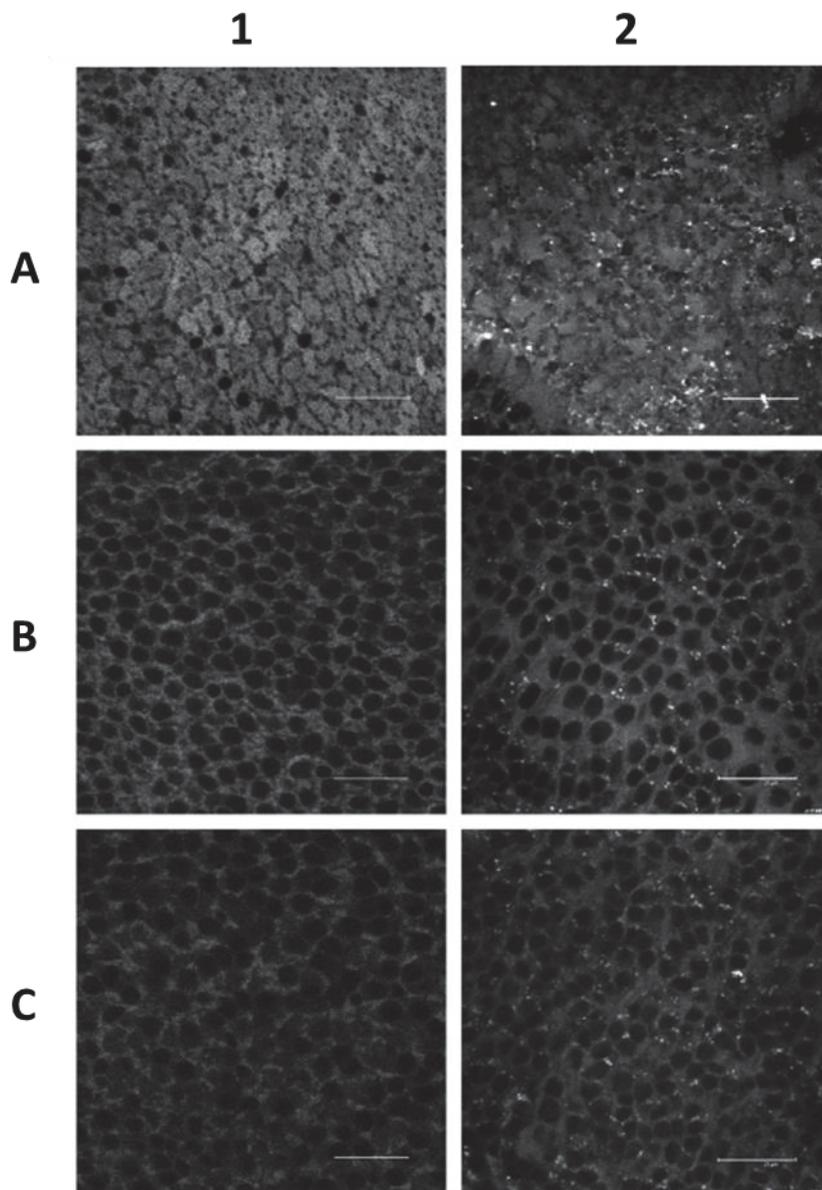
**Figure 19 :** Prise en charge de nanoparticules de PLGA par la muqueuse nasale. A : Autofluorescence de la cavité nasale. B : Nanoparticule de PLGA.

Modifié à partir de (165)

Un des plus grands intérêts de ce mode d'administration est qu'il représente une voie d'accès rapide pour le cerveau qui n'est pas soumise au passage de la barrière hémato-encéphalique. Les nanoparticules pénètrent l'épithélium olfactive présent dans la cavité nasale et remontent le nerf trijumeau pour accéder au cerveau. Parmi les études ciblant le cerveau par cette méthode, l'une utilise des nanovéhicules de PLGA (150-340 nm) anioniques et mesure une plus grande concentration du diazépam dans le cerveau par la voie nasale que par injection intraveineuse (166). Une autre étude (167) a, quant-à-elle, également montré un meilleur ciblage du cerveau par la voie nasale que par l'injection intraveineuse en utilisant du lorazépam encapsulé dans des nanoparticules de PLGA-poloxamer (160-320 nm) anioniques. Ce nanosystème est d'ailleurs plus performant que l'administration nasale de la drogue libre. A noter la présence d'un passage dans la circulation sanguine.

Revenons à la prise en charge de ces nanoparticules par la muqueuse nasale dont la pénétration est très rapide. Une étude (168) sur des nanoparticules de PLGA-poloxamer (160-180 nm) a montré que les nanoparticules traversent l'épithélium et pénètrent les couches sous-jacentes jusqu'à 25-30µm de profondeur en l'espace de 15mn (*Figure 20*). Là où des nanoparticules de PLA-PEG (150-300nm) anioniques atteignent des profondeurs de 40-50 µm en à peine 4 minutes après administration (169). Une dernière étude (170) s'intéresse au devenir de ces nanoparticules. Elle pointe le fait qu'il n'y a pas que la pénétration de la muqueuse qui est rapide, il y a aussi la clairance. En 90 minutes, les auteurs ne détectent plus de nanoparticules

de PLGA. Enfin, ils montrent que 24h après administration, les nanoparticules vont principalement être dans des ganglions lymphatiques, puis dans la circulation sanguine et enfin dans les poumons, rate, foie et intestins. Ils attribuent cette grande capacité à quitter la cavité nasale par l'important drainage des couches profondes de cette muqueuse par des capillaires sanguins et vaisseaux lymphatiques.

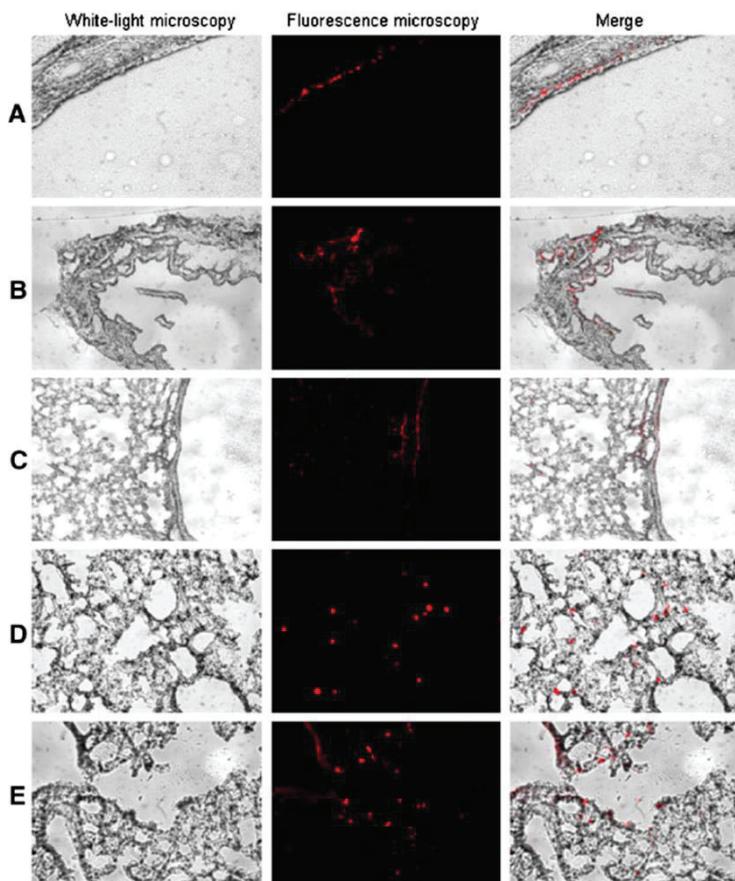


**Figure 20** : Pénétration de la muqueuse nasale par des nanoparticules de PLGA. 1 : tissus non-traités. 2 : tissus traités avec des nanoparticules. A : Surface de la muqueuse. B : Acquisition à 5µm de profondeur. C : Acquisition à 10µm de profondeur. Barre d'échelle : 25µm.

Modifié à partir de (168)

L'administration de nanoparticules de PLA et PLGA est plus couramment réalisée par nébulisation intratrachéale, cela afin d'éviter toute interférence par la muqueuse nasale. L'épithélium prismatic pulmonaire est fin, très vascularisé et présente également des cellules M, comme les intestins et la cavité nasale. La prise en charge des nanoparticules est efficace, comme montré par une étude (99) sur des nanoparticules de PLGA (180-250 nm) vectorisant des plasmides adsorbées et ayant encapsulé des particules magnétiques (pour la visualisation par Imagerie à Résonance Magnétique (IRM) ou bien des fluorophores (Microscopie confocale). Après 2h suivant l'administration, les nanoparticules sont disséminées dans l'ensemble des poumons où elles sont prises en charge par les cellules septales (aussi appelées alvéolaires de type 2 ; ces cellules représentent 60% des cellules alvéolaires pour 5% de la surface), et des macrophages. Cette vectorisation s'est révélée très efficace car l'expression du plasmide est toujours détectée 21 jours après l'administration. La prise en charge de nanoparticules de PLGA par les macrophages alvéolaires est corroborée par une autre étude où cette fois-ci la taille est de 700 nm (95).

Concernant la répartition des nanoparticules sur l'ensemble des poumons, une étude (171) pointe l'influence de la charge des nanoparticules. Les auteurs utilisent des microcapsules de lactose (10-12  $\mu\text{m}$ ) encapsulant des nanoparticules de PLGA-chitosan/alginate (positives) ou des nanoparticules de PLGA-PVA/alginate (négatives) de 250-350 nm. Les complexes nanoparticulaires de PLGA positives sont confinés dans les parties hautes des voies respiratoires (trachée, bronches, bronchioles) mais absente de la surface alvéolaire. Tandis que les complexes nanoparticulaires de PLGA négatives sont peu présentes dans les voies respiratoires supérieures mais atteignent principalement les canaux alvéolaires (*Figure 21*). Il est envisageable que ces différences soient la conséquence des différentes interactions avec le mucus et surtout avec le tensioactif pulmonaire (mélange de lipides et protéines permettant de réduire les tensions de surfaces lorsque les poumons sont vides, évitant ainsi que les parois alvéolaires collapent. Les interactions entre ce tensioactif biologique et les nanoparticules sont très bien décrites dans cette revue (172).



**Figure 21 :** Prise en charge par les différents compartiments pulmonaires de complexe nanoparticulaire anioniques de PLGA-PVA/alginate administrées dans des microcapsules de lactose.

**A :** Trachée

**B :** Bronches

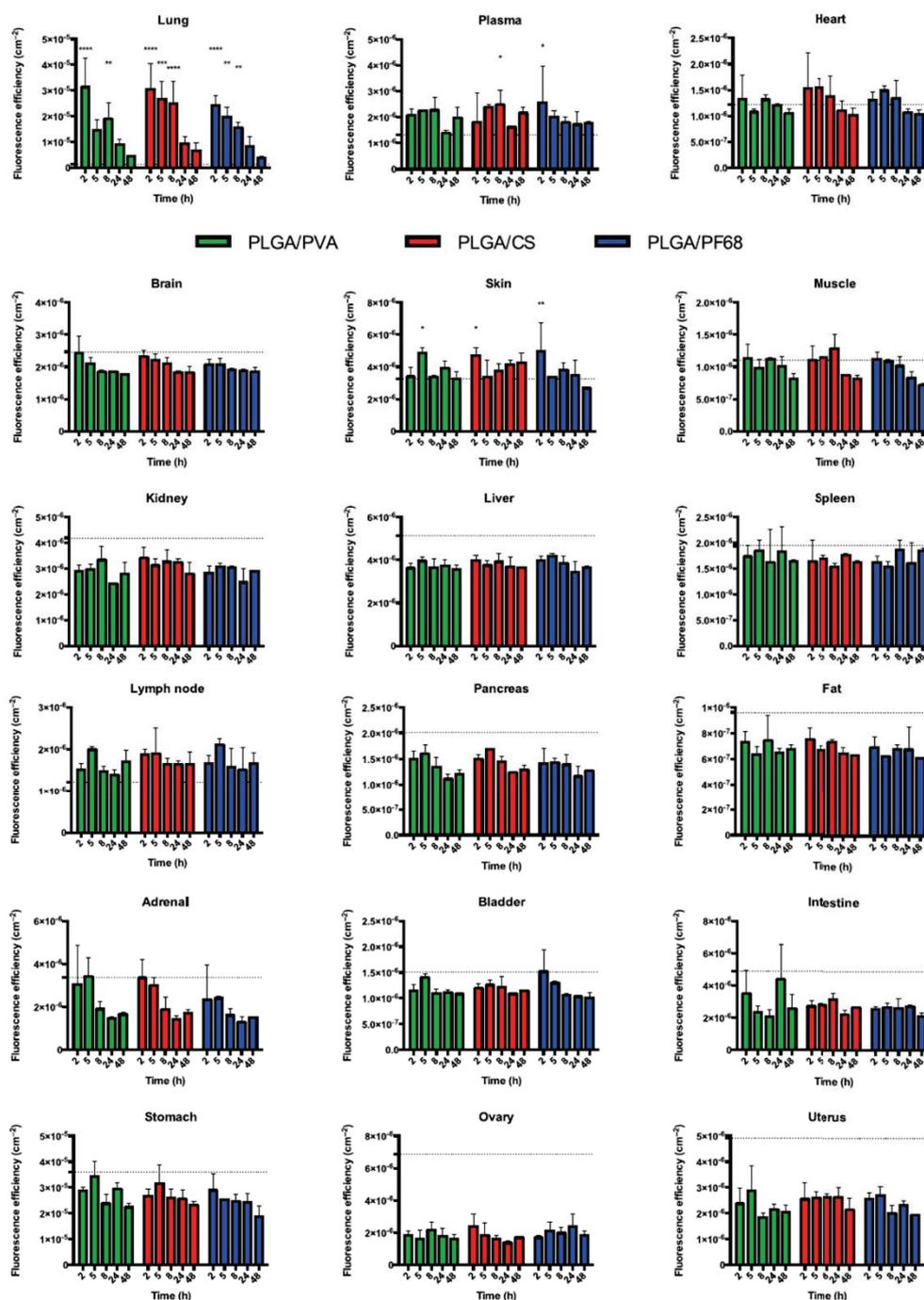
**C :** Bronchioles

**D-E :** Canaux alvéolaires

Modifié à partir de (171)

La diffusion des nanoparticules en dehors de la muqueuse pulmonaire est rapide, possiblement favorisé par la très riche vascularisation. En effet une étude sur des nanoparticules de PLGA-poloxamer (200-260 nm) montre que 30 minutes après nébulisation intratrachéale, les nanoparticules, en plus des poumons, atteignent aussi la circulation sanguine ainsi que le cerveau, le foie, la rate et le cœur. Ce passage dans la circulation sanguine, couplé à un renouvellement rapide du mucus pulmonaire, implique une clairance des nanoparticules. De cette manière des nanoparticules de PLGA-chitosan cationiques (440 nm) ne sont plus détectables 96h après administration (173). Cette clairance a également été observée dans une autre étude consacrée à l'influence des charges électrostatiques des nanoparticules de PLGA sur la biodistribution, mais cette fois-ci sur la diffusion en dehors des poumons (174). Ils comparent ainsi la biodistribution de nanoparticules (200 nm) de PLGA-PVA (neutre), PLGA-chitosan (positive) et PLGA-PF68 (négative) après nébulisation intratrachéale. Ils notent une diminution de la quantité de nanoparticules dans les 48h pour les trois formulations mais seulement une diffusion faible en dehors des poumons de 2 à 48h avec un pic de fluorescence dans le sang à 8h pour les nanoparticules positives et 2h pour les négatives (*Figure 22*). Il est donc possible que la pénétration de la muqueuse soit favorisée par l'énergie fournie par le spray.

Enfin les auteurs montrent que l'administration de ces nanoparticules tend à induire le recrutement de cellules immunitaires dans la muqueuse pulmonaire.



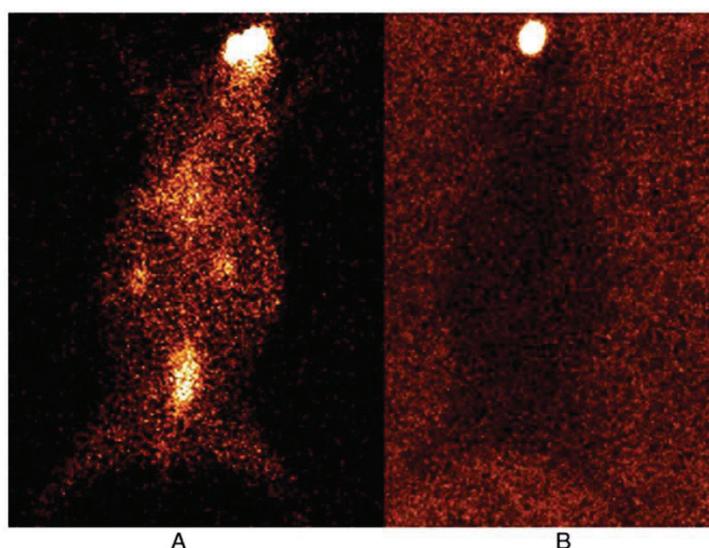
**Figure 22 :** Biodistribution de nanoparticules de PLGA positives (CS - rouge), neutres (PVA - vert) ou négatives (PF68 – bleu) de 2 à 48h après administration pulmonaire. La ligne en pointillée représente le niveau d'autofluorescence des tissus et les étoiles le niveau de significativité de la différence entre le signal de fluorescence associé aux nanoparticules et l'autofluorescence.

Modifié à partir de (174)

A l'instar de la peau qui est recouverte d'un épithélium pavimenteux kératinisé, les muqueuses de la bouche, de la cornée et du vagin sont, elles aussi, recouvertes par des épithéliums pavimenteux mais non-kératinisés. Contrairement aux épithéliums prismatiques, la couche superficielle est composée de cellules beaucoup plus larges que longues, disposant ainsi d'une grande interface d'échange avec l'environnement extérieur.

Les données de biodistribution sur l'administration de nanoparticules de PLA et de PLGA au niveau de la muqueuse buccale sont très rares. Pour ce mode d'administration, il est préférable d'inclure les nanoparticules au sein de films bioadhésifs. Une étude sur des nanoparticules de PEG-b-PLA a ainsi pu montrer *ex vivo* une plus grande perméation d'insuline encapsulée à travers les tissus buccaux (175).

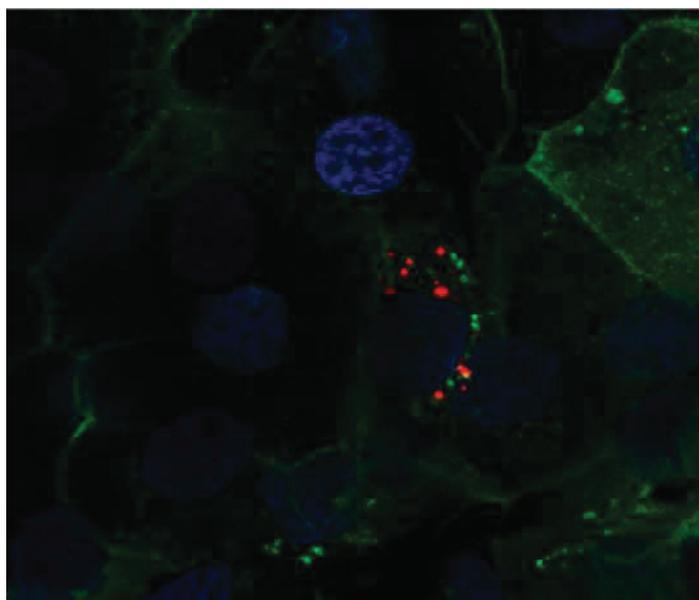
L'administration topique de nanoparticules de PLA et de PLGA a été testée sur la cornée, tissu muqueux composé d'un épithélium, d'une couche stromale et enfin d'un endothélium. L'organisme modèle pour cette voie est le lapin. La principale difficulté d'administrer un produit non-vectorisé réside dans l'efficace clairance lacrymale (176). Une étude (177) a pu ainsi montrer que le dépôt d'une solution commerciale sur un œil mène à une élimination rapide du produit par les larmes et un passage dans la circulation systémique. Après 6 heures, le produit va se retrouver dans les reins et la vessie (produit marqué par radioactivité). Tandis que l'incorporation de ce principe actif au sein de nanoparticules de PLGA (180-190 nm) anioniques diminue la clairance, le produit radioactif fait ainsi montre d'une rétention spécifique au niveau des yeux 6 heures après l'administration (*Figure 23*).



**Figure 23** : Biodistribution d'un produit radioactif 6h après administration topique sur les yeux. Libre (A) ou bien vectorisé par des nanoparticules de PLGA (B).

Modifié à partir de (177)

En plus de la rétention spécifique sur le lieu de l'administration, les nanoparticules pénètrent également la couche de cellules pavimenteuses de la cornée. Cela a été montré avec des nanoparticules de PLGA-PEG (100 nm) (178) avec peptides de pénétration administrés dans le sac sous-conjonctif (entre la paupière inférieur et le globe oculaire) (*Figure 24*). Les auteurs notent par ailleurs l'absence d'irritation. De même une autre étude (179) indique que la prise en charge de nanoparticules de PLGA-PEG (120-200 nm) par ces cellules pavimenteuses, dans les deux heures suivant l'administration, puisse impliquer un processus transcellulaire. Cette étude souligne d'ailleurs le risque de fuite de fluorophore du cœur des nanoparticules, 10% de la rhodamine ayant fui dans les deux heures. De même les auteurs ont pu remarquer que l'encapsulation de flurbiprofen dans les nanoparticules a eu un impact négatif sur la pénétration des nanoparticules de PLGA-PEG dans la cornée.

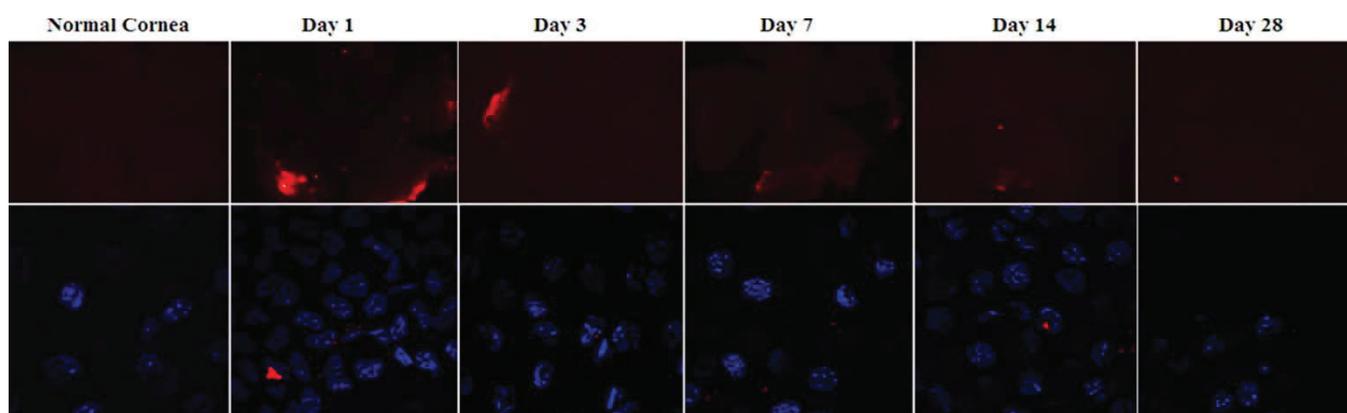


**Figure 24 : Prise en charge de nanoparticules de PLGA-PEG avec des peptides de pénétration adsorbés (rouge) par une cellule pavimenteuse de cornée.**

Modifié à partir de (178)

Le temps de rétention a été évalué par une équipe (180) travaillant sur des nanoparticules de PLGA (220-270 nm) avec des peptides RGD adsorbés (séquence protéique servant à cibler les interactions avec différentes intégrines présentes en surface de certaines cellules spécifiques) et véhiculant un plasmide afin de réduire la vascularisation inhérente à la greffe de cornée (ce qui augmenterait le risque de rejet). Ces nanoparticules, après injection sous-conjonctive, pénètrent la cornée où elles restent détectables pendant au moins deux mois (*Figure 25*). La protection

du plasmide n'atteint pas ce temps, néanmoins son expression est détectable pendant 4 semaines.



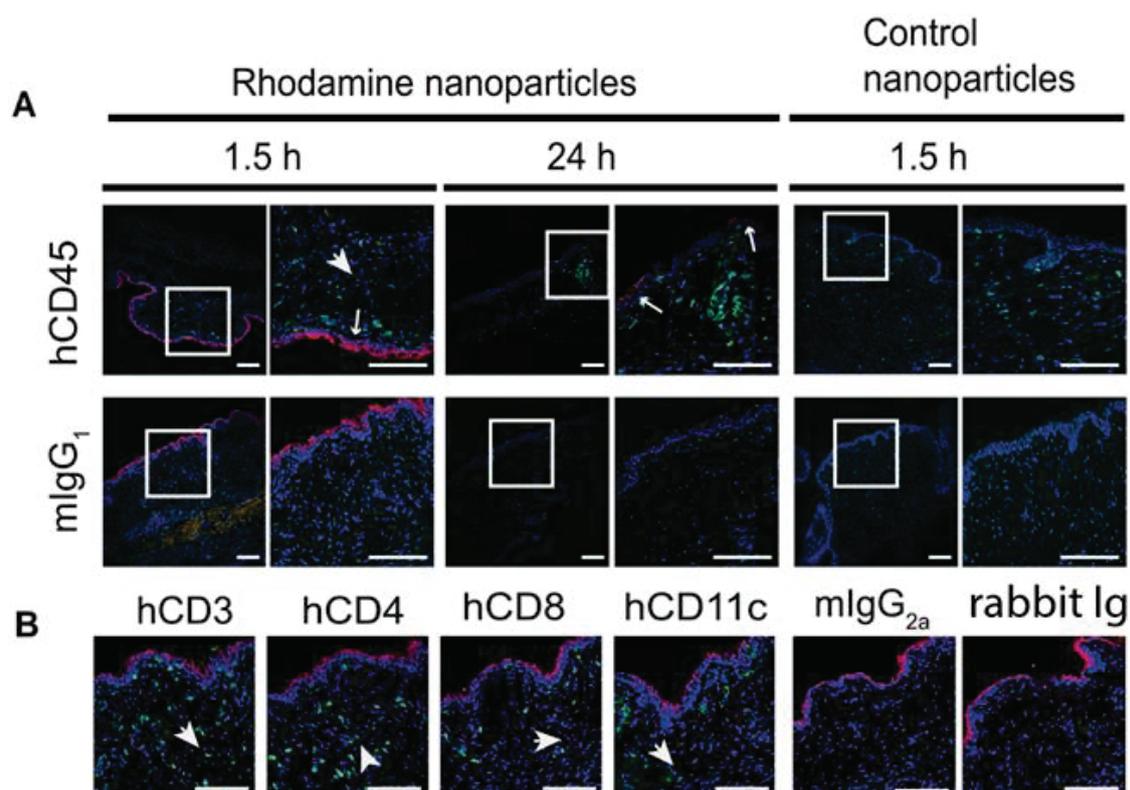
**Figure 25 :** Rétention de nanoparticules de PLGA (rouge) dans les cellules pavimenteuses de la cornée durant 4 semaines. (10 $\mu$ m de profondeur). En haut, acquisitions à faible grossissement (obj. X2.5). En bas, acquisitions à fort grossissement (obj. X100)

Modifié à partir de (180)

La cornée n'est pas vascularisée, ses cellules utilisent l'oxygène présent dans l'atmosphère et l'humeur vitreuse. Cette dernière est positionnée directement derrière la cornée, il est donc possible que des nanoparticules atteignent ce compartiment après administration topique sur la cornée. Des nanoparticules de PLA (310 nm) (181) injectées dans l'humeur vitreuse diffusent lentement vers la rétine grâce aux courants générés par les corps ciliaires (à proximité de l'arrière de l'iris). Au bout de 6h, les nanoparticules ont majoritairement quitté l'humeur vitreuse pour être prises en charge par l'épithélium pigmentaire de la rétine. Après 1 mois, les nanoparticules sont encore détectables au niveau de l'iris, du cristallin et de la rétine. Au stade de 4 mois après l'administration, les nanoparticules sont toujours présentes dans la rétine, certaines étant intactes dans le cytoplasme des cellules et d'autres étant partiellement hydrolysées.

La muqueuse vaginale est une cible de choix pour le traitement préventif et thérapeutique des maladies sexuellement transmissibles. Lors d'administrations de principes actifs, il faut particulièrement faire attention au reflux (par gravité ou expulsion). L'utilisation de nanoparticules au moins partiellement muco-adhérentes ou bien leur inclusion dans des hydrogels permet d'amoindrir cette difficulté. L'épithélium vaginal, qui est plus ou moins épais au gré des cycles menstruels (très fluctuant chez la souris), possède un réseau de cellules de Langerhans (sous-type de cellules dendritiques plus connu pour résider dans la peau). Les

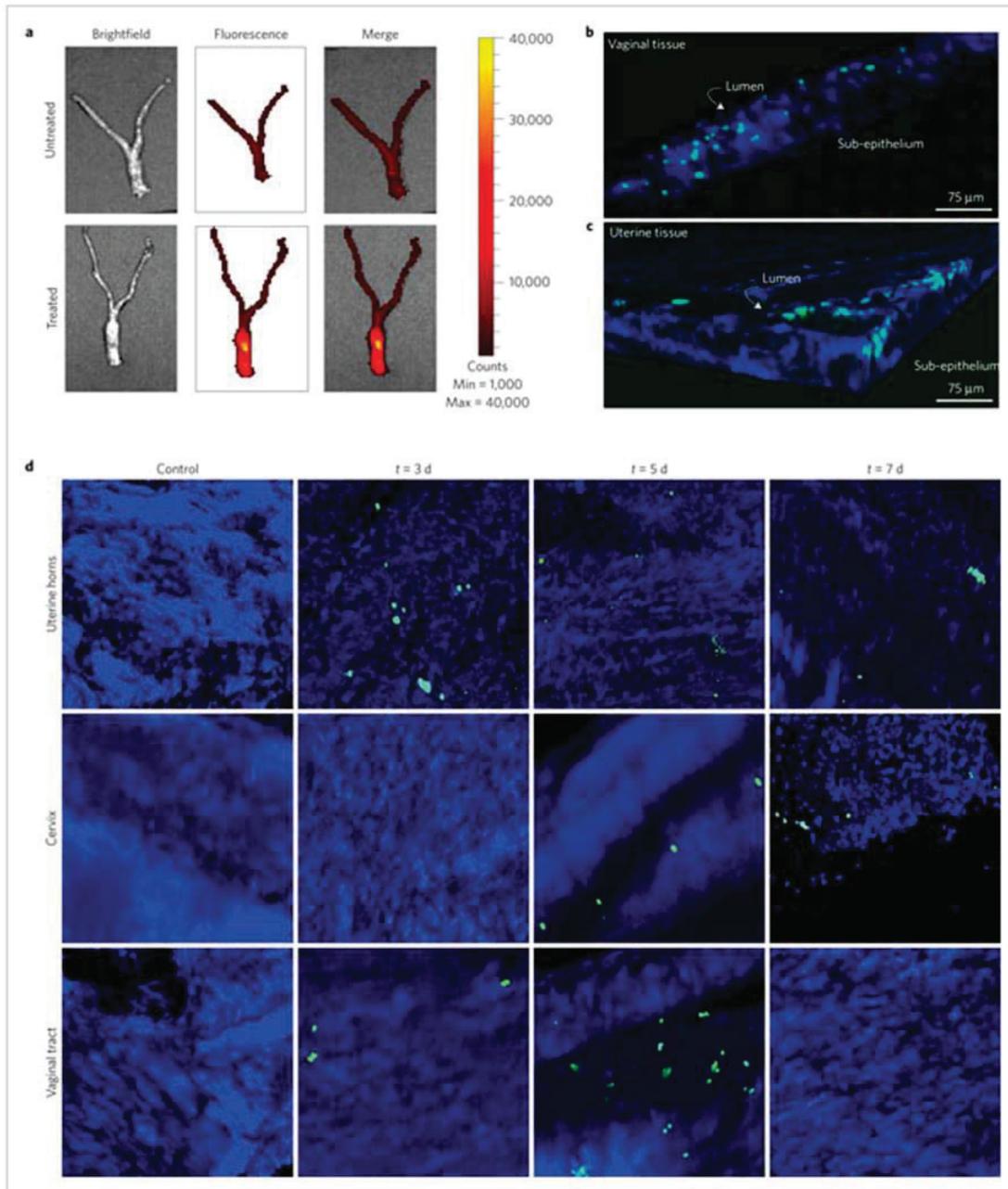
relations entre les nanoparticules « en général » et la muqueuse vaginale, ont été analysées dans une revue écrite par Ensign et *al* (182). Concernant les nanoparticules de PLA et PLGA, une étude (183) montre que la pénétration de nanoparticules de PLGA-PEG (100 nm) neutres administrées dans une solution hypotonique n'est pas effective dans au moins les 10 premières minutes, les nanoparticules restant agrégées en surface de l'épithélium. Néanmoins, dans les 6h après administration par spray vaginal de nanoparticules de PLGA (150-170 nm)(184), les nanoparticules se localisent dans les parties basses du vagin, ne pénétrant pas le cervix et les cornes utérines. Au niveau de la muqueuse, une partie des nanoparticules reste piégée dans le mucus tandis que l'autre a été internalisée par des cellules épithéliales. Les nanoparticules sont ensuite retrouvées dans le stroma de la muqueuse et de la sous-muqueuse vaginale. Une autre étude (94) s'est penchée sur l'utilisation de nanoparticules de PLGA (60 nm) anioniques incorporées dans un hydrogel. Au bout d'1h30, les nanoparticules se trouvent à la fois en surface et dans la muqueuse vaginale, tandis qu'après 24h, les nanoparticules atteignent les couches profondes de l'épithélium jusqu'à atteindre la proximité de cellules qui sont naturellement ciblées par le VIH en cas d'infection (souris humanisées) (**Figure 26**).



**Figure 26** : Pénétration de la muqueuse vaginale de souris humanisées par des nanoparticules de PLGA administrées incorporées dans un hydrogel. Les nanoparticules atteignent les couches profondes de l'épithélium où réside de nombreuses cellules ciblées par le VIH lors d'infection. B : 24h après administration.

Modifié à partir de (94)

Sur les temps un peu plus longs, des nanoparticules anioniques de PLGA véhiculant des siRNA en surface et de la coumarin-6 encapsulée (170-200 nm) ont été appliquées localement et leur biodistribution a été suivie sur une durée d'une semaine (185). Après les premières 24h, les nanoparticules atteignent les parties distales des cornes utérines en plus du tractus vaginal. Dans ces régions, les nanoparticules pénètrent les couches profondes de l'épithélium, jusqu'à 75 µm de profondeur. A noter que l'épithélium utérin diverge de celui du vagin et du cervix car il n'est pas pavimenteux mais prismatique. De J3 à J7, les nanoparticules pénètrent encore plus profondément les tissus pour atteindre 120 µm de profondeur. Au sein des cellules, tandis que des nanoparticules ont été localisées dans le cytoplasme (*Figure 27*), l'effet de « knockdown » des siRNA est toujours effectif. Dans l'ensemble, une pénétration relativement lente de cette muqueuse épaisse ne laisse pas envisager de grande diffusion en dehors du vagin. Les auteurs des études précédemment décrites hypothétisent une possible diffusion des nanoparticules par des capillaires, des vaisseaux lymphatiques ou bien par migration de phagocytes.



**Figure 27:** Biodistribution de nanoparticules de PLGA anioniques dans l'appareil reproducteur féminin de souris 24h (A, B et C) après administration topique jusqu'à 7 jours après administration. (D)

Modifié à partir de (185)

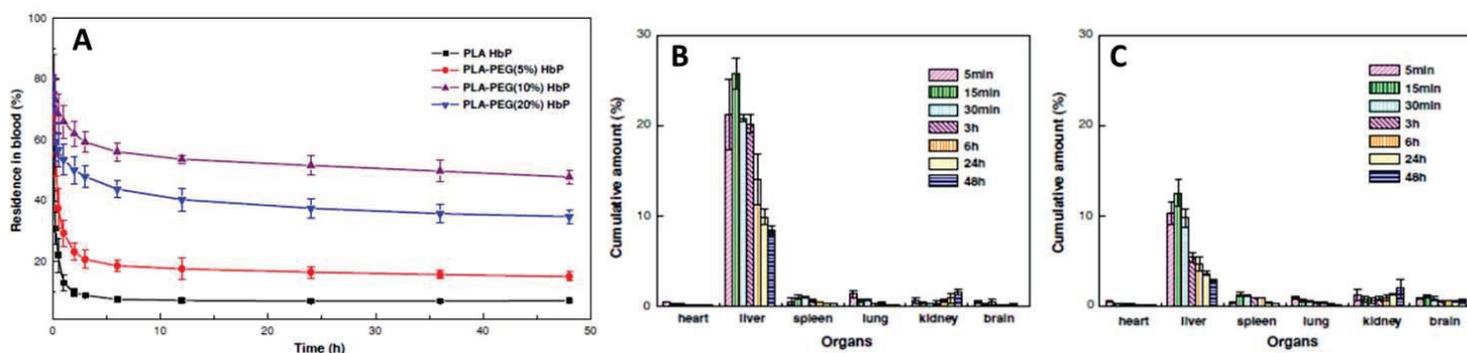
L'injection intraveineuse de nanoparticules est d'une manière générale le mode d'administration le plus étudié. Le principal obstacle physique rencontré lors de cette méthode est la barrière endothéliale. Le transport d'éléments à travers l'endothélium vasculaire est très bien décrit par Radu V Stan (186). Il y est expliqué que cet endothélium possède une organisation similaire à un épithélium pavimenteux qu'il est nécessaire de traverser afin de délivrer les principes actifs aux cibles choisies, que ce soit par passage entre les jonctions intercellulaires (<70 nm) ou par les canaux transendothéliaux, ou par le passage par transcytose ou encore par les organelles vacuolo-vésiculaires. Bien que les cellules endothéliales vasculaires soient le plus souvent victimes d'un ciblage non-désiré, certains laboratoires ont développé des stratégies afin de les cibler spécifiquement pour des applications comme le traitement des thromboses, cancers et autres pathologies. Ces stratégies appliquées aux nanoparticules en général, ont été résumées de manière détaillée par Howard *et al* (187).

En ce qui concerne les nanoparticules de PLA et PLGA, il n'y a que peu d'information par rapport à d'éventuelles interactions avec les cellules endothéliales dont une étude réalisée *in vitro* sur des cultures de cellules endothéliales (188) ou une autre sur le ciblage de cellules endothéliales liées aux tumeurs (189).

Les protéines du plasma sanguin peuvent interférer avec l'adressage des nanoparticules comme abordé dans un paragraphe précédent, mais elles peuvent en plus modifier la dynamique des nanoparticules de PLA et PLGA dans le flux sanguin. Une étude (190) va particulièrement souligner la grande influence de ces protéines sur l'adhérence de nanoparticules de PLGA (330 nm) à la surface de cellules endothéliales. Les auteurs ont montré *in vitro* une baisse de 90% de l'adhésion des nanoparticules à la paroi de cellules endothéliales dans un flux de sang humain complet, par rapport à un flux de tampon « simple ». Grâce à des expériences de déplétion de protéines du plasma, cette étude a pu démontrer que cette interférence incombe aux grosses protéines du plasma. L'absence de ces protéines a pour effet de restaurer (toujours *in vitro*) l'adhésion des nanoparticules aux parois des cellules endothéliales.

Afin de réduire les interactions aspécifiques avec les protéines du plasma (opsonines etc), une stratégie globalement acceptée est de recouvrir les nanoparticules de polyéthylène glycol (PEG). Il est admis qu'une couronne de PEG permet d'éviter l'adsorption d'opsonine à la surface des particules et donc de procurer une relative furtivité vis-à-vis du système réticulo-endothélial. Une étude (191) s'est d'ailleurs focalisée sur l'effet de différents recouvrements de PEG (5%, 10% et 20%) en surface de nanoparticules de PLA (180 nm) sur la clairance sanguine. En premier lieu, l'étude montre qu'avec ou sans PEG se déroule une clairance en deux phases. La première est très rapide mais relativement brève (6h) et est ensuite suivie par une clairance

lente mais constante dans le temps. En absence de PEG, il ne reste plus que 9% de nanoparticules de PLA circulante 2h après administration, contre plus de 60% en présence d'un manteau de PEG 10%. L'effet est toutefois moindre pour un manteau de PEG 20% (40-50%). La quantité de PLA-PEG (10%) libre est d'ailleurs de 50% même 48h après l'administration. Concernant l'adressage des différentes formulations, celles-ci vont préférentiellement être prises en charge par le tissu hépatique (pic 15 minutes après l'administration) puis dans une très faible mesure par la rate, poumon, reins et cerveau. A noter que la présence de PEG 10% multiplie tout de même par 5 la quantité de nanoparticules atteignant le cerveau par rapport aux nanoparticules de PLA sans PEG et cela pour une quantité de nanoparticules encore circulantes au moins 5 fois supérieure. En contraste, la quantité nanoparticules dans le foie est divisée par deux (Figure 28).



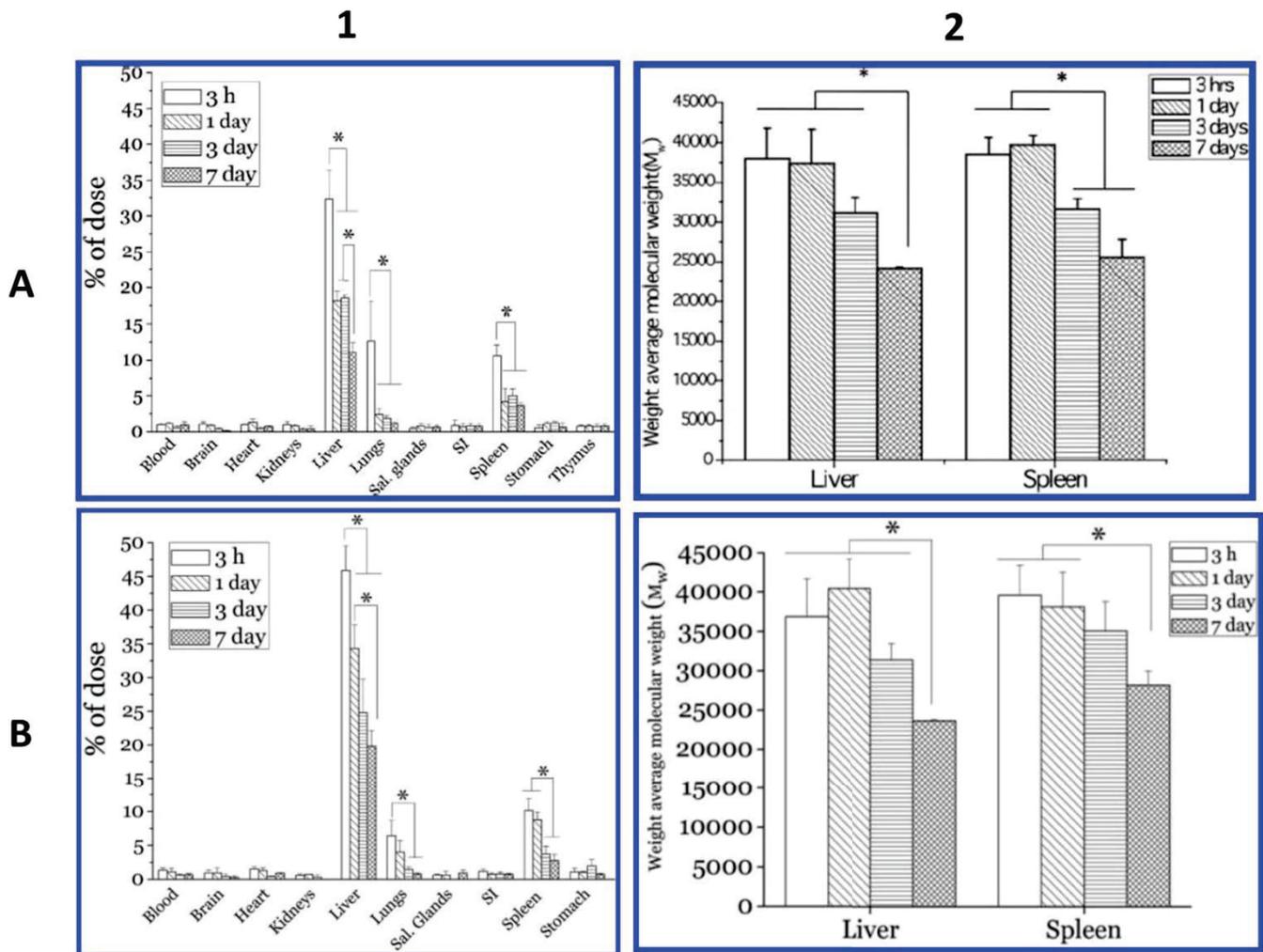
**Figure 28 :** Effet de l'enrobage de nanoparticules de PLA par du polyéthylène glycol sur le temps de circulation des nanoparticules (A) et prise en charge par différents organes. (B) : PLA (C) : PLA-PEG (10%)

Modifié à partir de (191)

La biodistribution des nanoparticules après injection dans le système vasculaire est complexe. En effet il a été montré (192) que même avec une chape de PEG, des nanoparticules de PLA-mPEG de 91 nm ne sont détectées que de manière résiduelle dans le plasma sanguin 3 heures après l'administration, la drogue encapsulée étant principalement localisée dans le foie et les reins. Dans la même idée, des nanoparticules de PLA-PEG de 100 nm véhiculant un composé d'euporium (193), ne sont plus circulantes 9h après l'administration alors qu'à 3h il reste 45% de la dose dans le sang et 15% à 6h. Cet article illustre aussi les différences de biodistribution que l'on peut rencontrer d'une étude à l'autre même lorsque les nanosystèmes utilisés sont très proches. En effet, comparée aux deux autres études décrites précédemment, celle-ci montre une prise en charge conséquente dans la rate (20% de 3h à 9h) tandis que la prise en charge hépatique est faible (1-2% à 3h), les taux de prise en charge dans les reins, le cœur et les

poumons sont identiques. La quantité de nanoparticules détectée dans le cerveau est équivalente à 0,3% de la dose juste après l'administration et nulle au-delà de 3h.

Pour finir sur l'administration intraveineuse, nous allons aborder un article très informatif (194) qui s'est focalisé sur la biodistribution de deux types de nanoparticules de PLGA ne se différenciant que par leur taille (200 nm contre 500 nm), et sur la dégradation de ces nanoparticules *in vivo* dans le foie et la rate en se basant sur le polymère lui-même par « gel permeation chromatographie ». En ce qui concerne la prise en charge des nanoparticules, une différence modérée est révélée avec 45% des particules de PLGA de 500 nm se retrouvant dans le foie 3h après l'administration (20% à 3J) contre 35% à 3h et 12,5% à 3J pour celles de 200 nm. Dans les poumons les nanoparticules de 200 nm sont plus présentes (12,5% 3h et 2.5% 3J) par rapport à celles de 500 nm (5% 3h et 1% 3J). En ce qui concerne la rate, la prise en charge est équivalente, 10% à 3h et environ 3% à 3J. La quantité de nanoparticules récupérée dans le sang est inférieure à 2% dans les deux cas et ce dès 3 heures après injection. Un des points remarquables soulevé par les auteurs est la non-détection d'environ 25% de la dose de nanoparticules de PLGA injectée quelle que soit la taille. Il est possible que ce pourcentage, qui est conséquent, soit pris en charge par un autre compartiment biologique, comme le système lymphatique ou bien tout simplement une internalisation ou adsorption des nanoparticules par les cellules endothéliales. En ce qui concerne la dégradation des nanoparticules de PLGA (dont les données sont très rares *in vivo*), celle-ci semble plus prononcée dans le foie où la taille des chaînes de polymère se réduit de 35 kDA à 20 kDA en une semaine contre une diminution de 35 kDA à 25 kDA dans la rate (*Figure 29*).

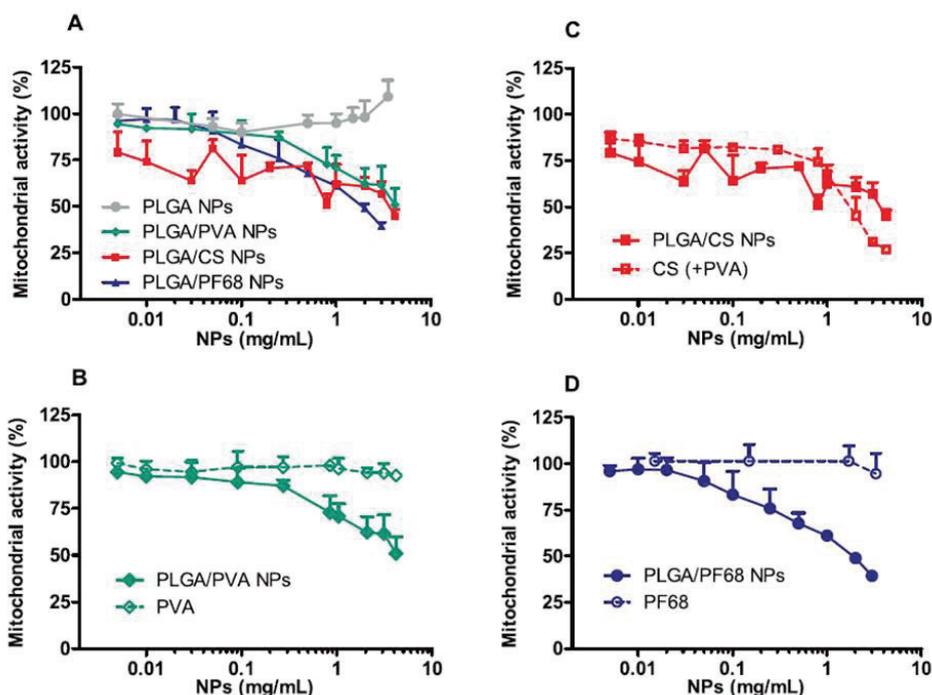


**Figure 29 : Biodistribution (1) et dégradation (2) de nanoparticules de PLGA de 200 nm (A) et 500 nm (B) de 3 heures à 7 jours après administration par injection intraveineuse.**

Modifié à partir de (194)

Nous avons pu remarquer que la biodistribution est influencée par la charge des nanoparticules, or cette charge est souvent modulée par l'apport de tensioactifs sur les nanoparticules dont l'objectif principal est surtout d'empêcher l'agrégation de certains nanosystèmes. Il s'avère néanmoins que la compatibilité de ces tensioactifs avec le vivant est ambiguë. Parmi les études décrites précédemment, l'administration chronique de nanoparticules de PLGA avec du PVA comme tensioactif, provoque une inflammation modérée de l'intestin et du foie (161), tandis qu'une autre étude sur la nébulisation de nanoparticules de PLGA avec différents tensioactifs (PVA, chitosan et PF68) n'observe qu'une légère tendance au recrutement de cellules immunitaires. Dans l'ensemble, à l'échelle des organes, ces nanoparticules ne représentent qu'un risque « convenable » qu'il convient de garder en mémoire. Par contre, qu'en est-il au

niveau cellulaire ? Les nanoparticules sont internalisées par différents types cellulaires dont des phagocytes et des cellules épithéliales qui peuvent ne représenter qu'une infime portion des organes. Or, dans ces cellules, la concentration en nanoparticules peut devenir très importante, au point éventuellement d'induire des effets cytotoxiques. Une étude *in vitro* récente s'est focalisée sur ce point (195) en utilisant des cultures cellulaires de macrophages et des nanoparticules de PLGA (170-230) sans tensioactifs, ou avec du chitosan, du PVA ou de PF68. Au niveau de la prise en charge des nanoparticules par les cellules, les nanoparticules sans tensioactifs sont les plus rapidement internalisées par les macrophages dans les 24h. De même, seules les nanoparticules sans tensioactifs n'ont pas induit de diminution de l'activité mitochondriale après 48h d'administration (**Figure 30**). L'emploi d'une concentration de 0,1% de nanoparticules de PLGA couplées aux différents tensioactifs diminue l'activité mitochondriale de 50%, alors que l'administration de chitosan, de PVA et de PF68 libre n'a pas eu d'effet. Enfin, les nanoparticules couplées à du chitosan augmentent également la nécrose des cellules après 48h de contact (dose de 0,1%). Au niveau de la production de ROS (stress oxydatif), une augmentation transitoire a été détectée pour toutes les formulations à une dose de 0,1% mais celle-ci s'est estompée en 15 minutes. En résumé, cet article pointe le risque important d'effets cytotoxiques, indépendant du stress oxydatif, lors de concentration locale forte de nanoparticules avec tensioactifs, notamment pour les cellules qui accumulent les nanoparticules *in vivo*.



**Figure 30 :** Impact de la prise en charge de nanoparticules avec ou sans tensioactifs sur l'activité mitochondriale de macrophage en culture, après 48h d'incubation. (1mg/mL = 0.1%)

Modifié à partir de (195)

Pour conclure cette partie sur la biodistribution des nanoparticules de PLA et PLGA, il en ressort qu'il est malheureusement difficile d'établir avec clarté un cheminement consensuel des nanoparticules dans l'organisme. En effet, nous avons pu voir que la moindre modification (tailles, charges électrostatiques de surface, polymères, tensioactifs, formulations et doses) sur les nanosystèmes influera sur la biodistribution des nanoparticules rendant ainsi complexe la comparaison des études entres-elles. Néanmoins, il semble possible d'affirmer sans trop d'ambiguïté que les nanoparticules semblent en général capables, *in vivo*, de pénétrer les muqueuses prismatiques et pavimenteuses, de rejoindre dans certain cas des ganglions lymphatiques et/ou la circulation systémique, et enfin qu'après diffusion dans l'organisme, le foie est un organe qui accumule fréquemment les nanoparticules. Certaines formulations de nanoparticules sont également capables de pénétrer dans les tissus cérébraux, ce qui représente un tropisme à surveiller en ce qui concerne le risque de mauvais adressage de formulations thérapeutiques.

Le flou qui ressort de cette analyse sur la biodistribution des nanoparticules est la conséquence du peu d'études dédiées au devenir *in vivo* des nanoparticules de PLA et PLGA. La rigueur des résultats de certaines publications bénéficierait grandement d'une mise à jour des technologies

d'études de biodistribution (la plupart des études utilisent des cryosections (<10 µm) et la détection de la drogue vectorisée dans des homogénats tissulaires), de l'utilisation de technique complémentaire pour confirmer des résultats. Rien que cela permettrait de réduire les risques inhérents aux fuites des principes actifs en dehors des nanoparticules. De même, l'aspect cellulaire de la prise en charge des nanoparticules *in vivo* est quasi-absent, comme les questions sur l'intégrité des nanoparticules une fois dans l'organisme. Il est évident que la réalisation d'une étude poussée de biodistribution à l'échelle cellulaire puisse être complexe et onéreuse au sein des modèles de rongeur. Il peut sembler normal qu'en ces temps particuliers, les laboratoires préfèrent favoriser l'utilisation de leur ressource financière pour l'évaluation des effets thérapeutiques. La taille des modèles de rongeur complexifie la réalisation d'observations sur l'organisme-entier à l'échelle cellulaire. De même, l'administration muqueuse de nanoparticules ou encore la dissection et l'observation des différentes muqueuses y sont également délicates.

Lors de l'élaboration du travail de thèse, les points ci-dessus ont été pris en compte. Tout d'abord, il semble nécessaire de se reposer sur des bases solides et saines pour pouvoir appréhender la biodistribution des nanoparticules et comment celle-ci évolue au fil des futures modifications. Le travail de thèse s'est donc établi sur un nanosystème figé, au plus simple et surtout le plus compatible possible avec le vivant. Des nanoparticules non-formulées de PLA de taille homogène (200 nm), anioniques, sans tensioactifs et avec des taux de solvants résiduels (acétone/éthanol) bien inférieurs aux normes de la pharmacopée. Les études de biodistribution reposent sur l'encapsulation d'agents de traçage élaborés, et surtout encapsulés à des doses où ils sont le moins susceptibles de fuir. Mais également sur la mise en place d'une méthodologie prenant en compte le risque de fuite de traceurs hors des particules, et qui combine l'utilisation de plusieurs technologies complémentaires. (Microscopie confocale, cytométrie en flux, imagerie en flux, microscopie électronique, live imaging). Enfin, il a semblé préférable d'utiliser un modèle animal adapté aux études de biodistribution sur animal entier, le poisson-zèbre (*Danio rerio*). Ce modèle animal est décrit dans la deuxième partie de l'étude bibliographique.

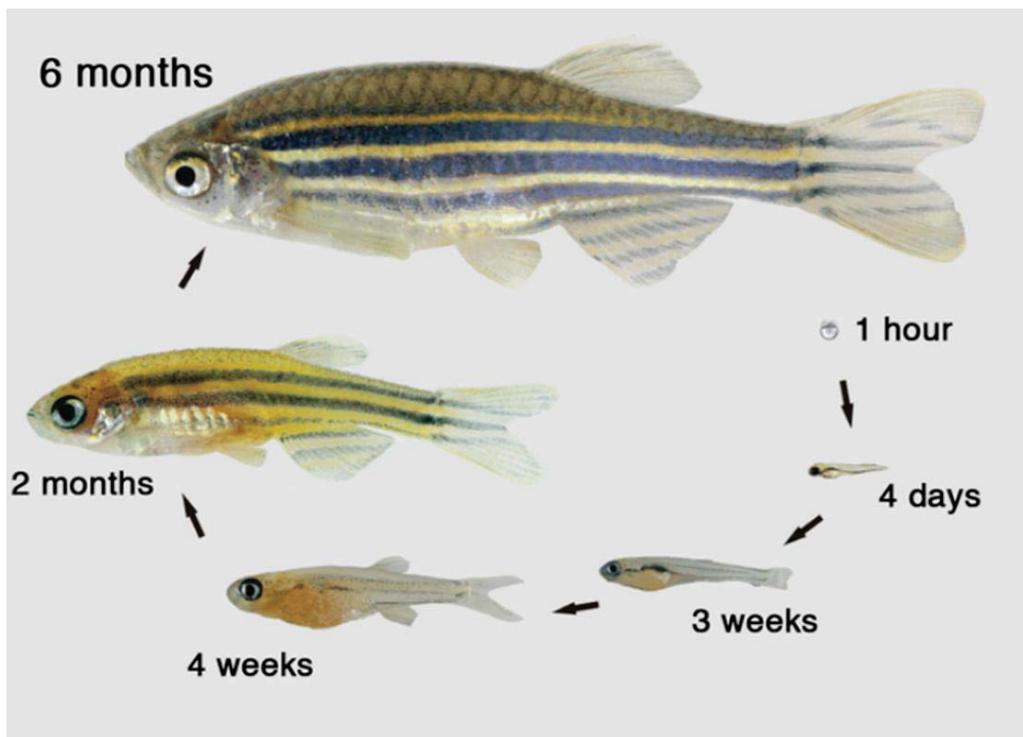
# POISSON-ZEBRE (*DANIO RERIO*)

## 1. Généralités

### 1.1. Informations générales

Le travail de thèse a été réalisé en s'appuyant sur un modèle animal scientifique reconnu, le poisson-zèbre. Ayant pour nom scientifique « *Danio rerio* », le poisson-zèbre est un poisson téléostéen, infra-classe qui regroupe les poissons osseux (super-classe des Osteichthyens) qui possèdent des nageoires rayonnées (classe des Actinoptérygiens) (98,8% des espèces de poissons). Les téléostéens appartiennent également au sous-embranchement des Vertébrés. Les poissons-zèbre font partie de la famille des cyprinidés, comme les gardons et les carpes.

Le poisson-zèbre est originaire de l'Inde et de la péninsule Malaise ; d'une manière générale des régions midi-orientales himalayennes. Son habitat naturel se trouve dans les eaux douces stagnantes et les cours d'eau avec de faibles courants. Il est par exemple possible de trouver des poissons-zèbres dans les rizières.



**Figure 31 :** Cycle de vie du poisson-zèbre. Sa taille adulte est de 2-5 cm (363)

## 1.2. Intérêts pratiques et scientifiques

Le poisson-zèbre est un modèle animal qui bénéficie de nombreux intérêts sur les plans pratiques et scientifiques. Du point de vue pratique, son élevage est relativement aisé de par sa robustesse (c'est d'ailleurs un poisson conseillé pour les aquariophiles débutants). Sa petite taille (2-5 cm une fois adulte) permet d'en élever un grand nombre dans un espace restreint. Avec un court cycle de développement de 3 jours, le poisson-zèbre atteint sa maturité sexuelle à partir de 3 mois, moment où les femelles peuvent pondre des centaines d'œufs toutes les semaines. Le poisson-zèbre est un modèle animal alternatif préconisé au niveau « Ethique » depuis l'élaboration de la règle des 3R (196). Enfin, l'entretien et l'élevage du poisson-zèbre sont peu onéreux par rapport au coût des modèles mammifères.

Mais le poisson-zèbre possède aussi et surtout de nombreux intérêts au niveau scientifique. La fécondation des œufs, ainsi que le développement des larves, s'effectuent à l'extérieur de l'organisme maternel et cela avec une relative transparence de leurs tissus, ce qui est avantageux pour la réalisation d'observations biologiques en « live ». Ensuite, et non des moindres, le génome du poisson-zèbre a été entièrement séquencé, ce qui a révélé qu'environ 70% des gènes

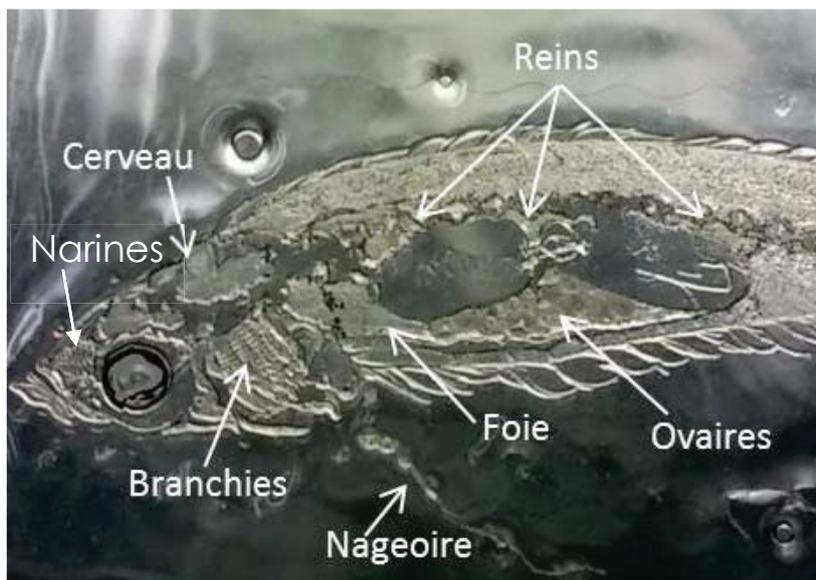
chez l'Humain possèdent un orthologue clair chez le poisson-zèbre (197). De plus, ce modèle dispose d'une ingénierie génétique très bien documentée permettant ainsi aux scientifiques d'avoir accès à de très nombreuses lignées transgéniques et mutantes (198). D'une manière non exhaustive, ce modèle bénéficie également de l'emploi de morpholinos (199,200), acides nucléiques injectés dans l'œuf afin de bloquer l'expression de certains gènes, une administration de principes actifs facile à réaliser (immersion dans le produit), une capacité de régénérescence accrue (foie/cœur/nageoires...) (201), des systèmes muqueux accessibles et enfin d'un système immunitaire possédant les principaux éléments, types cellulaires et mécanismes du système immunitaire canonique des Vertébrés. (202).

### 1.3. Modèle animal

Grâce à ces multiples avantages, le poisson-zèbre s'est imposé comme un modèle reconnu dans de multiples domaines. Une petite taille couplée avec à une relative transparence en fait un outil particulièrement adapté aux observations à l'échelle d'un organisme entier. L'excellence de l'ingénierie génétique sur ce modèle a permis de faire de grandes avancées dans la compréhension du développement et des pathologies des êtres-vivants (203–205). Ce modèle est également utilisé pour l'étude du système immunitaire (206–208), des interactions hôtes-pathogènes (209,210). Le poisson-zèbre est un modèle infectieux pour la tuberculose extrêmement performant (211). L'étude de la régénération des organes (201) et des processus de cicatrisation font aussi appel à ce modèle (212,213). Il est également employé pour les neurosciences avec par exemple l'étude des pathologies liées aux dégénérescences nerveuses comme les maladies d'Alzheimer (214) et Parkinson (215). Plus récemment, les larves de poisson-zèbres sont recommandées par l'OCDE (Zebrafish Embryo Acute Toxicity Test) (216) pour la réalisation de test préliminaire de toxicologie (217,218), de très nombreuses publications y sont notamment dédiées car il représente un organisme très sensible à son environnement et accessible en très grand nombre. Egalement pour ces raisons, le poisson-zèbre est activement utilisé pour la découverte de principes actifs par criblage à très haut débit (High throughput screening) pour de nombreuses affections (219,220). Enfin on peut aussi citer les applications récentes de ce modèle pour l'oncologie, que ce soit pour l'étude des mélanomes (221) ou pour étudier l'invasivité de certains cancers (222–224).

Pour conclure cette partie, l'utilisation du poisson-zèbre pour le travail de thèse s'appuie sur la possibilité de réaliser des observations à l'échelle d'un organisme entier à partir de sections histologiques (*Figure 32*), idéal pour des études de biodistribution. A cela se rajoutent de

nombreuses lignées transgéniques disponibles, l'aisance de l'administration des nanoparticules par immersion, et l'accessibilité des muqueuses. Du point de vue de la vaccination, ce modèle propose des systèmes immunitaire et muqueux développés et surtout les potentielles avancées pourraient bénéficier à la fois à la santé humaine, mais aussi à la santé vétérinaire et plus particulièrement à l'économie piscicole.



**Figure 32 :** Cryosection (40 µm) longitudinale d'un poisson-zèbre adulte illustrant la possibilité de réaliser des observations à l'échelle d'un organisme entier. Sur une même coupe il est possible d'étudier la muqueuse nasale, la muqueuse de la peau, celle des branchies, le cerveau, le foie, les reins, etc. Ce type de coupe permet également de préserver les connexions entre les organes.

## 2. Anatomie

### 2.1. Généralités

La communauté scientifique travaillant sur le poisson-zèbre a développé de nombreux outils pour aider la compréhension de l'organisation tridimensionnelle du poisson-zèbre et connaître en détail la structure de l'ensemble des organes. Parmi ces outils figurent ces différents atlas :

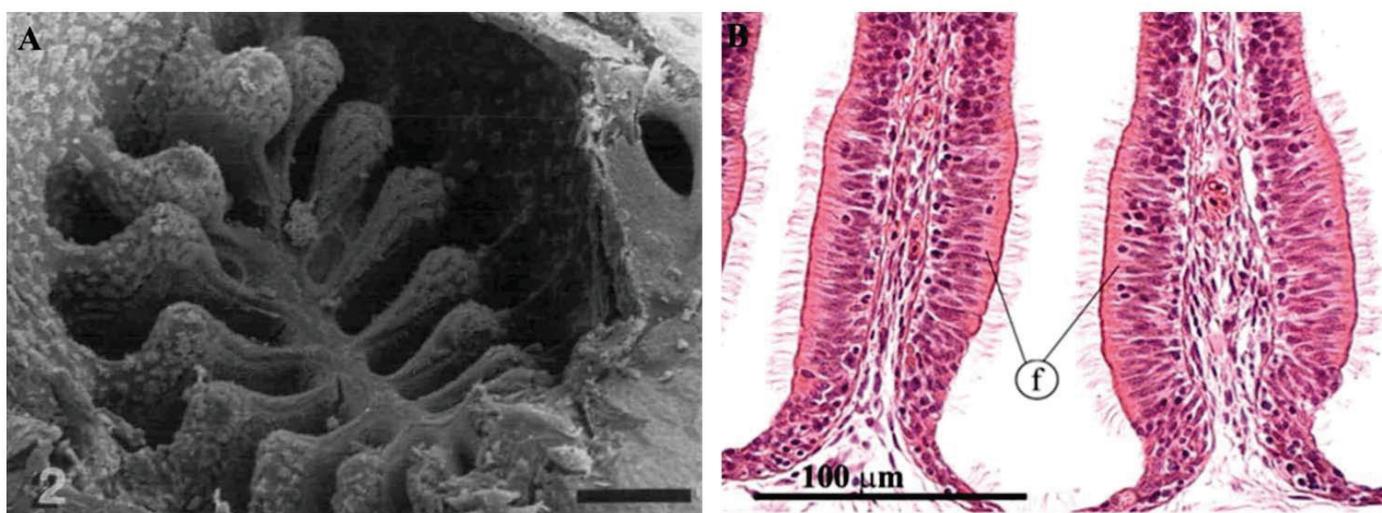
- <http://zebrafish.anatomyportal.org/> (Anatomie en 3D obtenue par « Tomographie à projection optique ») (225)
- <http://bio-atlas.psu.edu/zf/> (Atlas virtuel – bibliothèque de coupes histologiques) (226)
- <http://tpx.sagepub.com/content/39/5/759.full> (Publication en accès-libre dont le sujet est la structure de différents organes) (227)
- The Zebrafish: Atlas of Macroscopic and Microscopic Anatomy (Livre sur l'anatomie du poisson-zèbre) (228)

Ces références sont précieuses pour tout néophyte ayant la volonté de s'orienter en 3D et d'approfondir ses connaissances sur l'anatomie du poisson-zèbre, du stade larvaire au stade adulte.

Dans le but d'étudier la biodistribution des nanoparticules, il est nécessaire de comprendre l'organisation structurelle des différents organes du poisson-zèbre pouvant être impliqués dans des interactions avec les nanoparticules de PLA. Dans le cadre de l'utilisation de ces nanoparticules en tant que nanovéhicules vaccinaux pour l'administration muqueuse, nous allons particulièrement étudier les organes qui seront les premiers exposés : les différentes muqueuses. Nous allons premièrement aborder les muqueuses à épithélium prismatique avec l'organisation de l'appareil olfactif puis du tube digestif, ensuite nous détaillerons les muqueuses à épithélium pavimenteux que sont les branchies et la peau. L'organisation du thymus du poisson-zèbre sera ensuite abordée. Enfin, nous détaillerons des organes susceptibles à une exposition secondaire des nanoparticules : les reins, le foie et la rate. Pour finir nous décrirons la structure du système vasculaire et réticulo-endothélial.

### 2.2. Bulbe olfactif (Narines)

L'organe olfactif du poisson-zèbre se trouve au sein de deux fosses nasales situées du côté dorsal de la tête, aux alentours des yeux et au-dessus de la bouche. L'organe possède une forme de rosette et est composé d'une plaque centrale et de *lamellae* qui forment des prolongements entre le composant central et la cavité nasale. Il expose différents épithéliums, tous prismatiques, en fonction de la localisation. Le principal est un épithélium cilié (kinocilia long) non sensoriel qui forme des talus sur les *lamellae* dans la zone proche de la cavité nasale, et des bandes régulières dans la partie proche de la plaque centrale (**Figure 33**). L'épithélium sensoriel est constitué de cellules qui possèdent des cils plus courts et de cellules sensorielles qui projettent des dendrites dans la couche superficielle. Cet épithélium se trouve dans la région médiane des *lamellae* et est entouré par de l'épithélium cilié (227,229).



**Figure 33 :** (A) Rosette olfactive de poisson-zèbre adulte au sein d'une des fosses nasales. Celle-ci est formée d'une plaque centrale d'où partent des lamellae. L'épithélium principale est un épithélium cilié non-sensoriel qui forme des amas sur les lamellae à proximité de la cavité nasale. (B) Coupe histologie de lamellae dans la région proche de la cavité nasale. On remarque la présence de cils très longs à la surface de l'épithélium non-sensoriel (f). Les deux barres d'échelle représentent 100 μm

Modifié d'après (229) pour A et (227) pour B

## 2.3. Tube digestif

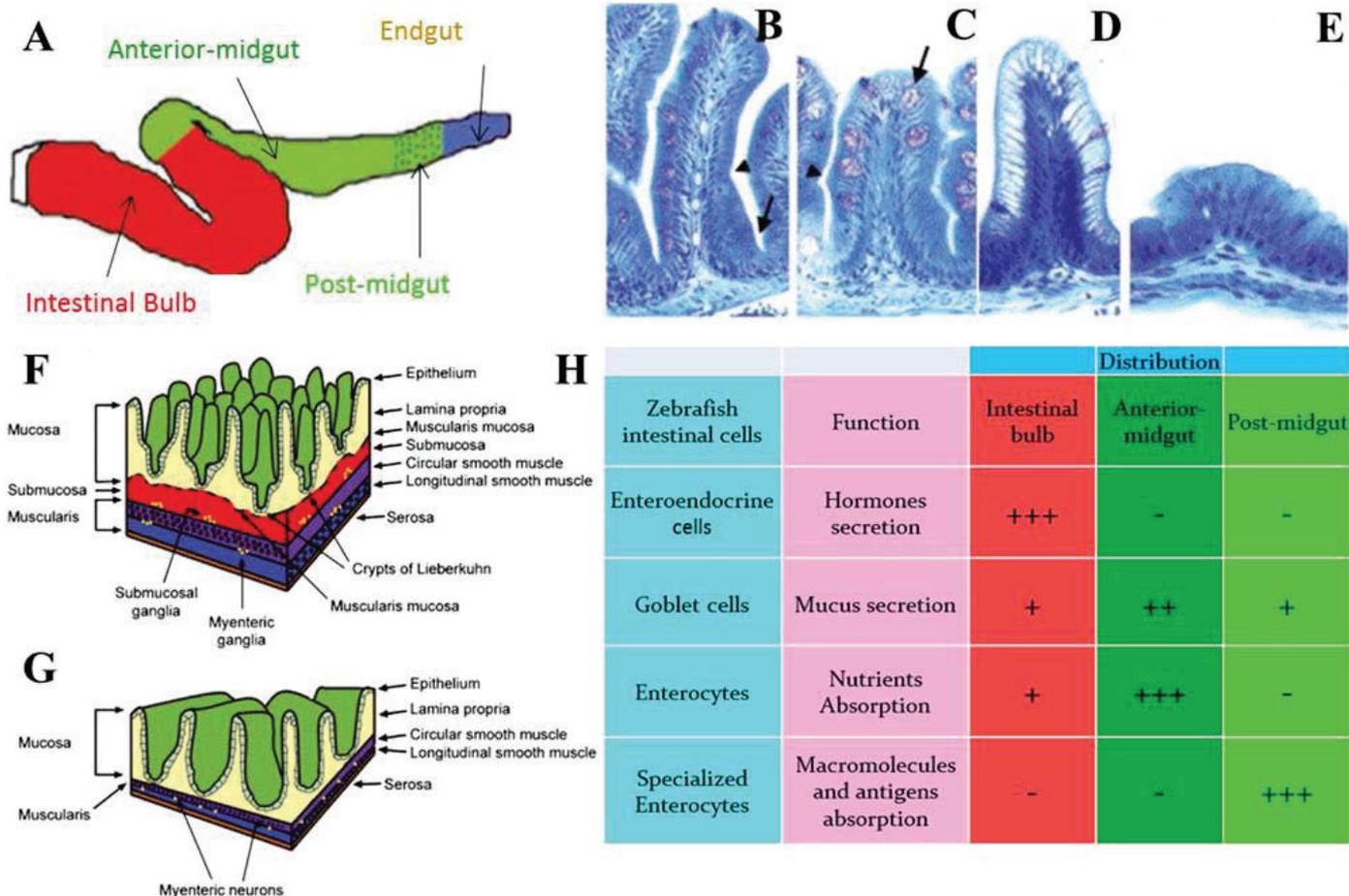
Le tube digestif du poisson-zèbre (227,230) est composé d'un bulbe intestinal, d'un intestin intermédiaire antérieur, d'un intestin intermédiaire postérieur et d'un intestin postérieur. L'épithélium muqueux prismatique forme des villosités dont la taille diminue dans le sens antéro-postérieur. Cet organe possède des différences structurales par rapport à son équivalent chez les mammifères. Premièrement il y a l'absence d'estomac. Le poisson-zèbre possède à la place un bulbe intestinal dont la lumière dispose d'un pH neutre contre un pH très acide pour l'estomac de mammifère (caractéristique commune aux cyprinidés). Au niveau de l'organisation de la muqueuse, celle du poisson-zèbre est plus simple que chez les mammifères. On constate par exemple l'absence des cryptes de Lieberkuhn à la base des vili, des couches sous-muqueuse et musculuse. Chez le poisson-zèbre, la muqueuse est constituée d'un épithélium monostratifié recouvrant la *lamina propria*.

Le tube digestif est divisé en plusieurs régions :

- Le bulbe intestinal, situé juste après l'œsophage, possède les vili les plus longues. Sa fonction présumée serait de stocker les aliments pour ensuite libérer en plusieurs fois le bol alimentaire dans les intestins. De même son épithélium serait responsable en partie de l'absorption des acides gras. Cet épithélium est principalement formé de cellules entéroendocrines, puis d'entérocytes et de cellules caliciformes (production de mucus). La limite entre le bulbe intestinal et l'intestin intermédiaire est dictée par la disparition des cellules entéroendocrines de l'épithélium.
- Vient ensuite l'intestin intermédiaire antérieur où se déroule majoritairement l'absorption des protéines. L'épithélium à ce niveau est principalement composé d'entérocytes et de cellules caliciformes. Enfin, il est la région la plus étendue de l'intestin intermédiaire.
- L'intestin intermédiaire postérieur commence avec le remplacement des entérocytes par des entérocytes spécialisés. Ces cellules sont spécialisées dans l'échantillonnage d'éléments étrangers dans la lumière intestinale qui sont ensuite stockés à l'intérieur de vacuoles supranucléaires et peuvent ensuite être transportées et libérées au niveau du pôle basal. Il a d'ailleurs été postulé que ces cellules puissent-être l'équivalent fonctionnel des cellules M chez les

mammifères et cette région intestinale l'équivalent fonctionnel de l'iléum. Cette région est courte par rapport à l'intestin intermédiaire antérieur.

- L'intestin postérieur débute avec la réapparition des entérocytes « normaux » et le changement de conformation des vili qui deviennent aplaties et longitudinales. Cette région est spécialisée dans la fonction osmorégulatrice.



**Figure 34 :** (A) Illustration de l'organisation du tube digestif du poisson-zèbre en différentes régions. (B-E) La hauteur des vili diminue dans l'axe antéro-postérieur. (B) Bulbe intestinal. (C) Intestin intermédiaire antérieur. (D) Intestin intermédiaire postérieur avec l'apparition des entérocytes spécialisés et leurs vacuoles supranucléaires (« bulles » blanches). (E) Intestin postérieur avec ses vili aplaties et longitudinales. (F) Schéma illustrant l'organisation de la muqueuse intestinale chez les mammifères. (G) Schéma illustrant l'organisation de la muqueuse intestinale de poisson-zèbre. (H) Tableau récapitulatif de la composition et fonction cellulaire de l'épithélium intestinale entre le bulbe intestinal, l'intestin intermédiaire antérieur et l'intestin intermédiaire postérieur.

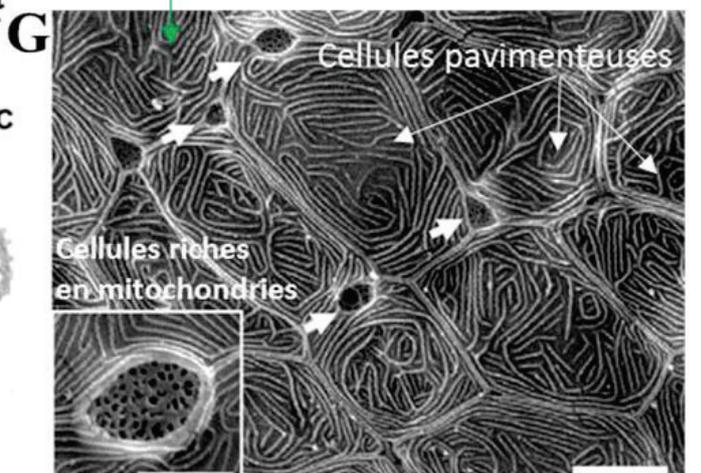
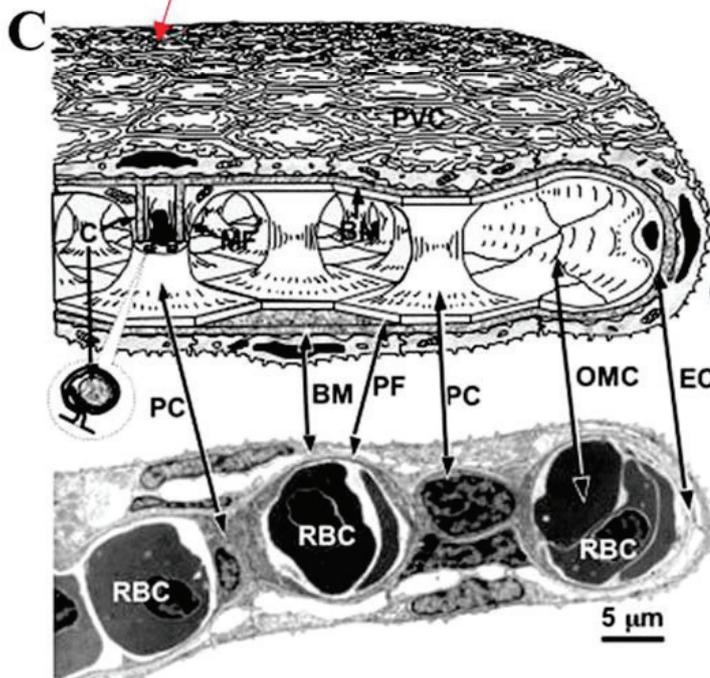
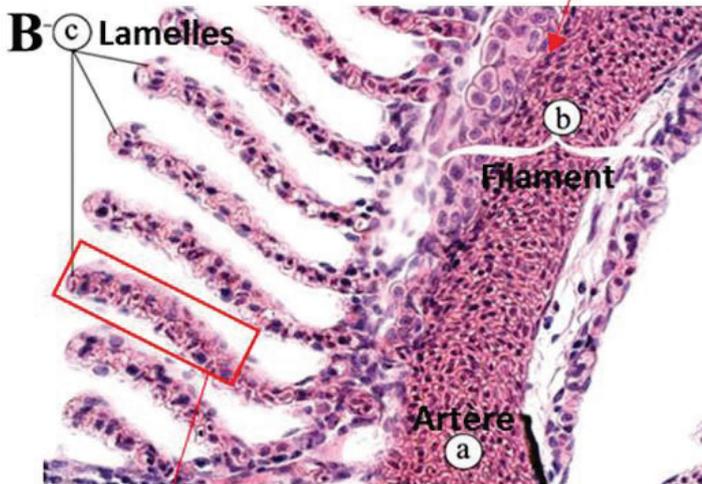
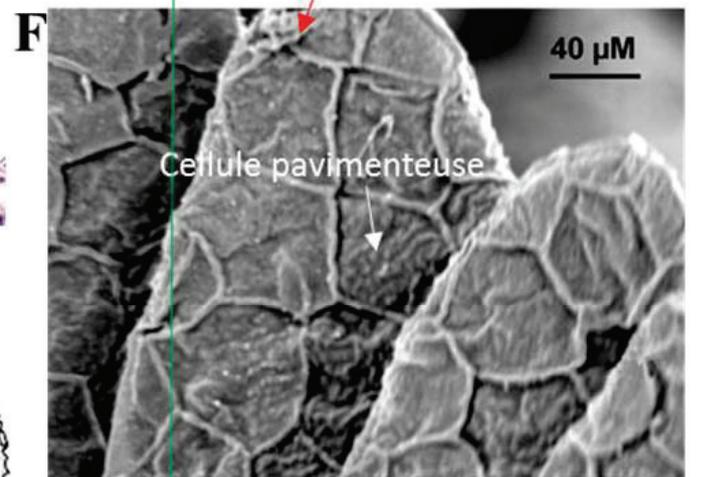
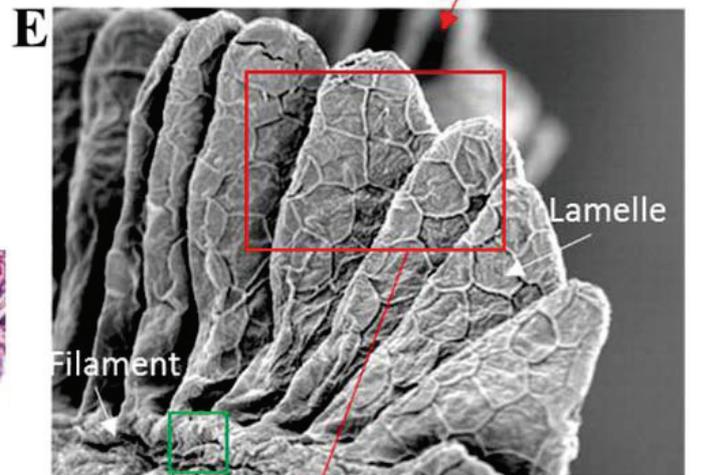
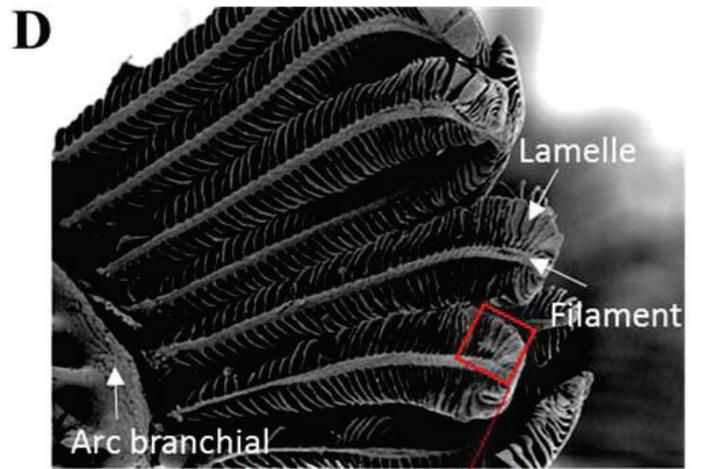
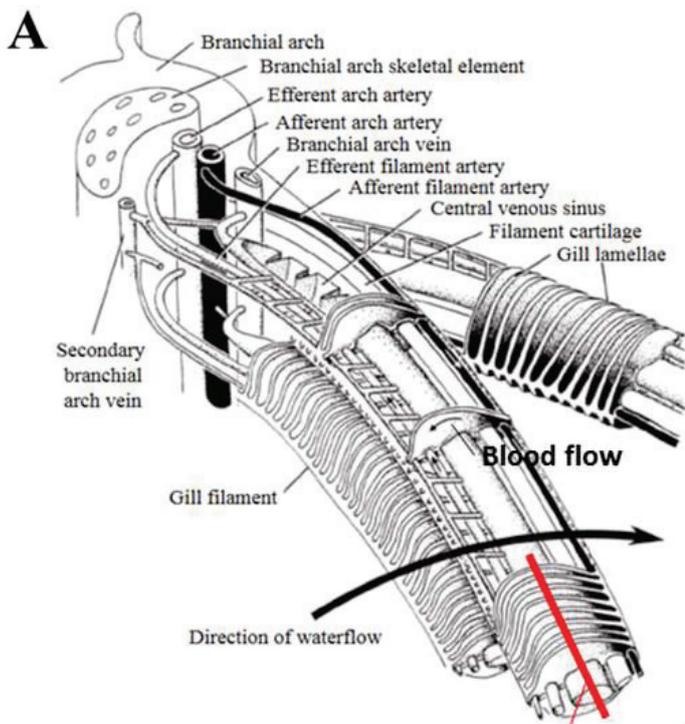
Modifié d'après (230) (A-G)

## 2.4. Branchies

Les branchies (227,231–235) représentent l'organe principal pour la respiration du poisson-zèbre et possède une fonction dans la régulation osmotique et ionique. Situées dans une cavité qui est protégée par un bouclier cartilagineux appelé « opercule », les branchies reposent sur des arcs branchiaux reliés au pharynx, ce dernier étant fenestré afin de propulser l'eau, aspiré par l'ouverture buccale, sur les branchies. C'est un organe qui nécessite une très grande vascularisation. Les branchies sont composées de paires de filaments, aussi appelées lamelles primaires, structures aplaties qui se projettent à partir des arcs branchiaux en formant un « V ». Les filaments disposent de ramifications appelées lamelles, aussi nommées lamelles secondaires, où se réalise l'échange gazeux. En effet l'orientation des structures branchiales (arcs/filaments/lamelles) est faite de sorte que le flux d'eau riche en oxygène se dirige directement entre les lamelles, où le sang circule dans le sens contraire de celui de l'eau, afin d'optimiser la réoxygénisation du sang.

Au niveau cellulaire, l'épithélium pavimenteux au niveau des filaments est pluristratifié (3 couches cellulaires ou plus) et possède un rôle proéminent dans la régulation ionique. Il sert également de support pour les lamelles. Sa couche superficielle est majoritairement composée de cellules pavimenteuses (90%), caractérisées par des microcrêtes renfermant des microfilaments d'actine et reliées entre-elles par des desmosomes, de cellules caliciformes et de cellules riches en mitochondrie (ionocytes). En profondeur se trouvent des cellules cuboïdales, des cellules immunitaires, des cellules neuroépithéliales et des cellules indifférenciées. L'épithélium de la lamelle est quant à lui toujours pavimenteux mais moins stratifié (1 à 3 couches de cellules) et quasiment uniquement composé de cellules pavimenteuses et de cellules indifférenciées. Le maintien de la lamelle est assuré par des cellules en pilier, qui sont des cellules épithéliales modifiées. Afin d'atteindre le sang, l'oxygène doit diffuser à travers la mince strate épithéliale, la lame basale et enfin les cellules en pilier.

Enfin, il est important de noter la présence chez certains poissons téléostéens d'une extension lymphoïde, à l'intérieur du « V » formé par les paires de filaments, riche en cellules lymphocytaires (236). Néanmoins, l'existence cette structure n'a pas encore été démontrée chez le poisson-zèbre.



**Figure 35 :** (A) Illustration de l'organisation structurale des branchies et de sa vascularisation. (B) Coupe histologique à travers un filament (b) et ses lamelles (c), au niveau de l'artère afférente (a). (C) Schéma de l'organisation interne des lamelles corrélé avec une acquisition de microscopie électronique à transmission. Des cellules pavimenteuses (PVC) recouvrent la surface des lamelles et reposent sur une lame basale (BM). La structure des lamelles est maintenue par des cellules en pilier (PC), d'origine endothéliale, dont la collerette cytoplasmique recouvre des faisceaux de collagène connectés à la lame basale. Les érythrocytes (RBC) circulent entre les cellules en pilier. La limite externe de l'espace entre les cellules en pilier est appelée « canal marginal extérieur » (OMC) et se finit par une cellule endothéliale vasculaire (EC). A noter la présence de microfilaments dans la partie médiane des cellules en pilier et dont la fonction serait potentiellement de permettre une contraction des cellules en pilier pour la gestion du flux sanguin. (D) Acquisition en microscopie électronique à balayage permettant l'observation d'un arc branchial, de ses filaments et lamelles. (E) Zoom sur un filament et ses lamelles. (F) Zoom sur les lamelles et ses cellules pavimenteuses dont les jonctions entre cellules sont caractérisées par des crêtes. (G) Acquisition en microscopie électronique à balayage de la surface de l'épithélium recouvrant les filaments. Les cellules pavimenteuses sont riches en microcrêtes d'actine et recouvrent partiellement les cellules riches en mitochondrie qui régule les échanges ioniques (zoom). Les barres d'échelles correspondent à 10  $\mu\text{m}$  pour la zone non zoomée et 3  $\mu\text{m}$  pour la région zoomée.

Modifié d'après (235) (A), (227) (B), (234) (C), (232) (D-F) et (233) (G)

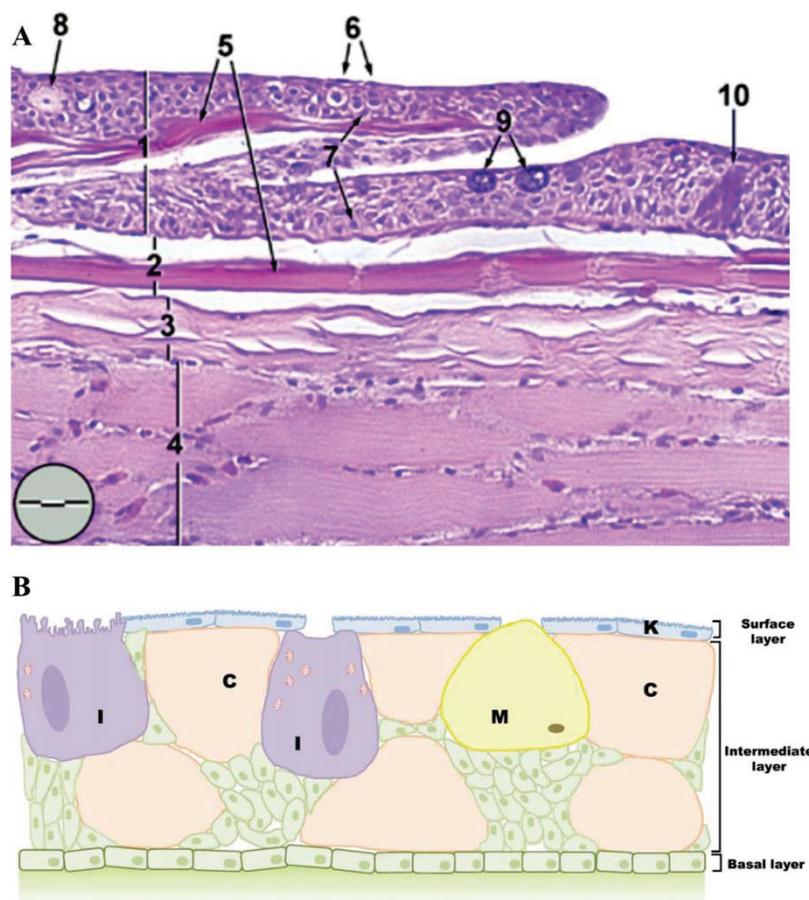
## 2.5. Peau

A l'inverse de la peau de mammifère, la peau du poisson-zèbre (237,238) ne dispose pas de couche cornée et est exclusivement composée de cellules vivantes. C'est un organe muqueux à épithélium pavimenteux pluristratifié et qui est organisé en 3 régions superposées : l'épiderme, le derme et l'hypoderme.

- L'épiderme est la région la plus externe de la peau. Sa couche superficielle est composée principalement de cellules pavimenteuses exposant des microcrêtes d'actine du côté apical. Ces cellules possèdent de la kératine et sont également nommées par certains auteurs : kératinocytes. Des cellules à mucus (caliciformes) ainsi que des ionocytes sont également présents au sein de cette couche. Un peu plus en profondeur se trouvent des cellules « club », très grandes cellules avec une fonction d'alarme, des cellules de Malpighi, des cellules sensorielles et des cellules indifférenciées. La couche la plus profonde de l'épiderme est constituée d'une monostrate de cellules basales qui assure l'ancrage de l'épiderme avec le derme.
- C'est au sein du derme que se situent les écailles (élasmoïdes) dont le renouvellement est constant. Le derme se distingue en deux régions : une

strate superficielle et une profonde. La strate superficielle dispose d'une matrice de collagène lâche et est riche en fibroblastes, cellules nerveuses et cellules pigmentaires. De même cette région est très vascularisée, une nécessité car la peau possède en effet un rôle secondaire dans la respiration. Différente, la strate profonde possède une matrice de collagène dense riche en fibrocytes. La disposition orthogonale des strates de collagènes rend cette région transparente (237).

- L'hypoderme est la région de la peau à l'interface avec les muscles sous-jacents. Cette région est riche en chromatophores et en adipocytes (stockage de la graisse sous-cutanée)



**Figure 36 :** (A) Coupe histologique d'une peau de poisson-zèbre adulte. 1 Epiderme ; 2 Derme strate souple et assise génératrice des écailles ; 3 Derme strate profonde ; 4 Muscle ; 5 Ecailles ; 6 Cellules pavimenteuses ; 7 Cellules basales non-différenciées ; 8 Cellules « club » ; 9 Cellules caliciformes ; 10 : Neuromaste. Barre d'échelle : 31,7  $\mu\text{m}$  (B) Illustration de l'épiderme. La couche superficielle est constituée de cellules pavimenteuses (K kératinocytes). Des cellules à mucus (M) et des ionocytes (I) possèdent également une interface d'échange avec l'environnement extérieur. La couche intermédiaire est composée entre-autres des cellules « club », tandis que des cellules basales composent la monocouche basale.

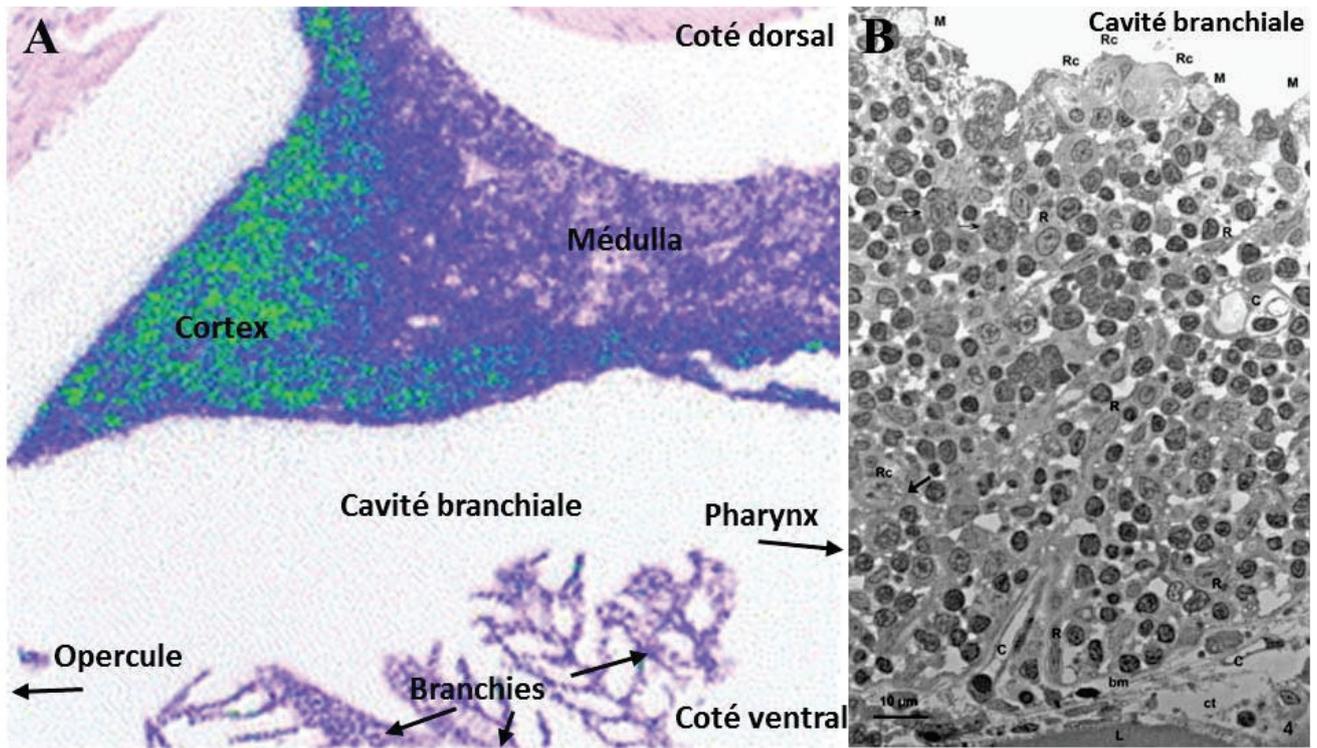
Modifié à partir de (364) pour (A) et (238) pour (B)

## 2.6. Thymus

Le thymus (227,239,240) est l'organe lymphoïde primaire responsable de la maturation des lymphocytes et de l'élimination des cellules T sensibles aux auto-antigènes. Chez le poisson-zèbre, le thymus prend l'apparence de deux lobes situés de part et d'autre du pharynx, sur la voute dorsale de la cavité branchiale. De ces deux lobes prennent naissance de fines extensions thymiques qui recouvrent la cavité branchiale. Elles forment par exemple un revêtement sur la face interne de chaque opercule.

Tissu d'origine épithéliale, le thymus se distingue en deux régions : le cortex et la médulla. Le cortex est riche en lymphocytes T et est le lieu où débute la maturation de ces lymphocytes. Cette maturation consiste à un réarrangement génétique des récepteurs des lymphocytes T afin d'augmenter le répertoire d'antigènes détectés et à une sélection positive afin d'éliminer les lymphocytes T ne possédant pas d'affinité forte contre un auto-antigène présenté par les molécules du CMH. La médulla possède moins de lymphocytes car c'est le lieu où s'achève la maturation et où les lymphocytes repartent dans la circulation sanguine. La sélection positive y est plus faible, par contre les lymphocytes T sont ici soumis à la sélection négative. C'est-à-dire que toute cellule possédant une affinité envers un auto-antigène est éliminée. Chez le poisson-zèbre, la distinction entre ces deux zones n'est pas franche, néanmoins si l'on se fie à l'expression du gène *RAG1*, impliqué dans le réarrangement génétique des récepteurs des lymphocytes T. Le cortex se situerait dans la partie externe de chaque lobe, directement en contact avec l'environnement extérieur. Tandis que la médulla, où ne s'effectue pas ce réarrangement génétique, serait dans la partie interne de chaque lobe thymique.

Chez le poisson-zèbre, cette région corticale en contact avec l'environnement extérieur est recouverte par un épithélium squameux composé de cellules pavimenteuses, de cellules à mucus, de ionocytes et de cellules à bâtonnets. Au sein de cette couche a pu être observée une circulation de cellules pharyngiennes et branchiales. Juste en dessous se trouve le parenchyme lympho-réticulaire qui comme son nom l'indique est riche en lymphocytes, cellules réticulaires, mais possède également des cellules présentatrices d'antigènes. Encore plus profond se trouve une lame basale qui sépare le parenchyme d'un tissu conjonctif.



**Figure 37 :** (A) Expression du gène RAG1 (vert), par hybridation *in situ*, au sein d'un lobe thymique du poisson-zèbre. Il permet de différencier la région corticale de la médulla. Le thymus est situé sur la face dorsale de la cavité branchiale, directement en contact de l'environnement extérieur. (B) La couche superficielle du thymus, qui fait partie du cortex, est recouvert par un épithélium squameux composé de cellules pavimenteuses, de cellules caliciformes (M), de ionocytes et de cellules à batonnets (Rc). Bm Lamelle basale ; L Adipocytes ; c capillaires sanguins ; R Cellules réticulaires ; ct Tissu conjonctif. Bar d'échelle : 10 µm.

Modifié d'après (240) pour (A) et (239) pour (B)

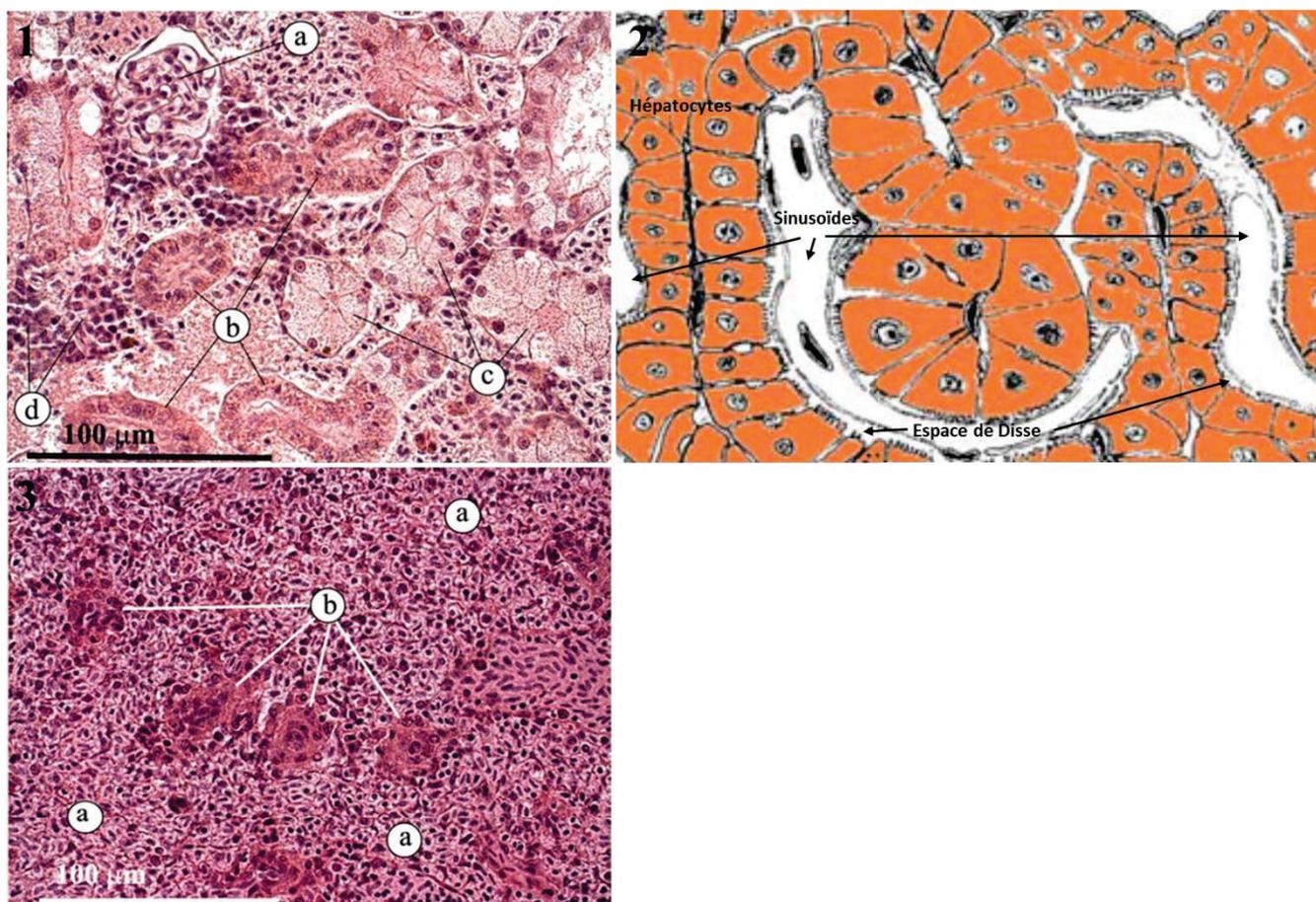
## 2.7. Organes internes : Reins, foie et rate

Nous allons maintenant aborder les organes susceptibles d'être exposés aux nanoparticules de PLA après pénétration dans l'organisme. Chacun de ces organes est impliqué dans la clairance et/ou l'échantillonnage d'éléments étrangers.

Le rein (227) est un organe dont la principale fonction est l'excrétion hors de l'organisme de déchets métaboliques présent dans le sang. La filtration du sang s'effectue au niveau des glomérules où est élaborée l'urine primaire qui est ensuite collectée dans différents canaux (appelées canaux collecteurs, tubules proximaux, distaux...). Le diamètre hydrodynamique maximum pour l'entrée d'une substance par le glomérule est inférieur à 10 nm. Chez le poisson-zèbre, cet organe tapisse la face dorsale du péritoine et est en dessous de la veine post-cardinale. Il se distingue 3 régions, le rein antérieur, intermédiaire et postérieur. Une particularité chez les poissons téléostéens est que l'hématopoïèse (située dans la moelle osseuse chez les mammifères) est réalisée dans le rein, au sein d'un tissu lymphoïde situé entre les tissus responsable de la fonction de filtration. Cette fonction hématopoïétique est plus prononcée dans la partie antérieure des reins du poisson-zèbre. Le tissu hématopoïétique se trouve dans les interstitiums du système responsable de la filtration, les cellules souches étant nichées dans un stroma de tissu réticuloendothélial.

Responsable de la détoxification de l'organisme par métabolisation de composants biologiques, le foie (227,241) chez le poisson-zèbre est constitué de 3 lobes entourant le tube digestif. Le foie est principalement constitué d'hépatocytes, cellules pouvant être polynucléées qui sont responsables du métabolisme des protéines, des lipides et des sucres. L'organisation du foie s'opère autour de sinusoides hépatiques où passe le sang. Autour de ces sinusoides se trouvent des travées d'hépatocytes, la frontière entre ces deux composants s'appelant l'espace de Disse. La structure est la suivante : une sinusoïde, un espace de Disse, une monocouche d'hépatocytes, différents canaux biliaires, puis une autre monocouche d'hépatocytes, un espace de Disse et une sinusoïde et ainsi de suite... Contrairement aux mammifères, il n'y a pas de cellules de Kupffer chez le poisson-zèbre (macrophage au niveau des sinusoides qui échantillonnent le sang), par contre la présence de cellules hépatiques stéllées (Cellules Ito) au sein des espaces de Disse est conservée (242). Ces cellules sont des réservoirs de vitamine A et possède également des fonctions immunitaires (243). Il a d'ailleurs été postulé au sein des mammifère que le foie soit un organe lymphoïde alternatif (244), que l'on pourrait attribuer à un caractère primitif possiblement conservé d'un temps antérieur à l'apparition des ganglions lymphatiques.

La rate (227) est un organe lymphoïde responsable de l'épuration des érythrocytes vieillissants, de l'échantillonnage d'éléments étranger, et serait un site d'activation de lymphocytes B. Chez le poisson-zèbre, la rate est localisée dans la cavité péritonéale, proche de lobes hépatiques et légèrement axée sur la gauche. La rate est composée d'une pulpe rouge très vascularisée (riche en érythrocytes et thrombocytes), et d'une pulpe blanche où se trouvent les ellipsoïdes. Ce sont des niches riches en macrophages et cellules réticulaires qui échantillonnent le sang.

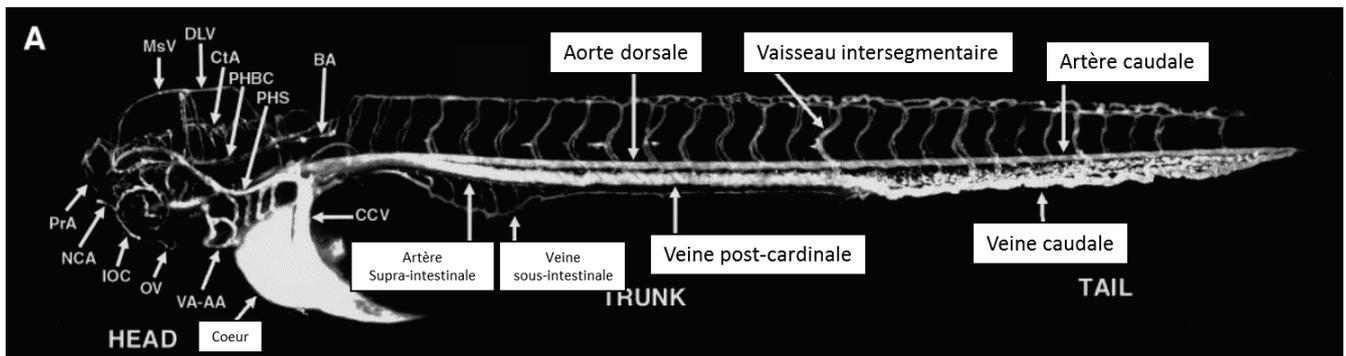


**Figure 38 :** (1) Coupe histologique de reins de poisson-zèbre où cohabitent les tissus de filtrations et immunitaires. (a) Glomérules ; (b) Tubules ; (c) Canaux collecteurs pour la partie filtration. (d) Tissu hématopoïétique. (2) Illustration de l'organisation du tissu hépatique de poisson-zèbre où sont représentés les monocouches d'hépatocytes autour des sinusoides. Les deux étant séparés par l'espace de Disse où réside les cellules hépatiques stellées. (3) Coupe histologique de rate de poisson-zèbre. Celle-ci est composée d'une pulpe rouge (a) riche en hématies et thrombocytes, et d'une pulpe blanche où réside des ellipsoïdes riche en macrophages et cellules réticulaires.

Modifié d'après (227) pour (1 et 3) et (241) pour (2)

## 2.8. Système circulatoire

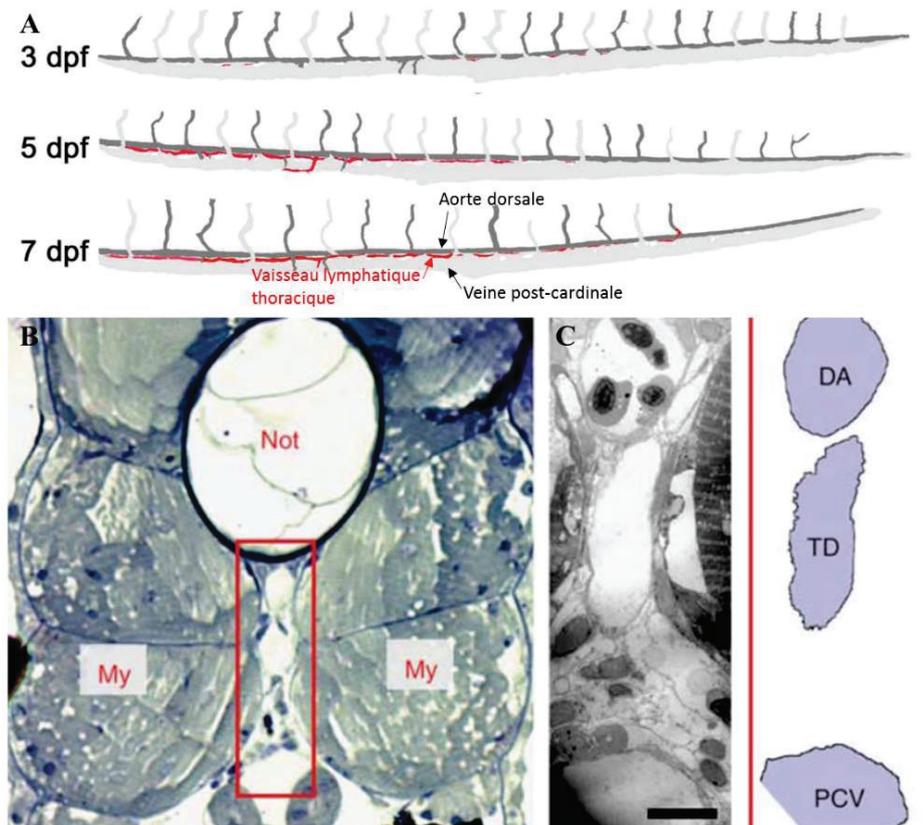
Lors de la réalisation du travail de thèse, le système vasculaire a été utilisé comme véhicule des nanoparticules qui ont été injectées au stade larvaire (3 jours post-fécondation) (245). A ce stade, le système vasculaire est déjà développé (*Figure 39*) et les vaisseaux principaux irrigant le tronc et la queue sont constitués par la veine post-cardinale et l'aorte dorsale dans lesquels ont été injectées les nanoparticules.



**Figure 39 :** Angiogramme d'une larve de poisson-zèbre de 3 jours illustrant la circulation sanguine.

Modifié à partir de (245)

Associé aux vaisseaux sanguin se développent des vaisseaux lymphatiques à partir du 5<sup>e</sup> jour post-fécondation. Le vaisseau lymphatique thoracique se situe entre l'aorte dorsale et la veine caudale. Son rôle est le transport de solutés, de graisse et de faciliter la migration de cellules immunitaires (*Figure 40*) (246).



**Figure 40 :** (A) Représentation du développement du vaisseau lymphatique thoracique entre l'aorte dorsale et la veine post-cardinale de la larve de poisson-zèbre. Celle-ci semble opérationnelle dès 7 jours après la fécondation. (B) Coupe histologique d'une larve de poisson-zèbre mettant en valeur une région sous la notochorde (Not) et entre les myotomes (My). Cette zone contient pour sa partie supérieur, l'aorte dorsale (DA), sa partie médiane, le vaisseau lymphatique thoracique (TD), et pour sa partie inférieure, la veine post-cardinale(PCV). (C) Observation en microscopie électronique à transmission de la zone encadrée et son schéma illustrant la position des vaisseaux.

Modifié à partir de (246)

Par rapport aux mammifères, les cellules sanguines de poisson présentent certaines particularités (227). Les hématies sont nucléées. La coagulation est assurée par des thrombocytes circulants, qui sont des cellules entières et non des fragments de cellules comme chez les mammifères, et sont également capables d'internaliser des bactéries et de les neutraliser (247). Parmi les leucocytes il y a entre 5 et 15% de monocytes pour 71 à 92% de lymphocytes. Le sang possède également des granulocytes comme les neutrophiles et les éosinophiles.

Enfin, chez les poissons téléostéens, le système réticulo-endothélial, responsable de l'entretien du sang, est assuré par de nombreux acteurs (248). D'une manière générale c'est dans le tissu hématopoïétique rénal que la clairance d'éléments indésirables, tel des colloïdes de carbone ou

bien encore des bactéries, est la plus efficace comparée aux ellipsoïdes de la rate. Les branchies sont également impliquées dans cette clairance. Une hypothèse pointe la participation des cellules en pilier des lamelles dans ce processus. L'endocarde de l'atrium au niveau du cœur participerait aussi mais dans une mesure presque négligeable, tout comme la muqueuse intestinale. Le foie des téléostéens, contrairement aux mammifères, n'est presque pas impliqué dans la clairance d'éléments étrangers, ce rôle étant certainement attribué aux cellules hépatiques stellées. Pour finir, dans le sang même, monocytes et thrombocytes participent à la clairance, ce qui ne semble pas être le cas pour les lymphocytes et les neutrophiles.

### 3. Système immunitaire

L'étude des potentielles interactions entre les nanoparticules de PLA produites au sein du laboratoire du Dr. VERRIER et les différents acteurs du système immunitaire est un des axes importants réalisé dans le travail de thèse. Les vertébrés sont exposés en permanence à de nombreux dangers biologiques dans leur environnement, comme certaines bactéries, virus, parasites et autres pathogènes. La première défense érigée par les organismes a pour but de prévenir la pénétration du pathogène avec différentes barrières physiques, par exemple en étant étanches comme les épithéliums ou bien en servant de piège comme le mucus en surface des muqueuses. En plus des barrières, le système immunitaire prend le relai pour la lutter contre les pathogènes ayant réussi à pénétrer l'organisme (249).

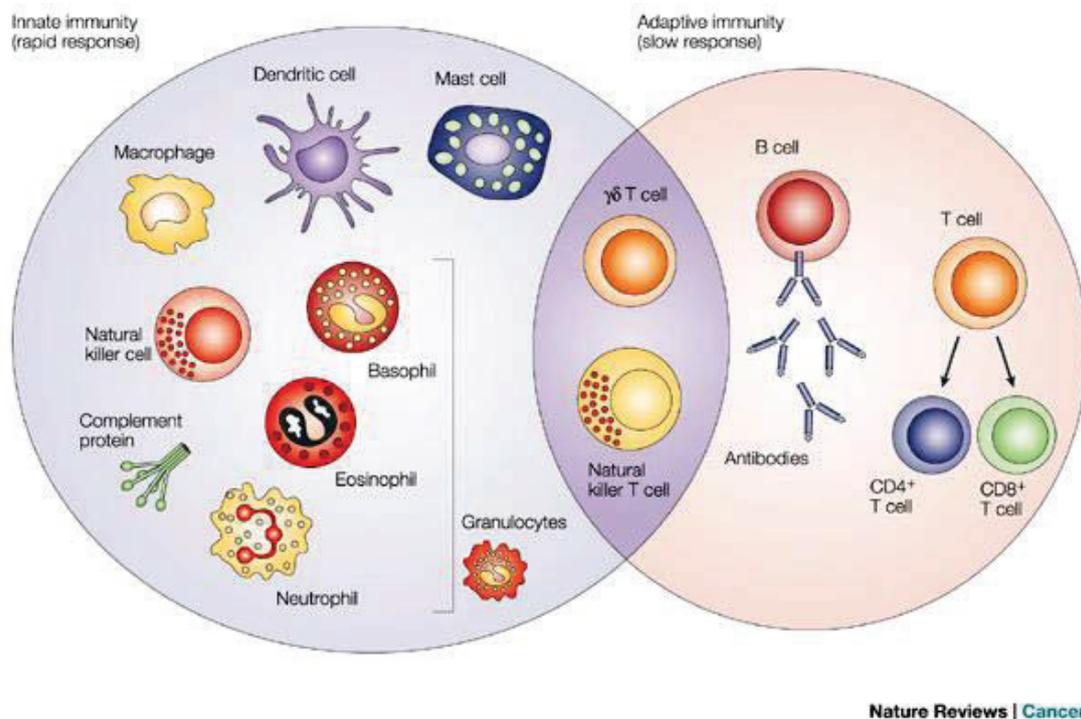
D'une manière générale, le système immunitaire possède deux composantes majeures : l'immunité innée et l'immunité adaptative. Nous allons les décrire d'une manière simplifiée.

- Brièvement, l'immunité innée est responsable de l'élimination non-spécifique d'éléments étrangers. Elle repose grandement sur la détection des pathogènes d'une manière générale (récepteurs impliqués dans les voies de signalisation TLR, NOD, CLR, STING etc) (250) par des cellules capables d'internaliser et de neutraliser les dangers, mais également de servir d'alarme en produisant divers signaux chimiques. Au final, cette composante du système immunitaire qui est en première ligne, produit une réponse forte et rapide contre les pathogènes mais qui ne perdure pas dans le temps. Parmi les cellules impliquées se trouvent différents types avec des fonctions particulières. Les cellules NK (« natural killer » ou « tueur non-spécifique ») sont spécialisées dans la détection et la mort des cellules infectées par des pathogènes intracellulaires (251). Parmi les granulocytes, les neutrophiles sont des phagocytes spécialisés dans la détection et la neutralisation d'éléments étrangers (252). Les macrophages appartiennent également aux phagocytes possèdent une fonction comparable à celle d'un d'éboueur, capable d'internaliser et de digérer tout élément étranger et débris cellulaire. Les macrophages sont impliqués dans l'homéostasie tissulaire et participent à l'élaboration de réponses immunitaires aussi bien en tant qu'acteurs que modulateurs. Afin de remplir leurs nombreuses fonctions, les macrophages possèdent une grande plasticité. Lors de

l'internalisation d'éléments pathogènes, ils sont également capables de servir de sentinelle et de propager l'information aux cellules spécialisées dans la réaction immunitaire spécifique (253). Les cellules spécialisées pour ce rôle de sentinelle sont les cellules dendritiques. Celles-ci sont capables d'échantillonner l'environnement extérieur et possèdent de nombreux récepteurs pour repérer les pathogènes. Après l'internalisation d'éléments étrangers, les cellules dendritiques effectuent une digestion « douce » pour préserver les antigènes. Ce point contraste avec la digestion plus rapide effectuée par les macrophages, ceux-ci utilisent d'ailleurs plus d'enzymes protéolytiques et le pH de leur lysosome est plus acide. Les cellules dendritiques sont également capables de manipuler le comportement des autres cellules immunitaires, *via* la sécrétion de cytokines par exemple, et joue donc un rôle majeur dans l'induction de réponses immunitaires (254). Ce sont d'ailleurs des acteurs clé pour la vaccination (255,256) car ce sont les seules cellules capables d'activer des lymphocytes T naïfs. Un autre processus est également impliqué dans l'élimination rapide des pathogènes, le système du complément. Il se compose de nombreux principes actifs sécrétés, comme les anticorps, capables de se lier aux pathogènes afin de faciliter leur détection et neutralisation par les phagocytes (257). Enfin, en plus de l'élimination des pathogènes, l'activation du système immunitaire innée va déclencher l'implication du système immunitaire adaptatif.

- Brièvement, l'immunité adaptative est activée par les cellules sentinelles mentionnées précédemment et va permettre une réponse immunitaire spécifique qui va perdurer. Les cellules sentinelles qui sont chargées d'éléments étrangers vont aller activer des cellules jouant principalement le rôle d'intermédiaire capables d'amplifier, de réduire ou bien de participer aux réactions immunitaires. Ce sont les lymphocytes T (258), qui peuvent aussi bien se trouver *in situ* que dans des sanctuaires lymphoïdes. Ces cellules sont capables de reconnaître spécifiquement des antigènes et de s'activer lorsqu'elles le font. Les lymphocytes CD8+, également appelés cytotoxique, activés sont capables de détecter les cellules infectées présentant l'antigène dont ils sont spécifiques sur les molécules du CMH et de les éliminer. Les lymphocytes CD4+ activés sont capables d'orienter les réponses immunitaires, favorisant selon le sous-type l'immunité cellulaire ou humorale. L'activation des lymphocytes T CD4+ « auxiliaire 1 » amplifie l'immunité cellulaire, en interagissant avec les

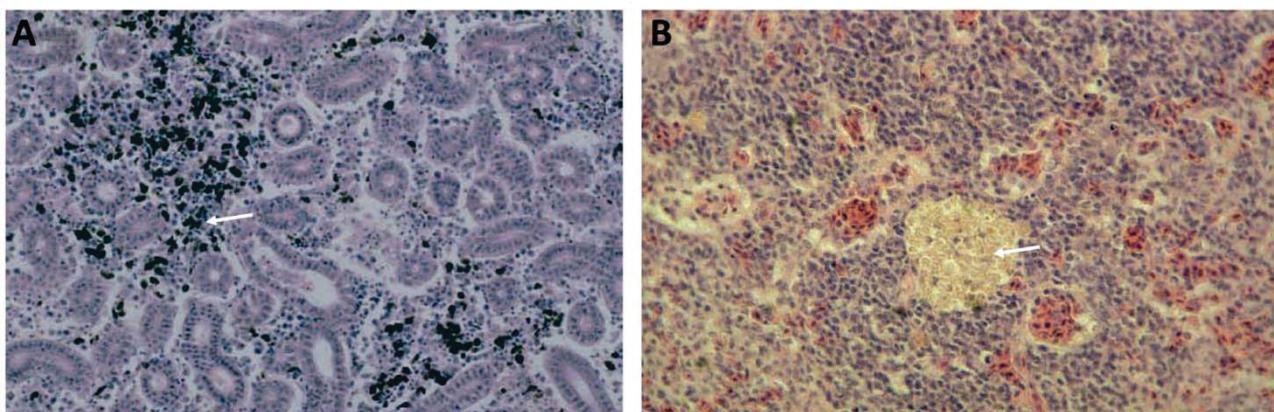
macrophages par exemple, et induit la création de lymphocytes T mémoire qui permettra lors d'une prochaine rencontre avec les pathogènes, une réponse immunitaire plus forte et plus rapide. Les lymphocytes T CD4+ « auxiliaire 2 » vont eux activer les lymphocytes B (259) capables de détecter le même antigène. L'activation déclenche une prolifération de ces lymphocytes B dont une partie va se différencier en plasmocytes spécialisés dans la production d'anticorps tandis que d'autres vont se différencier en lymphocytes B mémoire. Les anticorps produits sont capables de reconnaître spécifiquement l'antigène. Les anticorps vont donc recouvrir et neutraliser les pathogènes exprimant l'antigène, ils sont impliqués dans le système du complément. La première fois qu'un organisme rencontre un pathogène, la mise en place de cette réponse est lente. Mais grâce à la création de cellules mémoires, la réponse suite à une seconde exposition au pathogène se réalise très rapidement, avant que l'invasion ne puisse submerger l'immunité innée. Le but de la vaccination est de simuler cette première exposition pour créer les cellules mémoires (260). A noter la présence de lymphocytes T régulateurs qui empêchent les réactions immunitaires de s'emballer, risquant ainsi d'endommager l'organisme (comme les premières fièvres des nourrissons lorsqu'ils sont infectés par des bactéries gram négatifs).



**Figure 41 :** Illustration de différents acteurs impliqués dans l'immunité innée et l'immunité adaptative. (365)

La composante adaptative du système immunitaire coïncide au niveau évolutif avec l'apparition des vertébrés possédants une mâchoire, qui est un évènement bien antérieur à la divergence entre les poissons et les autres vertébrés. Le système immunitaire des poissons téléostéens est donc globalement conservé si on le compare à celui des mammifères (261). Les divergences étant imputées aux différentes pressions environnementales ayant agi sur les poissons et les mammifères. Le système immunitaire des poissons téléostéens a dû s'adapter à l'existence en milieu aqueux et à des barrières extérieures constituées de muqueuses composées de cellules vivantes ; en résumé à des expositions plus fréquentes.

Les principales différences avec les mammifères sont d'ordre structurel. Les organes lymphoïdes systémiques du poisson-zèbre sont les reins, le thymus, la rate et le foie, ce dernier représentant un organe lymphoïde alternatif (244,262,263). Le rein est l'organe lymphoïde primaire responsable de l'hématopoïèse (264). Le poisson-zèbre ne possède pas un vrai système comprenant des sites inducteurs et effecteurs différenciés. Cette caractéristique se traduit d'ailleurs par l'absence de ganglions lymphatiques et de centres germinatifs. Néanmoins, les organes lymphoïdes systémiques et les muqueuses exposées lors d'infections forment des centres de mélanomacrophages riches en cellules lymphoïdes (265). Les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (GALT, NALT, SALT et GiALT pour les intestins, les narines, la peau et les branchies respectivement) sont d'ailleurs diffus dans l'ensemble de l'organe avec des cellules immunitaires intraépithéliales et plus profondément dans les tissus (266,267). Une telle structure pourrait favoriser l'élaboration d'une réaction rapide du système immunitaire en cas d'agression.



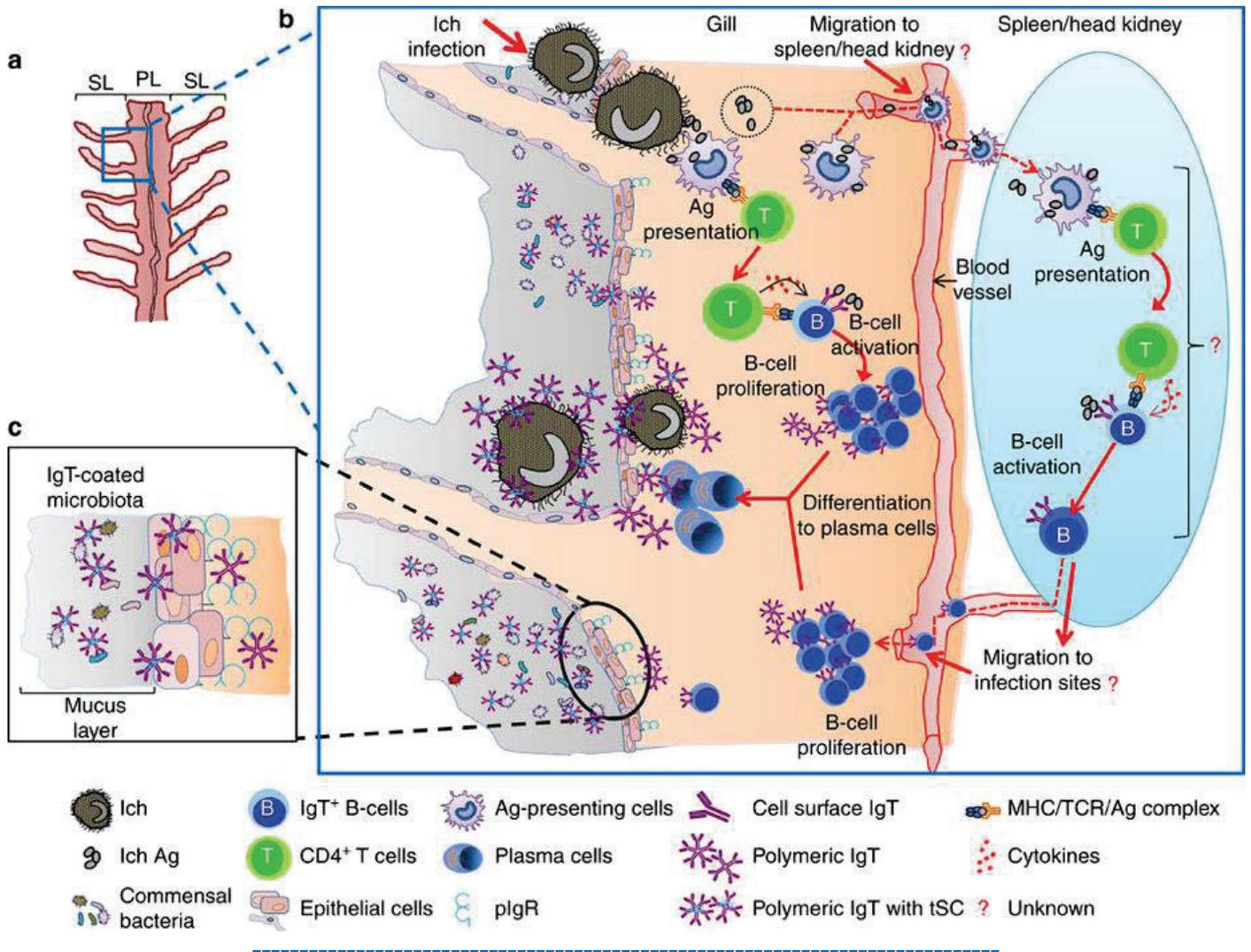
**Figure 42 :** Coupe histologique de reins (A) et de rate (B) mettant en valeur la présence de centre de mélanomacrophages (flèche blanche). Ces centres contiennent d'ailleurs plus ou moins de mélanine.

Modifié à partir de (265)

Signe que le système immunitaire entre poissons et mammifères est globalement conservé, les lignées cellulaires hématopoïétiques principales sont présentes chez le poisson-zèbre. Cela inclut les granulocytes, les cellules dendritiques (les cellules dendritiques plasmacytoïdes n'ont pas encore été identifiées), les monocytes, les macrophages, les cellules NK et ainsi que les lymphocytes B et T (268–270). Toutefois celles-ci sont moins caractérisées chez le poisson-zèbre, comme par exemple l'identification des sous-types cellulaires. De même l'existence des cellules dendritiques requiert de plus amples caractérisations fonctionnelles. Les poissons téléostéens possèdent des lymphocytes B capables de phagocyter et neutraliser des pathogènes, pour ensuite faire de la présentation d'épitope. L'identification de ce mécanisme a d'ailleurs été par la suite confirmé chez la souris (208,271).

En ce qui concerne les réponses innées et adaptatives, l'exposition à de nombreux pathogènes due à l'environnement aqueux se traduit par une protection immunitaire non-spécifique (innée) très développée. Une preuve en est l'opérationnalité du système immunitaire inné dès le deuxième jour après la fécondation tandis que l'induction de réponse immunitaire spécifique (adaptative) n'est possible qu'au bout de quelques semaines (272). Toutefois, bien que la partie adaptative du système immunitaire du poisson-zèbre puisse être considérée comme archaïque par rapport à celle chez les mammifères, il possède 3 différentes familles d'anticorps. Comme pour les mammifères, il possède les IgM et les IgD. Par contre les IgA, anticorps spécialisés dans les muqueuses, sont remplacés par des équivalents fonctionnels que sont les IgZ (IgT pour les autres téléostéens) (263). Pour la réponse innée, le système du complément est conservé. Le poisson-zèbre possèdent une grande diversité de récepteurs pour la détection des pathogènes. Ainsi les récepteurs NOD1 et NOD2 sont conservés, de même que la plus grande partie des récepteurs TLR même si des différences au niveau du substrat reconnu existe, le LPS est moins inducteur chez le poisson-zèbre que la souris. Sur ce point le poisson-zèbre possèdent plus de familles que l'être humain (273). Les systèmes de reconnaissance des CLR et de STING (274) sont également identifiés chez le poisson-zèbre.

Pour conclure, tous les principaux acteurs impliqués dans la mise en place de réponses immunitaires protectrices sur le long terme par vaccination sont présents chez le poisson-zèbre. Néanmoins ces acteurs nécessitent une plus ample caractérisation, ainsi que le développement de marqueurs spécifiques pour leur identification, cela malgré l'existence de nombreuses lignées transgéniques (275).



**Figure 43 :** Modèle schématique développé dans (318) illustrant l'induction d'une réponse anticorps IgT dans la muqueuse branchiale après une infection parasitaire. (a) Illustration de l'organisation des branchies avec le filament (PL) et les lamelles (SL). (b) Ce modèle est proposé par les auteurs de l'étude : Lors d'une infection parasitaire (Ich), des antigènes d'Ich sont pris en charge par des cellules présentatrices d'antigènes qui vont ensuite les présenter à des lymphocytes T CD4 naïfs présents dans le GALT. Toujours au sein de la muqueuse, les lymphocytes T CD4 activés spécifiques aux antigènes d'Ich vont à leur tour activer les lymphocytes B spécifiques aux antigènes d'Ich, ce qui déclenche leur prolifération. Ces lymphocytes B peuvent ensuite se différencier à la fois en plasmocytes afin de générer massivement les anticorps anti-Ich. Les auteurs émettent l'hypothèse qu'une partie des cellules présentatrices d'antigènes soient capables de migrer dans les organes lymphoïdes systémiques pour reproduire le même schéma qu'à l'intérieur de la muqueuse. Néanmoins ne détectant pas de lymphocytes B IgT<sup>+</sup> dans les reins, ils supposent qu'il doit y avoir migration vers les branchies des lymphocytes B IgT<sup>+</sup> activés. Enfin, une partie des anticorps ainsi sécrétés sont ensuite émis vers le mucus sous forme polymérique (c).

A partir de (318)

# 4. Etat de l'art concernant la biodistribution des nanoparticules chez les poissons

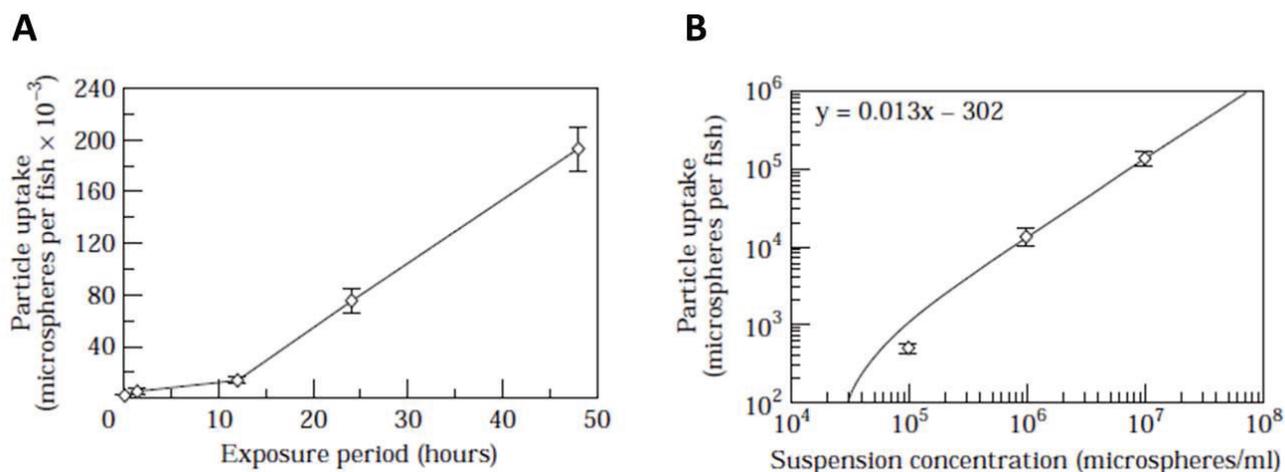
## 4.1. Biodistribution chez les téléostéens

Nous avons pu observer précédemment que les données sur la biodistribution de nanoparticules de PLA et PLGA sont rares. Malheureusement, ce constat s'applique également à leur biodistribution chez les poissons téléostéens. Le projet de thèse s'articule autour des administrations muqueuses et intraveineuses chez le poisson-zèbre, en insistant particulièrement sur les relations avec le système immunitaire. Ainsi, nous aborderons premièrement les données de biodistribution chez les téléostéens dans le cadre de vaccination, puis au sein du poisson-zèbre.

En ce qui concerne la vaccination chez les téléostéens, le domaine est actuellement détaillé au sein de deux revues récentes. Ji *et al* parcourent les bénéfices que procurent différents nanosystèmes pour la vaccination piscicole (276), comme l'augmentation du pouvoir adjuvant, tandis que Munang'andu *et al* proposent une vision large de la vaccination par voie muqueuses des téléostéens (277). Dans cette dernière publication, les auteurs exposent ce qui selon eux limitent actuellement ce type de vaccination : absence de protection des antigènes ainsi que le manque d'utilisation d'immunomodulateurs, l'induction de tolérance après expositions répétées par voie orale, ou bien encore le manque de données solides des phénomènes immunologiques, témoins de l'induction d'une protection efficace.

Bien que ne concernant pas l'utilisation de nanoparticules de PLGA et PLA, nous aborderons en premier une étude (278) fournissant de précieuses informations sur l'administration muqueuse (immersion) de particules de polystyrène (1  $\mu\text{m}$ ) recouvertes de BSA chez la truite (un salmonidé). Les auteurs se sont intéressés à la cinétique de prise en charge de ces particules durant 48h d'immersion. Il en résulte que durant une immersion longue, la prise en charge des particules par l'organisme se déroule en deux phases. Les douze premières heures, la pénétration des particules dans l'organisme est beaucoup plus lente que durant les 36 dernières heures. Malheureusement, le phénomène biologique responsable de l'augmentation de prise en charge à la douzième heure n'est pas expliqué. Les auteurs se sont ensuite intéressés à l'influence de la concentration en particule sur la pénétration dans l'organisme. Lors d'immersions de 24h, l'augmentation de la prise en charge des particules est quasi-proportionnelle à la concentration à laquelle sont exposées les truites. D'une même manière,

l'étude compare l'efficacité de différents types d'immersion. Il est conclu premièrement que l'utilisation d'une solution hyperosmotique pour augmenter la prise en charge durant une immersion brève de 2 mn n'est pas efficace. Ensuite, à concentration égale, l'immersion de 24h est plus efficace que celle de 2mn. Néanmoins, si l'on augmente la concentration de particule par un facteur 10, l'efficacité de l'immersion courte augmente jusqu'à atteindre la moitié de celle de 24h. Pour finir, les auteurs concluent également qu'en termes de quantité, la peau est l'organe le plus impliqué dans la prise en charge des particules micrométriques, devant les branchies et les reins.



**Figure 44 :** (A) Cinétique d'internalisation de particules de polystyrène microniques en des truites durant une immersion de 48h. (B) Influence de la concentration en particule durant une immersion de 24h sur leurs internalisations par des truites.

Modifié à partir de (278)

Une autre étude (279) va elle aussi fournir des informations importantes, bien que n'étant pas basée sur une administration par voie muqueuse. Cette étude réalisée chez le saumon atlantique compare les injections intra-péritonéales de nano- et micro- particules de PLGA (respectivement  $<1000$  nm et  $8 \mu\text{m}$ ) véhiculant de la gammaglobuline humaine et du bêta-glucane, à une solution adjuvante. Les auteurs ont pu observer que par rapport à la solution adjuvante qui fournit une réponse immune forte jusqu'à 120 jours, les solutions nano- et micro- particulaires n'induisent une réponse forte que jusqu'à 75 jours. La stimulation du système immunitaire est d'ailleurs dépendante de la charge d'antigènes administrée. En effet, l'augmentation de la quantité d'antigènes administrée de  $100 \mu\text{g}$  à  $400 \mu\text{g}$  a permis d'obtenir une induction significative du système immunitaire. Les auteurs ont également observé un effet dépôt aussi bien avec les microparticules de PLGA qu'avec les nanoparticules, par contre seules les nanoparticules ont pu être détectées dans l'organe lymphoïde que représente le rein. Pour

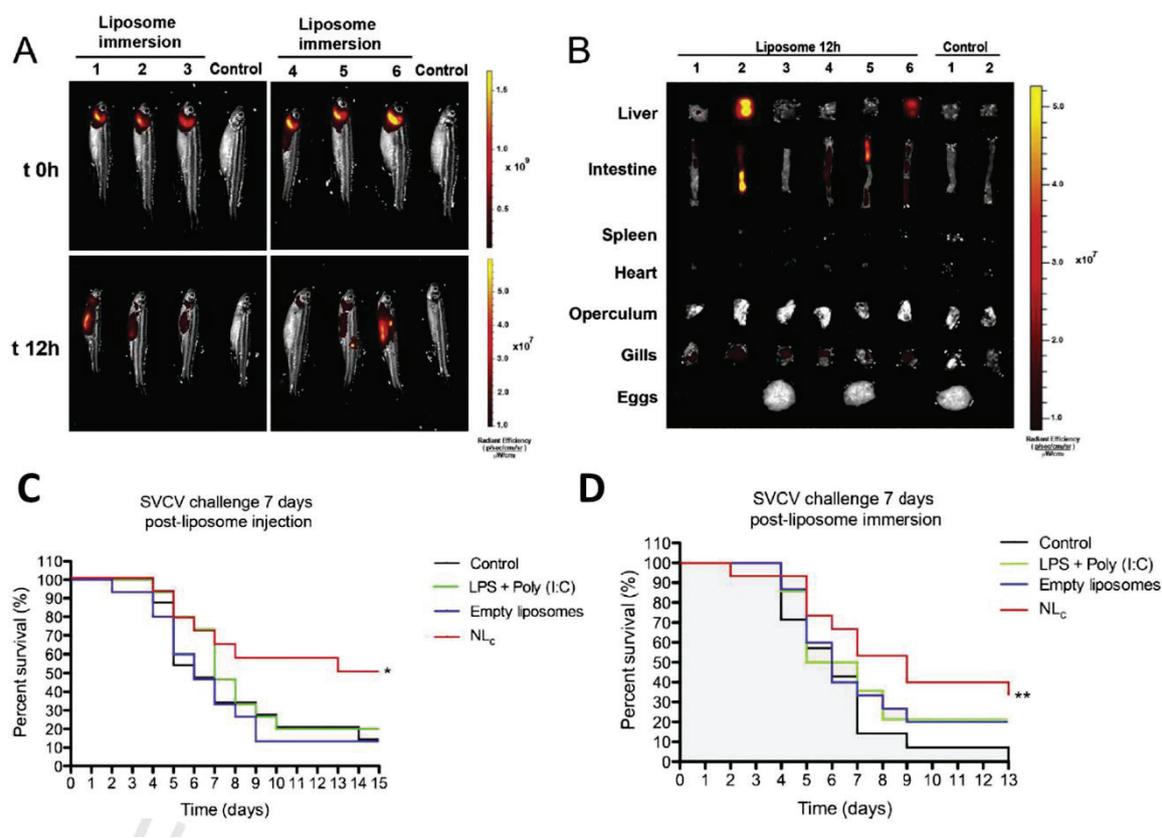
finir, l'avantage le plus sérieux des particules de PLGA vis-à-vis de la solution adjuvante, malgré une induction de réponses immunitaires un peu plus faible, est la faible apparition d'effets secondaires comme la mélanisation des tissus. En résumé, l'utilisation de particules de PLGA permet l'induction de réponses immunitaires modérée tout en garantissant une faible apparition d'effets secondaires.

L'utilisation de nanoparticules de PLGA a été évaluée pour la vaccination par voie orale de truite contre le virus infectieux à nécrose hématopoïétiques (IHNV) (280). Des nanoparticules (300-1000 nm) véhiculant des plasmides codant pour l'antigène G du virus ont été insérées dans des flocons de nourriture sèche. Les auteurs ont pu observer la présence des nanoparticules, 96h après l'administration, au sein de cellules épithéliales de la partie postérieure des intestins. Néanmoins, les auteurs concluent que leur stratégie nécessite des améliorations car malgré l'induction d'une production d'anticorps, l'effet protecteur fut faible. D'une même manière, l'administration par une seringue de gavage de nanoparticules de PLGA (<500 nm) chez la limande japonaise (281) a déclenché l'augmentation de différents paramètres immuns. A noter également l'observation d'un passage de nanoparticules dans le sang.

## 4.2. Administration de nanoparticules chez le poisson-zèbre

En ce qui concerne le poisson-zèbre, les informations les plus détaillées, concernant le devenir de nanoparticules au niveau tissulaire après immersion, proviennent d'une étude (282) qui a comparé les administrations par injection intrapéritonéale et par immersion de liposomes adjuvantés (poly:IC et LPS) (125 nm). Dotées d'une charge de surface neutre, ces nanoparticules ont été utilisées dans afin de vacciner des poissons-zèbre adultes contre la bactérie *pseudomonas aeruginosa* ou le virus de la virémie printanière de la carpe (VSVC). A la suite des injections intrapéritonéales, les liposomes s'accumulent principalement dans la rate et le foie, où elles sont encore détectables même après 72h. En ce qui concerne les immersions d'une durée de 30mn, cela est plus hétérogène. En effet 12h après, les nanoparticules sont détectées dans les branchies de chaque poisson ce qui n'est pas le cas pour le foie et les intestins (3/6 et 5/6 respectivement). Aucune prise en charge n'a pu être détectée dans la rate. Au niveau protection, l'injection intrapéritonéale permet d'obtenir une plus grande protection envers VSVC que l'administration par immersion (50% de survie contre 30% respectivement). Au vu des études précédemment décrites, les 30% de survie pourraient potentiellement être augmentés

grâce à une immersion supérieure à 30 mn ou bien par une concentration en nanoparticules plus élevée.

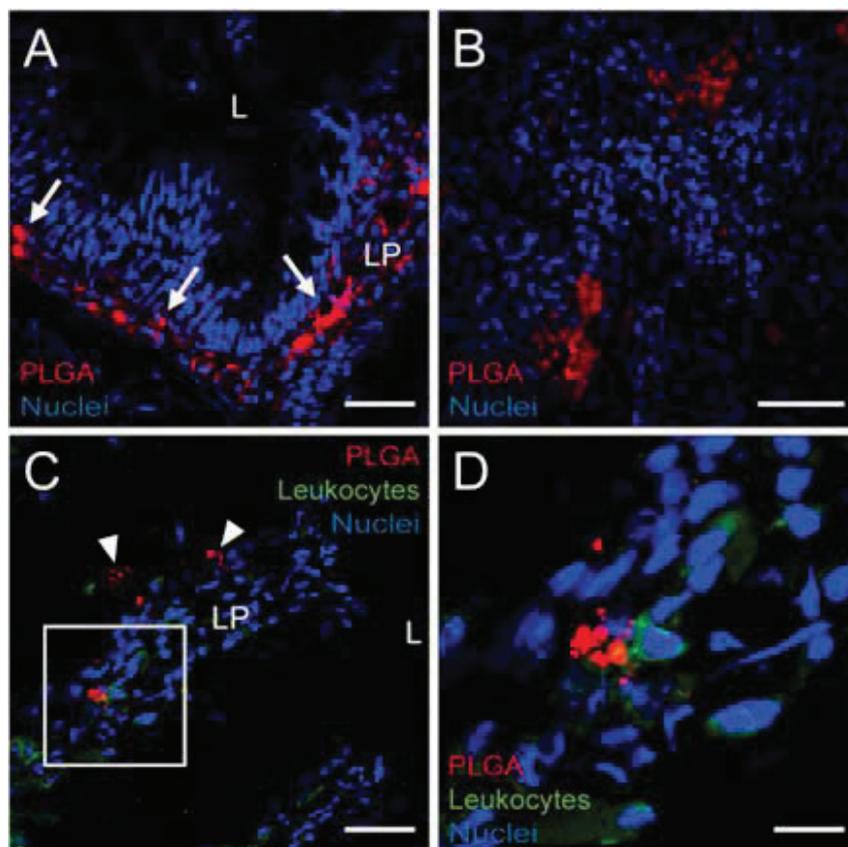


**Figure 45 :** Biodistribution chez le poisson-zèbre de liposomes fluorescents quelques instants et 12h après immersion. Observation à l'échelle de l'organisme entier(A) et sur des organes disséqués (B). L'administration intrapéritonéale (C) de ces nanoparticules ont permis d'obtenir un taux de survie de 50% après infection avec SVCV contre 30% après administration par immersion (D).

Modifié à partir de (282)

Une autre étude (283) s'est focalisée, chez le poisson-zèbre, sur l'administration par gavage hyperosmotique (PBS1X dans le système digestif d'un poisson d'eau douce) de nanoparticules de PLGA (50-400 nm) et de polystyrène (500 nm). La prise en charge des billes de polystyrène a été observé au sein de l'épithélium intestinale, de leucocyte dans la *lamina propria* et dans les ellipsoïdes de la pulpe blanche splénique. Trois heures après le gavage, ces nanoparticules sont également accumulées dans des leucocytes dans la rate. En ce qui concerne la prise en charge des nanoparticules de PLGA, en seulement 5mn de nombreuses particules atteignent la *lamina propria* où elles sont internalisées par des leucocytes 1h après. Néanmoins aucune particule de PLGA n'a pu être détectée au sein des entérocytes spécialisés de l'intestin intermédiaire postérieur. Au final, 3h après l'administration une forte accumulation est

également observée dans les ellipsoïdes spléniques. Ces résultats contrastent avec ceux observés avec l'étude précédente concernant les liposomes, ce qui souligne une nouvelle fois l'hétérogénéité des biodistribution entre différentes formulations nanoparticulaires.



**Figure 46 :** (A) Prise en charge de nanoparticules de PLGA au sein de la lamina propria seulement 5mn après gavage hyperosmotique chez le poisson-zèbre adulte. (B) 3h après l'administration, des nanoparticules se localisent dans les ellipsoïdes spléniques. (C) Bien que des accumulations de nanoparticules soient localisées au sein de leucocytes dans la lamina propria, cela ne put être observée au niveau de l'épithélium. (D) Zoom du cadre blanc dans (C). Barres d'échelle : (A-C) = 30  $\mu\text{m}$  et (D) = 10  $\mu\text{m}$ .

Modifié à partir de (283)

Rare sont les études réalisées permettant de mieux comprendre la dynamique des nanoparticules de PLA et PLGA au sein du flux sanguin chez le poisson-zèbre. Une étude (284) utilisant des particules (200 nm) de polystyrène à montrer que celles-ci adhèrent en surface des cellules endothéliales en une vingtaine de minutes après injection intraveineuse au sein de larves de p. Une autre (285) a permis de mettre en avant l'internalisation de nanoparticules de PLGA (200 nm) par des macrophages infectées par *mycobacterium marinum* également par injection intraveineuse chez les larves. Malheureusement cette étude n'a pas décrit d'observation

concernant les cellules endothéliales. Pour finir, une étude (286) décrit une voie de clairance sanguine indépendante de la voie hépatobiliaire et qui permet une excrétion de nanotubes de carbone (30-200 nm), injectés par intraveineuse chez la larve, par les cellules caliciformes intestinales. A noter que cette dernière observation a été également observée chez des souris où le système d'excrétion hépatobiliaire fut ligaturé.

Pour conclure, nous pouvons constater que les données sur la biodistribution de nanoparticules de PLA chez le poisson-zèbre sont très pauvres. Néanmoins, l'administration de nanobiotechnologies par immersion semble prometteuse pour les applications vaccinales. Enfin en ce qui concerne ces mêmes particules dans le sang, il semblerait qu'elles ne soient prises en charge que par les macrophages sub-luminaux.

## 2. OBJECTIFS DE THESE

---

L'usage des nanotechnologies est très répandu grâce aux nombreux avantages que procurent leurs utilisations. Au sein du domaine de la santé, les récentes avancées préconisent l'élaboration de nanobiotechnologies ayant une forte biocompatibilité pour amplifier les effets thérapeutiques. On a pu ainsi remarquer de nombreuses études utilisant ces avancées technologiques pour la vaccination ou bien encore la délivrance d'antibiotiques par exemple. Néanmoins afin de garantir l'optimisation de ces nanosystèmes, il est primordial d'en comprendre les interactions avec les différents compartiments biologiques *in vivo* et de comprendre comment influencer ces interactions.

Le but global de mon travail de thèse est, au sein du modèle du poisson-zèbre, d'analyser la biodistribution de nanoparticules de poly(acide lactique) à l'échelle tissulaire et cellulaire, *in vivo* après administration muqueuse et intraveineuse, et comment infléchir sur leurs interactions avec le vivant pour favoriser les applications vaccinales. Afin d'y parvenir, le projet de recherche se décompose en 3 objectifs principaux.

- Partie 1 : Analyser la biodistribution des nanoparticules de PLA après administration muqueuse chez le poisson-zèbre adulte.
  - Mise au point d'une méthodologie employant différentes techniques complémentaires.
  - Mise au point des outils permettant d'étudier leur relation avec les cellules présentatrices d'antigènes.
  - Basé sur leur tropisme naturel, déterminer l'adaptabilité de ces nanoparticules en tant que nanovéhicules pour la vaccination muqueuse.
  
- Partie 2 : Développer des stratégies capables de moduler la biodistribution de ces nanoparticules lors d'une administration muqueuse.
  - Identifier différentes stratégies de ciblage compatibles avec la formulation de nanoparticules de PLA.
  - Mettre au point les différentes formulations.
  - Initier l'évaluation des effets sur la biodistribution relatifs aux différentes stratégies

- Partie 3 : Analyser le comportement des nanoparticules de PLA dans le système circulatoire.
  - Caractériser la dynamique des interactions entre les nanoparticules de PLA et les acteurs du système vasculaire après injection intraveineuse chez la larve de poisson-zèbre.
  - Etudier le devenir des nanoparticules de PLA dans le système réticulo-endothélial après injection intraveineuse chez le poisson-zèbre adulte.

# 3. RESULTATS

## Biodistribution muqueuse

### 1. Publication scientifique

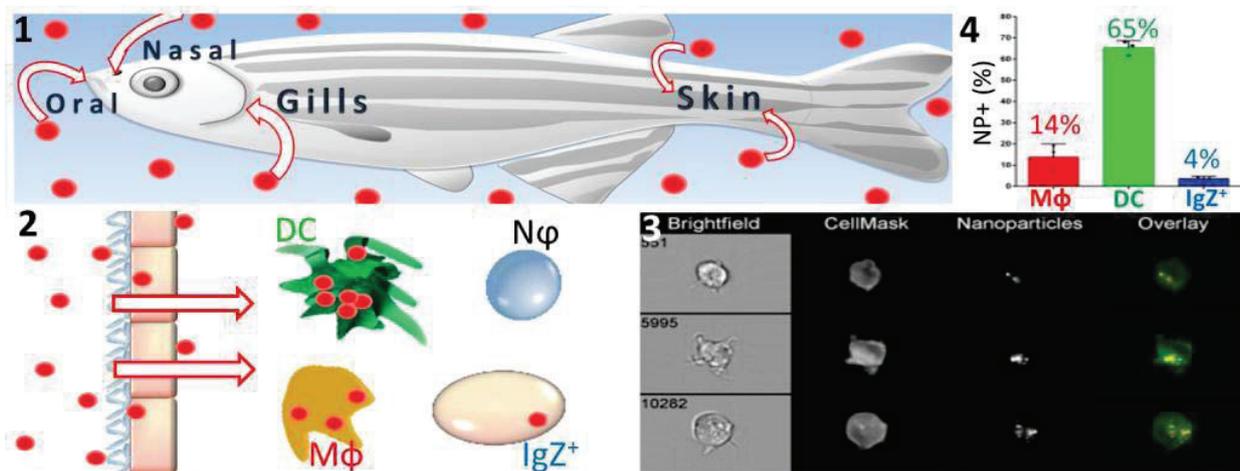


Figure 47 : Résumé graphique

# Specific and Efficient Uptake of Surfactant-Free Poly(Lactic Acid) Nanovaccine vehicles by Mucosal Dendritic Cells in Adult Zebrafish after Bath Immersion

Julien Rességuier<sup>1</sup>, Emilie Delaune<sup>1</sup>, Anne-line Coolen<sup>1</sup>, Jean-pierre Levraud<sup>2</sup>, Pierre Boudinot<sup>3</sup>, Dominique Le Guellec<sup>1</sup>, Bernard Verrier<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>LBTI, Université Claude Bernard Lyon1 / CNRS, France, <sup>2</sup>Macrophages et Développement de l'Immunité - UMR 3738, Institut Pasteur / CNRS, France, <sup>3</sup>Virologie et Immunologie Moléculaires, INRA, France

**Submitted to Journal:**  
Frontiers in Immunology

**Specialty Section:**  
Mucosal Immunity

**Article type:**  
Original Research Article

**Manuscript ID:**  
244187

**Received on:**  
22 Nov 2016

**Frontiers website link:**  
[www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)

---

### **Conflict of interest statement**

#### **The authors declare a potential conflict of interest and state it below**

BV is co-founder in a company developing the therapeutic use of PLA nanoparticles. The remaining authors declare no commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

### **Author contribution statement**

JR participated in the conception and design of the study, performed experiments, analyzed data and drafted the manuscript. ED and DLG participated in the conception and design of the study, assisted in experiments and data analysis, and wrote the manuscript. ALC performed histology in fli:GFP lines, analyzed data and assisted in drafting the manuscript. JPL generated mhc2dab:eGFP samples, assisted in designing the study and helped revise the manuscript. PB assisted in designing the study and helped revise the manuscript. BV assisted in the conception and design of the study, revised the manuscript and provided reagents and lab space. All authors read, critiqued, and approved the final manuscript.

### **Keywords**

PLA nanoparticle, Surfactant-free, Zebrafish, Vaccines Carrier, Mucosal delivery, Dendritic Cells, Imaging Flow Cytometry (IFC), biodistribution

### **Abstract**

Word count: 193

Activation of mucosal immunity is a key milestone for next-generation vaccine development. Biocompatible polymer-based nanoparticles are promising vectors and adjuvants for mucosal vaccination. However, their *in vivo* uptake by mucosae and their biodistribution in antigen-presenting cells need to be better understood to optimize mucosal nanovaccine designs. Here, we assessed if antigen-presenting cells are efficiently targeted in a spontaneous manner by surfactant-free poly(lactic acid) nanoparticles (PLA-NPs) after mucosal administration. Combining histology and flow imaging approaches, we describe and quantify the mucosal uptake of 200nm PLA-NPs in adult zebrafish. Following bath administration, PLA-NPs penetrated and crossed epithelial barriers from all exposed mucosae. In mucosae, PLA-NPs accumulated in antigen-presenting cells, which were identified as dendritic cells, macrophages and IgZ+ B cells in gills and skin. PLA-NP uptake by phagocytes was specific to these cell types, as PLA-NPs were not detected in neutrophils. Importantly, quantitative analyses in gills revealed that dendritic cells take up PLA-NPs with specifically high efficiency. This study shows that surfactant-free PLA-NPs, which display optimal biocompatibility, can spontaneously target dendritic cells with high efficiency *in vivo* following mucosal administration, and highlights PLA-NPs as powerful platforms for mucosal vaccine delivery in medical and veterinary fields.

### **Funding statement**

This work was supported in part by the European Commission FP7 ADITEC program (HEALTH-F4-2011-280873), the Era Net HIVERA (HIVNANOVA) and the ANR (grant ANR Fish-RNAVax), as well as by TEFOR-Investissement d'avenir (ANR-II-INBS-0014).

### **Ethics statements**

(Authors are required to state the ethical considerations of their study in the manuscript, including for cases where the study was exempt from ethical approval procedures)

*Does the study presented in the manuscript involve human or animal subjects:* Yes

*Please provide the complete ethics statement for your manuscript. Note that the statement will be directly added to the manuscript file for peer-review, and should include the following information:*

- Full name of the ethics committee that approved the study
- Consent procedure used for human participants or for animal owners
- Any additional considerations of the study in cases where vulnerable populations were involved, for example minors, persons with disabilities or endangered animal species

*As per the Frontiers authors guidelines, you are required to use the following format for statements involving human subjects: This study was carried out in accordance with the recommendations of 'name of guidelines, name of committee' with written informed consent from all subjects. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the 'name of committee'.*

*For statements involving animal subjects, please use:*

*This study was carried out in accordance with the recommendations of 'name of guidelines, name of committee'. The protocol was approved by the 'name of committee'.*

*If the study was exempt from one or more of the above requirements, please provide a statement with the reason for the exemption(s).*

*Ensure that your statement is phrased in a complete way, with clear and concise sentences.*

The experiments were conducted in accordance with the animal care guidelines of the European Union and French law and approved by the local Animal Ethic Evaluation Committee (CECCAPP).

In review

## Specific and Efficient Uptake of Surfactant-Free Poly(Lactic Acid) Nanovaccine vehicles by Mucosal Dendritic Cells in Adult Zebrafish after Bath Immersion

1 Julien Rességuier<sup>1</sup>, Emilie Delaune<sup>1</sup>, Anne-Line Coolen<sup>1</sup>, Jean-Pierre Levraud<sup>2</sup>, Pierre  
2 Boudinot<sup>3</sup>, Dominique Le Guellec<sup>1</sup>, Bernard Verrier<sup>1,\*</sup>

3 <sup>1</sup> Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique, Université Claude Bernard Lyon  
4 1, CNRS, Lyon, France

5 <sup>2</sup> Macrophages et Développement de l'Immunité, Institut Pasteur, CNRS, Paris, France

6 <sup>3</sup> Virologie et Immunologie Moléculaire, INRA, Jouy-en-Josas, France

7

8 \* Correspondence:

9 Bernard Verrier

10 bernard.verrier@ibcp.fr

11 **Keywords: PLA nanoparticles, Surfactant-free, Zebrafish, Vaccines Carrier, Mucosal delivery,**  
12 **Dendritic cells, Imaging Flow Cytometry, Biodistribution**

13 **5310 words – 6 figures**

14 **Abstract**

15 Activation of mucosal immunity is a key milestone for next-generation vaccine development.  
16 Biocompatible polymer-based nanoparticles are promising vectors and adjuvants for mucosal  
17 vaccination. However, their *in vivo* uptake by mucosae and their biodistribution in antigen-presenting  
18 cells need to be better understood to optimize mucosal nanovaccine designs. Here, we assessed if  
19 antigen-presenting cells are efficiently targeted in a spontaneous manner by surfactant-free  
20 poly(lactic acid) nanoparticles (PLA-NPs) after mucosal administration. Combining histology and  
21 flow imaging approaches, we describe and quantify the mucosal uptake of 200nm PLA-NPs in adult  
22 zebrafish. Following bath administration, PLA-NPs penetrated and crossed epithelial barriers from  
23 all exposed mucosae. In mucosae, PLA-NPs accumulated in antigen-presenting cells, which were  
24 identified as dendritic cells, macrophages and IgZ<sup>+</sup> B cells in gills and skin. PLA-NP uptake by  
25 phagocytes was specific to these cell types, as PLA-NPs were not detected in neutrophils.  
26 Importantly, quantitative analyses in gills revealed that dendritic cells take up PLA-NPs with  
27 specifically high efficiency. This study shows that surfactant-free PLA-NPs, which display optimal  
28 biocompatibility, can spontaneously target dendritic cells with high efficiency *in vivo* following  
29 mucosal administration, and highlights PLA-NPs as powerful platforms for mucosal vaccine delivery  
30 in medical and veterinary fields.

31

32

33 **1 Introduction**

34 Mucosal immunization is currently a major challenge in vaccinology, both for human and veterinary  
35 medicine (1–3). Mucosae represent the first defensive barriers of the organism against most  
36 pathogens. Their defenses rely not only on physical barriers such as mucus production and mono- or  
37 multi-layered epithelia, but also on specific immune systems called Mucosa-Associated Lymphoid  
38 Tissues (MALTs). Efficient mucosal immunization requires that MALT activation takes place  
39 locally. Indeed, mucosal B and T cell effectors, which get activated in mucosae, circulate via  
40 lymphatic and blood circulation, but home back to mucosae. Thus, central and mucosal lymphocyte  
41 populations represent two distinct compartments, and vaccines delivered by parenteral routes are  
42 generally unable to elicit efficient mucosal immunization, which instead requires a local induction by  
43 mucosally administered vaccines (1–3). As soluble antigens are poor mucosal immune inducers by  
44 themselves, extensive efforts have been made to develop particulate vaccine carriers able to cross the  
45 mucosal barriers and deliver antigens to the key initiators of immune response, the antigen-presenting  
46 cells (APCs) (2,4).

47 Some of the most promising vaccine vehicles for mucosal delivery are biodegradable polymeric  
48 nanoparticles (NPs), in particular NPs based on poly(D,L-lactic acid) (PLA) and its copolymer  
49 poly(lactic acid co-glycolic acid) (PLGA) (5,6). PLA and PLGA are FDA-approved biocompatible  
50 lactate-based polyesters, which present high safety records, can be completely resorbed in the body  
51 by metabolization of their degradation products, are easy to produce and eco-compatible (7). PLA-  
52 and PLGA-NPs constitute versatile vectors for adsorbing and/or encapsulating antigenic peptides and  
53 immunostimulant drugs (8,9). They have been shown to induce immune responses against various  
54 model antigens following parenteral administration in mammals (2,8). Their mucosal administration  
55 has also revealed their ability to cross mucosal barriers, reach some APCs and elicit mucosal immune  
56 responses (6,10–12). However, a detailed understanding of *in vivo* uptake and biodistribution of  
57 polymeric NPs following mucosal administration is still lacking, which has limited their development  
58 as mucosal vaccine vehicles. Here, we analyze if polymeric NPs efficiently cross mucosal barriers  
59 and reach APCs *in vivo*, using surfactant-free 200nm PLA-NPs as a model. PLA-NPs were prepared  
60 without any surfactant, for optimal biocompatibility (13). Because NPs generally become quickly  
61 coated by proteins and factors present in biological media (14), this model is likely representative of  
62 a variety of NPs surface-functionalized with targeting or antigenic proteins.

63 We performed this study in adult zebrafish (*Danio rerio*), a vertebrate model well suited for  
64 analyzing whole-body biodistribution with a cellular level of resolution. Long-time used for  
65 developmental studies, zebrafish has emerged as a powerful new vertebrate model to study disease  
66 and host-pathogen interactions, benefiting from the rising number of available transgenic lines and  
67 molecular markers of immune cell types (15–17). Zebrafish possess the major blood cell lineages  
68 found in mammals, and their adaptive immune system becomes fully competent at juvenile stage  
69 (15,18). The major lymphoid organs of teleosts are the kidney marrow, which is the site of  
70 hematopoiesis, the thymus and the spleen (19). Like other teleosts, zebrafish lack lymph nodes and  
71 display a diffuse lymphoid tissue organization in mucosae (20,21). Zebrafish have 3 classes of  
72 immunoglobulins, M, D and Z (called T in other teleosts), IgZ being the functional equivalent of  
73 mammalian mucosal IgA (22). Professional APCs such as macrophages, dendritic cells (DCs) and B  
74 cells have all been identified in zebrafish, and it was actually in teleosts that the phagocytic ability of  
75 B cells was first recognized (23,24). It is still unclear if fish APCs fulfill similar roles to their  
76 mammalian counterparts in the initiation of adaptive immune responses (23). Yet, DC cells capable  
77 of phagocytosis and T-cell stimulation were identified in zebrafish kidney marrow, and conserved co-

78 stimulatory molecules (CD80/CD86 and CD83) have been detected in T-cell stimulating cells,  
79 further supporting a conservation of dendritic cell function in zebrafish (25–27).

80 Main mucosae of adult zebrafish are found in the gut, gills, skin (a mucosa in teleosts) and nose; their  
81 MALTs are accordingly sub-divided into Gut-, Gill-, Skin- and Nose-Associated Lymphoid Tissues  
82 (GALT, GIALT, SALT and NALT, respectively) (20,22). Most leukocyte types are present in fish  
83 MALTs, including phagocytes (neutrophils, macrophages, DCs and B cells), T cells and plasma cells.  
84 Although their lymphoid tissues are diffuse, zebrafish mucosae share many structural and functional  
85 similarities with mammalian mucosae, which makes zebrafish a relevant model to study the mucosae  
86 of not only farm fish, but also vertebrates in general. For instance, zebrafish gills have been used as a  
87 model of mammalian pulmonary inflammation (28).

88 Here, we used zebrafish to assess the uptake of mucosal vaccines in various tissues. We analyzed the  
89 biodistribution of PLA-NPs administered to adult zebrafish by immersion, a straightforward  
90 administration method targeting gut, gills, skin and nasal mucosae altogether. We show that *in vivo*,  
91 surfactant-free NPs naturally penetrate and cross the mucosal epithelial barriers with high efficiency,  
92 and are specifically accumulated in mucosal APCs, and not in neutrophils. Quantification in the gills  
93 reveals that dendritic cells are the major APC type taking up PLA-NPs, with up to 65% being  
94 detected as positive for NPs. Our results suggest that active targeting strategies are not necessarily  
95 required for efficient uptake of polymeric NPs by mucosal DCs, and further highlight the potential of  
96 PLGA- and PLA-NPs as mucosal vaccine vehicles for applications in aquaculture or human health.

97

## 98 **2 Material and Methods**

### 99 **2.1 Nanoparticle preparation and characterization**

100 PLA-NPs were produced as previously described (10,29). The red CELLTRACE BODIPY TR  
101 METHYL ESTER (<sup>TM</sup>) or green BODIPY 500/510 C4, C9 (<sup>TM</sup>) fluorophores (LIFE  
102 TECHNOLOGIES) were encapsulated using a fluorophore:PLA ratio of 0,04% w/w. The  
103 nanoparticle size and size polydispersity were determined by diffuse light scattering using a Zetasizer  
104 nanoS apparatus (MALVERN INSTRUMENT, UK).

105

### 106 **2.2 Fish stocks, nanoparticle administration and ethic statement**

107 Experiments were performed on wild-type AB/Tubingen zebrafish and transgenic  
108 *Tg(mhc2dab:GFP)sd6*,(26) *Tg(mpeg1:mCherry)gl23* (30), *Tg(mpx:GFP)i114* (31) and  
109 *Tg(fli1:GFP)y1* (32) lines. Adults were individually immersed for 24h at 28°C in 100 mL of fresh  
110 fish facility water, containing 0.01% or 0.05% fluorescent PLA-NPs. The experiments were  
111 conducted in accordance with the animal care guidelines of the European Union and French law and  
112 approved by the local Animal Ethic Evaluation Committee (CECCAPP).

113

### 114 **2.3 Histology**

115 Animals exposed to red NPs were euthanized by tricaine overdose, fixed in 4% PFA for 24h at 4°C,  
116 then immersed in 30% sucrose for several days, embedded in Tissue-Tek O.C.T. Compound

117 (SAKURA FINETEK USA), flash frozen in isopentane, and sectioned using a CM3050 S cryostat  
118 (LEICA). DCs were stained using 1:50 FITC conjugate peanut agglutinin (FITC-PNA) (US  
119 BIOLOGICAL). Macrophage, neutrophil and IgZ<sup>+</sup> were stained using 1:250 rabbit anti-MPEG1,  
120 1:50 rabbit anti-MPX, and 1:500 rabbit anti-IgZ-IN2 antibodies (ANASPEC), respectively, and 1:250  
121 cross-adsorbed goat anti-rabbit secondary antibody (THERMOFISHER), which were either  
122 conjugated to DyLight 488 (for IgZ staining) or to DyLight 633 (for MPX and MPEG-1 stainings).  
123 For double staining, cryosections were saturated with 5% BSA between FITC-PNA and antibody  
124 labeling. No cross staining was observed for PNA/IgZ labelling, while a weak PNA signal could be  
125 detected in a few MPEG<sup>+</sup> macrophages. MPX<sup>+</sup> neutrophils consistently displayed moderate PNA  
126 signal, but distinct from DCs, which displayed high granular intracytoplasmic PNA staining and were  
127 MPX<sup>-</sup>. Cryosections were co-stained with DyLight 488-Phalloidin (THERMOFISHER) and DAPI  
128 (EUROMEDEX), and analyzed using a SP5 upward confocal microscope (LEICA) with 63X/1.4NA  
129 objective and ImageJ.

130

#### 131 **2.4 Flow cytometry**

132 The organs from euthanized animals (exposed to red PLA-NPs) were collected in cold PBS/heparin  
133 (1U/mL)/FBS (2%). Cell suspensions from brain, gill, liver, spleen and kidney were directly  
134 homogenized by passing through a 40  $\mu$ m mesh filter (FISHERBRAND). Skin and gut samples were  
135 dissociated for 8 min in 0.2% porcine trypsin (SIGMA ALDRICH) in Versene solution (LIFE  
136 TECHNOLOGIES) before mesh filtration. Washed cell suspensions were treated with DAPI (2.5  
137  $\mu$ g/mL) to mark dead cells, and processed using a LSRII Flow Cytometer (BD BIOSCIENCES).  
138 Data were analyzed using FlowJo v7.6.5.

139

#### 140 **2.5 Imaging flow cytometry for internalization score**

141 Cell suspensions, prepared as described above, were stained with 1:500 CellMask Green Plasma  
142 Membrane Stain (LIFE TECHNOLOGIES), treated with DAPI (10 $\mu$ g/mL), and analyzed using an  
143 ImageStream<sup>X</sup> Mark II imaging flow cytometer (AMNIS, MILLIPORE) with 63x objective, and  
144 IDEAs software. Cells with NP signal peaking at least 7 folds over background were selected, and  
145 their cytoplasmic area (excluding membrane) was automatically determined based on CellMask  
146 signal. The internalization score, reflecting the ratio of cytoplasmic to total brightness intensity, was  
147 computed for each cell using a built-in IDEAS function. As a negative control for NP internalization,  
148 cell suspensions from unexposed fish were incubated with 0.002% red NPs for 30 minutes at 4°C.

149

#### 150 **2.6 Imaging flow cytometry for quantification of nanoparticle uptake**

151 For macrophages and neutrophils identification, cell suspensions were prepared from gills of  
152 *Tg(mpeg1:mCherry)gl23* or *Tg(mpx:GFP)i114* adults exposed to 0.05% green or red NPs  
153 (respectively); dead cells were marked using DAPI. For DC and IgZ<sup>+</sup> cell staining, cell suspensions  
154 were prepared from gills of wild-type zebrafish exposed to red NPs, marked using 1:1,000  
155 LIVE/DEAD Fixable Violet Dead Cell Stain Kit (THERMOFISHER), and fixed/permeabilized  
156 using 2% PFA/0.1% triton X-100. DCs were stained using 1:2,000 FITC-PNA in absence of FBS.  
157 IgZ<sup>+</sup> cells were stained using 1:2,000 rabbit anti-IgZ (ANASPEC) and 1:2,000 DyLight488 conjugate

158 cross-adsorbed goat anti-rabbit antibodies (THERMOFISHER). Samples were analyzed using  
159 ImageStream<sup>X</sup> (50,000 to 100,000 events per acquisition) and IDEAS software. For DCs gating,  
160 events displaying the highest level of PNA staining were selected, from which cells devoid of an  
161 intracellular PNA signal or presenting a thick capsid (a hallmark of rodlet cells) were excluded.

162

## 163 2.7 Statistical analysis

164 Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6. Normality of samples was tested using  
165 Agostino & Pearson omnibus normality test. For flow cytometry experiments, one-way anova  
166 coupled with Bonferroni multiple comparison *posthoc* analysis was carried on populations that  
167 passed the normality test (gills, skin and kidneys). On populations that failed the normality assay  
168 (Liver), the non-parametric equivalent Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison *posthoc*  
169 analysis was used. For flow imaging experiments, as none of the populations respected the normality,  
170 a one-sided Mann-Whitney test was performed. Significance level is indicated as \* $p < 0.05$ , \*\* $p <$   
171  $0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

172

## 173 3 Results

### 174 3.1 PLA-NP characterization

175 PLA-NPs were produced by nanoprecipitation, a single step process whereby acetone-dissolved PLA  
176 is precipitated into a swirling aqueous phase of water and ethanol, in absence of surfactant. To detect  
177 PLA-NP by fluorescence imaging, red or green fluorescent dyes were encapsulated in NPs, by  
178 mixing the dyes with acetone. For optimal NP biocompatibility, water and acetone solvents were  
179 evaporated in the final product to a residual concentration well below 5,000 ppm, in accordance with  
180 European pharmacopoeia standards. Red and green PLA-NPs displayed mean diameters of 225 nm  
181 and 200 nm, respectively, and were highly homogeneous in size within a batch, as shown by  
182 scanning electron microscopy and by diffuse light scattering indicating a low polydispersity index  
183 (Table 1 and Figure S1). Fluorophore loaded PLA-NPs had a typical zeta potential of -60 mV.

### 184 3.2 PLA nanoparticles are taken up by epithelial cells of all targeted mucosae

185 To study the mucosal uptake of PLA-NPs *in vivo*, we immersed zebrafish for 24h in a bath  
 186 containing 0.01% red NPs. This administration method targets gills, skin, nasal mucosa and gut  
 187 altogether, and involves minimal manipulation that could be stressful to the fish or damaging to the  
 188 tissues; indeed, the treatment did not cause more detectable stress than the transient increase of  
 189 opercular breathing rhythm typically caused by netting and transfer of the fish from one tank to  
 190 another. To determine PLA-NP biodistribution at whole-body level, NP localization was first  
 191 analyzed by histological approaches, using confocal imaging of 40 $\mu$ m-thick longitudinal whole-body  
 192 cryosections. Images were taken within the core of cryosections, which allowed us to avoid the top  
 193 and bottom edges of cryosections where we observed artefactual displacement of PLA-NPs related to  
 194 cryosectioning and slide immersion (Figure S2).

195 We first investigated if PLA-NPs were taken up by epithelial cells of mucosae primarily exposed to  
 196 nanoparticles. In all these tissues, nanoparticles were found in epithelial cells bordering the external  
 197 environment (Figure 1). The gills, which have a gas-exchange function, typically display an  
 198 extremely branched architecture of primary lamellae supporting secondary lamellae, which each  
 199 consist in a network of capillaries sustained by endothelial pillar cells and covered by a non-  
 200 keratinized squamous epithelium. PLA-NPs were detected in the epithelium lining the branchial  
 201 cavity, and more specifically in pavements cells, identified by their typical actin microridges (Figure  
 202 1A). Located just below the gill cavity epithelium, the fish thymus may also be primarily exposed to  
 203 NPs upon immersion administration (33). Indeed, we detected NPs in the outermost layer of  
 204 pharyngeal epithelial cells covering the thymus (Figure 1B). The fish skin, unlike in mammals, is  
 205 considered a mucosa: its outermost layer is made of living and proliferating cells coated with mucus  
 206 and mucosal IgZ/T antibodies (34). The epithelial cells form a stratified non-keratinized epidermis,  
 207 interspersed with pores located over various types of mucus-secretory cells. We detected PLA-NPs  
 208 both in keratinocytes and in goblet cells (Figure 1C). As in mammals, the fish gut displays a single  
 209 epithelial layer mainly composed of brush-bordered enterocytes and mucus-producing goblet cells,  
 210 supported by folds of connective *lamina propria* (35). We detected PLA-NPs in enterocytes  
 211 throughout the intestine (Figure 1 D,E), with a particularity in the post-midgut, where a high  
 212 concentration of NPs was observed in supranuclear vacuoles of so-called specialized enterocytes,  
 213 which were described as a functional equivalent of the antigen-sampling mammalian M-cells (36,37)  
 214 (Figure 1E). NPs were also observed in the nasal mucosa, in cells of the ciliated pseudostratified  
 215 columnar epithelium (Figure 1F). Thus, despite the mucus layer covering mucosal epithelia, PLA-  
 216 NPs reached and were taken up by epithelial cells of all exposed mucosae.

217

### 218 3.3 PLA nanoparticles cross mucosal epithelial barriers and reach mucosal APCs

219 We then analyzed if PLA-NPs were able to cross epithelial barriers to reach mucosal APCs, in  
 220 cryosections. We detected NP accumulations in cells located in the deeper layers of the skin and the  
 221 gills, in the *lamina propria* of the gut, in the lympho-reticular parenchyma of the thymus and in the  
 222 nasal *lamina* (Figure 1). In the post-midgut, nanoparticles were also found translocated at the basal  
 223 boundaries of specialized enterocytes (Figure 1D). A variety of leukocytes, including phagocytes, are  
 224 present in deep epithelial and sub-epithelial areas (20). The pattern of NP accumulations suggested  
 225 that these NP-positive cells could be phagocytes.

226 To identify these cells, we labeled gills and skin cryosections using specific markers, such as MPX  
 227 and MPEG-1, specific markers of neutrophils and macrophages, respectively (30,31). IgZ staining

228 was used to identify cells of the B-cell lineage specialized in mucosae protection, as described in  
229 trout (38). The identification of DCs was performed based on their affinity for peanut-agglutinin  
230 (PNA), a surface marker of live DCs (25). In fixed, permeabilized cryosections, cells with the highest  
231 PNA<sup>+</sup> signal exhibited a granular intracytoplasmic staining and cellular protrusions reminiscent of  
232 dendrites. They displayed a strong MHC class 2 staining in transgenic *mhc2dab:EGFP* fish (Figure  
233 S3), and were negative for MPEG and IgZ stainings (Figure 2), further suggesting that these are  
234 dendritic cells.

235 Following PLA-NP exposure, DCs displayed a strong uptake of NPs in gills (Figures 2A,B), as well  
236 as in skin (Figure 2D). In gills, PLA-NPs were also observed in a number of macrophages (Figure  
237 2B) and less frequently in IgZ<sup>+</sup> cells (Figure 2C). Interestingly, no nanoparticles were detected in  
238 neutrophils (Figure 2A).

239

### 240 **3.4 PLA nanoparticles enter the bloodstream**

241 In addition to their accumulation in APCs, we detected scattered PLA-NPs in the circulatory system,  
242 as seen in blood vessels of the primary lamellae in gills (Figure 1A). Immersion exposure of  
243 transgenic *fli:GFP* adult zebrafish to fluorescent NPs at higher concentrations (0.05%), revealed not  
244 only numerous PLA-NPs in the gill bloodstream (Figure 3), but also NP internalization in endothelial  
245 cells (Figure 3B, B'). Thus, PLA-NPs cross mucosae and enter the bloodstream, suggesting that NPs  
246 may also reach internal organs.

247 Indeed, NP accumulations were observed in liver cells close to sinusoids (Figure 3C). These cells,  
248 which displayed an oblong nucleus distinct from the round shaped nucleus with scattered chromatin  
249 of hepatocytes, may correspond to macrophages or hepatic stellate (Ito) cells(39,40). Nanoparticles  
250 were never detected in brain, spleen or kidney cryosections.

251

### 252 **3.5 PLA nanoparticles penetrate the organism in a dose-dependent manner and reach liver** 253 **and kidney**

254 To quantify the PLA-NP uptake in primary and secondary exposure organs, we performed flow  
255 cytometry on dissociated cells of various candidate organs, which were dissected from fish exposed  
256 for 24h to 0.01 or 0.05% fluorescent NPs by immersion (Figure 4A-C). Consistent with confocal  
257 observations, gills and skin displayed 0.86% and 0.65% NP-positive cells, respectively, following  
258 0.01% NP exposure. A dose-dependent uptake was observed in these organs, among which the  
259 proportion of NP-positive cells tripled (2.5% and 2.1%, respectively), for 0.05% NP exposure.  
260 Quantification of nanoparticle uptake by this approach was, however, not applicable to intestines, due  
261 to the large number of debris corresponding to mucus and intestinal content loaded with  
262 nanoparticles (not shown).

263 Regarding internal organs, flow cytometry analysis corroborated the absence of NP uptake in the  
264 brain and the spleen observed by histology approaches. In kidney, however, a small population of  
265 NP-positive cells was detected by flow cytometry, increasing with NP concentration, but reaching  
266 only 0.16% at the highest NP concentration (Figure 4C). Consistent with histological observations, a  
267 higher mean of 3.5% positive cells was detected by flow cytometry in the liver for 0.01% NP  
268 exposure. Contrary to other organs, the proportion of liver NP-positive cells showed no significant

269 difference between the two PLA-NP concentrations, suggesting that liver capacity may be reached at  
 270 low NP concentration, as least in term of cell number.

271

272 **3.6 PLA nanoparticles are actively internalized and accumulate in kidney cells with myeloid**  
 273 **cell features.**

274 Because flow cytometry does not allow discrimination of true NP internalization events from cases  
 275 where NPs are simply stuck on the plasma membrane, we performed imaging flow cytometry to  
 276 clarify this point. Single cells isolated from fish exposed to 0.05% PLA-NPs displayed a clear  
 277 intracellular NP localization, as revealed by the use of a plasma membrane marker, and illustrated in  
 278 kidney cell suspensions (Figure 5A-B). The signal pattern was different when cells were exposed *in*  
 279 *vitro* to PLA-NPs under conditions that block internalization (4°C), where NPs were seen aside cells  
 280 or stuck on their plasma membrane (Figure 5C). This was quantified by computing internalization  
 281 scores based on a large number of single cells (Figure 5A). Altogether, PLA-NP internalization score  
 282 was 1,000 times higher for cells of NP-exposed fish, than for the 4°C control. These data not only  
 283 validate the consistency of our previous flow cytometry results, but also reveal that PLA-NPs are  
 284 actively taken up in cells of primary and secondary organs, following fish immersion.

285 Interestingly, as for the large gill cells with NP accumulations, the NP-positive kidney cells displayed  
 286 cellular processes reminiscent of dendrites (Figure 5B,D), suggesting that these might be myeloid  
 287 cells and possibly DCs.

288

289 **3.7 Dendritic cells are the major mucosal APCs taking up nanoparticles *in vivo***

290 The spontaneous targeting of PLA-NPs to APCs after mucosal administration (Figure 2) unveiled  
 291 their promising potential as mucosal vaccine vectors. To quantify in a robust manner their tropism for  
 292 phagocytes, we used high-resolution flow microscopy on single cell suspensions from fish exposed  
 293 for 24h to 0.05% fluorescent nanoparticles. This was performed on gills, which are not only easy to  
 294 dissociate, but also represent an organ of high significance for host-pathogen interactions, offering a  
 295 wide area of contact with the environment (41). In these experiments, specific labelling of  
 296 neutrophils and macrophages was achieved using mpx:eGFP and mpeg1:mCherry transgenic fish,  
 297 respectively, while DCs and IgZ<sup>+</sup> cells were identified, based on previous histological results (Figure  
 298 2), as cells with strong granular and intracellular PNA staining, and cells with strong IgZ signal,  
 299 respectively.

300 Phagocytes represented over 25% of all NP-positive cells, although they constitute less than 5% of  
 301 total gill cells (Figure 6A). Of these, DCs were the most abundant nanoparticle-positive phagocytes  
 302 (12.4% of total NP-positive cells) (Figure 6A,G). Macrophages and IgZ<sup>+</sup> cells represented 9.3% and  
 303 3.8% of total NP-positive cells, respectively (Figure 6A, F, H). Moreover, we confirmed the absence  
 304 of nanoparticles detection in neutrophils (Figure 6A, E). The 60-fold enrichment in DC proportion in  
 305 NP-positive cells, compared to their overall proportion among total gill cells, is especially. This ratio  
 306 is to be compared to the 5-fold enrichment for macrophages and 3-fold enrichment for IgZ<sup>+</sup> cells.  
 307 This strong uptake tendency of DCs was additionally evidenced by nanoparticles being detected in  
 308 65% of all DCs (Figure 6B). By contrast, PLA-NPs were detected in only 13.8% and 3.7% of  
 309 macrophages and IgZ<sup>+</sup> cells, respectively.

310 PLA-NPs were not only taken up by many dendritic cells but also present in large amounts in these  
311 cells. Indeed, relative to the average intensity detected for all NP-positive cells, DCs and  
312 macrophages, but not IgZ<sup>+</sup> cells, displayed significantly higher signal (Figure 6C). When a “spot  
313 count” analysis was applied, DCs significantly displayed the highest number of intracellular PLA-NP  
314 spots (on average 5.9 spots/cell), compared to macrophages (on average 2.1 spots/cell) and IgZ<sup>+</sup> cells  
315 (on average 1.9 spots/cell) (figure 6D).

316 Altogether, our results demonstrate that following mucosal administration, surfactant-free PLA-NPs  
317 are not only spontaneously internalized by epithelia, but also efficiently accumulated in mucosal  
318 APCs and especially in DCs, which likely represent crucial target APCs of vaccine approaches.

319

## 320 **4 Discussion**

321 An increasing body of evidence has revealed the potential of biodegradable polymeric nanoparticles  
322 for mucosal immunization. Yet, designing strategies to further enhance their efficacy requires a better  
323 understanding of how polymeric NPs are taken up by mucosae and get distributed in the organism, an  
324 aspect that has been often overlooked in the field at the expense of functional immunization studies.  
325 Here, using adult zebrafish as a vertebrate model organism with a fully mature immune system and  
326 200nm PLA nanoparticles (PLA-NPs) as model NPs, we analyzed if surfactant-free polymeric NPs  
327 are efficiently naturally taken up by mucosae and to what extent they reach dendritic cells, which in  
328 mammals are key professional APCs leading the immune response. Because zebrafish shares many  
329 similarities with higher vertebrates regarding mucosal immunity and tissue organization, and has a  
330 convenient size for whole-body imaging approaches, it can tremendously help the development of  
331 mucosal vaccines not only for fish-farming relevant species, but also for Vertebrates in general. In  
332 this study, zebrafish were immersed for 24h in a bath of fluorophore-loaded PLA-NPs, a simple  
333 administration mode that altogether targets mucosae in gills, gut, skin and nasal cavities. Using an  
334 unbiased histological approach at whole-body level, combined to quantification by flow cytometry  
335 and advanced flow imaging in dissected organs, we showed that PLA-NPs crossed mucosal barriers  
336 of all analyzed mucosae, and accumulated with specifically high efficiency in mucosal APCs, in  
337 particular in DCs. As surfactant-free PLA-NPs are most likely quickly covered by factors present in  
338 immersion water and biological tissues (14), the biodistribution of non-functionalized PLA-NPs that  
339 we describe here may also be indicative of the general tropism of surfactant-free polymeric NPs,  
340 functionalized or not.

341

### 342 **4.1 Surfactant-free PLA-NPs efficiently cross mucosal barriers**

343 At the mucosal level, we observed a conserved pattern whereby PLA-NPs penetrated cells of the  
344 outer epithelial layer and accumulated in phagocytes of deeper layers (Figure 1 and 4). PLA-NPs  
345 were detected in pavement epithelial cells and phagocytes of gills, skin and nose, in accordance with  
346 previous studies that examined the uptake of microspheres, bacteria, or nanoliposomes, in trout and  
347 zebrafish (42–45). PLA-NPs were also found in the epithelium and phagocytes of the nasal mucosa,  
348 which constitutes a promising site for mucosal vaccination in fish and mammals (46,47).  
349 Furthermore, PLA-NPs swallowed during immersion (48) were very efficiently taken up by  
350 enterocytes, which displayed strong and diffuse NP signals in most gut regions, and were detected in  
351 phagocytes of the *lamina propria*, in agreement with other studies that addressed the intestinal uptake  
352 of bacteria, submicron polymeric NPs or proteins (36,49). High amounts of PLA-NPs were also

353 detected in supranuclear vacuoles of post-midgut specialized enterocytes. These cells were shown to  
354 take up foreign material such as proteins, gold nanoparticles or bacteria from the gut *lumen*, and store  
355 it in supranuclear vacuoles, and were suggested to play an antigen-sampling role similar to  
356 mammalian M-cells (37,45,50,51). Supporting this notion, we detected accumulations of PLA-NPs at  
357 the basal side of the specialized enterocyte epithelium (Figure 1D). Although we cannot rule out that  
358 PLA-NP sampling is directly performed in the *lumen* by phagocytes themselves, these observations  
359 confirm that highly efficient antigen uptake takes place in the post-midgut region.

360 Thus, PLA-NPs efficiently cross epithelial barriers of all exposed mucosae. The fate of nanoparticles  
361 taken up by mucosal epithelial cells and phagocytes, and the path taken by nanoparticles from  
362 mucosal surfaces to the blood vessels remain to be investigated, to determine to what extent  
363 phagocytes contribute to this transport and if other transport mechanisms occur in mucosae.

364

### 365 4.2 Surfactant-free PLA-NPs reach a subset of organs with immune-related functions

366 Being positioned in the gill cavities, the zebrafish thymus, which is the primary lymphoid organ for T  
367 lymphocytes development as in upper vertebrates (33), seems primarily exposed to foreign antigens.  
368 As in mucosae, PLA-NPs were detected in the outer layer of epithelial cells covering the thymus and  
369 accumulated in cells of deeper layers, suggesting an intriguing role of the thymus as antigen sampling  
370 organ. This paradox, for an organ that plays a key role in self-nonsel self discrimination, deserves further  
371 study.

372 We furthermore demonstrated that PLA-NPs reach a subset of internal organs. The accumulation  
373 pattern of NPs in liver cells morphologically distinct from hepatocytes suggests that these cells may  
374 be macrophages or hepatic stellate cells, which in mammals not only have the ability to engulf  
375 nanoparticles but were also described as liver-resident professional APCs able to induce potent  
376 immune responses (39,40,52). The possibility that liver NP-accumulating cells may be APCs remains  
377 to be explored. We also identified by flow cytometry the presence of a small amount of PLA-NP  
378 positive cells in kidney, which in teleosts is the main primary lymphoid organ and a site for antigen  
379 presentation and lymphocyte maturation, as well as the niche for antibody producing cells (53).  
380 Imaging flow cytometry on isolated kidney cells revealed the presence of NP-accumulating cells with  
381 processes reminiscent of dendrites, suggesting that NPs might be present in DCs in this organ. The  
382 functional importance of NP presence in thymus, liver and kidneys for immune response remains to  
383 be further investigated. In the spleen, confocal microscopy and flow cytometry did not reveal any  
384 PLA-NP signal above the high intrinsic fluorescence. While PLGA-NPs accumulate in the spleen  
385 shortly after being administered by hyperosmotic gavage, polystyrene beads do not(50). Moreover,  
386 *Yersinia* antigens were detected in the spleen after immersion administration, but not 125nm  
387 nanoliposomes (45,54). Size difference, administration method, and NP composition may strongly  
388 influence particulate carrier uptake by the spleen.

389 The presence of PLA-NPs in spleen and kidney raises questions regarding the path taken by  
390 nanoparticles to reach internal organs. Although we cannot exclude that PLA-NPs diffuse through the  
391 mesenchymal tissue, their detection in gill blood vessels strongly suggests that PLA-NPs were  
392 transported to liver and kidney by the bloodstream. PLA-NPs, which have a hydrodynamic diameter  
393 too large to undergo glomerular clearance (55), may travel freely in the bloodstream or be transported  
394 by APCs.

395 Altogether, the ability of PLA-NPs to penetrate and accumulate in all mucosae and lymphoid organs,  
396 with the exception of the spleen, is promising for mucosal vaccine development. Moreover, the  
397 absence of PLA-NP detection in the brain by flow cytometry suggests that PLA-NPs were not able to  
398 cross the blood-brain barrier, reducing safety concerns for vaccine delivery.

399

#### 400 **4.3 Surfactant-free PLA-NPs efficiently target dendritic cells and other APCs**

401 PLA-NP accumulations were observed in mucosal phagocytes, corresponding to the three  
402 professional classes of APCs: macrophages, B cells and DCs. Surprisingly, we did not observe PLA-  
403 NP uptake in zebrafish neutrophils, which contrasts with reports of PLA-NP uptake by circulating  
404 neutrophils following intravascular injections in guinea pigs or by rat granulocytes *in vitro* (56,57).  
405 This difference may be explained by variations in NP physicochemical characteristics, such as the  
406 amount of surfactant, as polyvinyl alcohol was used for the preparation of the PLA-NPs described in  
407 these reports (56,57). Although we cannot exclude that PLA-NPs are taken up by neutrophils with a  
408 different kinetics than in other APCs, this hypothesis is unlikely, because fish exposure to NPs was  
409 continuous in this protocol. One may also speculate that neutrophils need to be activated (e.g. by  
410 local danger signals associated with the injection) to become able to engulf NPs, but they did not in  
411 zebrafish larvae injected with PLA-NPs (unpublished observations).

412 Instead, we detected NP accumulations in mucosal APCs, which, after 24h of cumulative exposure to  
413 PLA-NPs, represented in gills 25% of all NP-positive cells. Of these NP-positive APCs, half were  
414 macrophages or B cells. The initial dogma that B cells were incapable of phagocytosis *in vivo* was  
415 broken by the finding that teleost B cells are able to engulf and kill pathogens(58). Our results  
416 showing that PLA-NPs are taken up by gill IgZ<sup>+</sup> cells support the phagocytic nature of zebrafish B  
417 cells, in agreement with other studies (18,26). The macrophages function as cleaners of the organism,  
418 performing rapid phagocytosis and neutralization of encountered foreign materials and debris. Less  
419 potent than DCs, they are nevertheless also involved in immune response triggering. Given the great  
420 representation of macrophages and B cells in mucosae (2% and 1%, respectively, in gills), the ability  
421 of these APCs to take up PLA-NPs represents an interesting prospect for the use of particulate NPs in  
422 mucosal vaccines.

423 A major part of NP-positive mucosal APCs, which represented over 10% of all NP-positive cells in  
424 gills, were dendritic cells characterized by the following features: high intracellular and granular  
425 PNA staining (in fixed/permealized tissues), dendritic-like morphology, MHC2 expression, and  
426 absence of both MPEG-1 and MPX expression. Although we cannot dismiss that all dendritic cells  
427 might not share these characteristics, DC quantification in gills was in accordance with the  
428 macrophage/dendritic cell ratio previously described (26). In gills, where DCs represent only a small  
429 population of total cells, over 65% of DCs were positive to PLA-NPs and displayed the highest PLA-  
430 NP accumulations of all APCs, showing the great efficiency of DCs for PLA-NP uptake. Having  
431 unique ability to efficiently prime naïve T cells, mammalian DCs play a key role in orchestrating the  
432 activation and modulation of the adaptive immune response. DCs thus represent a crucial target for  
433 the development of mucosal vaccines, and the high efficiency of PLA-NP uptake by mucosal DCs, in  
434 absence of targeting molecules, makes PLA-NPs vehicles of choice for mucosal vaccine delivery.

435

#### 436 **4.4 Conclusion**

437 Altogether, we show that, in absence of functionalization, surfactant-free polymeric NPs of 200 nm  
438 are able to cross mucous layers and mucosal epithelia, and to be efficiently taken up by DCs. Thus,  
439 for such vehicles, functionalization strategies designed for improving the targeting *per se* of NPs  
440 toward DCs may be less beneficial for vaccine efficiency than other strategies aimed at activating  
441 DCs. Thanks to their versatility for carrying immune-stimulating molecules and antigens, their  
442 biodegradability, their eco-compatibility and, as we show here, their inherent targeting abilities,  
443 polymeric NPs using PLA backbone, represent great prospects for the enhancement of mucosal  
444 vaccine, with potential application in human health and aquaculture.

445

### 446 **Conflict of Interest Statement**

447 BV is co-founder in a company developing the therapeutic use of PLA nanoparticles. The remaining  
448 authors declare no commercial or financial relationships that could be construed as a potential  
449 conflict of interest.

450

### 451 **Author Contributions**

452 JR participated in the conception and design of the study, performed experiments, analyzed data and  
453 drafted the manuscript. ED and DLG participated in the conception and design of the study, assisted  
454 in experiments and data analysis, and wrote the manuscript. ALC performed histology in *fli:GFP*  
455 lines, analyzed data and assisted in drafting the manuscript. JPL generated *mhc2dab:eGFP* samples,  
456 assisted in designing the study and helped revise the manuscript. PB assisted in designing the study  
457 and helped revise the manuscript. BV assisted in the conception and design of the study, revised the  
458 manuscript and provided reagents and lab space. All authors read, critiqued, and approved the final  
459 manuscript.

460

### 461 **Acknowledgements**

462 We thank the AniRA-Cytométrie platform (T. Andrieu and S. Dussurgey), the PLATIM-Microscopie  
463 platform (C. Chamot, C. Lionnet and E. Chatre) and the PRECI fish facility (L. Bernard and R.  
464 Renard) of SFR BioSciences Gerland-Lyon Sud (UMS3444/US8), the Primatiss histology platform  
465 (C. Lethias and N. El Kholti), as well as E. Aleksejeva and B. Fromy for helpful technical advice.

466

### 467 **Funding**

468 This work was supported in part by the European Commission FP7 ADITEC program (HEALTH-  
469 F4-2011-280873), the Era Net HIVERA (HIVNANOVA) and the ANR (grant ANR Fish-RNAVax),  
470 as well as by TEFOR-Investissement d'avenir (ANR-II-INBS-0014).

471

472

473 **References**

- 474 1. Lycke N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nat Rev*  
475 *Immunol* (2012) **12**:592–605. doi:10.1038/nri3251
- 476 2. Pavot V, Rochereau N, Genin C, Verrier B, Paul S. New insights in mucosal vaccine  
477 development. *Vaccine* (2012) **30**:142–54. doi:10.1016/j.vaccine.2011.11.003
- 478 3. Irvine DJ, Hanson MC, Rakhra K, Tokatlian T. Synthetic Nanoparticles for Vaccines and  
479 Immunotherapy. *Chem Rev* (2015) **115**:11109–11146. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00109
- 480 4. Irvine DJ, Hanson MC, Rakhra K, Tokatlian T. Synthetic Nanoparticles for Vaccines and  
481 Immunotherapy. *Chem Rev* (2015) **115**:11109–11146. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00109
- 482 5. Pavot V, Berthet M, Rességuier J, Legaz S, Handké N, Gilbert SC, Paul S, Verrier B.  
483 Poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) particles as versatile carrier platforms for  
484 vaccine delivery. *Nanomedicine (Lond)* (2014) **9**:2703–18. doi:10.2217/nnm.14.156
- 485 6. Sharma R, Agrawal U, Mody N, Vyas SP. Polymer nanotechnology based approaches in  
486 mucosal vaccine delivery: Challenges and opportunities. *Biotechnol Adv* (2015) **33**:64–79.  
487 doi:10.1016/j.biotechadv.2014.12.004
- 488 7. Tyler B, Gullotti D, Mangraviti A, Utsuki T, Brem H. Polylactic acid (PLA) controlled  
489 delivery carriers for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* (2016)  
490 doi:10.1016/j.addr.2016.06.018
- 491 8. Gutjahr A, Phelip C, Coolen A-L, Monge C, Boisgard A-S, Paul S, Verrier B. Biodegradable  
492 Polymeric Nanoparticles-Based Vaccine Adjuvants for Lymph Nodes Targeting. *Vaccines*  
493 (2016) **4**:34. doi:10.3390/vaccines4040034
- 494 9. Ji J, Torrealba D, Ruyra À, Roher N. Nanodelivery Systems as New Tools for  
495 Immunostimulant or Vaccine Administration: Targeting the Fish Immune System. *Biology*  
496 (*Basel*) (2015) **4**:664–96. doi:10.3390/biology4040664
- 497 10. Primard C, Rochereau N, Luciani E, Genin C, Delair T, Paul S, Verrier B. Traffic of  
498 poly(lactic acid) nanoparticulate vaccine vehicle from intestinal mucus to sub-epithelial  
499 immune competent cells. *Biomaterials* (2010) **31**:6060–8.  
500 doi:10.1016/j.biomaterials.2010.04.021
- 501 11. Pavot V, Climent N, Rochereau N, Garcia F, Genin C, Tiraby G, Vernejoul F, Perouzel E,  
502 Lioux T, Verrier B, et al. Directing vaccine immune responses to mucosa by nanosized  
503 particulate carriers encapsulating NOD ligands. *Biomaterials* (2016) **75**:327–339.  
504 doi:10.1016/j.biomaterials.2015.10.034
- 505 12. Dubey S, Avadhani K, Mutalik S, Sivadasan S, Maiti B, Paul J, Girisha S, Venugopal M,  
506 Mutoloki S, Evensen Ø, et al. *Aeromonas hydrophila* OmpW PLGA Nanoparticle Oral  
507 Vaccine Shows a Dose-Dependent Protective Immunity in Rohu (*Labeo rohita*). *Vaccines*  
508 (2016) **4**:21. doi:10.3390/vaccines4020021
- 509 13. Grabowski N, Hillaireau H, Vergnaud J, Tsapis N, Pallardy M, Kerdine-Römer S, Fattal E.

- 510 Surface coating mediates the toxicity of polymeric nanoparticles towards human-like  
511 macrophages. *Int J Pharm* (2015) **482**:75–83. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.11.042
- 512 14. Docter D, Westmeier D, Markiewicz M, Stolte S, Knauer SK, Stauber RH. The nanoparticle  
513 biomolecule corona: lessons learned - challenge accepted? *Chem Soc Rev* (2015) **44**:6094–  
514 121. doi:10.1039/c5cs00217f
- 515 15. Stachura DL, Traver D. Chapter 2 – Cellular dissection of zebrafish hematopoiesis. *Methods*  
516 *Cell Biol* (2016) **133**:11–53. doi:10.1016/bs.mcb.2016.03.022
- 517 16. Levraud J-P, Palha N, Langevin C, Boudinot P. Through the looking glass: witnessing host-  
518 virus interplay in zebrafish. *Trends Microbiol* (2014) **22**:490–7. doi:10.1016/j.tim.2014.04.014
- 519 17. Palha N, Guivel-Benhassine F, Briolat V, Lutfalla G, Sourisseau M, Ellett F, Wang C-H,  
520 Lieschke GJ, Herbomel P, Schwartz O, et al. Real-time whole-body visualization of  
521 Chikungunya Virus infection and host interferon response in zebrafish. *PLoS Pathog* (2013)  
522 **9**:e1003619. doi:10.1371/journal.ppat.1003619
- 523 18. Page DM, Wittamer V, Bertrand JY, Lewis KL, Pratt DN, Delgado N, Schale SE, McGue C,  
524 Jacobsen BH, Doty A, et al. An evolutionarily conserved program of B-cell development and  
525 activation in zebrafish. *Blood* (2013) **122**:e1-11. doi:10.1182/blood-2012-12-471029
- 526 19. Uribe C, Folch H, Enriquez R, Moran G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a  
527 review. *Vet Med (Praha)* **56**:2011–486.
- 528 20. Parra D, Reyes-Lopez FE, Tort L. Mucosal Immunity and B Cells in Teleosts: Effect of  
529 Vaccination and Stress. *Front Immunol* (2015) **6**:354. doi:10.3389/fimmu.2015.00354
- 530 21. Munang'andu HM, Mutoloki S, Evensen Ø. An Overview of Challenges Limiting the Design  
531 of Protective Mucosal Vaccines for Finfish. *Front Immunol* (2015) **6**:542.  
532 doi:10.3389/fimmu.2015.00542
- 533 22. Salinas I, Zhang Y-A, Sunyer JO. Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Dev*  
534 *Comp Immunol* (2011) **35**:1346–65. doi:10.1016/j.dci.2011.11.009
- 535 23. Lewis KL, Del Cid N, Traver D. Perspectives on antigen presenting cells in zebrafish. *Dev*  
536 *Comp Immunol* (2014) **46**:63–73. doi:10.1016/j.dci.2014.03.010
- 537 24. Sunyer JO. Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system. *Nat Immunol*  
538 (2013) **14**:320–6. doi:10.1038/ni.2549
- 539 25. Lugo-Villarino G, Balla KM, Stachura DL, Bañuelos K, Werneck MBF, Traver D.  
540 Identification of dendritic antigen-presenting cells in the zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A*  
541 (2010) **107**:15850–5. doi:10.1073/pnas.1000494107
- 542 26. Wittamer V, Bertrand JY, Gutschow PW, Traver D. Characterization of the mononuclear  
543 phagocyte system in zebrafish. *Blood* (2011) **117**:7126–35. doi:10.1182/blood-2010-11-  
544 321448
- 545 27. Shao T, Zhu L-Y, Nie L, Shi W, Dong W-R, Xiang L-X, Shao J-Z. Characterization of surface

- 546 phenotypic molecules of teleost dendritic cells. (2015). doi:10.1016/j.dci.2014.11.010
- 547 28. Progzatzky F, Cook HT, Lamb JR, Bugeon L, Dallman MJ. Mucosal inflammation at the  
548 respiratory interface: a zebrafish model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2016)  
549 **310**:L551-61. doi:10.1152/ajplung.00323.2015
- 550 29. Lamalle-Bernard D, Munier S, Compagnon C, Charles M-H, Kalyanaraman VS, Delair T,  
551 Verrier B, Ataman-Onal Y. Coadsorption of HIV-1 p24 and gp120 proteins to surfactant-free  
552 anionic PLA nanoparticles preserves antigenicity and immunogenicity. *J Control Release*  
553 (2006) **115**:57–67. doi:10.1016/j.jconrel.2006.07.006
- 554 30. Ellett F, Pase L, Hayman JW, Andrianopoulos A, Lieschke GJ. mpeg1 promoter transgenes  
555 direct macrophage-lineage expression in zebrafish. *Blood* (2011) **117**:e49-56.  
556 doi:10.1182/blood-2010-10-314120
- 557 31. Renshaw SA, Loynes CA, Trushell DMI, Elworthy S, Ingham PW, Whyte MKB. A transgenic  
558 zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood* (2006) **108**:3976–8. doi:10.1182/blood-  
559 2006-05-024075
- 560 32. Lawson ND, Weinstein BM. In Vivo Imaging of Embryonic Vascular Development Using  
561 Transgenic Zebrafish. *Dev Biol* (2002) **248**:307–318. doi:10.1006/dbio.2002.0711
- 562 33. Bowden TJ, Cook P, Rombout JHWM. Development and function of the thymus in teleosts.  
563 *Fish Shellfish Immunol* (2005) **19**:413–427. doi:10.1016/j.fsi.2005.02.003
- 564 34. Xu Z, Parra D, Gómez D, Salinas I, Zhang Y-A, von Gersdorff Jørgensen L, Heinecke RD,  
565 Buchmann K, LaPatra S, Sunyer JO. Teleost skin, an ancient mucosal surface that elicits gut-  
566 like immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013) **110**:13097–102.  
567 doi:10.1073/pnas.1304319110
- 568 35. Wallace KN, Akhter S, Smith EM, Lorent K, Pack M. Intestinal growth and differentiation in  
569 zebrafish. *Mech Dev* (2005) **122**:157–73. doi:10.1016/j.mod.2004.10.009
- 570 36. Rombout JH, Lamers CH, Helfrich MH, Dekker A, Taverne-Thiele JJ. Uptake and transport of  
571 intact macromolecules in the intestinal epithelium of carp (*Cyprinus carpio* L.) and the  
572 possible immunological implications. *Cell Tissue Res* (1985) **239**:519–30. Available at:  
573 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3986879> [Accessed September 6, 2016]
- 574 37. Fuglem B, Jirillo E, Bjerås I, Kiyono H, Nochi T, Yuki Y, Raida M, Fischer U, Koppang EO.  
575 Antigen-sampling cells in the salmonid intestinal epithelium. *Dev Comp Immunol* (2010)  
576 **34**:768–74. doi:10.1016/j.dci.2010.02.007
- 577 38. Xu Z, Takizawa F, Parra D, Gómez D, von Gersdorff Jørgensen L, LaPatra SE, Sunyer JO.  
578 Mucosal immunoglobulins at respiratory surfaces mark an ancient association that predates the  
579 emergence of tetrapods. *Nat Commun* (2016) **7**:10728. doi:10.1038/ncomms10728
- 580 39. Zhang Z, Wang C, Zha Y, Hu W, Gao Z, Zang Y, Chen J, Zhang J, Dong L. Corona-directed  
581 nucleic acid delivery into hepatic stellate cells for liver fibrosis therapy. *ACS Nano* (2015)  
582 **9**:2405–19. doi:10.1021/nn505166x

- 583 40. Duong HTT, Dong Z, Su L, Boyer C, George J, Davis TP, Wang J. The use of nanoparticles to  
584 deliver nitric oxide to hepatic stellate cells for treating liver fibrosis and portal hypertension.  
585 *Small* (2015) **11**:2291–304. doi:10.1002/sml.201402870
- 586 41. Austbø L, Aas IB, König M, Weli SC, Syed M, Falk K, Koppang EO. Transcriptional  
587 response of immune genes in gills and the interbranchial lymphoid tissue of Atlantic salmon  
588 challenged with infectious salmon anaemia virus. *Dev Comp Immunol* (2014) **45**:107–114.  
589 doi:10.1016/j.dci.2014.02.007
- 590 42. MOORE JD, OTOTAKE M, NAKANISHI T. Particulate antigen uptake during immersion  
591 immunisation of fish: The effectiveness of prolonged exposure and the roles of skin and gill.  
592 *Fish Shellfish Immunol* (1998) **8**:393–408. doi:10.1006/fsim.1998.0143
- 593 43. Zapata AG, Torroba M, Alvarez F, Anderson DP, Dixon OW, Wisniewski M. Electron  
594 microscopic examination of antigen uptake by salmonid gill cells after bath immunization with  
595 a bacterin. *J Fish Biol* (1987) **31**:209–217. doi:10.1111/j.1095-8649.1987.tb05315.x
- 596 44. Khimmakthong U, Deshmukh S, Chettri JK, Bojesen AM, Kania PW, Dalsgaard I, Buchmann  
597 K. Tissue specific uptake of inactivated and live *Yersinia ruckeri* in rainbow trout  
598 (*Oncorhynchus mykiss*): Visualization by immunohistochemistry and in situ hybridization.  
599 *Microb Pathog* (2013) **59**:33–41. doi:10.1016/j.micpath.2013.03.001
- 600 45. Korbut R, Mehrdana F, Kania PW, Larsen MH, Frees D, Dalsgaard I, Jørgensen L von G.  
601 Antigen Uptake during Different Life Stages of Zebrafish (*Danio rerio*) Using a GFP-Tagged  
602 *Yersinia ruckeri*. *PLoS One* (2016) **11**:e0158968. doi:10.1371/journal.pone.0158968
- 603 46. Phua KKL, Staats HF, Leong KW, Nair SK. Intranasal mRNA nanoparticle vaccination  
604 induces prophylactic and therapeutic anti-tumor immunity. *Sci Rep* (2014) **4**:5128.  
605 doi:10.1038/srep05128
- 606 47. LaPatra S, Kao S, Erhardt EB, Salinas I. Evaluation of dual nasal delivery of infectious  
607 hematopoietic necrosis virus and enteric red mouth vaccines in rainbow trout (*Oncorhynchus*  
608 *mykiss*). *Vaccine* (2015) **33**:771–776. doi:10.1016/j.vaccine.2014.12.055
- 609 48. Robohm RA, Koch RA. Evidence for oral ingestion as the principal route of antigen entry in  
610 bath-immunized fish. *Fish Shellfish Immunol* (1995) **5**:137–150. doi:10.1016/S1050-  
611 4648(05)80023-3
- 612 49. Løvmo SD, Speth MT, Repnik U, Koppang EO, Griffiths GW, Hildahl JP. Translocation of  
613 nanoparticles and *Mycobacterium marinum* across the intestinal epithelium in zebrafish and  
614 the role of the mucosal immune system. *Dev Comp Immunol* (2016)  
615 doi:10.1016/j.dci.2016.06.016
- 616 50. Løvmo SD, Speth MT, Repnik U, Koppang EO, Griffiths GW, Hildahl JP. Translocation of  
617 nanoparticles and *Mycobacterium marinum* across the intestinal epithelium in zebrafish and  
618 the role of the mucosal immune system. *Dev Comp Immunol* (2016)  
619 doi:10.1016/j.dci.2016.06.016
- 620 51. Rombout JH, Lamers CH, Helfrich MH, Dekker A, Taverne-Thiele JJ. Uptake and transport of  
621 intact macromolecules in the intestinal epithelium of carp (*Cyprinus carpio* L.) and the

- 622 possible immunological implications. *Cell Tissue Res* (1985) **239**:519–30. Available at:  
623 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3986879> [Accessed July 28, 2016]
- 624 52. Winau F, Hegasy G, Weiskirchen R, Weber S, Cassan C, Sieling PA, Modlin RL, Liblau RS,  
625 Gressner AM, Kaufmann SHE, et al. Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for  
626 activating T cell responses. *Immunity* (2007) **26**:117–29. doi:10.1016/j.immuni.2006.11.011
- 627 53. Bromage ES, Kaattari IM, Zwollo P, Kaattari SL. Plasmablast and plasma cell production and  
628 distribution in trout immune tissues. *J Immunol* (2004) **173**:7317–23. Available at:  
629 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15585855> [Accessed September 22, 2016]
- 630 54. Ruyra A, Cano-Sarabia M, García-Valtanen P, Yero D, Gibert I, Mackenzie SA, Estepa A,  
631 Maspoch D, Roher N. Targeting and stimulation of the zebrafish (*Danio rerio*) innate immune  
632 system with LPS/dsRNA-loaded nanoliposomes. *Vaccine* (2014) **32**:3955–62.  
633 doi:10.1016/j.vaccine.2014.05.010
- 634 55. Longmire M, Choyke PL, Kobayashi H. Clearance properties of nano-sized particles and  
635 molecules as imaging agents: considerations and caveats. *Nanomedicine (Lond)* (2008) **3**:703–  
636 17. doi:10.2217/17435889.3.5.703
- 637 56. Zambaux M-F, Faivre-Fiorina B, Bonneaux F, Marchal S, Merlin J-L, Dellacherie E, Labrude  
638 P, Vigneron C. Involvement of neutrophilic granulocytes in the uptake of biodegradable non-  
639 stealth and stealth nanoparticles in guinea pig. *Biomaterials* (2000) **21**:975–980.  
640 doi:10.1016/S0142-9612(99)00233-1
- 641 57. Mainardes RM, Gremião MPD, Brunetti IL, da Fonseca LM, Khalil NM. Zidovudine-loaded  
642 PLA and PLA-PEG blend nanoparticles: influence of polymer type on phagocytic uptake by  
643 polymorphonuclear cells. *J Pharm Sci* (2009) **98**:257–67. doi:10.1002/jps.21406
- 644 58. Li J, Barreda DR, Zhang Y-A, Boshra H, Gelman AE, Lapatra S, Tort L, Sunyer JO. B  
645 lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nat*  
646 *Immunol* (2006) **7**:1116–24. doi:10.1038/ni1389

647

648

649

650

651

652

653

654

655

656 **Figure legends**

657 **Figure 1: Biodistribution of PLA-NPs in mucosae and thymus.** Representative confocal images of  
 658 gills (A), thymus (B), skin (C), intestines (D, E), and the olfactory mucosa (F), of wild-type adults  
 659 immersed for 24h in 0.01% red fluorescent NPs. Images were acquired in 40  $\mu\text{m}$ -thick whole-body  
 660 cryosections, stained with phalloidin (green) and DAPI (blue). **A:** In gills, NPs are found in pavement  
 661 cells lining the branchial cavity (arrowheads), accumulated in cells located in the sub-epithelial  
 662 compartment (stars), and detected in the blood (arrow). **B:** NPs are located in pavement cells lining  
 663 the branchial cavity above the thymus (arrowheads) and accumulated in cells of the lympho-reticular  
 664 parenchyma in the thymus (stars). **C:** In skin, NPs are visible in keratinocytes (arrowhead), goblet  
 665 cells (characterized by kidney-shaped nucleus, arrow) and accumulated in intra-epithelial cells (star).  
 666 **D,E:** In the intestine, a high number of NPs is found inside the intestinal *lumen* (D). As illustrated in  
 667 the end-gut (D), NPs are taken up by enterocytes (arrowheads), which display a diffuse signal. A  
 668 number of NPs is also observed in sub-epithelial cells (stars). In the post-midgut (E), NPs are mainly  
 669 found in apical areas of specialized enterocytes (arrowheads); a subset is also found at the basal  
 670 epithelial side (arrows). **F:** In the nasal mucosa, NP-positive cells are found in the olfactory  
 671 epithelium (arrowhead) and the *lamina* (arrows). NPs are accumulated in large cells of the *lamina*  
 672 (stars). B (Blood vessels), pL (Primary lamellae), sL (Secondary lamellae), Bc (Branchial cavity), Rc  
 673 (Rodlet cells), E (Epidermis), D (Dermis), Ext (External environment), Lu (*Lumen*), Ep (Epithelium),  
 674 Lp (*Lamina Propria*), Sm (Smooth muscles), Lrp (Lympho-reticular parenchyma), La (*Lamina*).  
 675 Scale bar: 10  $\mu\text{m}$  (B, E), 20  $\mu\text{m}$  (A, C, F), 30  $\mu\text{m}$  (D).

676

677 **Figure 2: PLA-NPs are accumulated in mucosal APCs. A-D:** Representative confocal images of  
 678 gills (A-C) and skin (D) of wild-type adults immersed for 24h in 0.01% fluorescent PLA-NPs (red).  
 679 Images were acquired from 40  $\mu\text{m}$ -thick whole-body cryosections, stained for neutrophils (MPX-  
 680 positive, cyan) (A), macrophages (MPEG1-positive, cyan) (B), IgZ<sup>+</sup> B-cells (green) (C) and DCs  
 681 (PNA, green) (A, B, D), in addition to nuclei (DAPI, blue). Maximal intensity projections from 3 (A-  
 682 C) or 5 (D) optic sections acquired every  $\mu\text{m}$ . NP accumulations are observed in gill DCs (A, B,  
 683 arrows), macrophages (B, star) and IgZ<sup>+</sup> cells (C, arrow), while no nanoparticle are detected in  
 684 neutrophils (A, stars). NPs are also taken up by a network of skin DCs (D, arrows). pL (primary  
 685 Lamellae), sL (secondary Lamellae), Bc (Branchial cavity), B (Blood), C (Cartilage), Ext (External  
 686 environment), E (Epidermis). Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ .

687

688 **Figure 3: Nanoparticles reach the circulatory system and the liver. A-B':** Representative  
 689 confocal images of gills from transgenic *fli:GFP* adults bathed for 24h in 0.05% red fluorescent  
 690 nanoparticles. Images were acquired in 40  $\mu\text{m}$ -thick whole-body cryosections, stained with DAPI  
 691 (blue in A). NPs are found in the *lumen* of gill arch (A) and gill filament (B) blood vessels, which are  
 692 delimited by green endothelial cells. Nanoparticles were also detected inside endothelial cells (arrow  
 693 in B). **B':** These observations are confirmed by the orthogonal view realized in the area between the  
 694 two dotted lines in B. **C:** Representative confocal image of the liver of wild-type adults exposed to  
 695 0.01% red fluorescent nanoparticles. Images were acquired in 40  $\mu\text{m}$ -thick whole-body cryosections,  
 696 stained with phalloidin (green) and DAPI (blue). Nanoparticles are highly concentrated in cells close  
 697 to sinusoids (s) and displaying an oblong nucleus (arrows). pL (Primary lamellae), sL (Secondary  
 698 lamellae), Bc (Branchial cavity), B (Blood vessel), Ga (Gill arch), C (Cartilage), Hp (Hepatocytes).  
 699 Scale bar: 10  $\mu\text{m}$  (B-B'), 20  $\mu\text{m}$  (A, C).

700

701 **Figure 4: Quantitative analysis of PLA-NP uptake in primary and secondary exposure organs.**  
 702 **A:** Flow cytometry analysis of NP uptake in gills, skin, kidney, liver, brain and spleen, following  
 703 exposure to 0.01% or 0.05% red fluorescent NPs. Histograms represent the mean percentage of  
 704 positive cells for each organ. While no NP uptake was detected in brain and spleen, PLA-NPs  
 705 significantly penetrated all other organs in a dose dependent manner, except for the liver where no  
 706 significant fluctuation was observed. **B, C:** Representative biparametric representations of  
 707 nanoparticle uptake in gills (**B**) and whole-kidney marrow (**C**). Nanoparticle-positive cells are mainly  
 708 found among FSC-high cells. Error bars: Standard error of the mean. Significance level is indicated  
 709 as: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Number of fish per condition (Control /  
 710 0.01% / 0.05%): gills (9 / 13 / 9), skin (9 / 13 / 9), kidneys (12 / 12 / 12), liver (12 / 12 / 12), brain (6 /  
 711 6 / 6) and spleen (6 / 6 / 6).

712

713 **Figure 5: Active NP internalization in cells of mucosae, kidneys and liver.** **A:** NP internalization  
 714 score, assessed by imaging in flow, in dissected organs from adult zebrafish exposed to 0.05% red  
 715 fluorescent nanoparticles (red histograms). As a negative control for internalization (blue  
 716 histograms), PLA-NPs were added at 4°C just before acquisition on the cell suspension from fish  
 717 unexposed to NP. Whereas most nanoparticles are found at or outside the cell membrane in the  
 718 negative controls (internalization scores  $< -1$ ), a high majority of nanoparticles is detected inside the  
 719 cells of NP treated fish (internalization scores  $> 2$ ) in all analyzed organs. **B-D:** Representative  
 720 images of nanoparticles in kidney (**B, C**) or gill (**D**) cell suspensions, from NP-exposed fish (**B, D**) or  
 721 control conditions (**C**), which display membrane processes reminiscent of dendrites. Total number of  
 722 analyzed cells (NP 0.05% / 4°C control): Gills (3 independent acquisitions) 1312 / 4355, Skin (2  
 723 independent acquisitions) 345 / 4185, Liver (2 independent acquisitions) 1431 / 2651, Kidney (1  
 724 acquisition) 117 / 3180. One fish per acquisition. Error bars: Standard deviation.

725

726 **Figure 6: High uptake of PLA-NPs by mucosal DCs.** **A-D:** Quantification by imaging flow  
 727 cytometry of the nanoparticle uptake by gill phagocytes from adult zebrafish, previously immersed  
 728 for 24h in 0.05% nanoparticles. For each cell type, results from at least 3 independent acquisitions  
 729 are represented as dots; histograms indicate the mean. Neutrophils and macrophages were labeled by  
 730 GFP and mCherry expression in transgenic *mpx:GFP* and *mpeg1:mCherry* fish, respectively (1 fish  
 731 per acquisition). DCs and IgZ<sup>+</sup> B-cells were identified based on high intracellular and granular  
 732 FITC-PNA staining and intracellular IgZ staining, respectively (2 fishes per acquisition). **A:**  
 733 Percentage of NP-positive cells, for each phagocyte type, relative to the total number of cells (left) or  
 734 of NP-positive cells (right). APCs, which represent less than 4% of total cells in gills, represent over  
 735 25% of NP-positive cells altogether, among which DCs show the most important enrichment. **B:**  
 736 Percentage of NP-positive cells within each cell type. A high majority of DCs are positive to PLA-  
 737 NPs. **C:** Nanoparticle signal intensity per cell relative to the mean fluorescence of all NP-positive  
 738 cells. DCs and macrophages internalize more nanoparticles than average. **D:** Nanoparticle signal spot  
 739 count per cell. DCs display more signal *foci* than average. **E-H:** Representative images of neutrophils  
 740 (**E**), and NP-positive macrophages (**F**), DCs (**G**) and IgZ<sup>+</sup> cells (**H**). Error bars: Standard deviation.  
 741 Significance level is indicated as: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

742

743 **Table 1: Nanoparticle characteristics**

744

Nanoparticle	Fluorophore	Mean diameter (nm)	Polydispersity index
Red fluorescent - PLA	CellTrace BODIPY TR methyl ester	$225.4 \pm 4.6$	$0.04 \pm 0.01$
Green fluorescent - PLA	BODIPY 500/510 C4,C9	$199.9 \pm 2.5$	$0.05 \pm 0.01$

745

In review

Figure 1.TIF

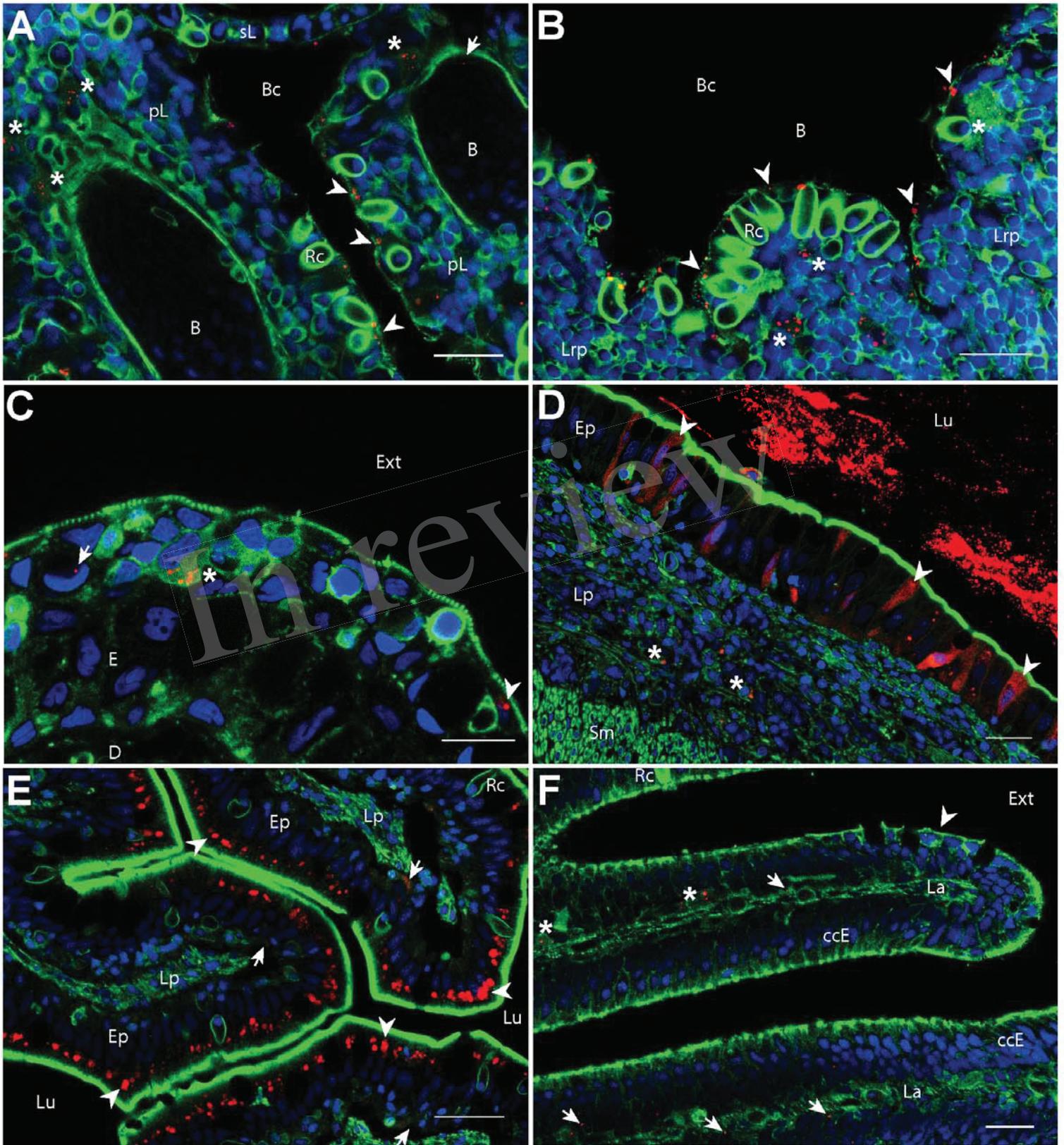


Figure 2.TIF

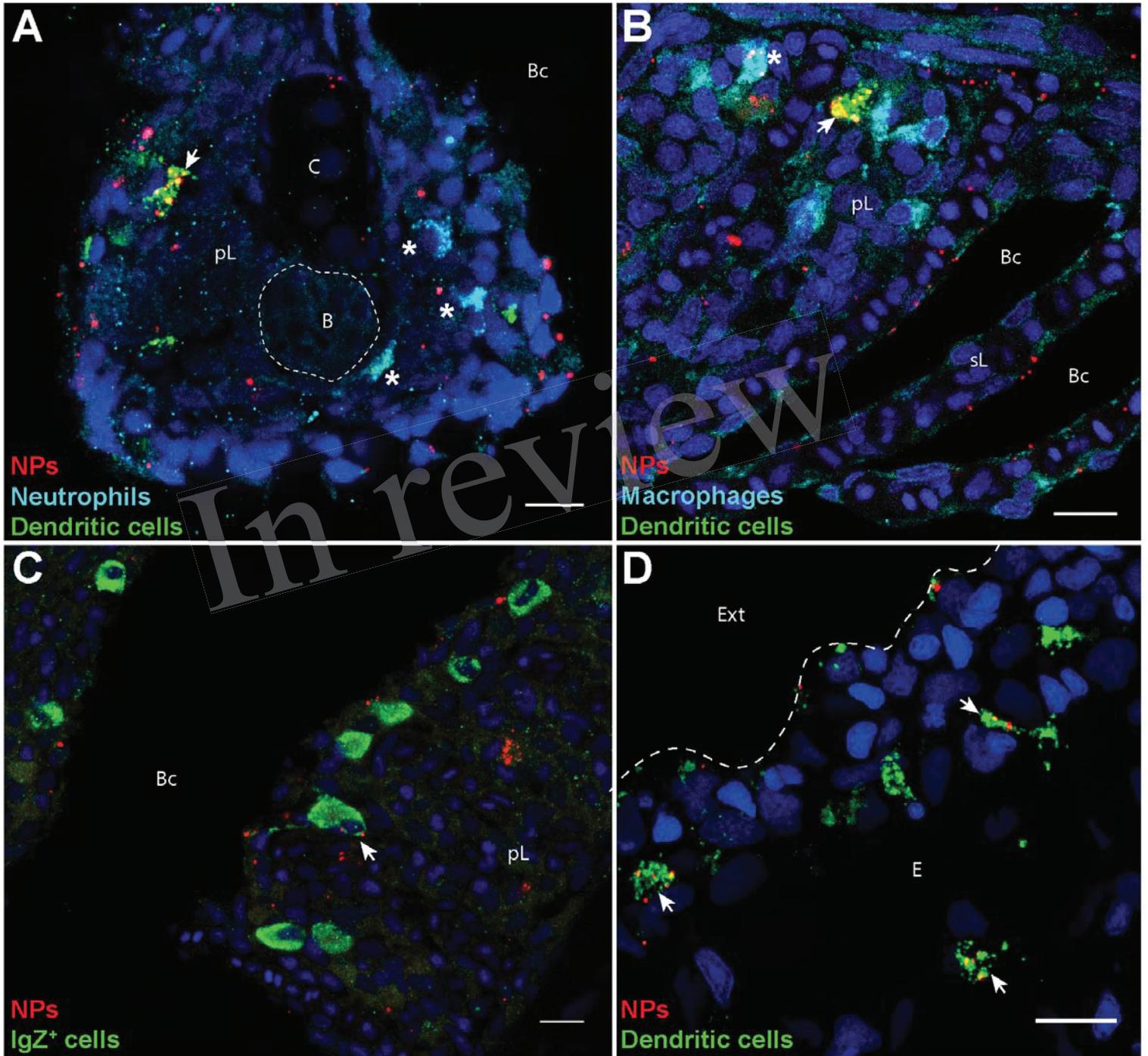


Figure 3.TIF

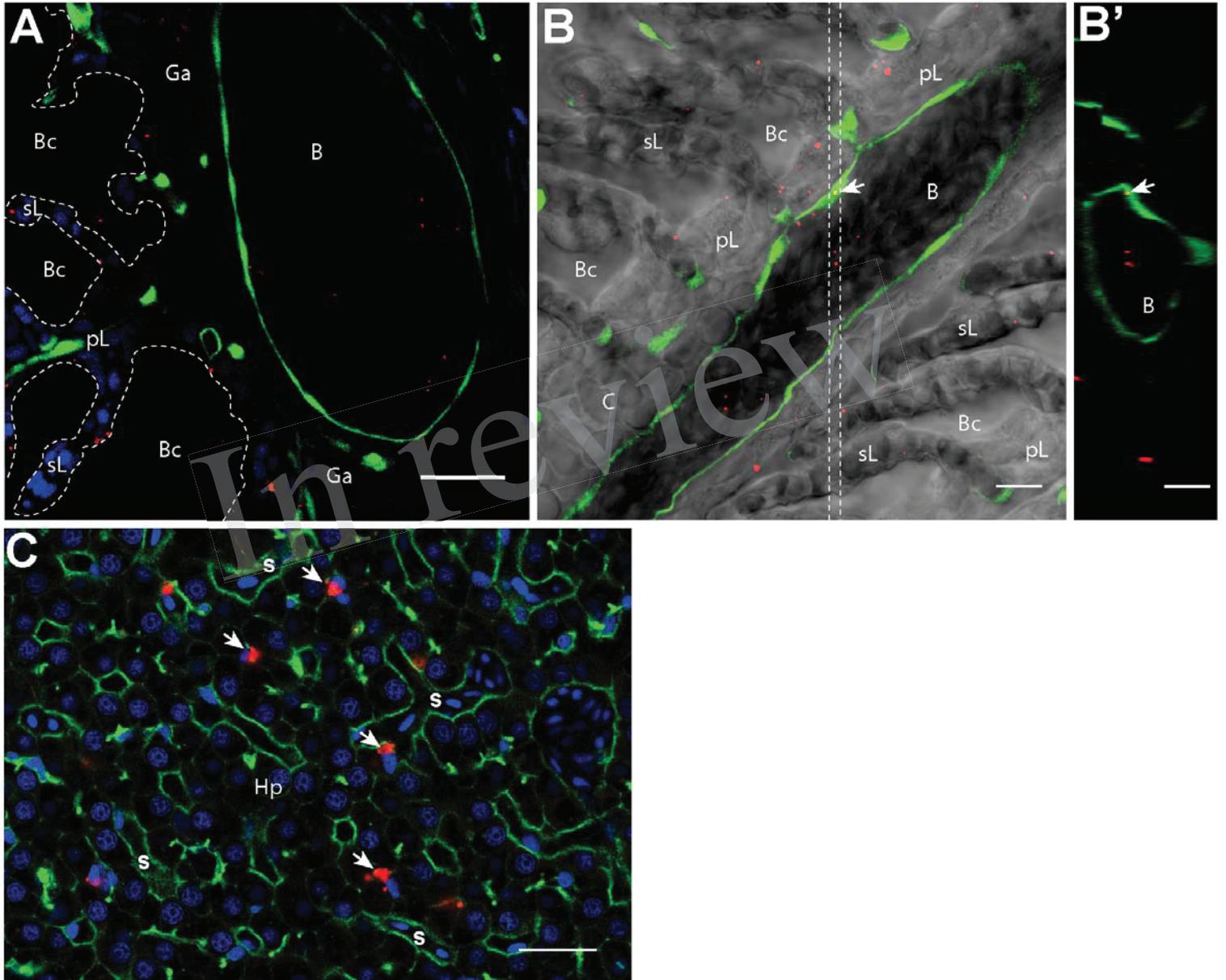


Figure 4.TIF

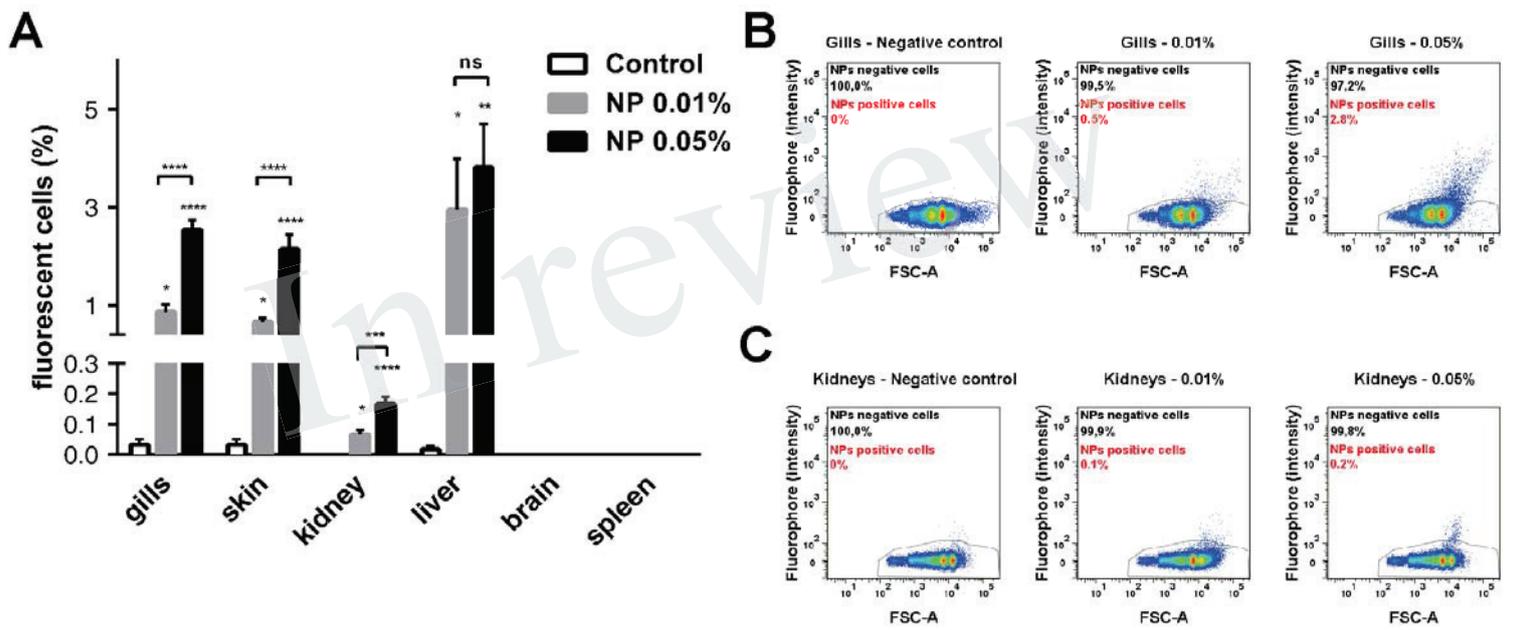


Figure 5.TIF

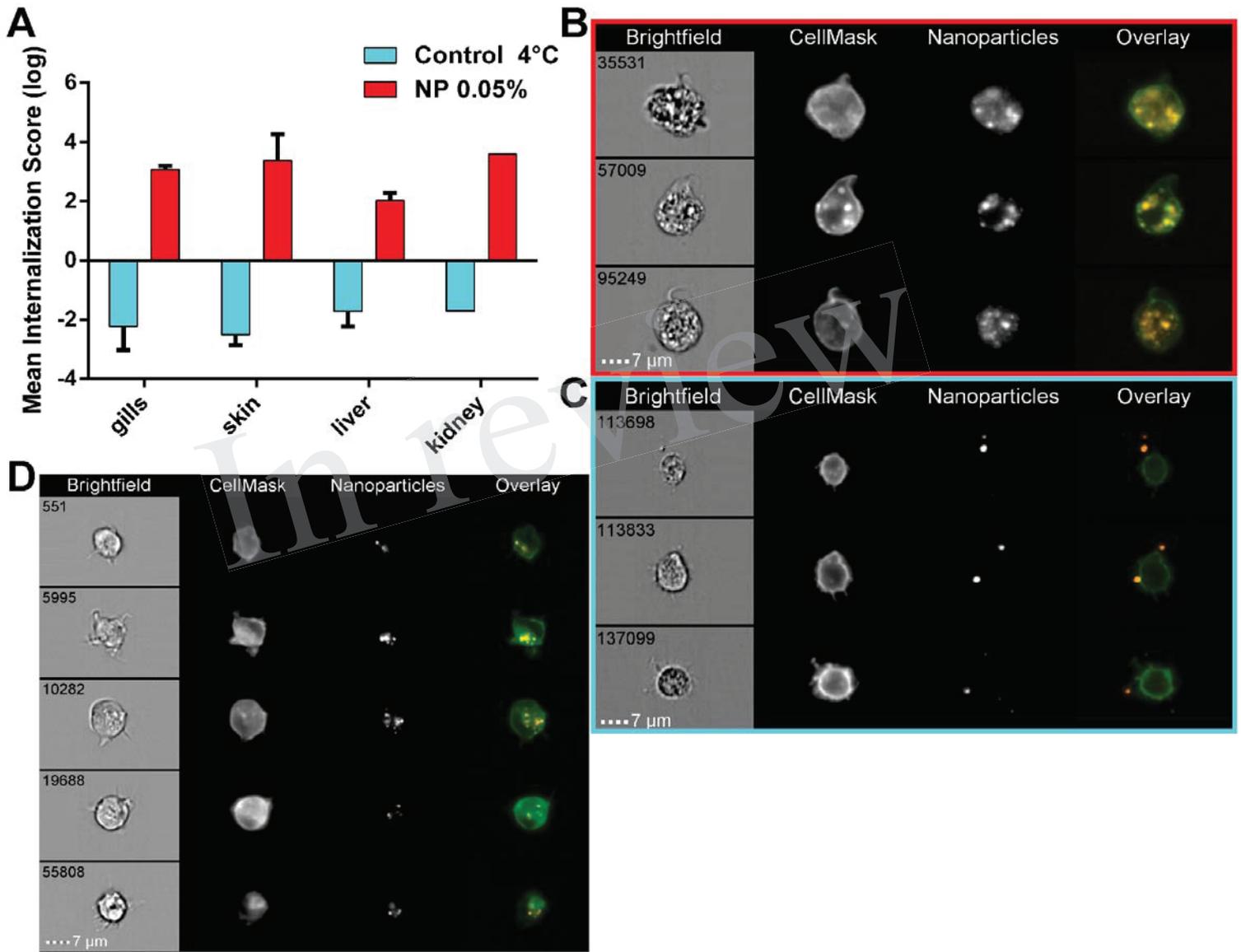
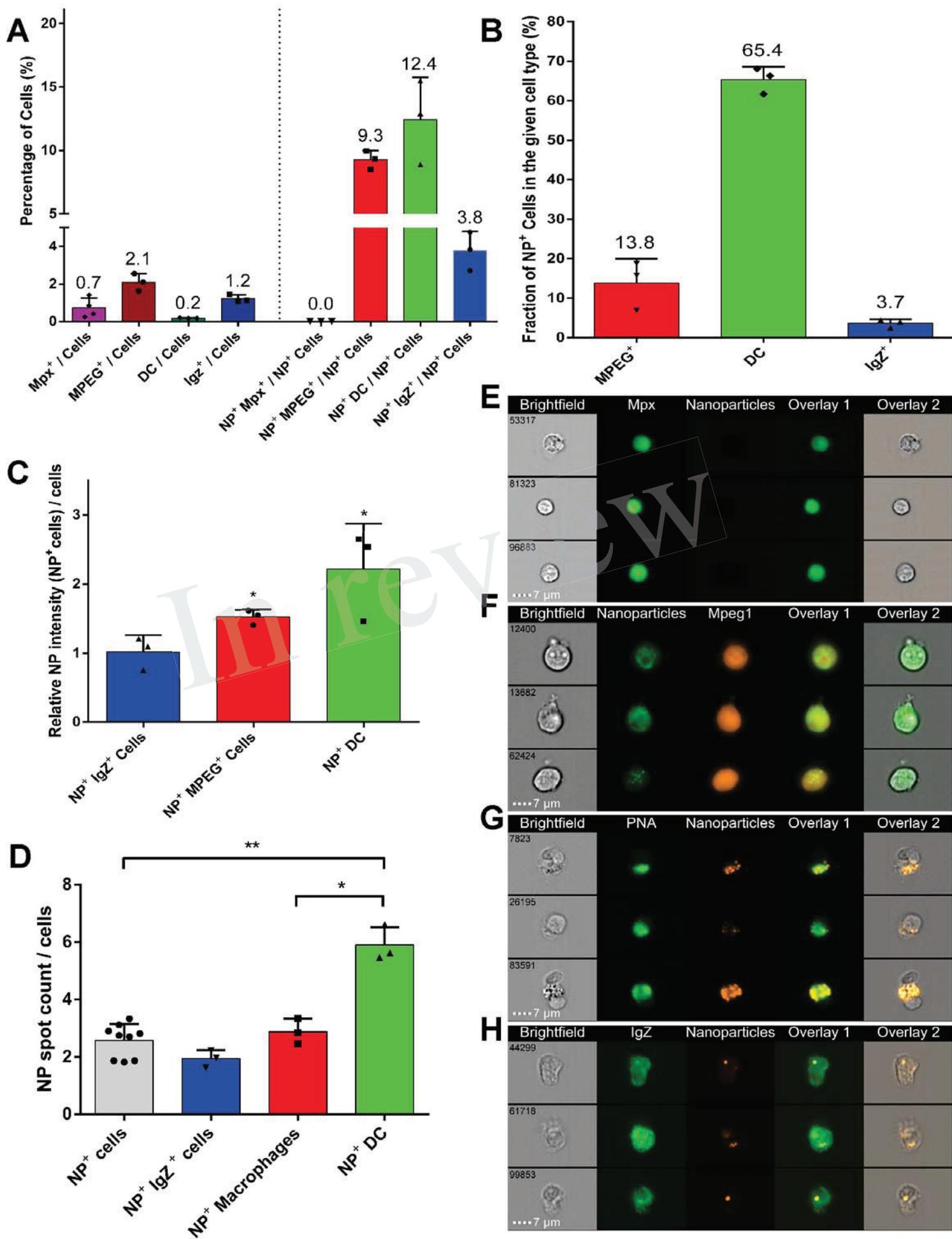


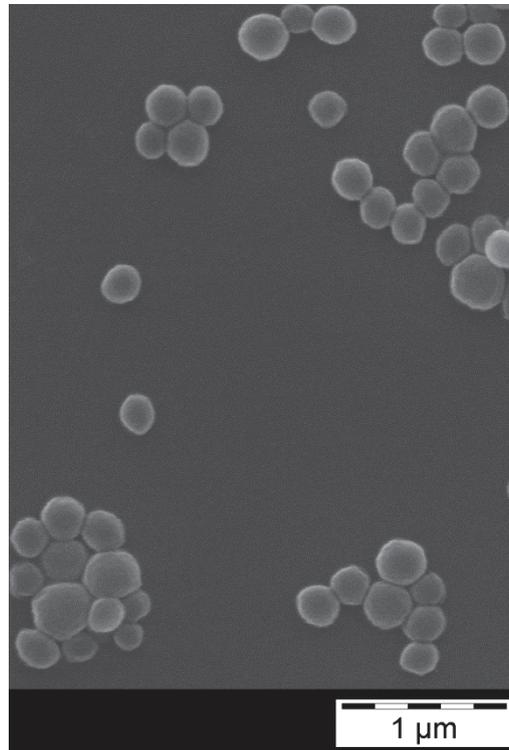
Figure 6.TIF



821

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

822 SUPPLEMENTARY DATA

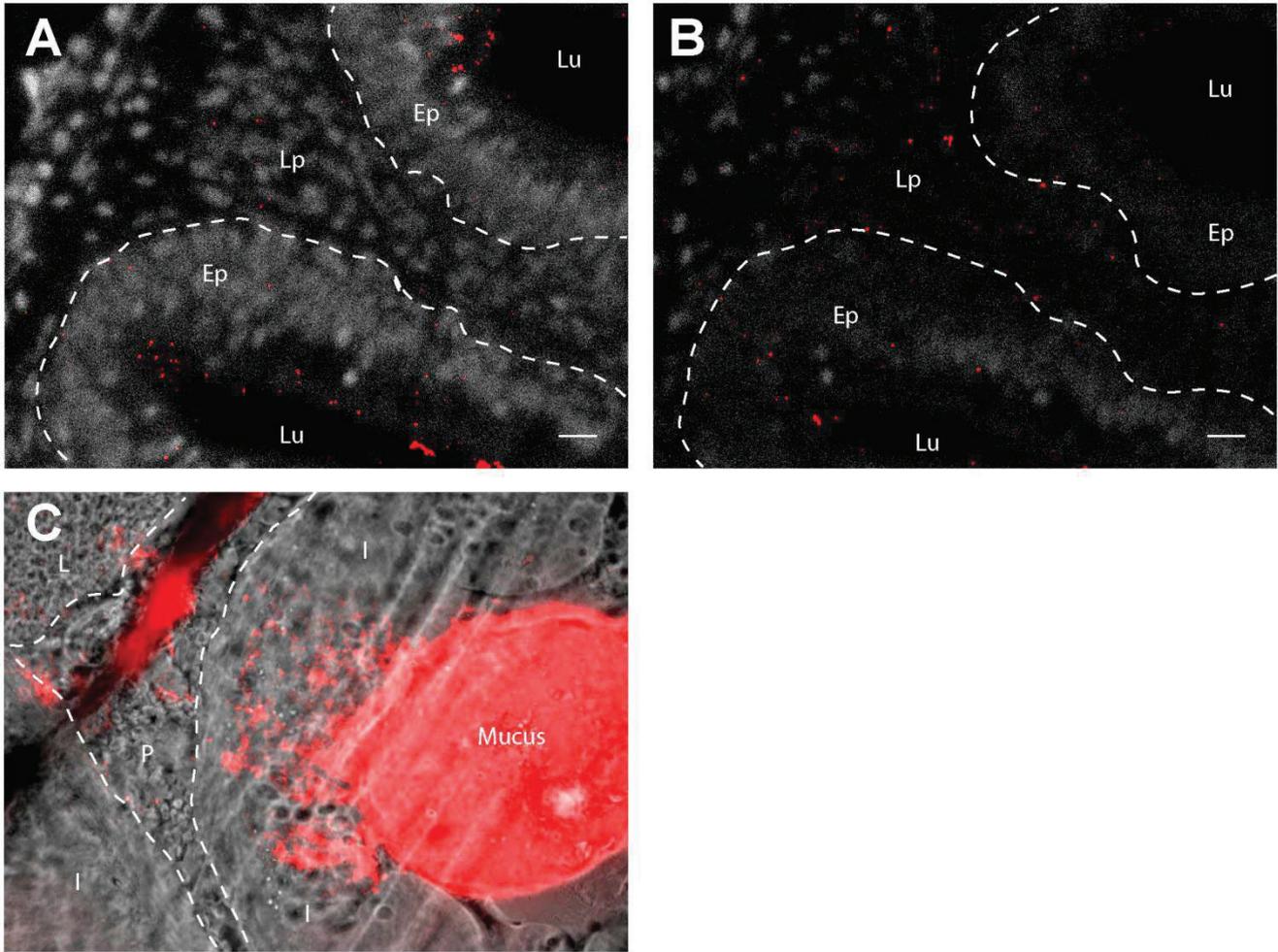


823

824

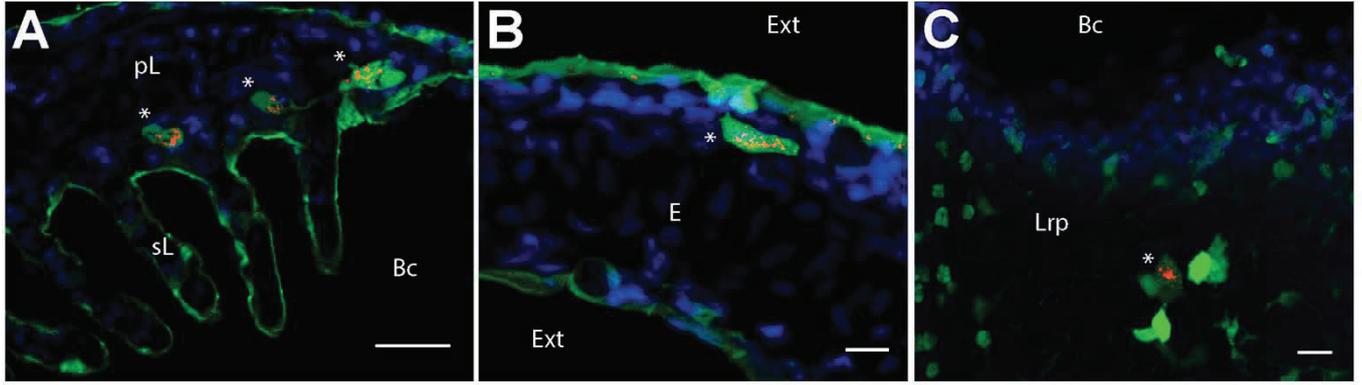
825 Figure S1. Scanning electron microscopy acquisition of 200nm surfactant-free PLA nanoparticles.

826



1  
 2  
 3  
 4  
 5  
 6  
 7  
 8  
 9  
 10  
 11  
 12  
 13  
 14  
 15  
 16  
 17  
 18  
 19  
 20  
 21  
 22  
 23  
 24  
 25  
 26  
 27  
 28  
 29  
 30  
 31  
 32  
 33 827  
 34 828  
 35 829  
 36 830  
 37 831  
 38 832  
 39 833  
 40 834  
 41 835  
 42 836  
 43 837  
 44 838  
 45 839  
 46 840  
 47 841  
 48 842  
 49 843  
 50 844  
 51 845  
 52  
 53  
 54  
 55  
 56  
 57  
 58  
 59  
 60  
 61  
 62  
 63  
 64  
 65

**Figure S2. Artefactual nanoparticle displacement at cryosection surface. A, B:** Images of 40 $\mu$ m-thick gut cryosections from adult zebrafish exposed for 24h to 0.05% red fluorescent nanoparticles. Pictures are maximal intensity projection of 5 confocal pictures taken every two micrometers. Whereas acquisitions in the core of the cryosection reveal low nanoparticle uptake in the *lamina propria* (A), a larger number of nanoparticles are detected in the same region at the surface the cryosection (B), suggesting that PLA nanoparticles may be displaced during immersion steps of the staining protocol. **C:** Epifluorescence image from similar cryosections, cut across a nanoparticle-rich region of the gut lumen. The smear of nanoparticles originating from the lumen suggests that the cryosectioning blade may displace nanoparticles at the surface of sections. Lu (*Lumen*), Lp (*Lamina propria*), Ep (*Epithelium*), I (*Intestines*), P (*Pancreas*), L (*Liver*). Scale bar: 10  $\mu$ m



1  
 2  
 3  
 4  
 5  
 6  
 7  
 8  
 9  
 10  
 11  
 12  
 13  
 14 846  
 15 847  
 16 848 **Figure S3. Cells with high intracellular and granular PNA staining express MHC2. Confocal images of gill**  
 17 849 **(A), skin (B) and thymus (C) cryosections from *mhc2dab:GFP* adult fish, following PNA (red) and DAPI**  
 18 850 **(blue) staining. Single optical section (A) or maximal intensity projections from 9 (B) or 5 (C) optical**  
 19 851 **sections taken every micrometer. pL (primary *Lamellae*), sL (secondary *Lamellae*), Bc (Branchial cavity),**  
 20 852 **Ext (External environment), E (Epidermis), Lrp (Lympho-reticular parenchyma). Scale bar: 10  $\mu$ m (B,**  
 21 853 **C), 20  $\mu$ m (A).**  
 22 854  
 23  
 24 855  
 25  
 26  
 27 856  
 28  
 29 857  
 30  
 31  
 32 858  
 33  
 34 859  
 35  
 36 860  
 37  
 38  
 39 861  
 40  
 41 862  
 42  
 43  
 44 863  
 45  
 46 864  
 47  
 48 865  
 49  
 50  
 51 866  
 52  
 53 867  
 54  
 55  
 56 868  
 57  
 58 869  
 59  
 60  
 61  
 62  
 63  
 64  
 65

## 2. Discussion et résultats complémentaires

### 2.1. Méthodologie et développement des marquages

L'élaboration de cette publication scientifique, est basée sur la volonté de déterminer si les nanoparticules de PLA sont aptes à servir de nanoplateformes pour la délivrance de vaccin par voie muqueuse.

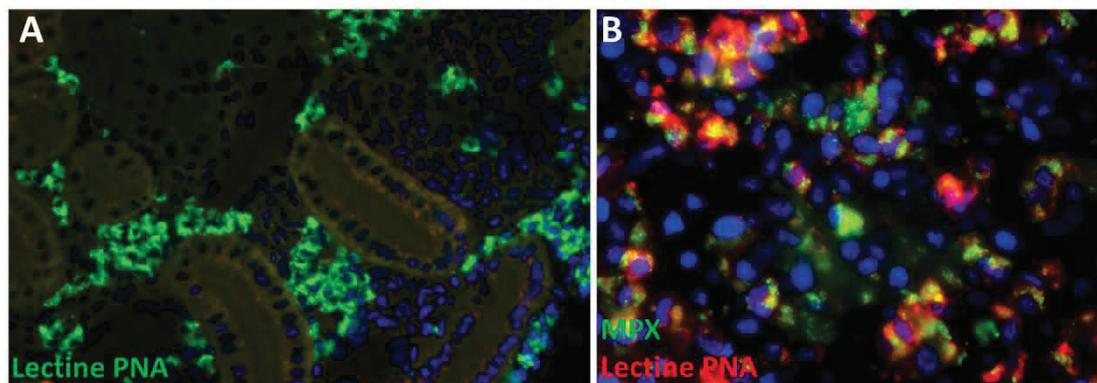
Afin de mener à bien cette étude, il a été nécessaire de développer différents outils : une méthodologie robuste permettant de caractériser la biodistribution de nanoparticules à l'échelle cellulaire et de quantifier certains événements ; ainsi que les marquages permettant d'étudier les cellules immunitaires chez le poisson-zèbre.

- Nous avons pu constater que les données sur la biodistribution des nanoparticules de PLA *in vivo* se basent le plus couramment sur une seule technique, ce qui peut fournir un impact significatif par divers biais potentiels. Cela est par exemple le cas concernant les études basées sur des cryosections fines d'une épaisseur inférieure à 10  $\mu\text{m}$ , où nous avons constaté que les nanoparticules peuvent être déplacées par la lame lors de la section et lors des immersions. Nous avons pu montrer que l'emploi de cryosections d'une épaisseur de 30 à 40  $\mu\text{m}$  permet de s'affranchir de ces biais en réalisant les acquisitions au centre des sections par microscopie confocale. Nous avons donc appuyé notre approche par une utilisation combinée de 3 techniques complémentaires : la microscopie confocale, la cytométrie en flux et l'imagerie en flux. La microscopie confocale a particulièrement été adaptée pour les observations qualitatives au niveau des tissus et pour identifier les cellules internalisant les nanoparticules. Néanmoins pour l'évaluation de la prise en charge dans différents organes, surtout lorsqu'elle est peu commune (nous n'avons pu détecter la prise en charge des nanoparticules dans les reins par microscopie confocale), il est nécessaire d'utiliser la cytométrie en flux. Cette technique a permis, en complément de l'évaluation de la prise en charge dans les organes où les nanoparticules ont été détectées, de consolider nos observations concernant l'absence de nanoparticules dans le cerveau et la rate et de détecter une population discrète de cellules positives aux nanoparticules dans les reins. Nous avons aussi pu identifier que l'évaluation de la prise en charge dans les intestins semblait surdimensionnée par rapport aux

observations obtenues par microscopie confocale, et cela illustre une des limites de la cytométrie en flux qui concerne les faux-positifs, surtout pour les nanoparticules. En effet lorsqu'un évènement est positif aux nanoparticules, il est possible que la nanoparticule soit à l'extérieur où collée à la cellule ou bien que l'évènement ne soit pas une cellule mais un débris tissulaire. L'imagerie en flux nous a permis de contrôler la cohérence des données de cytométrie en flux, confirmant la présence d'évènement faux-positifs dans les intestins et la validité des autres données. Ensuite, l'imagerie en flux a permis de quantifier l'implication des cellules présentatrices d'antigène dans l'internalisation de nanoparticules, et ce grâce aux observations sur les cellules présentatrices d'antigènes acquises par microscopie confocale. Nous avons ainsi développé une méthodologie où chaque technique permet de contrôler et d'enrichir les autres, et ce dans le but de réaliser une analyse puissante de la biodistribution des nanoparticules.

- Bien que des lignées transgéniques de poissons-zèbre permettent de rendre fluorescent certaines cellules immunitaires, la disponibilité de poissons adulte et le choix de la couleur de fluorescence ne sont pas toujours acquis. Il a donc été nécessaire de mettre au point des marquages permettant d'observer les différentes cellules immunes du poisson. Après avoir testé 12 anticorps, nous avons obtenu des marquages capables de révéler les macrophages (anti-MPEG1), les neutrophiles (anti-PMX) et des cellules du lignage lymphocytaire B IgZ<sup>+</sup> (anti-IgZ). Malheureusement, aucun marquage satisfaisant n'a pu être obtenu pour révéler les cellules du lignage lymphocytaire B IgM<sup>+</sup>. N'ayant pas à disposition des anticorps marquant les cellules dendritiques, principaux inducteurs des réponses immunitaires, nous avons utilisé la lectine de cacahuète. Cette lectine est utilisée en marquage de surface pour enrichir les suspensions cellulaires de reins de poisson-zèbre en cellules dendritiques (287,288). Son utilisation en tant que marquage intracellulaire sur des cryosections permet d'obtenir un intense marquage intracellulaire et granulaire de cellules dendritiques dans les muqueuses du poisson-zèbre. Toutefois ce marquage n'est pas applicable pour le rein. En effet, en accord avec les résultats provenant de son utilisation en tant que marquage de surface en cytométrie en flux (287), le marquage révèle les cellules rénales hématopoïétiques précurseurs MPX<sup>+</sup> (*Figure 48*). Au sein des différentes muqueuses, les marquages MPX et PNA sont distincts. Il est à noter que toutes les cellules dendritiques ne sont pas obligatoirement marquées par la lectine PNA. Chez les mammifères il a été montré que ce marquage nécessite parfois un prétraitement avec de la sialidase pour révéler le substrat en surface de certaines

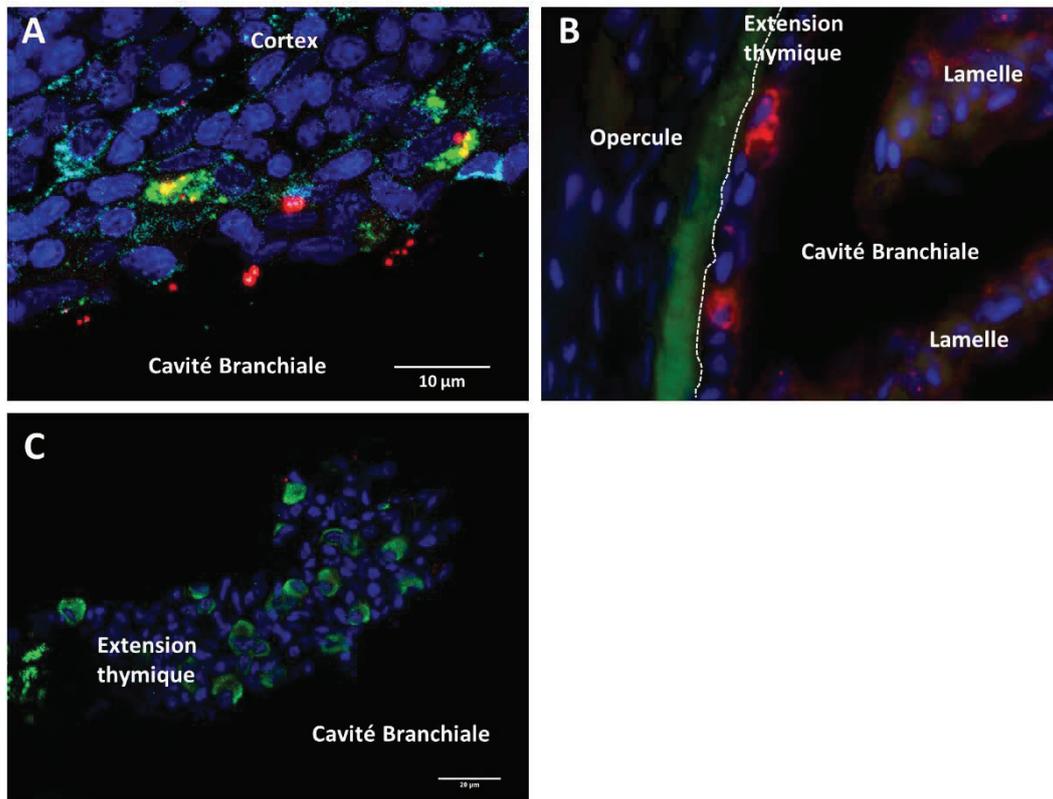
cellules dendritiques (289). Nous n'avons pas vérifié si cela été le cas chez le poisson-zèbre.



**Figure 48 :** Marquage avec la lectine de cacahuète (PNA) dans les reins de poissons-zèbre adultes, observée par microscopie à fluorescence. Le marquage PNA révèle des cellules présentes dans les régions hématopoïétiques des reins (A – PNA en vert) et co-localise avec un marquage anti-MPX qui est spécifique des neutrophiles ainsi que de certaines cellules précurseurs (B – PNA en rouge et MPX en vert)

## 2.2. Thymus

Un point remarquable est la pénétration des nanoparticules dans le thymus du poisson-zèbre, et plus particulièrement leur prise en charge par des cellules dendritiques de la région corticale (**Figure 49**). De plus, des cellules IgZ<sup>+</sup> ont également été identifiées au sein des prolongements thymiques. Enfin, de par sa localisation, le thymus est directement exposé aux pathogènes extérieurs. Avec ces observations, cette prise en charge des nanoparticules de PLA soulève des interrogations vis-à-vis de potentielles conséquences sur le système immunitaire. Il serait par exemple intéressant d'approfondir les recherches sur l'induction de la tolérance immunologique des poissons envers les matières inertes habituellement en suspension dans l'eau ou bien le rôle des cellules dendritiques cortical dans la maturation des lymphocytes T. Les cellules dendritiques médullaires expriment la protéine AIRE (290) et sont impliquées dans la sélection négative des lymphocytes T. Enfin, avec la présence de cellules IgZ<sup>+</sup>, il ne faut pas exclure la possibilité que le thymus puisse avoir un rôle plus direct dans l'induction de réponses immunitaires.



**Figure 49 :** Acquisitions par microscopie confocale de cryosections (40μm) de poissons-zèbre adultes après une immersion de 24h dans des nanoparticules (0.01%) (A-C). (A) Prise en charge de nanoparticules de PLA (rouge) au sein de cellules dendritiques (vert) dans la région corticale du thymus. Les macrophages sont en cyan. (B rouge – C vert) Présence de cellules IgZ<sup>+</sup> au sein des prolongements thymiques recouvrant la cavité branchiale, au niveau de la face interne de l’opercule. Barre d’échelle : A=10μm et B=20μm.

### 2.3. Analyse préliminaire transcriptomique

En plus des données présentées dans la publication scientifique, des résultats préliminaires complémentaires ont également été obtenus. L’équipe d’accueil a précédemment démontré que les nanoparticules de PLA à elles seules ont un pouvoir adjuvant (291), nous avons donc désiré effectuer un premier sondage concernant l’influence de l’administration muqueuse de ces nanoparticules sur l’expression de plusieurs gènes à l’échelle tissulaire (**Figure 50**). Ce travail a été réalisé sous ma supervision par Anne-Sophie REGENT, étudiante en 2<sup>e</sup> année de master. Les gènes étudiés ont été choisis pour leur implication dans les processus pro-inflammatoires et le stress oxydatif : *IL1β*, médiateur majeur de la réponse inflammatoire d’origine immunes (292,293) ; le gène *MMP9* qui est également impliqué de ce processus inflammatoire d’origine immun, notamment induit après activation de la voie de signalisation des Toll-like-receptor (294,295) ; le gène *INOS2a* qui est un témoin du stress oxydatif dans les tissus, il est fortement lié aux phénomènes de toxicité car lié à la présence de ROS (Reactive

Oxygen Species) (296). Les gènes *IL1 $\beta$*  et *MMP9* sont exprimés, entre autres, par les cellules épithéliales et les cellules immunitaires phagocytes.

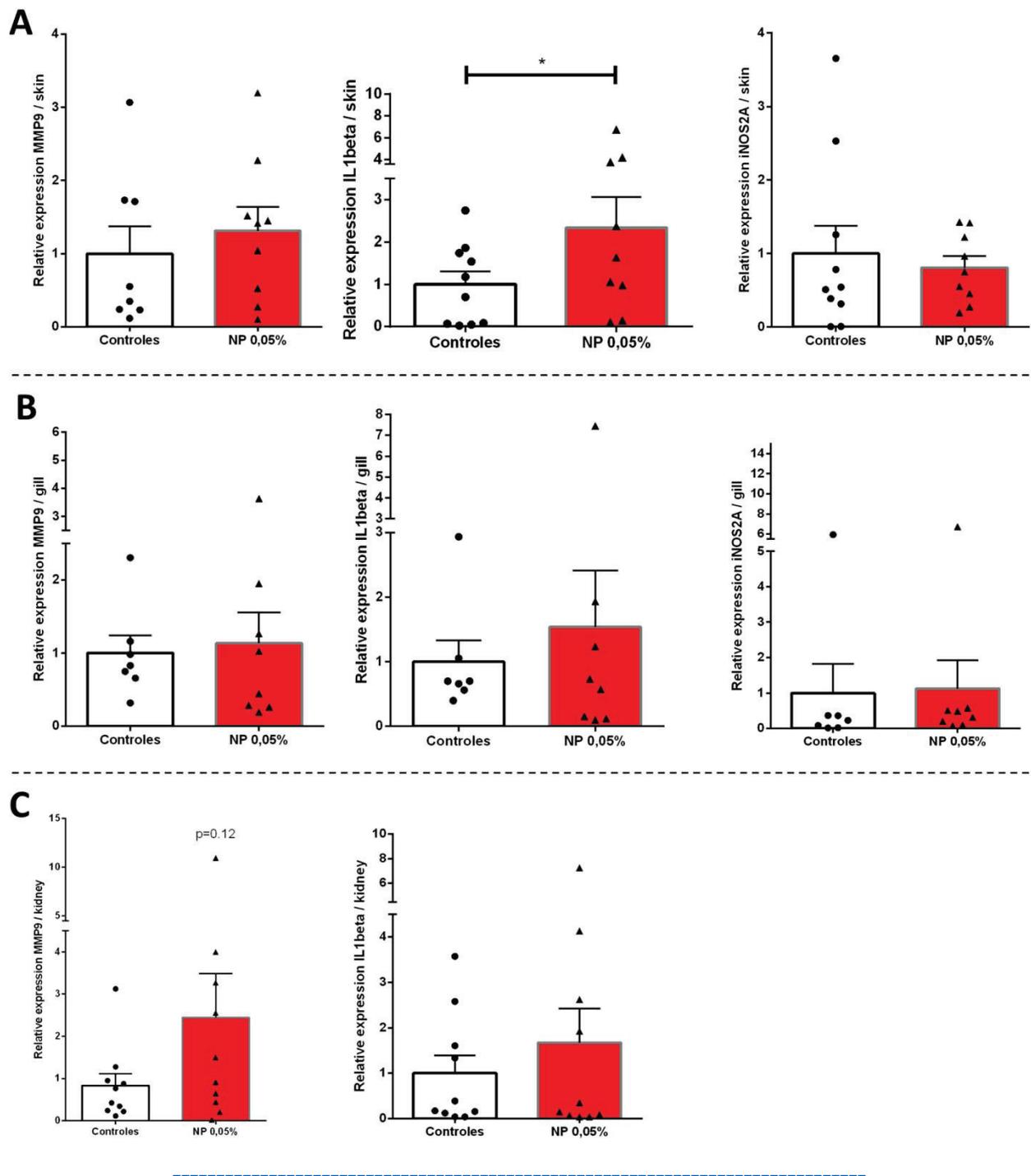
L'influence de l'administration de nanoparticules de PLA nues et sans fluorophores (0,05%) par immersion (24h), sur l'expression des 3 gènes choisis a été étudiée dans les branchies, la peau et le rein. Les branchies et la peau sont deux organes muqueux où pénètrent les nanoparticules de PLA par cette voie d'administration, le rein est l'un des organes lymphoïdes systémique où la présence de nanoparticules a également été détectée (0,16% des cellules sont NP<sup>+</sup>). A noter que les données sont harmonisées par rapport à l'expression d'un gène de ménage ubiquitaire, le gène codant l'ARN ribosomal 18S. Le premier élément remarquable de cette étude préliminaire est l'absence de surexpression du gène *INOS2a* au sein des deux muqueuses. L'absence d'induction de ce gène impliqué dans le stress oxydatif conforte la notion de non-toxicité des nanoparticules de PLA élaborée par le laboratoire d'accueil ainsi que de la voie d'administration. Ensuite ces nanoparticules non-formulées, malgré le faible taux de significativité, semblent potentiellement capables de moduler l'expression des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire immune, ce qui serait en accord avec leur effet adjuvant observé lors d'injection chez les mammifères :

- Au sein des branchies (**Figure 50-A**), le gène *IL1 $\beta$*  est significativement surexprimé suite à l'exposition aux nanoparticules (x2), tandis que pour le gène *MMP9* cela n'est qu'une tendance car l'augmentation n'atteint pas le seuil de significativité.
- Dans la muqueuse cutanée (**Figure 50-B**), une tendance, non-significative, à l'augmentation de l'expression des gènes *IL1 $\beta$*  et *MMP9* est observée. Le manque de significativité est possiblement la conséquence de l'hétérogénéité de l'expression des gènes *MMP9* et *IL1 $\beta$*  parmi les échantillons biologiques. En effet, au sein d'environ la moitié des poissons les gènes semblent être surexprimés, tandis que dans l'autre moitié ils semblent être sous-régulés par rapport au contrôle. Il est possible que cette hétérogénéité puisse être liée à la manière dont les nanoparticules sont perçues par l'organisme. Les poissons sont naturellement disposés à ne pas réagir immunologiquement à des matières en suspension ; il est possible qu'il y ait au sein de ces deux organes muqueux un conflit sur la définition de la dangerosité que représentent ces nanoparticules non-formulées. De plus amples recherches pourraient permettre de mieux comprendre

comment ces organes définissent la relation à adopter vis-à-vis de ces nanoparticules.

- Concernant les reins (**Figure 50-C**), il est remarquable d'observer une tendance à l'augmentation de l'expression des gènes *MMP9* ( $p=0,12$ ) et *IL1 $\beta$*  alors que la population de cellules positives aux nanoparticules est très discrète (0,16%).

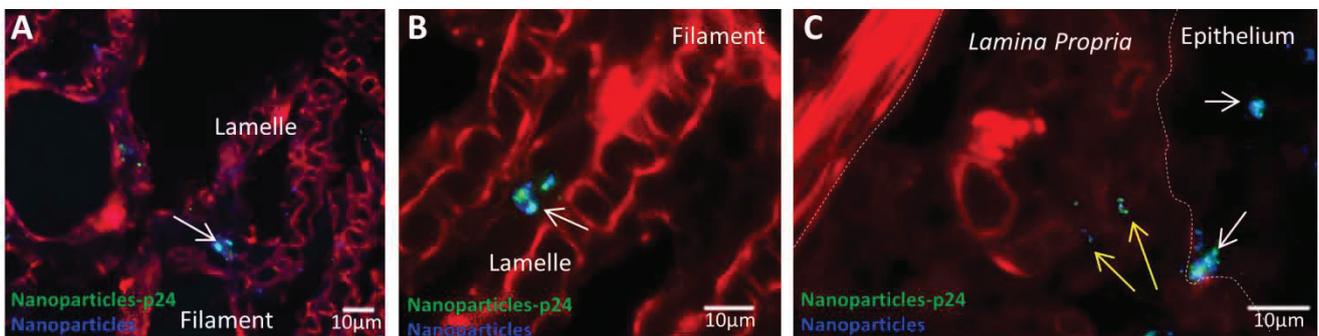
Dans l'ensemble, de cette étude préliminaire ressort une absence de surexpression d'un gène témoin d'une toxicité chimique ou mécanique (*INOS2a*), et des tendances à la surexpression de gènes favorisant l'induction de réponses inflammatoires immunes aussi bien dans les organes muqueux étudiés mais également dans le rein qui représente l'organe lymphoïde systémique primaire. Bien que préliminaires, ces résultats sont encourageants pour l'emploi des nanoparticules de PLA élaborées au sein du laboratoire en tant que nanovéhicules vaccinaux lors d'administration muqueuse.



**Figure 50 :** L'exposition à des nanoparticules de PLA nues module l'expression de gènes de l'immunité. Suite à des immersions de poissons-zèbre adultes 24h dans une solution de nanoparticules de PLA nues (0,05%), l'expression des gènes IL1 $\beta$ , MMP9 et INOS2a a été quantifiée par qPCR. Les résultats sont présentés en termes de facteurs d'augmentation ou de diminution après normalisation vis-à-vis de l'expression d'un gène de ménage (18S). Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM. (A) Au sein des branchies, l'exposition aux nanoparticules augmente significativement l'expression du gène IL1 $\beta$ , non significativement le gène MMP9 et ne présente aucune incidence sur l'expression du gène INOS2a. (B) Au sein de la peau, l'exposition aux nanoparticules ne présente pas d'effet significatif concernant l'expression du gène MMP9, une augmentation non-significative pour le gène IL1 $\beta$  et aucune influence sur le gène INOS2a. (C) Au sein des reins, le niveau d'expression tend à augmenter pour les gènes MMP9 ( $p=0,12$ ) et IL1 $\beta$ . La significativité des comparaisons statistiques est exprimée :  $p < 0,05$  (\*).

## 2.4. Co-distribution NP-PLA nues et NP-PLA-p24

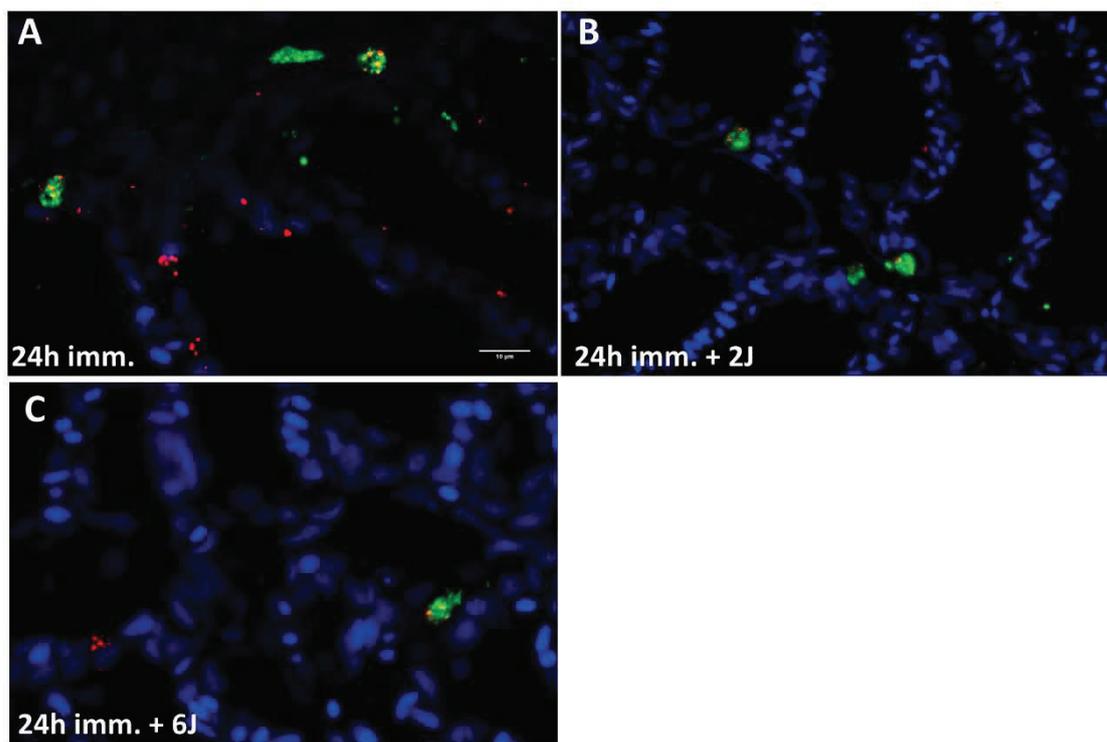
Toujours en tant que données préliminaires complémentaires, il s'est posé la question de savoir si la biodistribution décrite sur les nanoparticules nues, était conservée après la modification de la surface des nanoparticules par l'adsorption d'antigènes. Bien que ce point nécessitera de plus profondes investigations, les données préliminaires obtenues après co-administration de nanoparticules de PLA nues ou formulées avec de la p24 (protéine antigénique issue du VIH) par immersion au sein de poissons-zèbre adultes durant 6h, ne semblent pas révéler de modifications majeures de la biodistribution. Les fluorescences des deux types de nanoparticules co-administrées colocalisent au sein des phagocytes des filaments (**Figure 51-A**) et lamelles (**Figure 51-B**) de la muqueuse branchiale, ainsi que dans des phagocytes intra-épithéliaux et de la *lamina propria* de la muqueuse intestinale (**Figure 51-C**). La co-distribution des nanoparticules de PLA nues et véhiculant de la p24 au sein de phagocytes muqueux est une donnée rassurante pour une utilisation en tant que nanovaccins muqueux. Néanmoins des caractérisations approfondies sont requises car les propriétés physico-chimiques de la surface des nanoparticules jouent un rôle important dans leurs interactions avec le vivant.



**Figure 51 :** Co-distribution de nanoparticules de PLA nues (bleues) et formulées avec de la p24 en surface (vertes) au sein de phagocytes muqueux après administration par immersion (6h) chez le poisson-zèbre adulte. Les acquisitions ont été réalisées sur cryosections par microscopie à fluorescence après traitement avec de la phalloïdine couplé à de la rhodamine (rouge). Cette co-distribution a été observée au sein de phagocytes branchiaux au sein des filaments (A) et des lamelles (B), mais aussi dans des phagocytes intra-épithéliaux et de la lamina propria dans la muqueuse intestinales. Les barres d'échelles sont équivalentes à 10 µm.

## 2.5. Devenir des nanoparticules de PLA

Cette étude soulève plusieurs interrogations comme par exemple le devenir au cours du temps de ces nanoparticules au sein de l'organisme. Pendant quelle durée peuvent-elles être encore détectées ou bien combien de temps est-il nécessaire à leur complète dégradation *in vivo* ? Des données préliminaires qualitatives obtenues après immersion de poissons adultes dans une solution de nanoparticules de PLA fluorescentes, indiquent que la fluorescence des nanoparticules est encore détectable une semaine après l'administration dans les cellules dendritiques de branchies ainsi que dans d'autres phagocytes. Ce point semble indiquer que le tropisme des nanoparticules de PLA envers les APC puisse être persistant, une donnée préliminaire additionnelle encourageante pour les applications vaccinales. De plus, ces données semblent également indiquer une disparition des nanoparticules au sein des cellules épithéliales de branchies dans les jours suivant l'administration. Ces résultats exploratoires bénéficieraient toutefois d'une plus ample caractérisation comme par exemple l'aspect quantitatif, ce qui pourrait confirmer ou infirmer ces observations.



**Figure 52 :** Devenir des nanoparticules de PLA (rouge) au sein de la muqueuse branchiale suite à une exposition de poissons-zèbre adultes par immersion (24h – 0,05%). Les acquisitions ont été réalisées sur des cryosections par microscopie à épifluorescence. (A) Après l'immersion de 24h, les nanoparticules de PLA sont localisées au sein de cellules épithéliales et de cellules dendritiques (vertes). (B) Deux jours après l'exposition, les nanoparticules sont toujours détectées au sein de cellules dendritiques et plus rarement dans les cellules épithéliales. (C) Six jours après l'exposition, les nanoparticules sont toujours détectables et quasi-exclusivement localisées au sein de cellules dendritiques et phagocytes.

### 3. Matériels et méthodes complémentaires

#### **Analyse du marquage avec la lectine PNA dans le rein.**

Le marquage avec la lectine PNA a été effectué sur des cryosections (4 $\mu$ m) provenant de poissons-zèbre adultes non-exposés à des nanoparticules. Il consiste en une incubation de 20 minutes à température ambiante dans une solution de lectine PNA-FITC (USbiological) dilué à 1/250.

Pour la réalisation du co-marquage avec la lectine PNA et l'anticorps anti-mpx (Anaspec), un marquage identique mais avec de la lectine PNA-alexa594 (thermofischer) a été réalisé avant l'étape de saturation avec du sérum de veau fœtal (4h – température ambiante). En effet, la lectine PNA est susceptible de posséder une affinité pour des composants du sérum. Après saturation, une incubation d'une heure à température ambiante (TA) avec l'anticorps anti-mpx a été réalisée, suivie d'un rinçage en PBS1X et d'une incubation avec un anticorps secondaire anti-lapin-dylight488 (thermofischer) (1/500 – 30mn – TA).

Les lames ont ensuite été montées avec du vectashield + DAPI (Vector lab) et observées avec un microscope à épifluorescence AxioImagerZ1 (Zeiss).

#### **Analyse de l'expression de gènes par qPCR.**

Deux conditions ont été traitées de manière identique, une condition contrôle avec des poissons-zèbres non-exposé à des nanoparticules de PLA, et une condition où ils ont été exposés à une suspension de nanoparticule de PLA nues et non-fluorescente (0.05%) durant 24h par immersion.

Les poissons ont ensuite été mis à mort par surdose d'anesthésiant (tricaine – Sigma aldricht) jusqu'à la perte du reflexe moteur et des mouvements branchiaux. Les branchies, la peau et le rein ont été prélevés.

L'ARN total a été extrait selon la méthode d'extraction par trizol (297). Afin d'éliminer les risques d'une contamination par de l'ADN génomique, les échantillons ont été traités avec un kit « TURBO DNase free » (Ambion) selon les recommandations du fabricant.

La quantité et la qualité de l'ARN ont ensuite été évaluées en utilisant un Nanodrop (Thermoscientific). Afin d'obtenir les ADNc, une transcription inverse est réalisée en suivant le protocole indiqué au sein de (298) avec l'enzyme superscript II (Thermofischer).

Après vérification de la spécificité des primers sélectionnés (**Tableau 10**), la qPCR a été réalisée en utilisant de l'ADN polymérase (Promega-M7741) avec un kit « FS universal SYBR Green MasterRox » (Roche) sur un appareil thermocycleur RotorGene HRM (Qiagen). Les acquisitions sont analysées selon la méthode du double  $\Delta$  Ct et les valeurs obtenues pour chaque gène ont été normalisées par l'expression du gène de ménage *18S*.

**Tableau 10 : Primers utilisés**

Primers:	Sens	Antisens
<i>18S</i>	CGGAGGTTCGAAGACGATCA	TCGCTAGTTGGCATCGTTTATG
<i>MMP9</i>	CATTAAAGATGCCCTGATGTATCC	AGTGGTCCGTGGTTGAG
<i>IL1B</i>	CCACGTCTCCACATCTCGTA	AACAGCAGCTGGTCGTATCC
<i>INOS2<math>\alpha</math></i>	CCAGAGCCTTCGTCTGGAGA	TTAGAGCCTGGACGAGCGTG

L'analyse statistique des résultats a été effectuée grâce au logiciel GraphPad Prism 6. Pour les résultats n'ayant pas une distribution suivant une loi normale, le test de MannWhitney one-sided a été appliqué. Pour ceux où la distribution suit une loi normale, c'est le test de Student qui a été réalisé.

### Co-distribution des nanoparticules de PLA nues et de PLA-p24

Pour cette expérience, deux types de nanoparticules de PLA ont été co-administrées par immersion (0,05%) au sein de poissons-zèbre adultes : des nanoparticules de PLA nues avec du 1,6-diphényl-1,3,5hexatriène (DPH) (Sigma-Aldrich) encapsulé, et des nanoparticules de PLA avec de la p24 adsorbée (Solution initial : 0,25% PLA 200 $\mu$ g/mL p24 – Adsorption 2h sur roue à TA) et de la coumarine-6 encapsulée (Sigma-Aldrich). Le ratio fluorophore/polymère est de 0,2% pour ces deux formulations.

Après 6h d'exposition, les poissons ont été mis à mort, fixés en PFA 4% (Thermofischer) puis congelés et cryosectionnés.

Les cryosections obtenues ont été traitées avec de la phalloïdine-TRITC (Thermofischer).

Les lames ont ensuite été montées avec du vectashield (Vector lab) et observées avec un microscope à épifluorescence AxioImagerZ1 (Zeiss).

### Devenir des nanoparticules de PLA

Pour étudier le devenir des nanoparticules de PLA plusieurs jours après l'administration par immersion, des poissons-zèbre adultes ont été immergés dans une suspension à 0,05% de

nanoparticules de PLA nues avec du CELLTRACE BODIPY TR METHYLESTER (Life technologies). Le ratio fluorophore/polymère est de 0,04%. Après l'administration, les poissons ont été replacés dans de l'eau d'animalerie. Une partie des poissons a été mise à mort par surdose d'anesthésiant juste après l'immersion, une autre deux jours plus tard et la dernière partie 6 jours après l'administration.

Après la mise à mort, les poissons ont été fixés, congelés et cryosectionnés (4 $\mu$ m).

Les coupes ont été traitées avec de la lectine PNA-FITC (1/250 20mn TA) pour révéler les cellules dendritiques. Les lames ont ensuite été montées avec un milieu de montage vectashield + DAPI et observées avec un microscope à épifluorescence AxioImagerZ1 (Zeiss).

## 4. Conclusion

L'ensemble de ces résultats a été obtenu grâce à la mise en place d'une méthodologie rigoureuse pour analyser *in vivo* la biodistribution des nanoparticules. Ceux-ci suggèrent que les nanoparticules de PLA, élaborées au sein du laboratoire d'accueil, puissent être utilisées comme nanovéhicules pour la vaccination muqueuse. En effet, les nanoparticules de PLA non-formulées sont internalisées par les cellules présentatrices d'antigènes au sein des muqueuses, cette internalisation semble persister au moins 6 jours. De même, ces nanoparticules sont capables de traverser les muqueuses pour atteindre des organes lymphoïdes systémiques. Enfin leur administration semble possiblement capable d'influencer l'expression de gènes pro-immuns, couplée une non-toxicité non-encore réfutée.

Pour la suite de ce projet de thèse, le prochain objectif est l'utilisation de l'ensemble de ces résultats pour définir des stratégies de ciblage capables d'optimiser la biodistribution des nanoparticules de PLA pour la vaccination muqueuse.

## 1. Introduction

L'utilisation de nanovéhicules pour vectoriser des principes actifs répond à un besoin d'améliorer l'efficacité thérapeutique tout en réduisant les effets néfastes et non-désirés. L'application d'une stratégie de ciblage permet d'optimiser les nanovecteurs en leur procurant une meilleure spécificité. Ces stratégies de ciblage reposent en majorité sur un mécanisme dit de « couple ligand-récepteur », selon lequel un des partenaires est greffé à la surface des nanoparticules tandis que l'autre est présent sur les cibles biologiques (299). L'affinité entre les deux partenaires permet de favoriser le contact entre les nanoparticules et leur cible biologique, ainsi que de prolonger le temps de rétention. Dans le cas de cibles biologiques de type cellulaires, cela peut résulter en l'induction plus fréquente d'évènements d'internalisation par rapport à une formulation de nanoparticules sans stratégie de ciblage. Les principales stratégies de ciblage reposent sur le couplage de protéines comme la transferrine, de molécules comme le folate, d'aptamers (oligonucléotides ou peptides) et d'anticorps.

L'utilisation d'une telle stratégie nécessite toutefois de veiller à ne pas créer d'interférences, lorsque la ou les cibles sont atteintes, avec la libération de la charge antigénique ou du principe actif véhiculé par les nanoparticules. De même, l'adsorption d'éléments sur les nanoparticules peut également influencer sur leur clairance. Par exemple le greffage de polyéthylène-glycol rend les nanoparticules furtives vis-à-vis du système immunitaire, diminue leur opsonisation et réduit leur clairance hépatique. Le couplage d'éléments peptidiques peut quant à lui favoriser la reconnaissance des nanoparticules par le système hépatobiliaire en charge du recyclage des protéines. D'autres points sensibles sont la complexité de réaliser le couplage sur les nanoparticules et la piètre fiabilité des extrapolations *in vitro* vers *in vivo* des effets de la stratégie de ciblage (300). Une citation de cette même revue illustre ce point : « Une observation sur une cellule dans un environnement particulier n'est pas nécessairement applicable à toutes les cellules d'une multitude d'environnements ».

Parmi les différentes manœuvres de ciblage apparaît un engouement particulier pour les stratégies basées sur le biomimétisme (301). Ces stratégies se basent sur les couples d'affinités impliquant différents sucres, glycanes (polymères saccharides), lectines (protéines liant

spécifiquement certaines séquences de glycanes), toxines (la candoxine possède un tropisme naturel vers le cerveau), composants engagés dans les tropismes viraux ou bactériens et plus récemment le revêtement des nanoparticules avec des membranes de cellules de mammifères.

Suite aux résultats obtenus sur la biodistribution des nanoparticules de PLA administrées par immersion au sein de poissons-zèbre adultes, s'est posée la question de l'optimisation de leur biodistribution dans un but vaccinal. Cela implique d'améliorer l'effet thérapeutique tout en réduisant les inconvénients pour la vaccination. Pour atteindre cet objectif, plusieurs choix sont possibles :

- Est-il nécessaire d'améliorer le ciblage vers les cellules présentatrices d'antigènes ? Cela n'est pas une nécessité au regard du tropisme naturel des nanoparticules de PLA envers les cellules dendritiques branchiales. Néanmoins, favoriser l'activation de ces cellules avec des immunomodulateurs pourrait s'avérer bénéfique.
- Augmenter la prise en charge globale des nanoparticules serait-elle bénéfique pour de la vaccination muqueuse ? Oui, c'est une stratégie importante car non seulement elle permet d'augmenter la charge d'antigènes pénétrant l'organisme, mais surtout elle permet de réduire la dose de nanoparticules nécessaire pour obtenir un effet thérapeutique équivalent. Cela réduit, dans le cas d'une administration muqueuse, la quantité de nanoparticules qui ne pénètrent pas l'organisme et qui sont donc gaspillées. D'un point de vue pratique, cela permet d'obtenir des solutions vaccinales moins onéreuses et en conséquence certainement plus adaptables à une application civile.
- Est-ce qu'organiser un ciblage spécifique de certains tissus, ici les muqueuses, est utile ? Là encore, oui, si l'on veut vacciner un organisme contre un pathogène capable de ne cibler que la peau (comme le pou de la mer dans la pisciculture marine) chez le poisson par exemple ou bien la muqueuse vaginale contre des pathogènes sexuellement transmissibles chez l'Humain. Cela permet de réduire l'exposition non-désirée de certains organes tout en favorisant la pénétration des nanoparticules au sein des tissus cibles du pathogène. Le système immunitaire local sera donc plus performant et donc possiblement plus protecteur.

## 1.1. Choix de la stratégie de ciblage

Durant le travail de thèse, il a été choisi de développer des stratégies dont le but principal est un ciblage capable d'augmenter la prise en charge générale des nanoparticules par l'organisme, et dans un second temps qu'elles soient capables de favoriser la prise en charge dans une muqueuse plutôt que les autres.

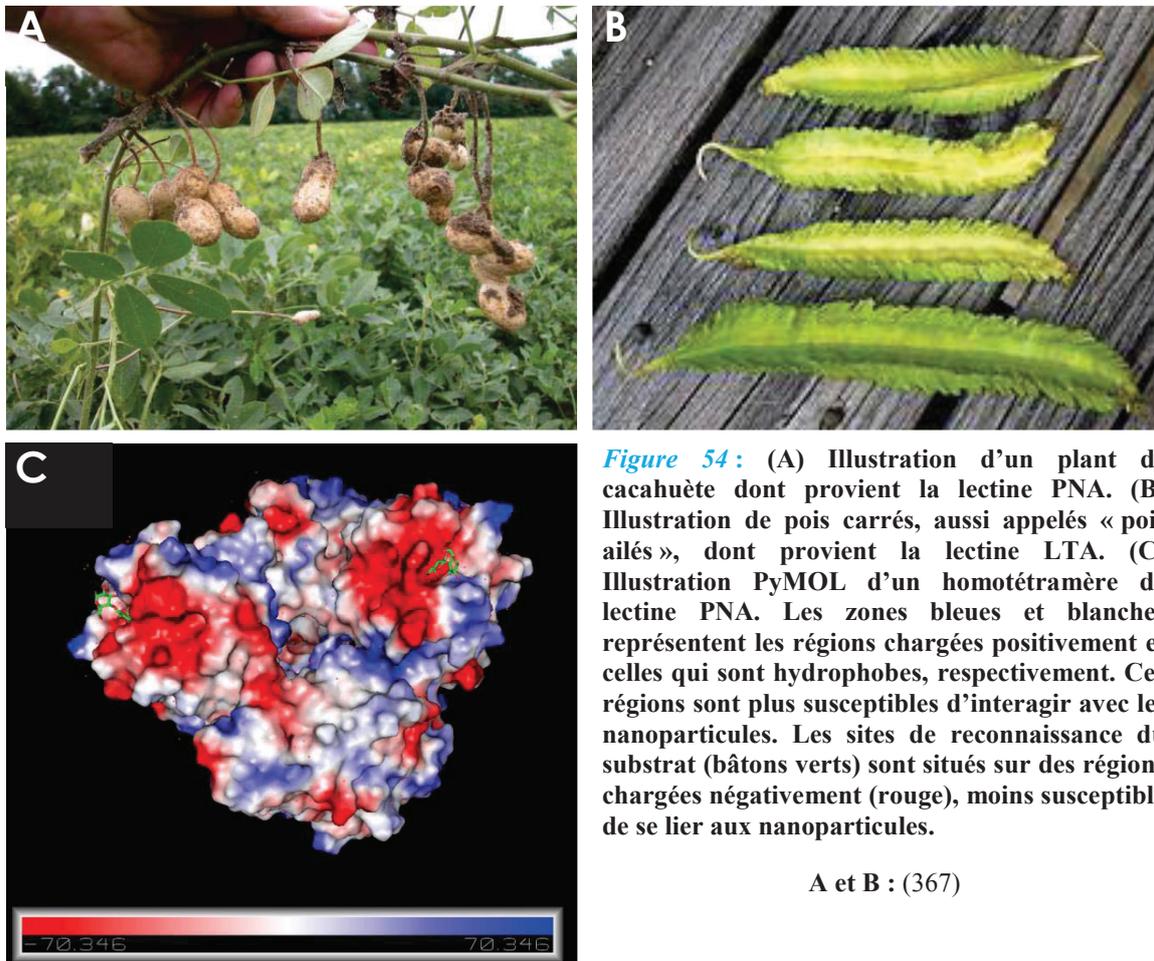
Pour établir ces stratégies, nous nous sommes tournés vers l'utilisation des lectines pour plusieurs raisons. Ces protéines, qui ont une affinité particulière pour des glycanes spécifiques, sont accessibles, peu onéreuses et donc compatibles avec une utilisation industrielle. L'avantage le plus intéressant est que leur substrat est souvent surexprimé en surface de cellules épithéliales de muqueuse. Nombre de lectines sont d'ailleurs capables de favoriser le passage de nanoparticules par voie orale chez les mammifères (302).

Histologic site	ConA	WGA	PNA	DBA	SBA	LTA	GO
<b>Gill lamellae</b>							
mucous cells	0	1/2/3	0	0/2/3	0/2/3	0	0
granular cells	0	2	2-3	1-2	1-2	3	2-3
<b>Gill rakers</b>							
mucous cells	0	0/1/2	0	0/2/3	0/2/3	0	0
granular cells	0	3	2-3	1	0-1	3	2

**Figure 53 : Evaluation du potentiel de liaison de différentes lectines envers les cellules caliciformes et les cellules granuleuses de branchies. Les rectangles bleus mettent en évidence les deux lectines utilisées dans le travail de thèse comme agent de ciblage. 0 : absence de liaison – 3 : Liaison forte**

Modifié à partir de (366)

Comme le montre la [Figure 53](#), au sein des branchies se trouvent des cellules exprimant les substrats reconnus par différentes lectines et notamment par les deux lectines qui ont été choisies pour développer les stratégies de ciblage : la lectine agglutinine de *lotus tetragonolobus* (LTA) et l'agglutinine de cacahuète (PNA).



**Figure 54 :** (A) Illustration d'un plant de cacahuète dont provient la lectine PNA. (B) Illustration de pois carrés, aussi appelés « pois ailés », dont provient la lectine LTA. (C) Illustration PyMOL d'un homotétramère de lectine PNA. Les zones bleues et blanches représentent les régions chargées positivement et celles qui sont hydrophobes, respectivement. Ces régions sont plus susceptibles d'interagir avec les nanoparticules. Les sites de reconnaissance du substrat (bâtons verts) sont situés sur des régions chargées négativement (rouge), moins susceptible de se lier aux nanoparticules.

A et B : (367)

## 1.2. Lectine agglutinine de *Lotus tetragonolobus*

La lectine agglutinine de *lotus tetragonolobus* est extraite du pois carré, aussi appelé pois ailé (**Figure 54-B**). C'est une protéine homotétramérique d'un poids moléculaire de 107 kDA, globalement chargée positivement. Cette lectine reconnaît spécifiquement les séquences glycanes d'«  $\alpha$ -fucose ». Cette lectine a été choisie car elle est utilisée pour le ciblage des cellules M intestinales chez les mammifères, en effet ces cellules exposent des séquences d'  $\alpha$ -fucose à leur surface apicale (303). Bien que les entérocytes spécialisés des téléostéens ne soient que des équivalents fonctionnels, il n'est pas impossible que l'exposition de ces glycanes en surface soit conservée. De plus, il a été montré dans la **Figure 53** que la lectine LTA est capable de se lier à des cellules « granuleuses » dans les branchies de carpes, le poisson-zèbre et la carpe faisant partie de la famille des Cyprinidés. L'adsorption de la lectine LTA en surface des nanoparticules de PLA pourrait donc potentiellement favoriser la prise en charge dans l'intestin intermédiaire postérieur, mais également un potentiel ciblage des branchies.

Enfin, d'un point de vue adsorption sur les nanoparticules de PLA, bien que sa grosseur risque de réduire la quantité possible d'adsorber en surface des nanoparticules, le fait qu'elle soit

homotétramérique avec 4 sites de liaison aux substrats est une bonne chose. En effet, même si l'adsorption de la lectine sur la nanoparticule gêne stériquement un des sites de reconnaissance du substrat, il en reste 3 autres fonctionnels. Enfin, avec une charge électrostatique globalement positive, l'adsorption de la lectine sur une nanoparticule chargée négativement se retrouve facilitée par les liaisons électrostatiques.

### 1.3. Lectine agglutinine d'*Arachis hypogaea*

La lectine agglutinine de cacahuète (*Arachis hypogaea*) est extraite de la cacahuète (**Figure 54-A**). Il s'agit également d'une protéine homotétramérique qui possède un poids moléculaire de 110kDA et est globalement chargée négativement. Cette lectine reconnaît la séquence « Gal-β(1-3)-GalNAc ». En dehors du ciblage, cette lectine est couramment utilisée pour révéler par marquage histologique les cellules spermatogéniques, certaines cellules tumorales, cellules dendritiques, centres germinatifs et kératinocytes chez les mammifères. Cette lectine a été choisie car lors du travail de thèse, elle a permis de marquer des cellules dendritiques de poisson-zèbre, mais la raison principale de ce choix est que lors de marquages trop intenses avec la lectine PNA, certaines cellules épithéliales de branchies, la bordure en brosse intestinale et la surface des kératinocytes dans la peau, avaient fixé la lectine PNA. Cela implique l'exposition de la séquence glycanique reconnue par la lectine PNA à la surface apicale de cellules des muqueuses branchiale, cutanée et intestinale. Il était donc envisageable que l'adsorption de cette lectine favorise la prise en charge générale des nanoparticules de PLA par les épithéliums muqueux du poisson-zèbre, mais aussi par certaines cellules dendritiques. Des études bibliographiques ont ensuite révélé que par rapport à certaines autres lectines, comme LTA, l'utilisation de la lectine PNA avec des nanoparticules est très peu fréquente. Une étude (304) a montré qu'un greffage covalent de PNA en surface de nanoparticules de polystyrène augmente l'adhésion des nanoparticules en surface de régions intestinales inflammées de souris, dans le cas de colites. Une autre étude (305), *in vitro* cette fois-ci, a révélé que l'adsorption de PNA en surface de nanoparticules d'oxyde de magnésium favorise l'activation d'une lignée cellulaire de macrophages. Cette dernière étude met en évidence qu'en plus de potentielles propriétés de ciblage, la lectine PNA pourrait favoriser l'activation de cellules présentatrices d'antigènes *in vivo*. Une étude a par ailleurs montré que la lectine PNA est un agoniste des récepteurs TLR4 chez les mammifères (306).

En ce qui concerne l'adsorption de la lectine PNA sur les nanoparticules de PLA élaborées dans l'équipe, comme pour la lectine LTA, son poids moléculaire élevé risquerait de réduire la quantité adsorbable tandis que sa structure homotétramérique devrait permettre de garder

fonctionnel plusieurs sites de liaison au substrat quel que soit le site d'adsorption. Par contre sa charge globale négative risque d'entraîner une répulsion entre nanoparticules et PNA. Afin de mieux appréhender l'adsorption de la PNA, il a été nécessaire d'étudier sa structure sur PyMOL (*Figure 54-C*). On peut donc observer que les domaines de la protéine qui sont chargés négativement (**rouges**) sont principalement ceux où s'effectue la liaison avec le substrat, il y a peu de probabilités que la liaison avec la nanoparticule se fasse dans ces domaines, ce qui est une bonne chose. Ce qui est le plus notable, c'est que malgré une charge globale négative, la lectine PNA possède de nombreux domaines hydrophobes (**blancs**) ainsi que des domaines chargés positivement (**bleus**). Ce sont ces domaines qui sont les plus susceptibles d'accueillir la liaison avec la nanoparticule, soit par interactions hydrophobes, soit par liaisons électrostatiques.

**Tableau 11 : Récapitulatif des propriétés des lectines LTA et PNA**

Agent de ciblage	Lectine Lotus Tetragonolobus (Pois carré) - LTA	Lectine Arachis Hypogaea (Cacahuète) - PNA
Structure	Homotétramère	Homotétramère
Poids moléculaire	107 kDa	110 kDa
Charge électrostatique	Positive	Négative
Point isoélectrique	7,3/7,6/7,9/8,2	5,5/6,5
Site de liaison	$\alpha$ -fucose	Gal- $\beta$ (1-3)-GalNAc
Intérêts		
Ciblage potentiel	Intestins (Cellules M mammifères) Branchies	Branchies - Peau – Intestins et Tissus enflammés
Effet adjuvant		Agoniste TLR4 - Activation macrophages <i>in vitro</i>

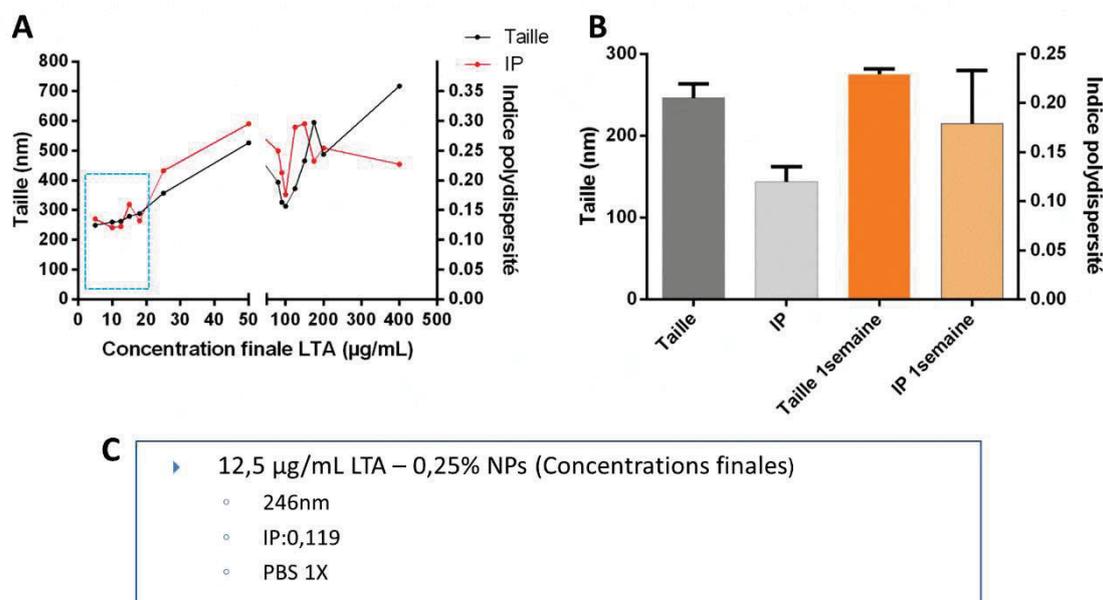
## 1.4. Objectifs

Dans cette partie, nous aborderons la mise au point des différentes formulations avec les lectines LTA et PNA. Ces deux formulations subiront ensuite une évaluation préliminaire, par microscopie confocale, de leur biodistribution au sein des muqueuses intestinale, cutanée et branchiale. Cela dans le but d'identifier d'éventuels changements par rapport à la biodistribution des nanoparticules de PLA nues. Selon les résultats obtenus, des caractérisations supplémentaires seront réalisées.

## 2. Résultats

### 2.1. Adsorption de la lectine LTA sur les nanoparticules de PLA

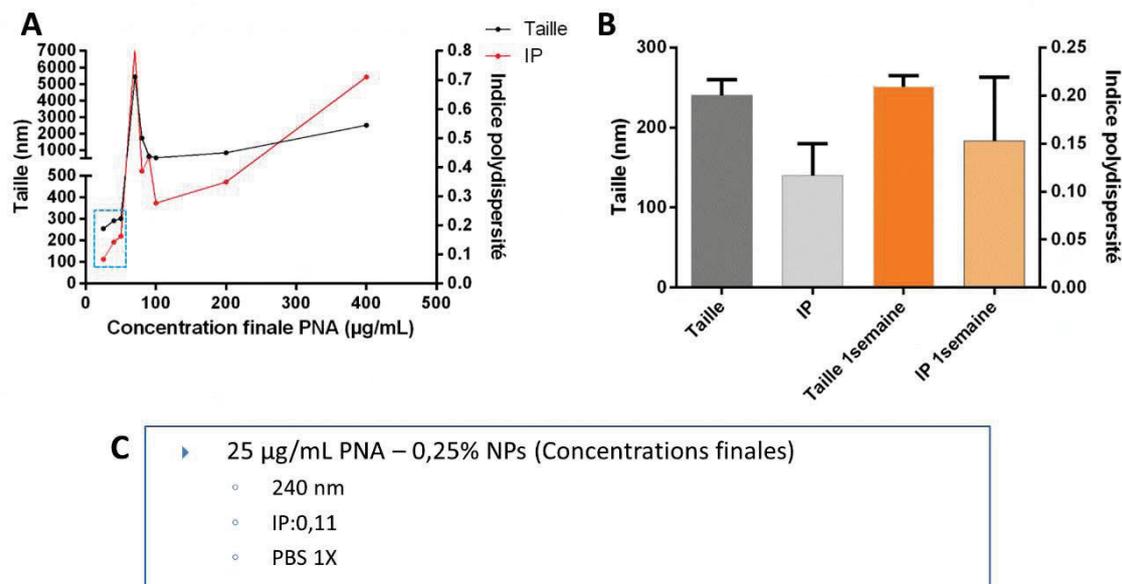
Afin de mettre au point la stratégie de ciblage avec la lectine LTA, il a été nécessaire de faire varier la concentration en lectine pour une concentration fixe de nanoparticules. Divers tests ont révélé que 0,25% finale est la concentration finale en nanoparticules la plus adaptée. Cette méthode permet de déterminer pour quel intervalle de concentration de lectine il était possible d'obtenir une formulation stable. Pour une concentration de lectine variant de 5 µg/mL à 400 µg/mL (concentration finale), seuls les essais avec une concentration de lectine inférieure à 20 µg/mL ont montré une augmentation de taille raisonnable (< 300 nm, sachant qu'initialement les nanoparticules nues mesuraient environ 210 nm) couplée à un score d'homogénéité de qualité (Indice de polydispersité (IP) < 0,2) (*Figure 55–A*). Le protocole d'adsorption de LTA choisi est de mélanger, volume à volume, une solution de nanoparticules de PLA (0,25% finale) et une solution de LTA (12,5µg/mL finale) dans un tampon PBS 1X. Les nanoparticules ainsi formulées possèdent une taille moyenne de 246 nm et possèdent une homogénéité correcte (IP : 0,12) (*Figure 55–C*). Il a ensuite été montré qu'après une semaine à 4°C, ces formulations restent stables avec juste une faible perte d'homogénéité (IP : 0,17) (*Figure 55–B*). Nous avons donc pu mettre au point une formulation stable de nanoparticules de PLA avec de la lectine de LTA adsorbée en surface. La quantité de lectine adsorbée demanderait à être améliorée, même si cela est en accord avec l'adsorption de protéine à fort poids moléculaire. De même, la présence du tampon PBS1X modifiera la force ionique lors de l'administration par immersion, même si les nanoparticules formulées sont diluées dans de l'eau d'animalerie.



**Figure 55 :** Mise au point de l’adsorption de la lectine LTA sur des nanoparticules de PLA. (A) Pour une concentration fixe en nanoparticules (0,25% finale), l’intervalle de stabilité (rectangle bleu) est obtenu pour un apport d’une concentration en lectine comprise entre 5 et 20 µg/mL (finale). (B) Les formulations de nanoparticules de PLA-LTA (0,25% et 12,5 µg/mL finaux respectivement) sont stables pendant au moins une semaine. (C) Récapitulatif des caractéristiques de la formulation de nanoparticules de PLA-LTA retenue.

## 2.2. Adsorption de la lectine PNA sur les nanoparticules de PLA

Exactement de la même manière que pour déterminer les conditions d’adsorption pour la lectine LTA, il a fallu révéler dans quelles conditions on obtient des formulations stables et homogènes de nanoparticules de PLA-PNA. Pour une concentration fixe de nanoparticules de PLA (0,25% finale), on obtient des formulations stables dans un intervalle de concentration de 5 à 50 µg/mL de PNA (finale) (Figure 56-A). Les conditions d’adsorption qui ont été retenues sont 0,25% de nanoparticules de PLA (finale) pour 25 µg/mL de PNA (finale). Ces conditions permettent d’obtenir une formulation homogène (IP : 0,11) de nanoparticules de PLA-PNA de 240 nm en moyenne, et cela dans un tampon de PBS1X (Figure 56-C). Ces formulations sont également stables pour au moins une semaine, où juste l’homogénéité semble légèrement augmenter (IP : 0,15) (Figure 56-B). En ce qui concerne les points à améliorer, ceux-ci sont identiques à ceux évoqués pour l’adsorption de la LTA.



**Figure 56 :** Mise au point de l’adsorption de la lectine PNA sur des nanoparticules de PLA. (A) Pour une concentration fixe en nanoparticules (0,25% finale), l’intervalle de stabilité (rectangle bleu) est obtenu pour un apport d’une concentration en lectine comprise entre 5 et 50 µg/mL (finale). (B) Les formulations de nanoparticules de PLA-PNA (0,25% et 25 µg/mL finaux respectivement) sont stables pendant au moins une semaine. (C) Récapitulatif des caractéristiques de la formulation de nanoparticules de PLA-PNA retenue.

Nous avons donc réussi à passer une étape cruciale dans le développement d’une stratégie de ciblage, à savoir être capable d’adsorber les éléments dans des conditions non-complexes au sein d’un tampon qui ne devrait avoir qu’une incidence modérée sur la biodistribution par voie muqueuse une fois dilué dans l’eau d’animerie (278). Toutefois quelques inconvénients subsistent. Les concentrations de lectines utilisées pour les adsorptions sont à la limite inférieure des seuils de détection des différents kits de dosage de protéines disponibles au laboratoire, en conséquence nous n’avons pas été en mesure de quantifier de manière précise la quantité de lectine libre restante. Néanmoins l’observation d’une augmentation du diamètre des nanoparticules est un témoin de l’adsorption d’au moins une partie des lectines.

## 2.3. Evaluation préliminaire de la biodistribution

La première évaluation préliminaire des stratégies de ciblage a été réalisée par une administration des nanoparticules (0,01%) par immersion durant 24 heures chez des poissons-zèbre adultes. A la différence de l'étude sur la biodistribution précédemment décrite pour les nanoparticules de PLA non formulées, ici, l'eau dans laquelle ont été réalisées les immersions était légèrement saumâtre. En effet dans les 100 mL d'eau d'immersion se trouve 4 mL de PBS1X (tampon dans lequel se trouvent les formulations de nanoparticules PLA-LTA et PLA-PNA). On est donc en présence d'une eau d'animalerie avec une concentration en PBS de 0,04X (l'eau pour les conditions sans lectine a reçu la même quantité de PBS1X). Afin de pouvoir détecter les nanoparticules des différentes formulations, un fluorophore a été encapsulé au sein de chaque nanoparticule. Les observations ont ensuite été focalisées sur les muqueuses intestinale, branchiale et cutanée.

L'objectif de ces observations est de déceler toute modification notable de la biodistribution des nanoparticules avec les différentes lectines par rapport à la biodistribution des nanoparticules nues.

### Muqueuse intestinale

Pour chaque condition expérimentale, il a été réalisé des acquisitions au sein de l'intestin intermédiaire antérieur (MG) à faible (objectif x10) et fort (objectif x63) grossissement, et au sein de l'intestin intermédiaire postérieur (pMG) à fort grossissement. Dans la condition « témoin négatif » où aucune nanoparticule n'a été administrée (**Figure 57- A-A''**), seule une rare autofluorescence a été détectée dans la *lamina propria* de l'intestin intermédiaire antérieur.

En ce qui concerne la biodistribution des nanoparticules de PLA nues (**Figure 57- B-B''**), par rapport aux données récoltées dans la partie 1 (publication), le passage des nanoparticules dans la *lamina propria* de l'intestin intermédiaire antérieur et postérieur semble plus marqué.

Bien que cela ne soit que des résultats préliminaires, il semble que l'adsorption de lectine LTA sur les nanoparticules de PLA (**Figure 57- C-C''**) favorise le passage des nanoparticules dans la *lamina propria* de l'intestin intermédiaire antérieur. En effet, les fortes accumulations semblent plus nombreuses et intenses que pour les nanoparticules nues. Cette observation nécessite toutefois une confirmation par des techniques de quantification. Au niveau de l'intestin intermédiaire postérieur, les nanoparticules sont internalisées par les entérocytes spécialisés et il ne semble pas y avoir de modification flagrante vis-à-vis de la condition avec

les nanoparticules nues. Comme pour l'observation précédente, seule une quantification pourrait indiquer si la prise en charge est plus ou moins intense. Il est possible que la stratégie de ciblage basée sur l'adsorption de lectine LTA soit donc potentiellement bénéfique pour la pénétration des nanoparticules dans la muqueuse intestinale.

L'adsorption de la lectine PNA (*Figure 57- D-D''*) semble aussi favoriser la pénétration des nanoparticules dans la *lamina propria* de l'intestin intermédiaire antérieur. Néanmoins, ces accumulations paraissent moins intenses que pour la formulation de nanoparticules de PLA-LTA. Aucune différence notable par rapport aux deux autres formulations nanoparticulaires n'est observée au niveau de l'intestin intermédiaire postérieur, les nanoparticules sont prises en charge par les entérocytes spécialisés. Etablie grâce à l'observation selon laquelle un marquage intestinal avec une forte exposition à la lectine PNA révèle la bordure en brosse, la stratégie d'adsorber la lectine PNA sur les nanoparticules semble en effet augmenter le passage des nanoparticules de PLA. Toutefois, cette observation est à prendre avec précaution car non seulement elle nécessite confirmation mais surtout le potentiel effet semble moins évident que lors de l'utilisation de la lectine LTA adsorbée sur les nanoparticules de PLA.

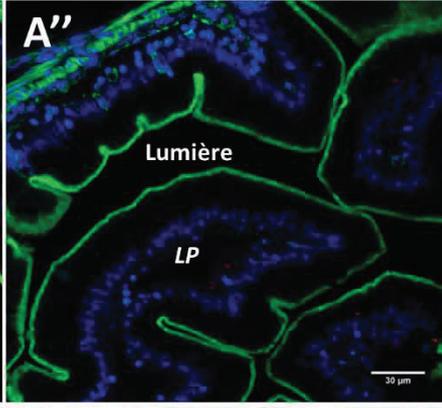
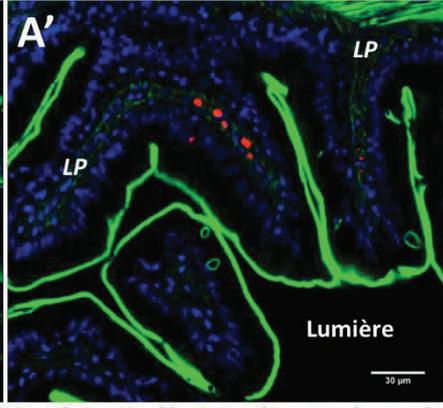
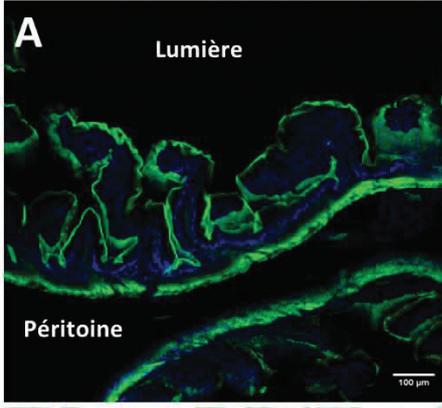
Dans l'ensemble, les données obtenues au niveau de la muqueuse intestinale semblent indiquer un potentiel effet de ciblage des lectines LTA et PNA une fois adsorbée sur les nanoparticules de PLA.

MG x10

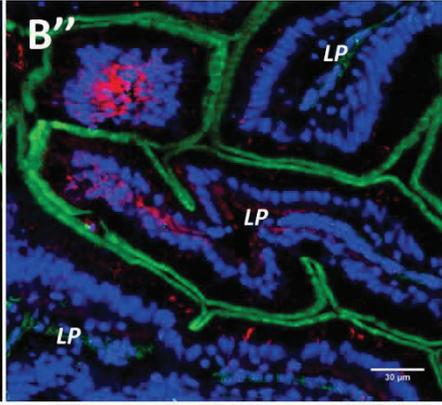
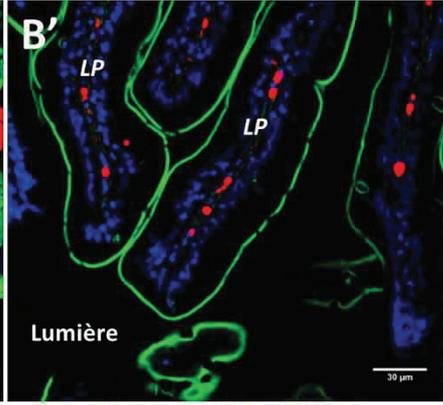
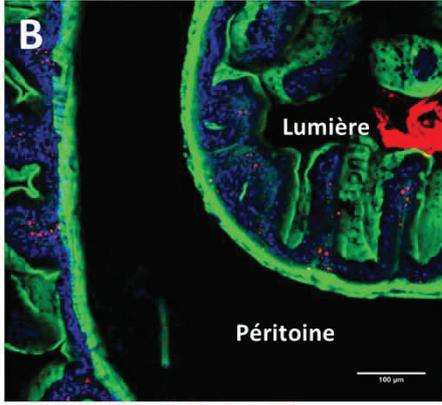
MG x63

pMG x63

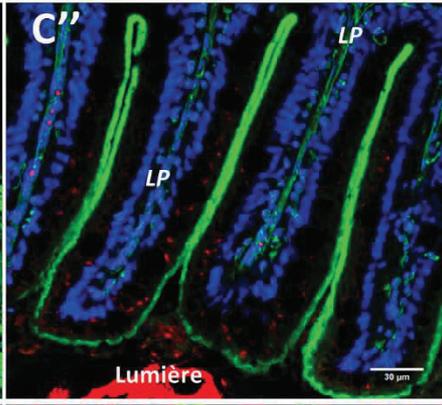
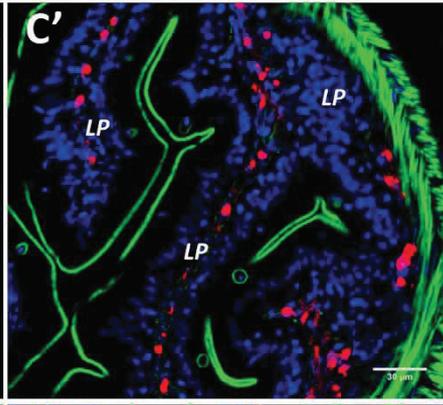
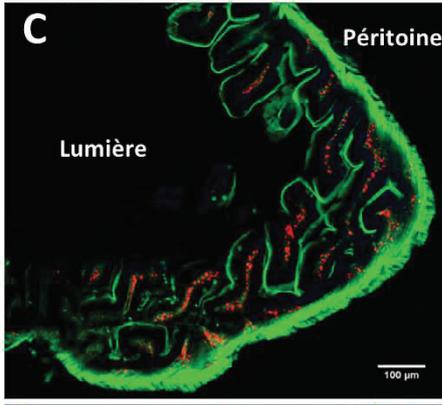
Témoin négatif



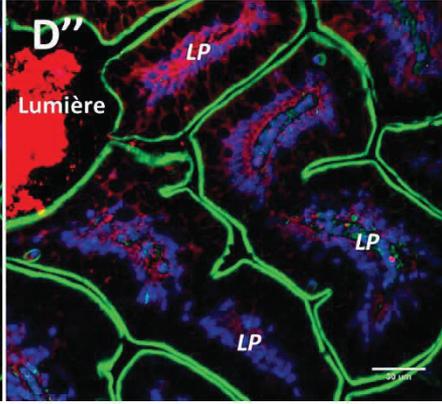
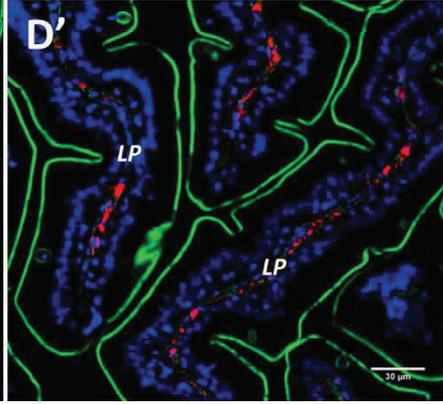
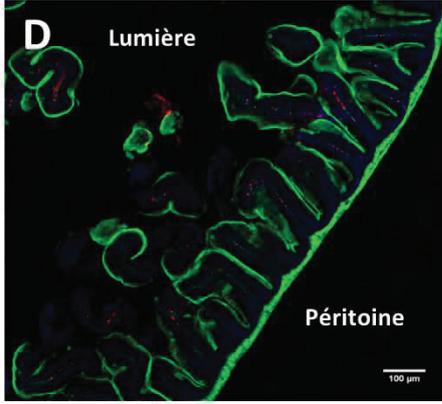
PLA



PLA-LTA



PLA-



**Figure 57 :** Evaluation préliminaire de la biodistribution de nanoparticules de PLA nues, formulées avec de la lectine LTA ou bien formulées avec de la lectine PNA, au sein de la muqueuse intestinale. Les acquisitions ont été réalisées en microscopie confocale spectrale sur des cryosections (30µm) de poissons-zèbre adultes exposés aux nanoparticules par immersion durant 24h. Les nanoparticules sont illustrées en rouge, l'actine-fibrillaire en vert et les noyaux en bleu. (A-A'') Témoin négatif sans nanoparticules ;(A) Illustration de l'autofluorescence rouge au sein de l'intestin intermédiaire antérieur avec l'objectif x10. (A') Même illustration mais avec l'objectif x63, une rare autofluorescence est visible au sein de la *lamina propria*. (A'') Aucune autofluorescence n'est visible au sein de l'intestin intermédiaire postérieur. (B-B'') Administration de nanoparticules nues fluorescentes. Une prise en charge de nanoparticules est détectable au sein de la *lamina propria* de l'intestin intermédiaire antérieur aux objectifs x10 (B) et x63 (B'). Au sein de l'intestin intermédiaire postérieur, les nanoparticules sont internalisées par les entérocytes spécialisés et une fluorescence diffuse est également visible dans la *lamina propria* (B''). (C-C'') Administration d'une formulation de nanoparticules de PLA avec de la lectine LTA adsorbée. D'intenses et nombreuses accumulations de nanoparticules sont observées au sein de la *lamina propria* de l'intestin intermédiaire antérieur aux objectifs x10 (C) et x63 (C'). Au niveau de l'intestin intermédiaire postérieur, les nanoparticules sont prises en charge par les entérocytes spécialisés où elles sont localisées au sein des vacuoles supranucléaires (C''). (D-D'') Administration d'une formulation de nanoparticules de PLA avec de la lectine de PNA adsorbée. Des accumulations nombreuses sont détectées au sein de la *lamina propria* de l'intestin intermédiaire antérieur aux objectifs x10 (D) et x63 (D'). Au sein de l'intestin intermédiaire postérieur, les nanoparticules sont internalisées par les entérocytes spécialisés et une fluorescence diffuse est également visible au sein de la *lamina propria* (D''). LP : *Lamina propria*. Les barres d'échelles correspondent à : 100 µm (A, B, C, D) et 30 µm (A'-A'', B'-B'', C'-C'', D'-D'')

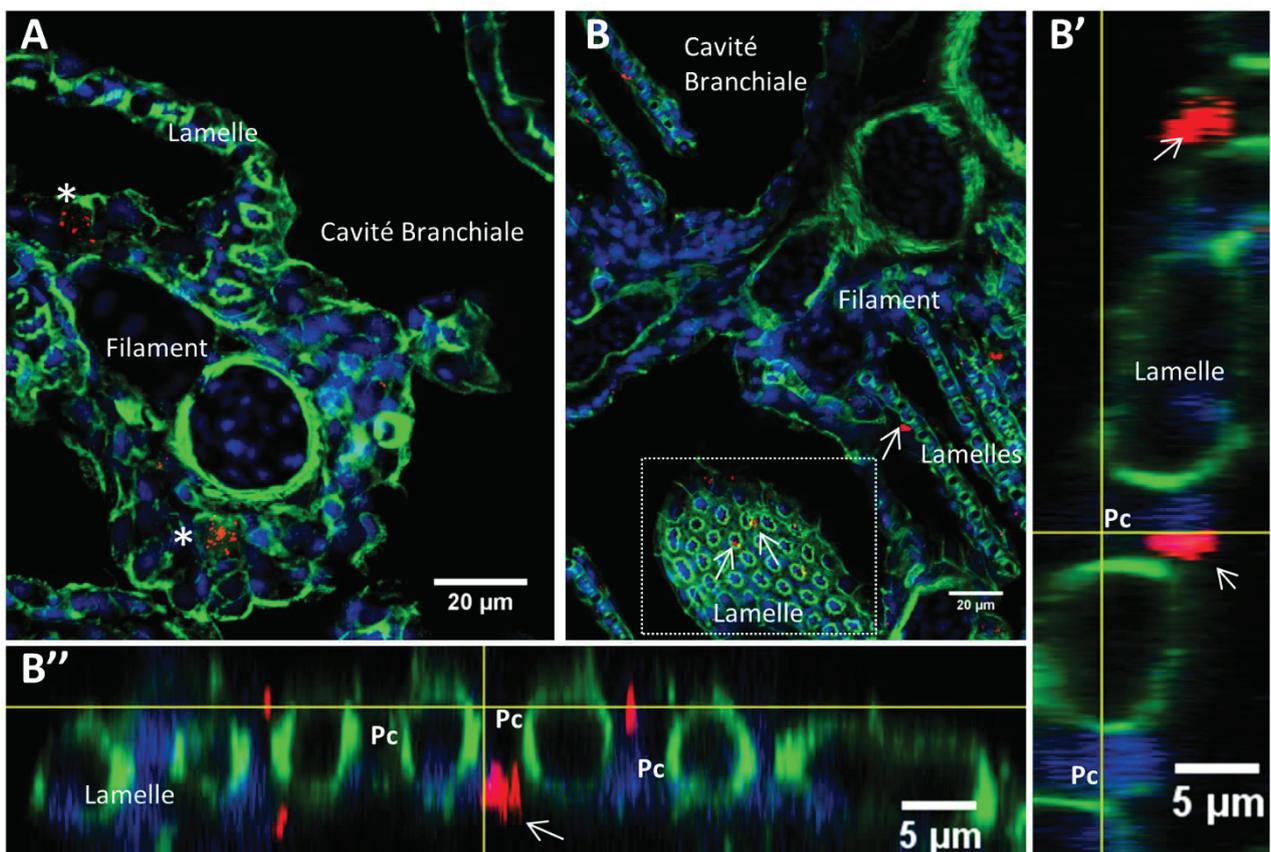
## Muqueuse branchiale

Au sein de la muqueuse branchiale, aucune amélioration remarquable n'a pu être observée avec la formulation de nanoparticules avec la lectine LTA adsorbée (non-montré). Il semble que cette stratégie de ciblage diminue la prise en charge des nanoparticules par les branchies. Cela ne représenterait pas forcément un inconvénient dans le cas d'une vaccination contre un pathogène ayant pour tropisme les intestins et non les branchies. Il est possible que chez le poisson-zèbre, à l'instar de la carpe, il n'y ait pas de séquence «  $\alpha$ -fucose » exposée au sein des branchies.

Au contraire, l'administration d'une formulation de nanoparticules de PLA-PNA offre une biodistribution nouvelle. Outre des accumulations de nanoparticules très intenses par des phagocytes au sein des filaments (**Figure 58-A**), celles-ci sont surtout détectables fréquemment au sein des lamelles (**Figure 58-B**). Les vues orthogonales révèlent que ces accumulations ne se situent pas dans la lumière des capillaires des lamelles, mais bien au niveau épithélial ou sous-épithélial (**Figure 58-B'-B''**). Ce changement notable de la biodistribution mérite des investigations approfondies au cas où cette observation puisse être liée à une augmentation de la pénétration des nanoparticules au sein des branchies.

Nous avons donc pu constater une possible différence entre la biodistribution des nanoparticules de PLA-LTA et celle des nanoparticules de PLA-PNA. Il ne semble pas pertinent d'effectuer de plus amples caractérisations de la biodistribution des nanoparticules de

PLA-LTA au sein des branchies. Pour les nanoparticules de PLA-PNA, la présence d'accumulations très intenses à la fois au sein des filaments et des lamelles de la muqueuse branchiale peuvent potentiellement indiquer une augmentation de la prise en charge des nanoparticules d'une manière générale. Nous disposons donc potentiellement d'une stratégie ciblant principalement les intestins et non les branchies (LTA), et une stratégie qui semble capable de renforcer le tropisme des nanoparticules vers les branchies et dans une moindre mesure les intestins.

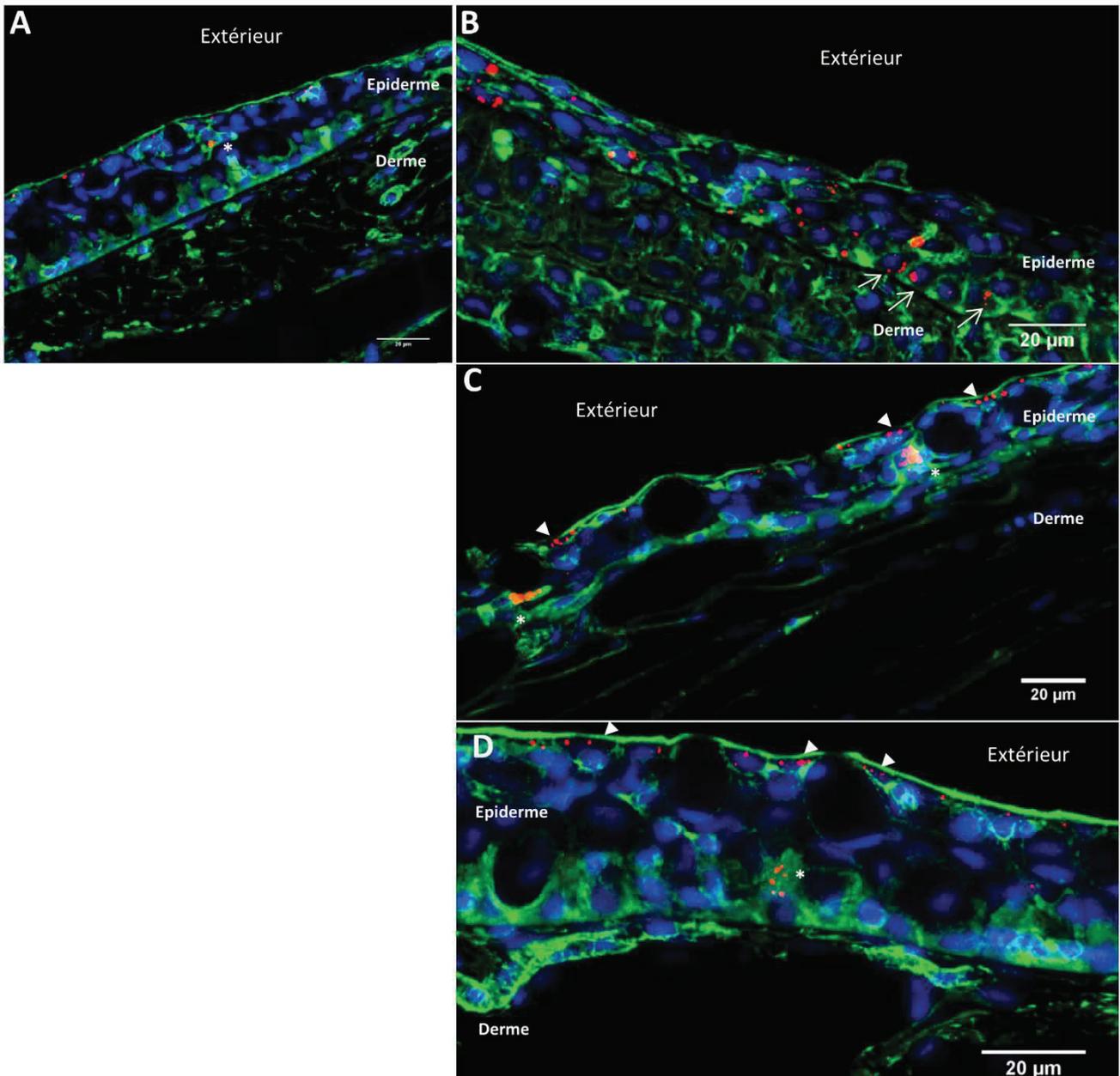


**Figure 58 :** Evaluation préliminaire de la biodistribution de nanoparticules de PLA formulées avec de la lectine PNA, au sein de la muqueuse intestinale. Les acquisitions ont été réalisées en microscopie confocale spectrale sur des cryosections (30µm) de poissons-zèbre adultes exposés aux nanoparticules par immersion durant 24h au sein d'une eau légèrement saumâtre. Les nanoparticules sont illustrées en rouge, l'actine-fibrillaire en vert et les noyaux en bleu. (A) Dans les filaments sont observées d'intenses accumulations de nanoparticules au sein de phagocytes sous-épithéliaux. (B) Par rapport aux observations réalisées précédemment avec des nanoparticules nues, des nanoparticules adsorbées avec de la lectine PNA sont observées dans les lamelles (flèches). (B'-B'') Les vues orthogonales du cadre blanc présent dans (B) indiquent que ces accumulations se localisent au sein de la couche épithéliale ou sous-épithéliale et non au sein de la lumière vasculaire. Pc : Cellule pilier. Barres d'échelle : 20 µm pour (A-B) et 5 µm pour (B'-B'')

## Muqueuse cutanée

L'administration de nanoparticules nues dans de l'eau légèrement saumâtre ne semble pas modifier la biodistribution par rapport à une même administration dans l'eau d'aquariologie usuelle. Les nanoparticules sont toujours capables de pénétrer les cellules pavimenteuses de la couche superficielle et d'être accumulées au sein de phagocytes résidant dans l'épiderme (*Figure 59-A*). L'ajout d'une stratégie de ciblage consistant à adsorber de la lectine PNA sur les nanoparticules semble induire un nouveau tropisme des nanoparticules. Bien que la biodistribution de ces nanoparticules soit hétérogène le long de la peau, dans certaines régions les nanoparticules ont été observées internalisées par les cellules de la couche basale de l'épiderme (*Figure 59-B*). Il semblerait que la prise en charge de ces nanoparticules par les cellules pavimenteuses (kératinocytes) soit également renforcée. En effet, le signal de fluorescence des nanoparticules observées paraît plus intense et semble être observé plus fréquemment parmi ces cellules. Pour finir, les accumulations de nanoparticules au sein des phagocytes intra-épidermiques semblent également plus intenses (*Figure 59-C*). Ainsi ces données préliminaires indiquent une possible amélioration de la pénétration des nanoparticules de PLA dans la muqueuse cutanée où elles sont internalisées par un nouveau type de cellules et où les accumulations semblent plus intenses.

En ce qui concerne la stratégie de ciblage basée sur la lectine LTA, à part une possible augmentation du nombre de kératinocytes internalisant des nanoparticules, ce qui nécessitera une confirmation par une expérience de quantification, aucune autre observation ne semble indiquer une biodistribution différente de celle des nanoparticules nues (*Figure 59-D*).



**Figure 59 :** Evaluation préliminaire de la biodistribution de nanoparticules de PLA nues, formulées avec de la lectine LTA ou bien formulées avec de la lectine PNA, au sein de la muqueuse intestinale. Les acquisitions ont été réalisées en microscopie confocale spectrale sur des cryosections (30µm) de poissons-zèbre adultes exposés aux nanoparticules par immersion durant 24h. Les nanoparticules sont illustrées en rouge, l'actine-fibrillaire en vert et les noyaux en bleu. (A) La biodistribution des nanoparticules de PLA nues montre que les nanoparticules sont capables de pénétrer la muqueuse cutanée où elles sont internalisées par des kératinocytes et accumulées par des phagocytes intra-épidermiques. (B) L'adsorption de lectine PNA sur les nanoparticules de PLA semble leur procurer un tropisme additionnel. Des nanoparticules sont en effet observées au sein de cellules composant la couche basale de l'épiderme. (C) Toujours avec les nanoparticules de PLA-PNA, le tropisme envers les cellules pavimenteuses et les phagocytes intra-épidermique est conservé, un signal intense de fluorescence étant observé dans ces cellules. (D) L'adsorption de lectine LTA sur les nanoparticules de PLA ne semble pas influencer sur la biodistribution. Les nanoparticules sont détectées au sein des kératinocytes (peut-être plus fréquemment) et des phagocytes intra-épidermiques. Barres d'échelle : 20 µm (A-D)

## Conclusion partielle

Ces résultats préliminaires indiquent que les deux stratégies de ciblage, développées pour répondre aux objectifs du travail de thèse, possèderaient chacune une influence différente sur la biodistribution des nanoparticules de PLA. La stratégie de ciblage basée sur la lectine LTA paraît favoriser la pénétration des nanoparticules vers la muqueuse intestinale, en particulier dans la région de l'intestin intermédiaire. La stratégie de ciblage induite par l'adsorption de lectine PNA semble quant à elle être capable de moduler la biodistribution au sein des trois muqueuses étudiées. Bien que l'effet ne soit pas flagrant au niveau de la muqueuse intestinale, de nouveaux tropismes ont pu être observés dans les branchies et la peau, en plus d'une potentielle augmentation de la prise en charge générale des nanoparticules.

Néanmoins, ces données demeurent préliminaires. Il est donc nécessaire de réaliser une évaluation de la prise en charge dans les organes pour mieux déterminer l'efficacité de ces deux stratégies de ciblage.

### 2.4. Evaluation par cytométrie en flux de la prise en charge des nanoparticules de PLA-PNA

Parmi les deux stratégies développées, c'est celle impliquant la lectine PNA qui a été choisie pour approfondir les caractérisations. D'une part parce que c'est la stratégie qui semble la plus prometteuse pour augmenter la prise en charge générale dans les muqueuses, mais aussi parce que c'est cette stratégie qui a induit de nouveaux tropismes pour les nanoparticules de PLA. De plus, ces nouveaux tropismes ont été observés dans les muqueuses branchiale et cutanée, les deux muqueuses où la biodistribution des nanoparticules de PLA nues a été caractérisée plus en détails au sein de la première partie.

L'expérience a pour objectif d'évaluer l'effet de l'adsorption de la lectine PNA sur la pénétration des nanoparticules dans les branchies et la peau. Cela devrait permettre de définir plus robustement si cette stratégie augmente la quantité de nanoparticules prise en charge dans ces muqueuses. Les suspensions cellulaires provenant des branchies ou de la peau de poissons-zèbre ont donc été analysées par cytométrie de flux sur la détection du fluorophore encapsulé dans les nanoparticules. Les données ont été acquises à partir de poissons-zèbre adultes exposés aux nanoparticules (0.01%) par immersion durant 24 heures. Pour chaque organe, nous avons fait les acquisitions de suspension cellulaire provenant : de poissons non-exposés aux nanoparticules afin de déterminer le seuil d'autofluorescence, de poissons exposés à des

nanoparticules de PLA nues fluorescentes, de poissons co-exposés à des nanoparticules de PLA nues fluorescentes et à de la lectine PNA soluble, de poissons exposés à des nanoparticules de PLA avec de la lectine PNA adsorbée.

### **Muqueuse Branchiale** (*Figure 60-A*)

En moyenne, 1,36% des cellules de branchies sont positives aux nanoparticules nues ce qui est en accord avec les observations réalisées dans la partie 1. L'adsorption de la lectine PNA ne montre aucune modification significative avec une moyenne à 1,26% de cellules NP<sup>+</sup>. Lorsque la lectine est co-administrée soluble avec les nanoparticules de PLA nues, le nombre de cellules NP<sup>+</sup> augmente significativement par rapport à la condition où elle est adsorbée (2,19%). En considérant un risque de 6% de visualiser un faux-positif, cela semble également augmenter vis-à-vis de l'administration de nanoparticules de PLA sans lectine. La différence entre les conditions PNA adsorbée ou soluble conforte l'idée que la lectine est bien adsorbée à la surface des nanoparticules lorsque l'on effectue l'administration des nanoparticules de PLA-PNA.

L'intensité moyenne de fluorescence par cellule a également été analysée, elle est directement liée à la quantité de nanoparticules internalisées par les cellules. Bien que l'adsorption de la lectine PNA sur les nanoparticules de PLA n'influence pas le nombre de cellules NP<sup>+</sup>, la quantité de nanoparticules par cellule est en moyenne doublée significativement par rapport à la condition où seules des nanoparticules nues ont été administrées. Dans la condition où la lectine est administrée soluble, avec une forte versatilité entre les acquisitions, la quantité de nanoparticules par cellules paraît plus élevée mais n'est pas significativement différente.

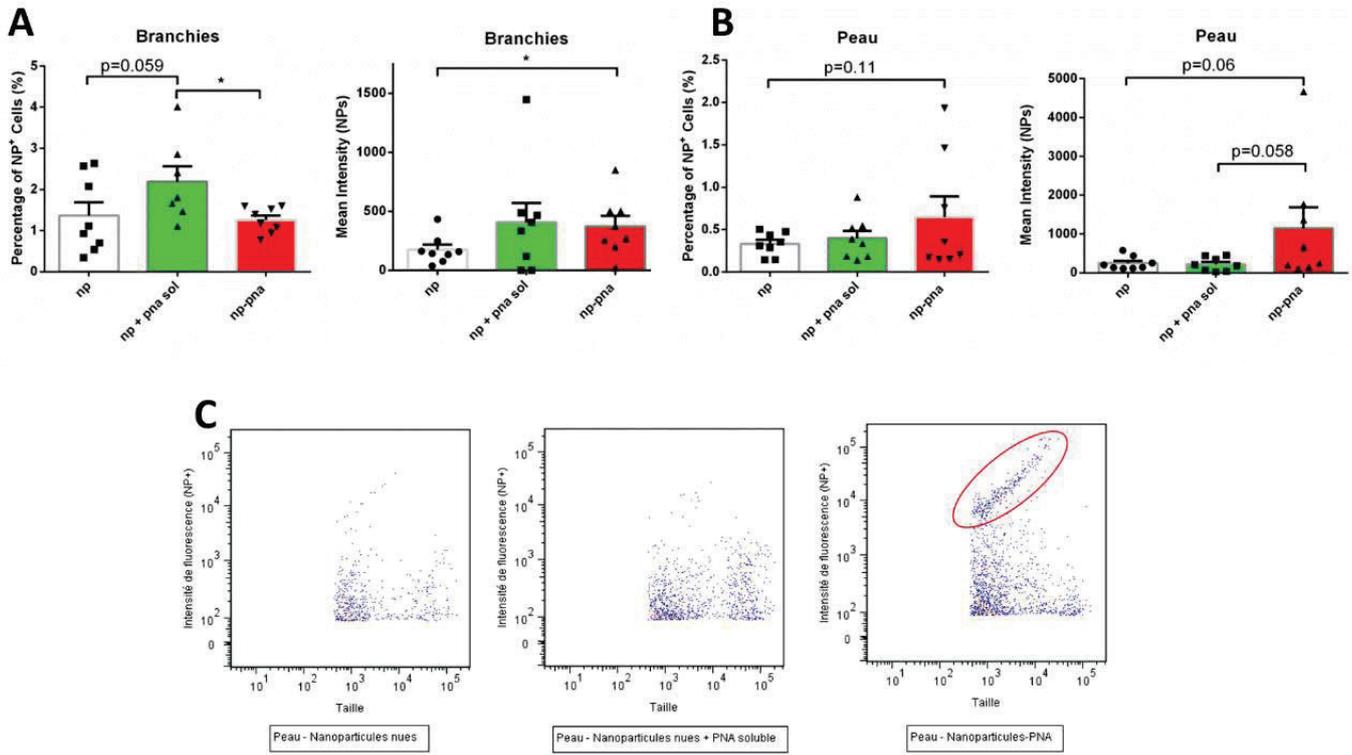
Cette expérience confirme que la stratégie de ciblage mise au point permet d'augmenter la prise en charge des nanoparticules de PLA par les branchies (+113%), ce qui est loin d'être négligeable. De plus, la lectine soluble semble avoir le potentiel d'être capable d'améliorer la prise en charge des nanoparticules par les branchies

## Muqueuse cutanée (Figure 60-B-C)

Au niveau de la peau, l'absence d'influence de la lectine PNA soluble sur la prise en charge des nanoparticules de PLA nues est en contraste avec les données provenant de la muqueuse branchiale.

En considérant un risque de 11% d'avoir obtenu un faux-positif, l'adsorption de la lectine PNA sur les nanoparticules semble pouvoir amplifier le nombre de cellules NP<sup>+</sup>. De même, avec un risque de 6% d'observer un faux-positif, cette stratégie semble également augmenter la quantité de nanoparticules par cellules. Les données sont à la limite de la significativité (marge d'erreur : < 5%), la réalisation de nouvelles acquisitions provenant de nouveaux échantillons biologiques pourrait permettre d'améliorer la pertinence des résultats. Si après augmentation du nombre de spécimens ces observations se confirmaient, l'adsorption de la PNA serait capable de multiplier par 7 la quantité de nanoparticules pénétrant la muqueuse cutanée.

! L'observation des back-gates sur la population de cellules NP<sup>+</sup> révèle l'apparition d'une sous population parmi les poissons ayant internalisé le plus de nanoparticules de PLA-PNA. (Figure 60-C: ovale rouge).



D	Branchies		Peau	
	Pourcentage de cellules Nanoparticules + (%)	Intensité de fluorescence par cellules	Pourcentage de cellules Nanoparticules +	Intensité de fluorescence par cellules
<b>Formulation (0,01%) Immersion 24h</b>				
<b>Nanoparticules nues (Bodipy TR)</b>	1,36	174	0,33	246
<b>Nanoparticules nues (Bodipy TR) + PNA soluble</b>	2,189 (+74%) p:0,059	407 (+134%)	0,4 (+21%)	218 (-11%)
<b>Nanoparticules-PNA (Bodipy TR)</b>	1,26 (-7%)	372 (+113%) *	0,65 (+97%) p:0,11	1143 (+365%) p:0,06

**Figure 60 :** Evaluation de la prise en charge de nanoparticule dans les branchies et la peau par cytométrie en flux. Les suspensions cellulaires proviennent de poissons-zèbre adultes immergés 24 heures dans une solution de nanoparticules de PLA nues, de nanoparticules de PLA nues co-administrées avec de la lectine PNA soluble ou bien de nanoparticules de PLA-PNA. (A) Dans la muqueuse branchiale, l'adsorption de lectine PNA double la quantité de nanoparticules internalisées par cellule. La lectine soluble augmente également la quantité de nanoparticules par cellule, mais également la quantité de cellules NP<sup>+</sup>. (B) Dans la muqueuse cutanée, seule l'adsorption de lectine PNA permet d'augmenter et la quantité de cellules NP<sup>+</sup>, et la quantité de nanoparticules de PLA par cellule. (C) Au sein des suspensions cellulaires provenant de muqueuse cutanée, la réalisation de backgates sur les populations de cellules NP<sup>+</sup> révèle la présence d'une sous-population de cellules spécifiquement dans le cas où la lectine PNA est adsorbée sur les nanoparticules. (D) Tableau récapitulatif de la prise en charge des nanoparticules. La significativité est exprimée : p<0.05 (\*)

## Conclusion partielle

Dans l'ensemble, les résultats de cette expérience suggèrent que la lectine PNA soit capable d'influencer la biodistribution des nanoparticules de PLA, aussi bien adsorbée sur les nanoparticules que soluble. La stratégie de ciblage pourrait permettre d'accroître la pénétration des nanoparticules dans les branchies et la peau du poisson-zèbre lors d'une immersion.

De plus, le fait que la lectine soluble semble avoir un effet sur la biodistribution des nanoparticules soulève l'hypothèse que plusieurs mécanismes sont potentiellement impliqués dans cette augmentation de la prise en charge des nanoparticules de PLA-PNA.

Des recherches supplémentaires sont donc nécessaires pour essayer d'appréhender le mode d'action de cette stratégie de ciblage. Bien que la stratégie soit efficace pour augmenter la biodistribution des nanoparticules de PLA dans ces deux organes, en comprendre le fonctionnement permettrait d'optimiser les paramètres d'administration.

### 2.5. Evaluation préliminaire par microscopie confocale du devenir de la lectine PNA

Les expériences précédentes ont soulevé de nouvelles interrogations dont la résolution nécessite des données sur le mode d'action de cette stratégie de ciblage basée sur l'adsorption de lectine PNA sur les nanoparticules de PLA. L'objectif de cette évaluation préliminaire est de mieux appréhender le devenir de la lectine PNA adsorbée sur les particules lors de l'administration par immersion. En effet les questions soulevées sont : La lectine se décroche-t-elle des nanoparticules ? La biodistribution de la lectine est-elle identique à celles des nanoparticules ? Est-ce qu'il y a un ciblage spécifique de certaines cellules par la lectine PNA ?

Pour répondre à ces questions, des poissons-zèbres adultes ont été exposés par immersion (24 heures) à des nanoparticules de PLA-PNA (0.01%) fluorescentes au sein d'une eau légèrement saumâtre. Une fois les immersions finies, les poissons ont été euthanasiés, fixés, congelés, puis des cryosections de 30 µm d'épaisseur ont été réalisées. Ensuite, les observations ont été focalisées sur les muqueuses branchiale et cutanée après avoir réalisé un immuno-marquage anti-PNA. Considérant la faible quantité de lectine présente sur les nanoparticules, le marquage a été réalisé en utilisant 3 anticorps successifs afin de réduire les marquages non-spécifiques et d'amplifier suffisamment le signal spécifique de la lectine PNA.

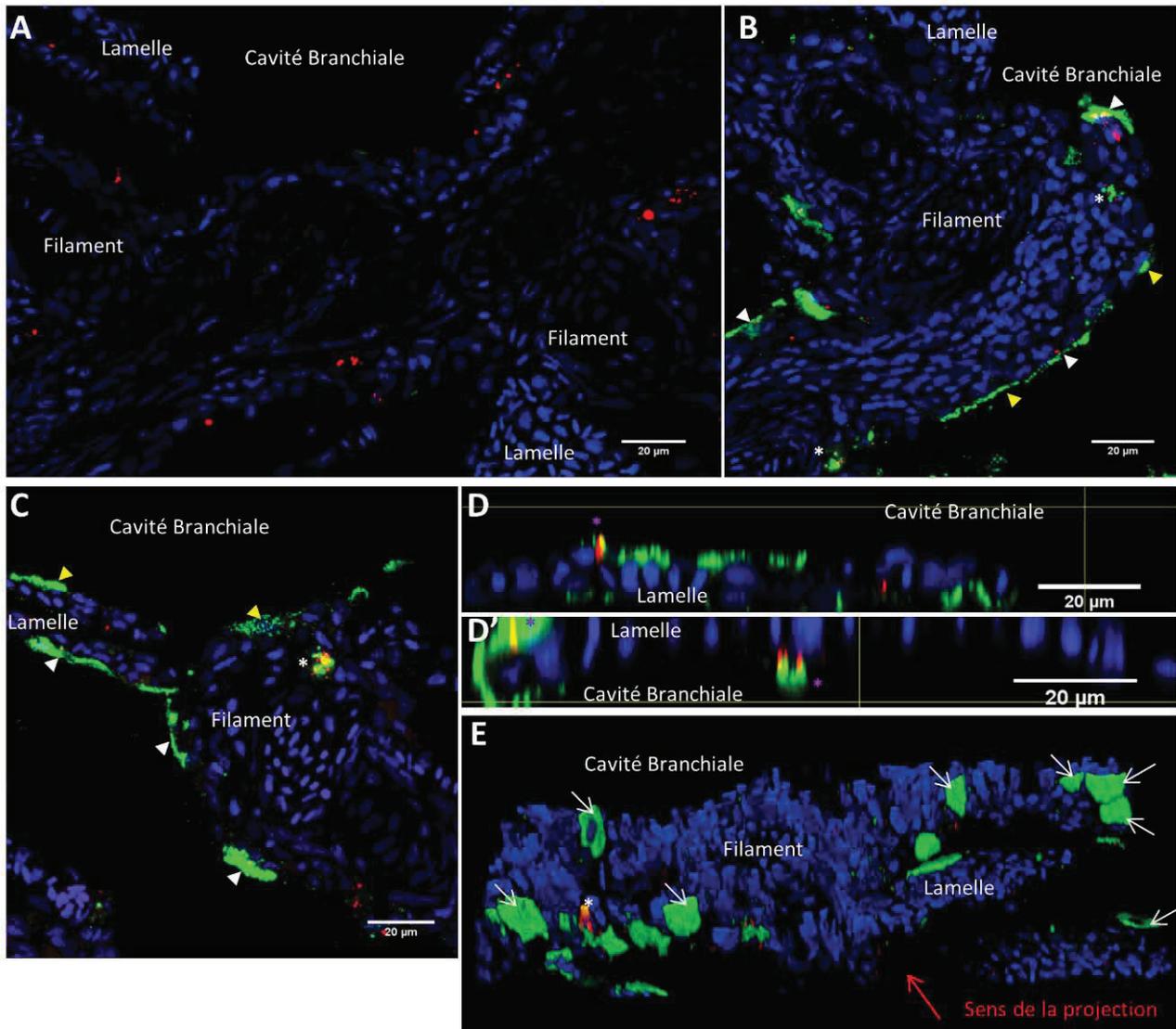
## Muqueuse Branchiale

La première étape réalisée fut la détermination de l'existence des épitopes endogènes reconnus par l'anticorps anti-PNA. Le marquage sur des poissons-zèbres exposés à des nanoparticules nues n'a pas révélé d'épitopes endogènes (*Figure 61-A*).

Concernant l'administration des nanoparticules de PLA-PNA, il semble que l'anticorps ne soit pas capable de se fixer sur la lectine PNA adsorbée, ce qui est possiblement dû à un encombrement stérique. Par contre le marquage révèle la présence de lectine PNA en surface de certaines cellules épithéliales ayant internalisé (pointe de flèche blanche) ou non (pointe de flèche jaune) des nanoparticules (*Figure 61-B-C*). Cela indique que non seulement il existe des séquences « Gal- $\beta$ (1-3)-GalNAc » en surface de certaines cellules pavimenteuses, mais aussi qu'il y a un potentiel effet de compétition d'affinité entre les nanoparticules et la surface de ces cellules pour la lectine PNA. Néanmoins il n'est pas possible à ce point de déterminer si cela favorise le passage des nanoparticules ou non, certaines cellules recouvertes de PNA n'ayant pas internalisé de nanoparticules. En contraste, au sein des phagocytes accumulant les nanoparticules (Etoile blanche) se trouve également un marquage intense de la lectine PNA. Cela indique que les lectines PNA initialement adsorbées en surface des nanoparticules ne se fixent pas intégralement en surface des cellules épithéliales et qu'elles peuvent avoir potentiellement un effet sur l'internalisation des nanoparticules par les phagocytes.

Concernant l'apparition du nouveau tropisme des nanoparticules vers des cellules de lamelles de branchies, ces intenses accumulations de nanoparticules sont localisées en-dessous de membranes plasmiques recouverte de lectine PNA (étoile magenta). Cela conforte l'idée que la liaison de la lectine PNA puisse tout-de-même affecter la prise en charge des nanoparticules de PLA (*Figure 61-D-D'*).

Enfin, les cryosections étant d'une épaisseur de 30  $\mu\text{m}$ , des projections 3D ont pu être réalisées à partir d'acquisitions tous les micromètres (*Figure 61-E*). Ces projections 3D confirment que la fixation de lectine PNA en surface des cellules pavimenteuses de branchies est spécifique à certaines cellules, il est d'ailleurs possible d'observer la limite entre deux cellules recouvertes de PNA.



**Figure 61 :** Distribution de la lectine PNA adsorbée sur de nanoparticules de PLA au sein de la muqueuse branchiale. Les acquisitions ont été réalisées en microscopie confocale spectrale sur des cryosections (30 $\mu$ m) de poissons-zèbre adultes exposés aux nanoparticules par immersion durant 24h au sein d'une eau légèrement saumâtre. Les nanoparticules sont illustrées en **rouge**, la lectine PNA en **vert** et les noyaux en **bleu**. (A) Le marquage anti-PNA au sein de poissons exposés à des nanoparticules nues sans lectine ne révèle pas la présence d'épitope endogène. (B-C) La lectine adsorbée sur les nanoparticules recouvre l'extrémité apical de certaines cellules pavimenteuses, qu'elles aient internalisé ou non des nanoparticules. La lectine est également internalisée par les phagocytes accumulant les nanoparticules. (D-D') La réalisation de vue orthogonale montre qu'au sein des lamelles, les accumulations intenses se situent à proximité de membranes plasmiques recouvertes par de la PNA. (E) Projection 3D de l'ensemble d'une cryosection qui illustre le caractère spécifique de la liaison de la lectine PNA en surface de certaines cellules pavimenteuses. Barres d'échelles : 20  $\mu$ m (A-D')

## Muqueuse cutanée

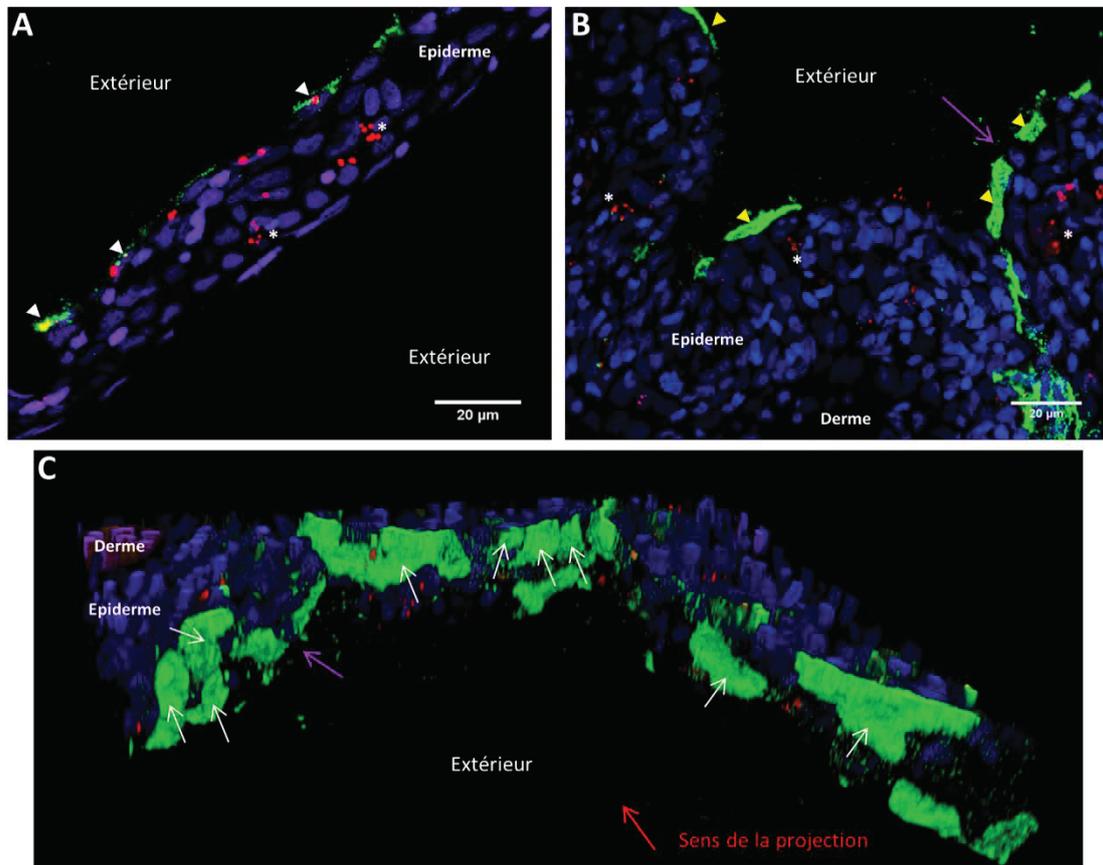
La distribution de la lectine PNA, adsorbée initialement sur les nanoparticules de PLA, au sein de la peau semble relativement similaire à celle au niveau de la muqueuse branchiale. Comme pour les branchies, la lectine recouvre spécifiquement certaines cellules pavimenteuses (*Figure 62-A-B*). De même ces cellules ne sont pas nécessairement positives pour l'internalisation de nanoparticules. Par contre, la lectine n'est pas détectée au sein des accumulations intra-épidermiques de nanoparticules. Il est possible que ces phagocytes ne prennent en charge que des nanoparticules sans lectine PNA, ou bien que la lectine ne se soit pas encore décrochée des nanoparticules dans le compartiment cellulaire. En effet, l'anticorps anti-PNA utilisé n'est pas capable de révéler la lectine encore adsorbée sur les nanoparticules de PLA.

Les réalisations des projections 3D confirment, comme pour les branchies, que la lectine PNA recouvre spécifiquement certaines cellules pavimenteuses (*Figure 62-C*). La projection 3D illustrée et l'acquisition en B sont issues de la même cryosection, la flèche mauve est un repère indiquant la correspondance entre les régions.

## Conclusion partielle

Les résultats montrent que la lectine semble interagir d'une manière similaire avec les composantes biologiques des muqueuses branchiales et cutanées. En effet, plusieurs phénomènes de liaison de la lectine PNA avec des composants organiques des muqueuses branchiale et cutanée ont été observés. Néanmoins à ce stade il n'est pas possible de déterminer s'ils sont impliqués dans les effets observés sur la biodistribution durant l'expérience de cytométrie en flux..

Ces résultats demeurent préliminaires et ne permettent ainsi que d'entrevoir un aperçu de l'effet de la lectine PNA sur la biodistribution des nanoparticules de PLA. De nombreuses études plus approfondies sont nécessaires afin de pouvoir voir émerger les premières conclusions.



**Figure 62 :** Distribution de la lectine PNA adsorbée sur de nanoparticules de PLA au sein de la muqueuse cutanée. Les acquisitions ont été réalisées en microscopie confocale spectrale sur des cryosections (30μm) de poissons-zèbre adultes exposés aux nanoparticules par immersion durant 24h au sein d'une eau légèrement saumâtre. Les nanoparticules sont illustrées en **rouge**, la lectine PNA en **vert** et les noyaux en **bleu**. (A-B) La lectine PNA recouvre l'extrémité apicale de cellules pavimenteuses mais n'est pas détectée au sein des accumulations intra-épidermiques de nanoparticules. (C) Projection 3D illustrant la spécificité du recouvrement de la surface plasmique de certaines cellules pavimenteuses par la lectine PNA. Barres d'échelle : 20 μm (A-B)

## 3. Matériels et méthodes

### **Analyse des caractéristiques des suspensions nanoparticulaires.**

Le diamètre moyen et l'homogénéité de taille ( $I_p$ ) des différentes formulations de nanoparticules de PLA, ont été déterminés par la méthode de diffusion dynamique de la lumière en utilisant un appareil Zetasizer nanoS (MALVERN INSTRUMENT, UK). Cette technique repose sur le mouvement brownien des nanoparticules en suspension.

### **Adsorption des LTA et PNA.**

La lectine LTA a été adsorbée sur les nanoparticules de PLA par un mélange volume à volume d'une solution de lectine LTA (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) et de nanoparticules de PLA (0,5%). Le mélange est ensuite agité rotativement pendant 2h à TA puis stocké à 4°C jusqu'à utilisation.

La lectine PNA a été adsorbée sur les nanoparticules de PLA par un mélange volume à volume d'une solution de lectine PNA (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) et de nanoparticules de PLA (0,5%). Le mélange est ensuite agité rotativement pendant 2h à TA puis stocké à 4°C jusqu'à utilisation.

### **Histologie – Expérience préliminaire.**

Afin d'évaluer qualitativement la biodistribution des nanoparticules de PLA-LTA et PLA-PNA, des poissons-zèbre adultes ont été exposés par immersion aux différentes formulations de nanoparticules (0,01%) durant 24h. Les différentes conditions sont les suivantes : contrôle négatif en absence de nanoparticules, contrôle d'exposition avec des nanoparticules de PLA nues, exposition aux nanoparticules de PLA-LTA, exposition aux nanoparticules de PLA-PNA. Chaque formulation de nanoparticules utilisée possédait du CELLTRACE BODIPY TR METHYLESTER (Life technologies) encapsulé pour pouvoir les détecter par fluorescence.

Les poissons ont été mis à mort après les 24h d'exposition par surdose d'anesthésiant (tricaine – Sigma aldricht), puis fixés en PFA 4% (thermofischer) congelés en isopentage (Sigma-Aldricht) et cryosectionnés (30  $\mu\text{m}$ ).

Les lames ont été traitées avec de la phalloïdine-dylight488 (Thermofischer) et du DAPI (Sigma-aldricht) pour révéler la structure des tissus et les noyaux, respectivement.

Après montage des lames avec du vectashield, les acquisitions ont été réalisées avec un microscope confocal spectral droit SP5 (Leica). Les données ont ensuite été analysées avec le logiciel ImageJ.

Deux poissons par condition ont été utilisés.

### **Histologie – Marquage anti-PNA**

Des cryosections non-traitées, provenant de poissons-zèbre exposés aux nanoparticules de PLA-PNA durant 24h par immersion, obtenues ci-dessus ont été utilisées. Les lames ont tout d'abord été saturées avec une solution de BlockAid non diluée (Thermofischer) durant 30 minutes à TA, puis incubées en présence d'un anticorps de chèvre anti-PNA (Vector lab - 1/500 1h TA), puis après lavage, d'un anticorps de lapin anti- chèvre (Jackson – 1/500 30mn TA), puis après un autre lavage, d'un anticorps anti-lapin-dylight488 (Thermofischer – 1/500 30mn TA)

Les lames ont ensuite été traitées avec du DAPI (3 µg/mL) pendant 10 minutes et montées avec du milieu de montage vectashield (Vector lab). Les acquisitions ont été réalisées avec un microscope confocal spectral droit SP5 (Leica). Les données ont ensuite été analysées avec le logiciel ImageJ.

### **Cytométrie en flux**

Plusieurs conditions d'exposition de poissons-zèbre adultes ont été réalisées :

- Contrôle négatif en absence de nanoparticule
- Contrôle d'administration de nanoparticules de PLA nues (0,01%)
- Co-administration de nanoparticules de PLA nues (0,01%) et de la lectine PNA soluble (1 µg/mL)
- Administration de nanoparticules de PLA avec de la lectine PNA adsorbée (0,01% et 1µg/mL)

Chaque poisson est immergé individuellement dans 100 mL d'eau d'animalerie / PBS 0.04X, contenant ou non les différentes formulations ci-dessus, durant 24h à 28°C. Afin de pouvoir détecter les nanoparticules par fluorescence, chaque formulation nanoparticulaire ci-dessus avait du CELLTRACE BODIPY TR METHYLESTER encapsulé.

Les poissons ont été mis à mort par excès d'anesthésiant, les branchies et la peau ont été prélevées dans une solution de PBS1X/Héparine (1U/mL)/SVF (2%) à 4°C. Les suspensions cellulaires ont été obtenues en homogénéisant les organes prélevés à travers un filtre cellulaire à maille de 40µm (Fisherbrand). S'en est suivi un cycle de lavages, pour retirer le maximum de débris et de graisses, par centrifugation (400g 8mn 4°C) et resuspension en PBS1X/SVF (2%). Les suspensions cellulaires ont ensuite été traitées avec du DAPI (2,5 µg/mL), pour exclure les cellules mortes, juste avant l'acquisition des données. Celle-ci a été réalisée en utilisant un cytomètre de flux LSRII (BD Biosciences). Les données ont ensuite été analysées avec le logiciel FlowJo v7.6.5.

## 4. Conclusion

Lors du travail de thèse, deux stratégies de ciblage ont été identifiées sur les bases du biomimétisme des lectines. Les lectines LTA et PNA ont chacune été adsorbées sur des nanoparticules de PLA ce qui a fourni des formulations de qualité en terme d'homogénéité, de taille et de stabilité. La stratégie basée sur la lectine LTA s'est avérée potentiellement bénéfique pour la pénétration des nanoparticules dans la muqueuse de l'intestin intermédiaire. Étudiée plus en détail, la stratégie utilisant la lectine PNA adsorbée procure de nouveaux tropismes aux nanoparticules de PLA dans les branchies et la peau. Cette stratégie est efficace pour augmenter d'un facteur 2 la prise en charge des nanoparticules par la muqueuse branchiale, tandis qu'une potentielle augmentation de la prise en charge au sein de la muqueuse cutanée semble envisageable. Néanmoins, ces données ont soulevé de nombreuses questions sur les mécanismes impliqués dans ces effets bénéfiques sur la biodistribution des nanoparticules de PLA.

Quoi qu'il en soit, ces deux stratégies méritent d'être étudiées plus en détail, au niveau de la quantification mais également sur l'identification de leur mode d'action. En effet, être capable d'orienter la pénétration des muqueuses par les nanoparticules avec une infime quantité de lectines pourrait ouvrir de nombreuses perspectives d'applications.

## 1. Introduction

L'administration intraveineuse est une des voies les plus utilisées pour l'administration de principes actifs. Néanmoins, elle est mal adaptée pour l'administration de produits hydrophobes et souffre en général d'un manque de spécificité responsable de l'apparition d'effets indésirables. L'utilisation de nanoparticules, comme celles à base de PLA élaborées au sein de l'équipe du Dr. VERRIER, rend possible l'utilisation de composés hydrophobes (encapsulés dans la matrice de polymère). De plus, ces nanoparticules sont compatibles avec l'utilisation de stratégies de ciblage capable de réduire le manque de spécificité inhérent aux injections systémiques. De plus, lors des administrations par immersion, nous avons pu observer que les nanoparticules de PLA atteignent la circulation sanguine. Il nous est donc paru opportun d'analyser le devenir et la biodistribution des nanoparticules de PLA après administration intraveineuse.

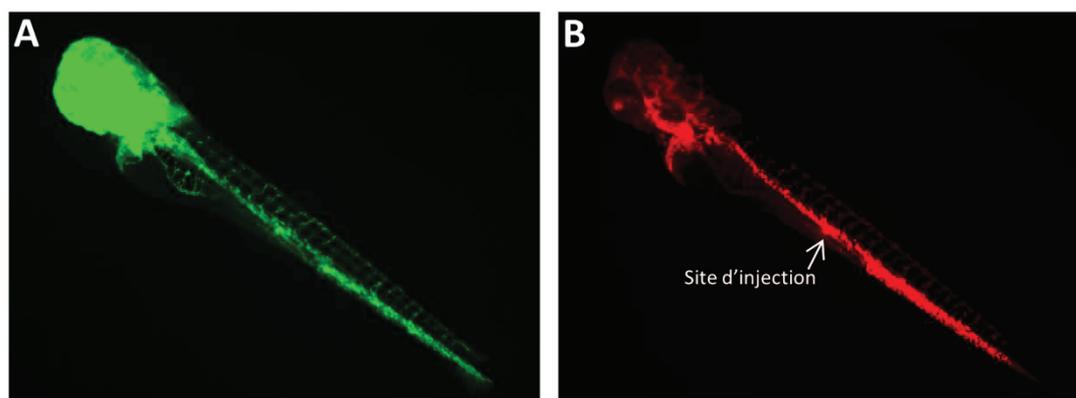
Malheureusement, peu de données sont accessibles concernant les interactions des nanoparticules de PLA avec le système vasculaire *in vivo*. Une étude a montré que les nanoparticules de PLA sont internalisées *in vitro* par des lignées de cellules endothéliales provenant de la vasculature cérébrale (307). *In vivo*, ces mêmes auteurs ont observé la fluorescence contenue dans les nanoparticules au niveau de vaisseaux sanguins cérébraux de souris (308).

Réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr. LEVRAUD, l'objectif principal de cette partie est de mieux comprendre, après une injection intraveineuse, le devenir *in vivo* des nanoparticules de PLA et comment elles interagissent avec le système circulatoire. Ces études seront plus élaborées sur l'endothélium vasculaire et les phagocytes du système réticulo-endothélial. Nous analyserons le dynamisme du devenir des nanoparticules de PLA après l'injection intraveineuse de nanoparticules de PLA au sein de larves de poissons-zèbre (3 jours post-fécondation). Ensuite nous étudierons également la prise en charge des nanoparticules au niveau du système réticulo-endothélial après injection intraveineuse chez le poisson-zèbre adulte.

## 2. Résultats

### 2.1. Internalisation par les cellules endothéliales et les macrophages

L'injection de nanoparticules de PLA fluorescentes au sein de larves de poissons-zèbre transgéniques où les cellules endothéliales sont mises en évidence, par l'expression d'une protéine fluorescente sous le contrôle d'un promoteur spécifique aux cellules endothéliales, suggère que les nanoparticules puissent être capables d'atteindre l'intégralité du système vasculaire. En effet la distribution de la fluorescence des cellules endothéliales (*Figure 63-A*) et de celle provenant des nanoparticules de PLA (*Figure 63-B*), sont superposables.

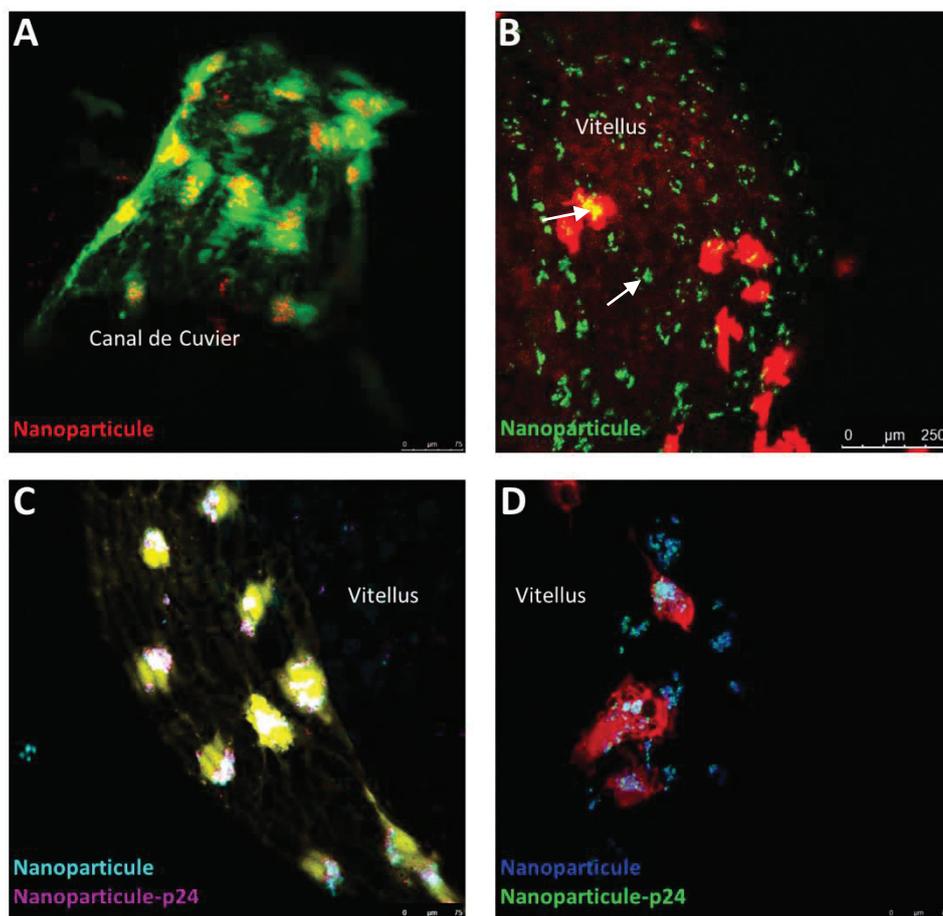


**Figure 63** : Des nanoparticules de PLA fluorescentes (rouge), 1h après injection intraveineuse au sein de larves de poissons-zèbre transgéniques (fli :GFP) de 3 jours, sont distribuées le long du système vasculaire (vert). Les acquisitions ont été réalisées sur des spécimens vivants par stéréomicroscope à fluorescence. (A) Distribution du système vasculaire, les cellules endothéliales étant illuminées en vert. (B) Distribution des nanoparticules de PLA après injection dans la veine post-cardinale.

Cette observation laisse penser qu'une interaction *in vivo* des nanoparticules de PLA avec les cellules endothéliales est possible. Pour vérifier cette hypothèse, des acquisitions en microscopie confocale ont été réalisées au niveau des canaux de Cuvier et du vitellus. Au sein de ces régions les cellules endothéliales sont proches de la surface, lors d'acquisitions « live » les lasers perdent moins de puissance à cause de la pénétration des tissus à traverser, la qualité

des observations s'en retrouve préservée. En utilisant des lignées transgéniques, ces acquisitions ont révélé que les nanoparticules de PLA nues sont internalisées par des cellules endothéliales (*Figure 64-A*) et des macrophages sous-jacents (*Figure 64-B*).

L'utilisation thérapeutique des nanoparticules peut impliquer une adsorption de protéine. Pour évaluer si une adsorption de protéine peut interférer la prise en charge des nanoparticules de PLA par ces deux types cellulaires, une adsorption de protéine p24 (VIH) a été réalisée. Le laboratoire du Dr. VERRIER possède une grande expertise sur l'adsorption de cette protéine. Ces nanoparticules de PLA-p24 ont ensuite été co-injectées avec des nanoparticules de PLA nues au sein de larves de poisson-zèbre des mêmes lignées transgéniques que précédemment. Aucune interférence n'a été observée, les deux formulations co-localisent au sein des cellules endothéliales (*Figure 64-C*) et leurs macrophages sous-jacents (*Figure 64-D*). Cette expérience suggère que l'adsorption d'une protéine sur les nanoparticules n'interfère pas nécessairement avec leur biodistribution. Ce résultat est encourageant pour la réalisation d'études utilisant les nanoparticules de PLA pour l'administration de protéines à des fins thérapeutiques.



**Figure 64** : Prise en charge de nanoparticules de PLA nues ou formulées avec un antigène adsorbée (p24), par des cellules endothéliales et des macrophages 2h après injection intraveineuse. Les illustrations sont des projections max d'acquisitions réalisées proche des canaux de Cuvier, par microscopie confocale sur spécimens vivants. (A) Les nanoparticules de PLA nues (**rouge**) sont internalisées par les cellules endothéliales (**vert** - fli:GFP). (B) Les nanoparticules de PLA nues (**vert**-flèches blanches) sont également internalisées par des macrophages (**rouge** – mpeg1:RFP). (C) Nanoparticules nues (**cyan**) et nanoparticules formulées (**magenta**) sont co-distribuées au sein des cellules endothéliales (**jaune**). (D) Nanoparticules nues (**bleu**) et nanoparticules formulées (**vert**) sont également co-internalisées par des macrophages (**rouge**). Barres d'échelle : 75  $\mu\text{m}$  (A, C-D) et 250  $\mu\text{m}$  (B)

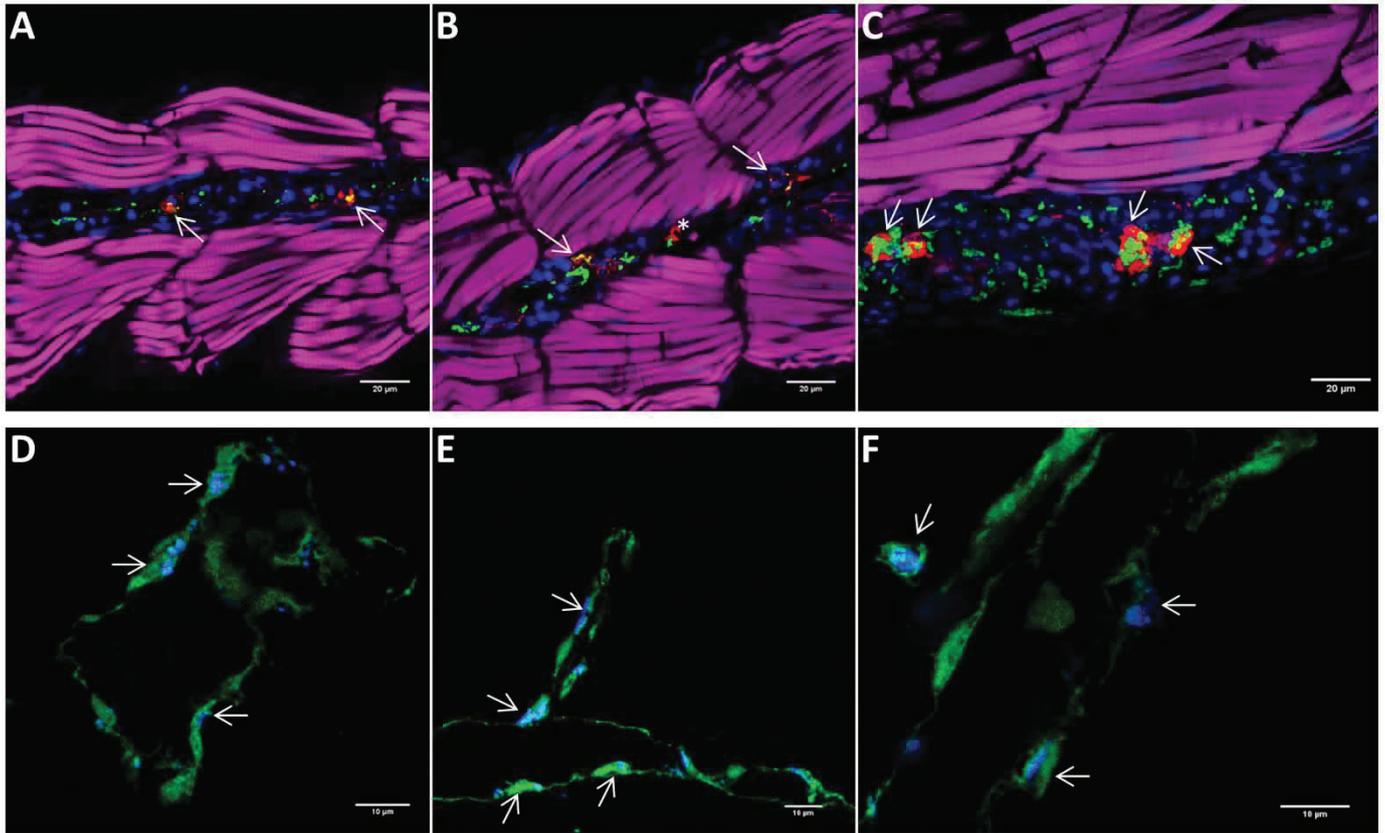
## 2.2. Cinétique de la prise en charge des nanoparticules de PLA

Après avoir montré l'internalisation des nanoparticules par les cellules endothéliales et les macrophages, s'est posé la question du dynamisme de cette prise en charge, combien de temps les nanoparticules demeurent circulantes ? Que deviennent les nanoparticules au cours du temps ?

Des acquisitions au microscope confocal ont été réalisées sur des cryosections (30 µm) provenant de larves de poissons-zèbre 30 minutes, 4 heures et 24h après injection intraveineuse de nanoparticules de PLA nues fluorescentes. Au sein de larves transgéniques où les macrophages sont illuminés en rouge, la prise en charge des nanoparticules est effective dès 30 minutes par ces cellules (*Figure 65-A*). Néanmoins tous les macrophages n'internalisent pas de nanoparticules (*Figure 65-B* étoile). Bien que ces acquisitions ne montrent qu'un aspect qualitatif, 24 heures après l'injection certains macrophages semblent posséder d'intenses accumulations de nanoparticules par rapport au temps 30 minutes (*Figure 65-C*).

Au sein de larves transgéniques où les cellules endothéliales sont illuminées en vert, la prise en charge des nanoparticules par ces cellules est également effective dès 30 minutes (*Figure 65-D*). Aucune différence de localisation des nanoparticules n'a été observée à 4 heures (*Figure 65-E*) et à 24 heures (*Figure 65-F*) après l'administration. De même, aucune fluorescence n'est détectée dans la lumière des vaisseaux sanguins quel que soit le temps post-administration. Il est donc probable qu'à 30 minutes plus aucune nanoparticule ne soit circulante.

Une fois dans la circulation sanguine, les nanoparticules semblent rapidement prises en charge par l'endothélium et les macrophages qui lui sont environnants.



**Figure 65 :** Cinétique de prise en charge de nanoparticules de PLA nues par des macrophages et des cellules endothéliales, de 30 minutes à 24 heures après injection intraveineuse au sein de larves de poissons-zèbres. Les acquisitions ont été réalisées par microscopie confocale sur des cryosections (30  $\mu\text{m}$ ) de larves *mpeg1:RFP* où les macrophages sont fluorescents en rouge (A-C), et de larves *fli:GFP* où les cellules endothéliales sont fluorescentes en vert (D-F). Les cryosections sur larve *mpeg1:RFP* ont été traitées avec de la phalloïdine-dylight633 (magenta) et du DAPI. Les nanoparticules de PLA nues sont internalisées dès 30mn au sein des macrophages (A - NPs / macrophages / noyaux / Actine-F) et des cellules endothéliales (D - NPs / cellules endothéliales). A ce temps, aucune fluorescence n'est détectée au sein de la lumière des vaisseaux sanguins. Bien qu'il y ait des macrophages négatifs aux nanoparticules, celles-ci sont toujours observées au sein de macrophages 4h (B) et 24h (C) après injection. A 24h, le signal des nanoparticules est très intense au sein des macrophages. Les nanoparticules sont également toujours observées au sein des cellules endothéliales 4h (E) et 24h (F) après injection. Barres d'échelle : 20  $\mu\text{m}$  (A-C) et 10  $\mu\text{m}$  (D-F).

### 2.3. Devenir des nanoparticules de PLA par Microscopie électronique

Afin de caractériser plus en détail le devenir des nanoparticules de PLA après une injection intraveineuse, la microscopie électronique a été utilisée pour réaliser des observations à l'échelle subcellulaire. Pour garantir la détection des nanoparticules de PLA, de l'or colloïdal (6 nm) dense aux électrons a été incorporé au sein de leur matrice durant la nanoprécipitation. Pour étudier le devenir de l'intégrité nanoparticulaire, la fenêtre d'étude a également été étendue de 30mn – 24h à 10mn – 7 jours.

Cette cinétique montre que 10 minutes après l'injection intraveineuse, des nanoparticules de PLA sont déjà internalisées par les cellules endothéliales tandis que d'autres sont circulantes dans le flux sanguin (*Figure 66-A* Flèche / pointes de flèche jaunes, respectivement). Toutes les étapes d'internalisation des nanoparticules par les cellules endothéliales ont pu être observées, du premier contact entre les nanoparticules et la membrane plasmique, jusqu'à leur observation dans le système endo-membranaire (*Figure 66-B-D*). Le mode d'internalisation n'est pas clair. Des invaginations de la membrane plasmique montrant à ce niveau une densité aux électrons plus importantes que dans les autres régions, laissent supposer une endocytose par la voie des clathrines (*Figure 66-B*). Cependant, des figures de macropinocytoses et de phagocytose ont été également observées (*Figure 66-C*), suggérant que l'internalisation des nanoparticules pourrait s'effectuer selon différents processus. La taille de 200 nm des nanoparticules correspond à la limite connue entre pinocytose et phagocytose.

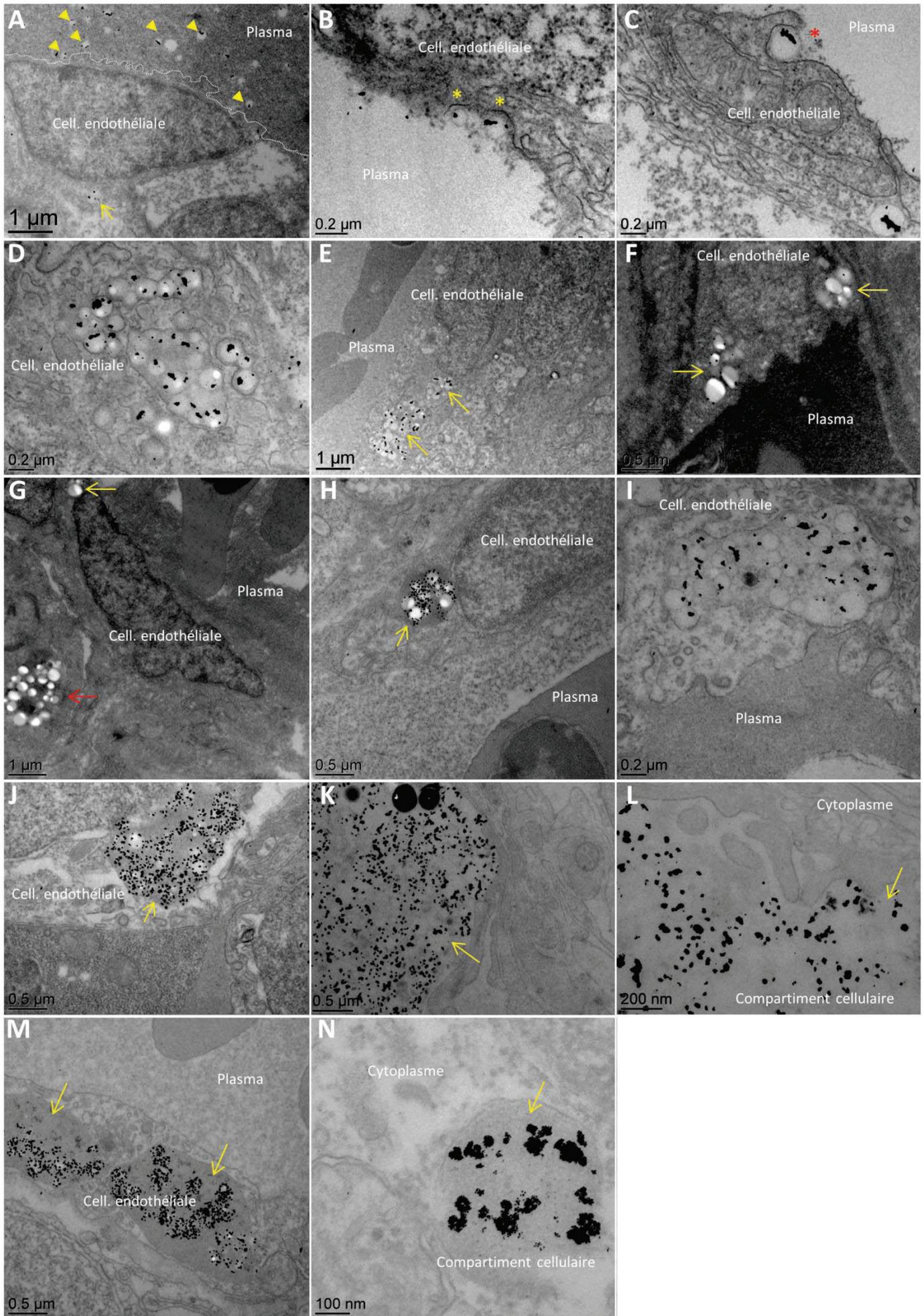
Aucune nanoparticule n'a pu être détectée au sein du plasma sanguin 30 minutes après l'injection (*Figure 66-E*), confirmant que la circulation des nanoparticules dans le flux sanguin est transitoire. De même, de nombreuses nanoparticules sont toujours détectées au sein du système endo-membranaire des cellules endothéliales. L'aspect de ces nanoparticules ne semble d'ailleurs pas dégradé. Ces observations permettent de se rendre compte que pour un signal de fluorescence détecté par microscopie confocale dans l'expérience précédente, il peut s'agir d'une multitude de nanoparticules accumulées au sein d'un même emplacement subcellulaire.

L'allure des nanoparticules semble stable durant les premières 24h comme en témoigne les observations à 4h (*Figure 66-F*) et à 24h (*Figure 66-G*) après l'administration, que ce soit à l'intérieur d'une cellule endothéliale ou bien d'un phagocyte sous-jacent (flèche rouge).

Il faut attendre 3 jours après l'injection intraveineuse pour observer une évolution de l'apparence des nanoparticules internalisées. L'or colloïdal semble s'échapper de la matrice des nanoparticules (*Figure 66-H*). Il est envisageable que cette observation puisse être liée à une dégradation des nanoparticules. Quatre jours après l'administration, plusieurs aspects différents de nanoparticules ont été observés à l'intérieur des cellules. Un aspect qui semble similaire aux temps précédents est visible parmi certaines cellules (*Figure 66-I*), tandis que des nanoparticules internalisées par d'autres cellules semblent dans un état de dégradation avancé. Parmi ces dernières, les nanoparticules de PLA ne sont presque plus détectées, ce qui n'est pas le cas de nombreux agrégats d'or colloïdal (*Figure 66-J*). Cette hétérogénéité dans l'allure des nanoparticules de PLA est plus flagrante 7 jours après l'administration. Ce qui ressemble à une « pâte » de PLA amorphe a été observée au sein de certaines cellules endothéliales (*Figure 66-*

K-L), tandis que parmi d'autres cellules sont observées des réminiscences de nanoparticules de PLA et des agrégats d'or colloïdal (*Figure 66-M*). Enfin, seuls des agrégats d'or colloïdal sont visibles parmi le système endo-membranaire de certaines cellules, aucune présence de PLA n'y étant détectée (*Figure 66-N*). Ces observations semblent indiquer qu'une dégradation de l'intégrité particulière des nanoparticules de PLA est possible dans les sept jours suivant leur internalisation par des cellules *in vivo*.

Cette étude à l'échelle subcellulaire a permis de mieux appréhender le devenir des nanoparticules *in vivo*, concernant les voies d'internalisation impliquées, leur comportement dans le flux sanguin et leur stabilité colloïdale une fois prise en charge.



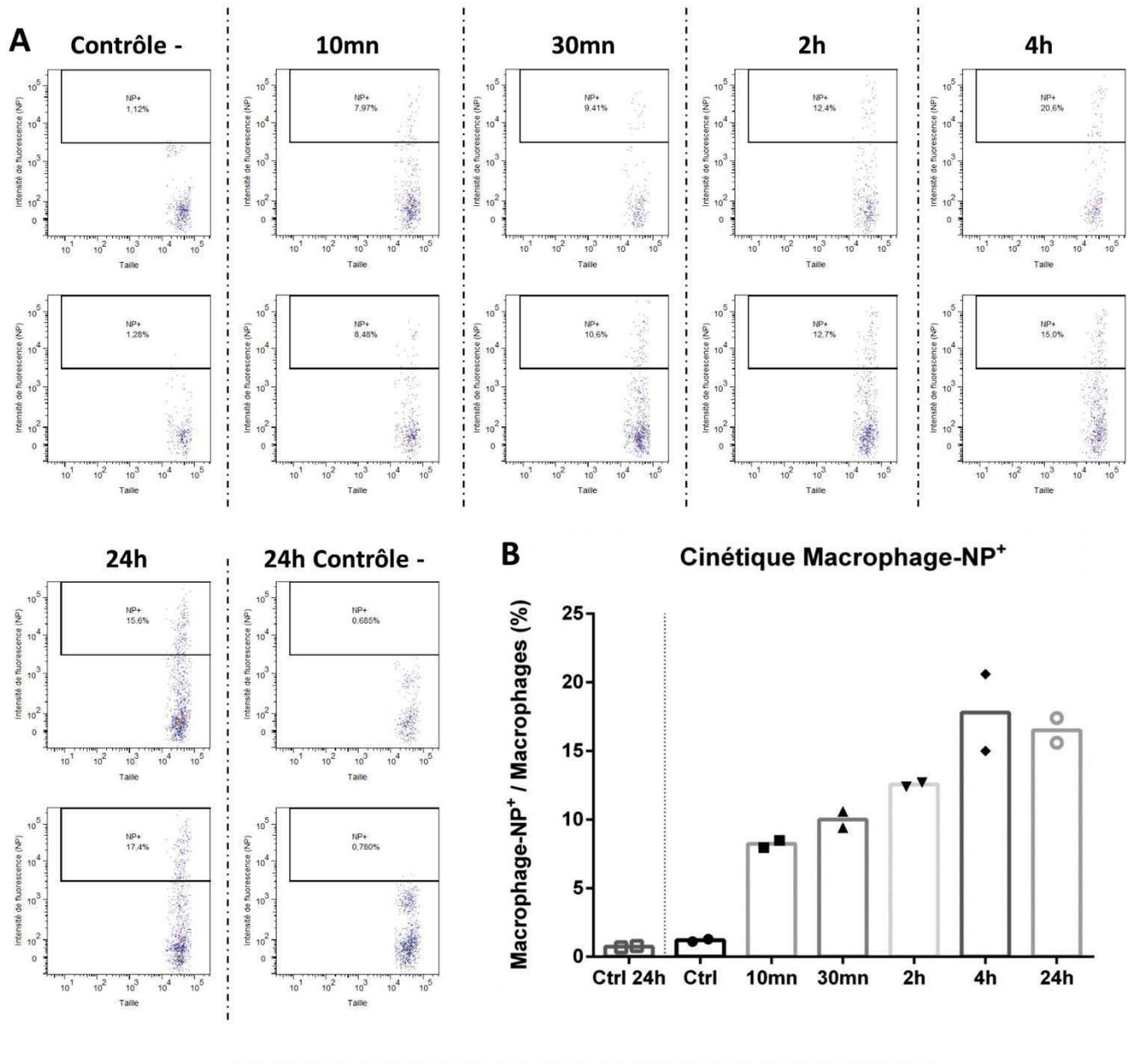
**Figure 66 :** Cinétique de prise en charge de nanoparticules de PLA nues avec de l'or colloïdal (<10 nm) encapsulé, par le système vasculaire de 10mn à 1 semaine après injection intraveineuse au sein de larves de poisson-zèbre de 3 jours. Les acquisitions ont été réalisées par microscopie électronique à transmission sur des coupes ultrafines d'environ 60 nm d'épaisseur. (A-D) Observations 10mn après l'injection intraveineuse. Les nanoparticules sont à la fois circulantes dans le plasma sanguin (pointes de flèche jaunes) et prises en charge par les cellules endothéliales 10mn après l'injection (A). L'internalisation par ces cellules implique un épaissement de la membrane plasmique (B-étoiles jaunes) ou bien la formation de bras cytoplasmiques (C-étoile rouge). De nombreuses nanoparticules sont déjà concentrées dans des compartiments cellulaires (D). Plus aucune nanoparticule n'est détectée dans la circulation sanguine à 30 minutes (E). 4 heures (F) et 24 heures (G) après administration, les nanoparticules ne semblent pas dégradées au sein des cellules endothéliales (flèches jaunes) ou de phagocytes (flèche rouge) qui leur sont sous-jacents. C'est à partir d'au moins 3 jours que l'on observe un changement au niveau des nanoparticules internalisées, l'or colloïdal se libère de la matrice de PLA (H). La dégradation des nanoparticules semble plus prononcée 4 jours après injection, au sein de certaines cellules les nanoparticules sont encore discernables (I). Tandis que parmi d'autres cellules l'on observe plus d'agrégats d'or colloïdal que de nanoparticules de PLA (J). Au final, au bout d'une semaine il est possible d'observer des « pâtes » de PLA amorphes (K-L), des nanoparticules de PLA avec une taille diminuée (M) ou bien plus que des nano-cristaux d'or (N). Barres d'échelle : 100 nm (N), 200 nm (B-D,I,L), 1 µm (A,E,G) et 500 nm (F,H,J-K,M)

## 2.4. Cinétique de la prise en charge des nanoparticules de PLA par les macrophages par cytométrie en flux

(Figure 67)

Lors des précédentes observations, les accumulations de nanoparticules semblaient plus intenses au sein des macrophages à 24 heures plutôt qu'à 30 minutes après administration (Figure 65). Afin d'approfondir cette observation, l'implication des macrophages dans la prise en charge des nanoparticules de PLA, au cours du temps, a été quantifiée par cytométrie en flux. Cette expérience a été réalisée sur des larves transgéniques *mpeg1:RFP* afin de pouvoir détecter les macrophages. Les macrophages sont rapidement impliqués dans l'internalisation de nanoparticules de PLA, presque 8% d'entre eux sont NP<sup>+</sup> 10 minutes après l'injection. Le nombre de macrophages ayant internalisé des nanoparticules augmente ensuite continuellement jusqu'à atteindre 17% 4h après l'administration. Ensuite, ce pourcentage stagne à 24h malgré la production de nouveaux macrophages.

Ainsi, la prise en charge des nanoparticules de PLA par les macrophages est continue dans les premières 24h. L'absence de nanoparticules de PLA circulante dès 30 minutes après l'injection soulève l'interrogation de comment les macrophages prennent-ils en charge les nanoparticules entre 30mn et 24h après l'administration ?

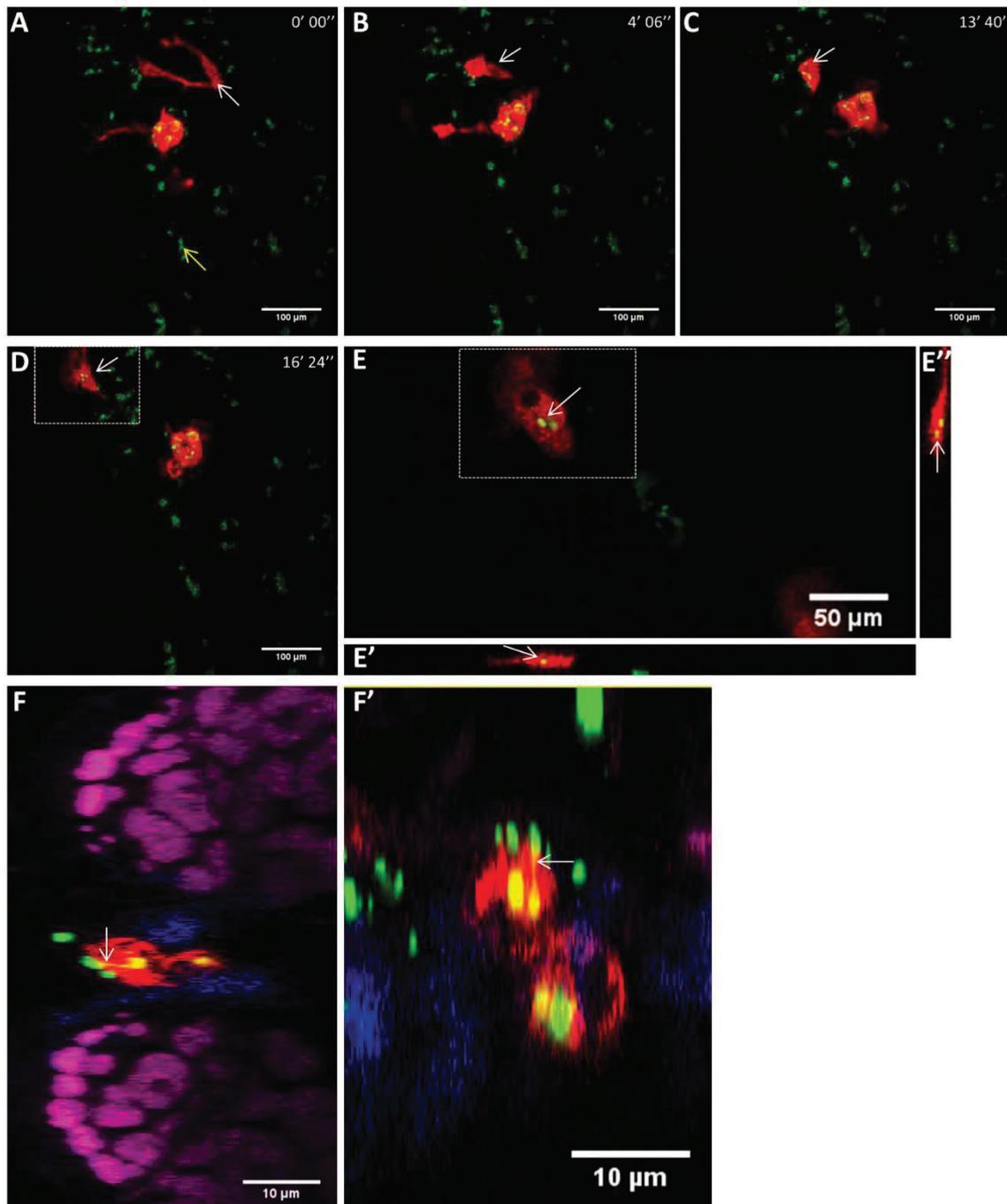


**Figure 67 :** Analyse de la cinétique de prise en charge des nanoparticules de PLA après injection intraveineuse, par cytométrie en flux. (A) Graphiques des différentes acquisitions, de 10 minutes à 24 heures. L'axe des abscisses indique la taille des événements, celui des ordonnées l'intensité de fluorescence correspondant aux nanoparticules. (B) Histogramme indiquant les valeurs moyennes du pourcentage de macrophages positifs aux nanoparticules, par rapport aux macrophages en général. Chaque acquisition a été réalisée sur 10 embryons par duplicats.

## 2.5. Transfert de nanoparticules de PLA entre cellules endothéliales et macrophages

Lors d'acquisitions « live » pour étudier le comportement des macrophages après injection intraveineuse de nanoparticules de PLA, nous avons pu obtenir une vidéo d'une internalisation de nanoparticules par un macrophage lorsqu'il n'y a plus de nanoparticules circulantes. Cette vidéo a été réalisée en acquérant une pile d'image à chaque temps, la vidéo est composée des projections d'intensité maximale de chaque pile. Dans la région superficielle du vitellus, les nanoparticules sont majoritairement prises en charge par les cellules endothéliales dans lesquelles elles forment des amas. Au début de la vidéo (*Figure 68-A*), un de ces amas est mis en valeur par une flèche jaune. Cette vidéo montre un macrophage (rouge) négatif pour les nanoparticules (vert), pointé par une flèche blanche. Ce macrophage établit un contact avec une cellule endothéliale chargée d'amas de nanoparticules (*Figure 68-B*). Puis après être resté en contact une dizaine de minute avec cette cellule (*Figure 68-C*), il s'éloigne avec des amas de nanoparticules visibles à l'intérieur (*Figure 68-D*). Etant donné que la vidéo est composée de superpositions d'images, cela aurait pu être l'effet d'une superposition entre le macrophage et une autre cellule endothéliale contenant des nanoparticules. L'analyse de la pile d'acquisition composant la projection max de l'encadré blanc (*Figure 68-D*), confirme que les nanoparticules sont bien à l'intérieur de ce macrophage. Cela a été observé au sein de coupes optiques (*Figure 68-E*) mais également en étudiant les vues orthogonales (*Figure 68-E'-E''*).

De même, les acquisitions réalisées par microscopie confocale pour déterminer la cinétique de prise en charge par les macrophages à partir de cryosections (*Figure 65*) ont été analysées plus finement. Un transfert de nanoparticules entre cellules endothéliales et macrophages (*Figure 68-F-F'*) semble avoir été observé. Le ou les processus cellulaires impliqués reste à élucider.



**Figure 68 :** Transfert de nanoparticules entre cellules endothéliales et macrophages. Les acquisitions ont été réalisées par microscopie confocale en « live » (A-E'') ou sur cryosections (F-F') (30 μm d'épaisseurs). Les nanoparticules (vert) ont été injectées en intraveineuse sur des larves transgénique (mpeg1:RFP) âgées de 3 jours post-fécondation. (A-D) Acquisitions provenant d'une vidéo réalisée 1h20 après l'injection transformées en projections max, au niveau de la surface du vitellus. Les amas de nanoparticules sont au sein de cellules endothéliales (flèche jaune). Au début de la vidéo est observé un macrophage négatif pour les nanoparticules (A). Quatre minutes plus tard, ce macrophage se met en contact avec une cellule endothéliale chargée en nanoparticules (B). Le contact dure une dizaine de minutes (C) et lorsque le macrophage repart, 3 amas de nanoparticules sont visibles à l'intérieur (D). L'analyse des coupes optiques (E) et des vues orthogonales (E'-E'') de la région encadrée de blanc dans (D) confirme que les nanoparticules sont à l'intérieur du macrophage. Ce passage de nanoparticules a également été observé sur les cryosections, 30mn après l'administration (F-F'). (F') est une vue orthogonale provenant de (F). Barres d'échelle : 100 μm (A-D), 50 μm (E) et 10 μm (F-F').

## 2.6. Conclusion partielle

Dans l'ensemble, les résultats obtenus permettent de mieux appréhender les relations des nanoparticules de PLA nues avec le système vasculaire *in vivo*.

D'un point de vue dynamique, la prise en charge des nanoparticules est très rapide et implique diverses voies d'internalisation. Les nanoparticules internalisées sont ensuite dégradées, les premières dégradations totales étant observées après 7 jours.

Enfin, il a été mis en évidence un transfert de nanoparticules d'une cellule endothéliale à une cellule présentatrice d'antigène. Le mécanisme impliqué demeure inconnu.

Ces résultats représentent un des premiers aperçus du devenir des nanoparticules de PLA *in vivo* à l'échelle cellulaire et intracellulaire.

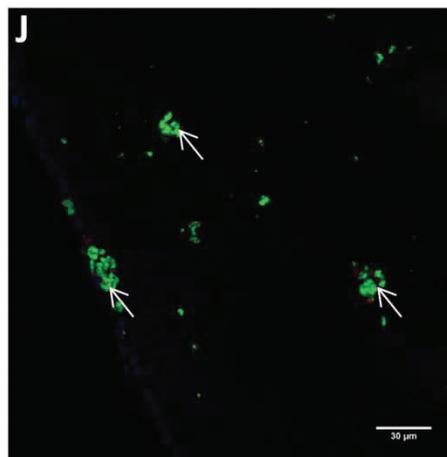
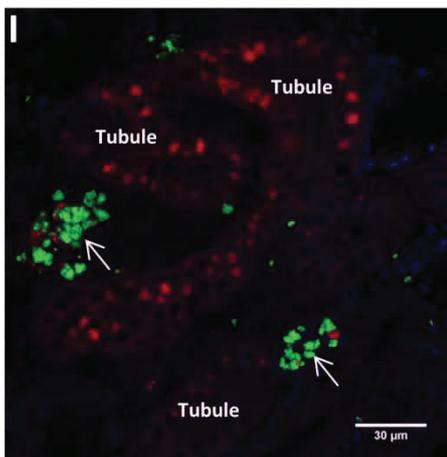
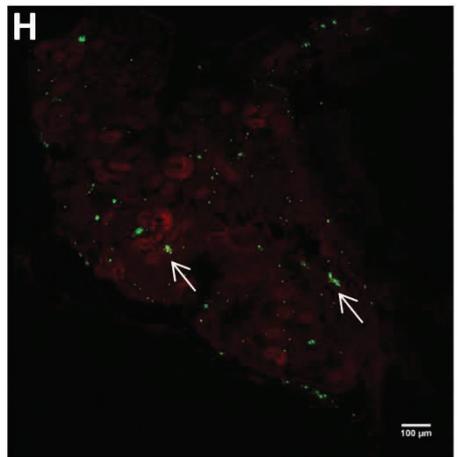
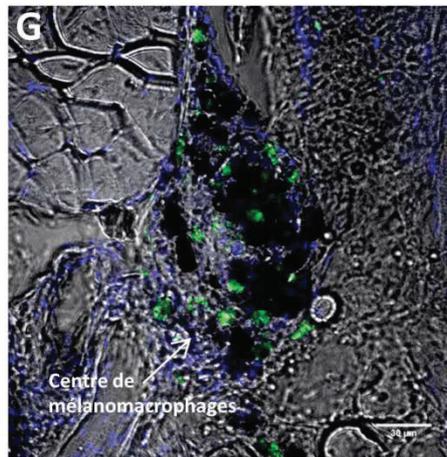
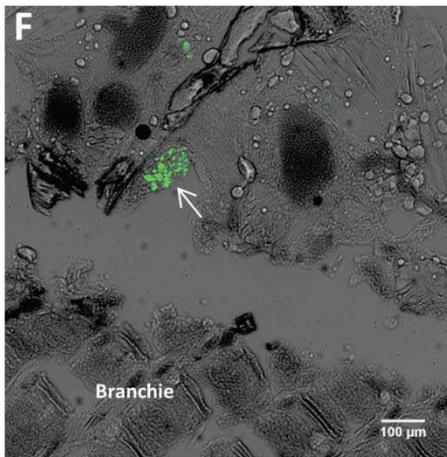
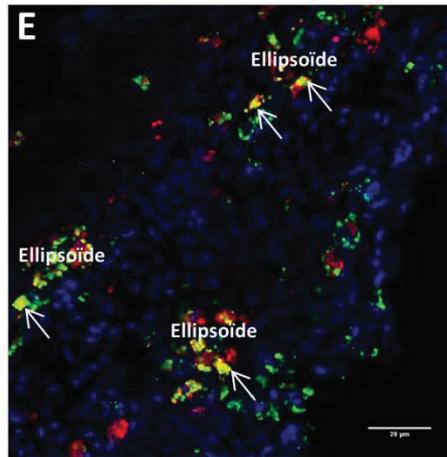
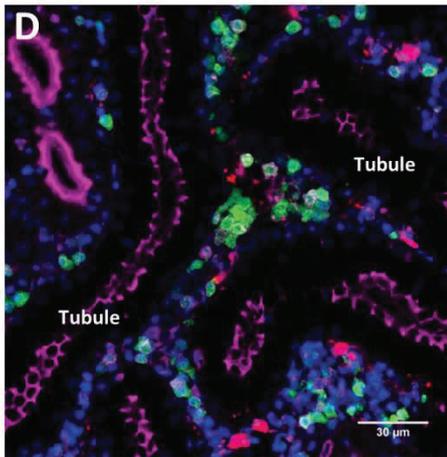
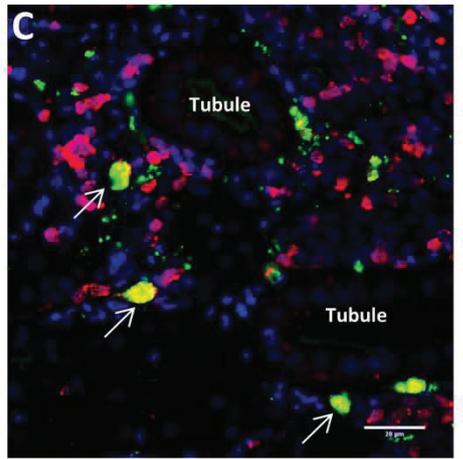
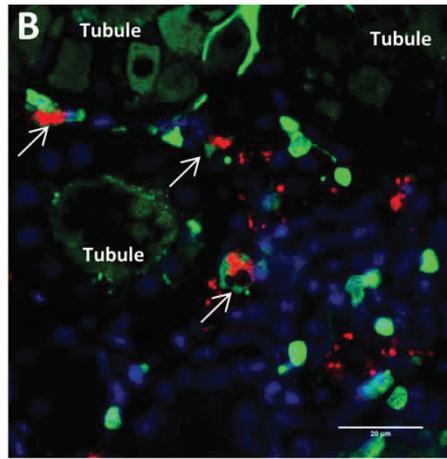
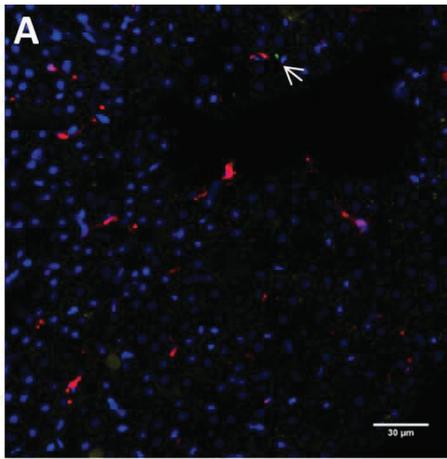
## 2.7. Devenir des nanoparticules de PLA dans le système réticulo-endothélial chez le poisson adulte

Lors de l'administration de nanoparticules par immersion, nous avons montré que celles-ci sont capables d'atteindre le système circulatoire et plusieurs organes internes comme le rein et le foie. Pour savoir si les nanoparticules atteignant le sang sont capables de pénétrer ensuite le rein et le foie, il a semblé pertinent d'étudier le devenir de nanoparticules administrées directement dans le flux sanguin chez le poisson adulte.

A la différence des données obtenues lors des administrations par immersion (*Publication* très peu de nanoparticules ont été observées dans le foie (*Figure 69-A*) deux heures après l'injection intraveineuse. Cela suggère que lors d'une administration par immersion, la prise en charge hépatique des nanoparticules puisse ne pas impliquer la circulation sanguine. Deux heures après l'injection intraveineuse, une intense prise en charge de nanoparticules est observée dans les tissus hématopoïétiques du rein. Les nanoparticules y sont internalisées par des cellules CMH2 positives (*Figure 69-B*), MPEG1 positives (*Figure 69-C*) et MPX négatives (*Figure 69-D*). Il est possible que ces cellules NP<sup>+</sup> soient des macrophages. De même, des accumulations de nanoparticules ont été détectées au sein de macrophages spléniques (*Figure 69-E*). Ainsi, à partir de la circulation sanguine les nanoparticules semblent capables de pénétrer efficacement le rein et la rate, où elles sont prises en charge par des cellules immunitaires.

Une semaine après l'administration intraveineuse, le fluorophore encapsulé dans les nanoparticules est toujours détectable et ne semble pas avoir diffusé dans les tissus. Cela suggère que les intenses fluorescences détectées puissent toujours témoigner de la présence des nanoparticules. Des regroupements de cellules positives aux nanoparticules sont d'ailleurs observés au niveau de la cavité branchiale (*Figure 69-F*). La présence de ces cellules a également été observée au sein d'un centre de mélanomacrophages (*Figure 69-G*), qui est une structure immunitaire favorisant la présentation d'antigène. Dans le rein et la rate, organes où les nanoparticules étaient accumulées au sein de macrophages quelques heures après l'injection, de nombreux regroupement de cellules positives aux nanoparticules sont également détectées (*Figure 69-H-I et J*, respectivement).

Une fois dans la circulation sanguine, les nanoparticules de PLA semblent donc capables de pénétrer des tissus liés au système immunitaire, où vont se former, au cours du temps, des amas de phagocytes ayant internalisé des nanoparticules.



**Figure 69 :** Tropisme des nanoparticules de PLA après injection intraveineuse chez le poisson-zèbre adulte. Les acquisitions ont été réalisées par microscopie confocale sur des cryosections (30µm) de poissons-zèbre adulte 2h (A-E) et 7 jours (F-J) après l'injection. (A) Peu de nanoparticules (vert) atteignent le foie. En rouge sont représentés les macrophages. (B) Les nanoparticules de PLA (rouge) sont internalisées par des cellules CMH2<sup>+</sup> (vert) dans le rein. (C) Toujours dans le rein, les cellules internalisant les nanoparticules (vert) sont également MPEG<sup>+</sup> (rouge). (D) Enfin, aucune cellule MPX<sup>+</sup> (vert) ne prend en charge de nanoparticules de PLA (rouge) dans le rein. (E) Dans la rate, les nanoparticules (vert) sont également accumulées par des cellules MPEG<sup>+</sup> (rouge). Une semaine après l'injection, des regroupements de cellules NP<sup>+</sup> (vert) sont observés dans la cavité branchiale (F), au sein de centre de mélanomacrophage (G), dans le reins (H-I) et la rate (J). Barre d'échelle : 30 µm (A,D,G,I-J), 20 µm (B-C,E) et 100 µm (F,H)

## 3. Matériels et méthodes

### Injection intraveineuse de nanoparticules dans des larves de poisson-zèbre.

Des alevins de 3 jours ont été utilisés pour étudier cette voie d'administration. A ce stade de leur développement, les embryons sont transparents avec un système vasculaire développé et un système immunitaire inné fonctionnel. Des capillaires en borosilicate de 1 mm de diamètre extérieur et 0,58 mm de diamètre intérieur (Havard APPARATUS) ont été effilés grâce à une étireuse horizontale à laser (SUTTER Instrument-T2000) afin de réaliser les injections.

Les larves sont anesthésiées pendant 5mn dans une solution de tricaine à 24 mg/100mL) puis transférées sur un support en agarose immergé dans de l'eau de Volvic. Les injections sont réalisées avec un femtojet (Eppendorf) sous une loupe binoculaire au grossissement x60. Le temps d'injection et la pression ont été ajustés jusqu'à ce qu'une goutte de 7/50 de mm apparaisse après une impulsion, ce qui représente un volume d'1 nL. Un volume de 2 à 5 nL de suspension de nanoparticules de PLA est ensuite injecté dans la veine post cardinale au milieu du corps. Pour une concentration en nanoparticule de 0,5% cela représente une administration de  $1 \cdot 10^6$  à  $5 \cdot 10^6$  nanoparticules.

### Observation des nanoparticules de PLA dans le système circulatoire au sein de larves vivantes.

Au sein du laboratoire du Dr.Levraud, différentes formulations de nanoparticules de PLA ont été injectées par intraveineuse dans des larves de 3 jours, comme décrit précédemment. Pour réaliser les observations, les larves ont été incluses dans de l'agarose low-melting 2% sur une lamelle et immergées dans une goutte d'anesthésiant. Les acquisitions et vidéos ont ensuite été

réalisées avec un microscope confocale inversé, ou bien une loupe à épifluorescence pour les faibles agrandissements.

Ainsi, plusieurs lignées de poissons transgéniques et de nanoparticules de PLA fluorescentes ont été utilisées :

- Injection de nanoparticules de PLA nues, contenant du CELLTRACE BODIPY TR METHYLESTER, à 0,5% dans des larves d'une lignée transgénique fli:GFP.
- Injection de nanoparticules de PLA nues, contenant de la coumarine-6, à 0,5% dans des larves de poissons-zèbre d'une lignée transgénique mpeg1:RFP
- Co-injection de nanoparticules de PLA nues, contenant du DPH, à 0,5% et de nanoparticules de PLA avec de la p24 adsorbée (200µg/mL de p24 pour 0.5% de nanoparticules mélangés 2h sur une roue à TA), contenant du CELLTRACE BODIPY TR METHYLESTER, à 0,5% au sein de larves provenant d'une lignée transgénique fli:GFP.
- Co-injection de nanoparticules de PLA nues, contenant du DPH, à 0,5% et de nanoparticules de PLA avec de la p24 adsorbée (200µg/mL de p24 pour 0.5% de nanoparticules mélangés 2h sur une roue à TA), contenant de la coumarine-6, à 0,5% au sein de larves provenant d'une lignée transgénique mpeg1:RFP.

La vidéo présentée provient de l'injection de nanoparticules de PLA nues et contenant de la coumarine-6, au sein de larves issues d'une lignée transgénique mpeg1:RFP. Les acquisitions ont été réalisées toutes les minutes et 22 secondes dans une région proche des canaux de cuvier.

### **Histologie - Cinétique de prise en charge des nanoparticules par les cellules endothéliales et les macrophages chez la larve de poisson-zèbre.**

Macrophage : Des larves de poisson-zèbre transgénique mpeg1:RFP ont été injectées par intraveineuse avec des nanoparticules de PLA nues contenant du BODIPY 500/510 C4, C9 (Life technologies), à 0.5%.

Cellules endothéliales : Des larves de poisson-zèbre transgénique fli:GFP ont été injectées par intraveineuse avec des nanoparticules de PLA nues contenant de la coumarine-30 (Sigma-Aldrich), à 0.5%.

Après injections, les alevins ont été placés dans de l'eau de Volvic à 28°C jusqu'à leur mise à mort par surdose d'anesthésiant à 4°C. Les larves ont été mises à mort après 30 minutes, 4

heures et 24 heures après l'administration des nanoparticules. Elles ont ensuite été fixées en PFA, cryoprotégées en sucrose 30%, congelées et enfin cryosectionnées (30 µm).

Pour les macrophages, les lames ont été traitées avec de la phalloïdine-dylight633 (Thermofischer) et du DAPI. Tandis que pour les cellules endothéliales, aucun traitement n'a été effectué. Les lames ont ensuite été montées avec du vectashield et les acquisitions réalisées avec un microscope confocal spectral droit SP5 (Leica). Le traitement d'image a ensuite été réalisé avec le logiciel ImageJ.

### **Histologie - Cinétique de prise en charge des nanoparticules par le système vasculaire par microscopie électronique à transmission, après injection intraveineuse chez la larve.**

Des larves de poisson-zèbre « wild-type » ont été injectées avec des nanoparticules de PLA nues contenant de l'or colloïdal hydrophobe (6nm). Après injections, les alevins ont été placés dans de l'eau de Volvic à 28°C jusqu'à leur mise à mort par surdose d'anesthésiant à 4°C. Les larves ont été mises à mort 10 minutes, 30 minutes, 4 heures et 24 heures, 72 heures, 96 heures et une semaine après l'administration des nanoparticules. Les larves ont ensuite été rapidement traitées avec un protocole adapté à la conservation des ultrastructures.

Brièvement, les échantillons sont fixés dans une solution de glutaraldéhyde (1.5%) et de PFA (1%) tamponnée avec du cacodylate 0.1% pH=7.4. L'incubation est réalisée sur la nuit à 4°C. Après lavage avec une solution de cacodylate 0.1M / sucrose 8%, les échantillons sont incubés 1h avec une solution de tétraoxyde d'osmium pour fixer les lipides. Après rinçage avec de l'eau distillée, les échantillons sont déshydratés avec des bains successifs en éthanol (de 30% à 100%). Enfin, les alevins sont ensuite imprégnés dans une résine Epon et inclus par polymérisation de la résine à 60°C durant plusieurs jours.

Une fois incluses, les larves sont sectionnées en coupes ultrafines par le biais d'un ultramicrotome. Seules les coupes ultrafines irisées sont conservées pour les observations en microscopie électronique car elles possèdent une épaisseur d'environ 60nm. Après dépôt sur des grilles en cuivre, les échantillons sont observés à l'aide d'un microscope électronique à transmission MET PHILIPS CM120 couplé à une caméra GATAN Orius200 2Kx2K. La résolution de cet appareil est de 0.34 nm.

## **Cytométrie en flux – Cinétique de prise en charge par les macrophages après injection intraveineuse de nanoparticules de PLA chez la larve.**

Des larves de poisson-zèbre transgénique *mpeg1:RFP* ont été injectées par intraveineuse avec des nanoparticules de PLA nues contenant du BODIPY 500/510 C4, C9 (Life technologies), à 0.25%. La quantité de nanoparticules est plus faible afin de réduire les risques de faux-positif potentiellement causés par la présence de nanoparticules non-intériorisées 10 minutes après l'injection.

Après injections, les alevins ont été placés dans de l'eau de Volvic à 28°C jusqu'à leur mise à mort par surdose d'anesthésiant à 4°C. Les larves sont mises à mort 10 minutes, 30 minutes, 2 heures, 4 heures et 24 heures après l'administration des nanoparticules. Deux conditions de contrôle négatif en absence de nanoparticules ont également été réalisées : au temps 0 et à 24 heures. Pour chaque temps de la cinétique, 2 fois 10 alevins de poisson-zèbre ont été injectés. Les larves ont été mises à mort par surdose d'anesthésiant à 4°C.

La dissociation des larves est réalisée par une incubation dans une solution de trypsine de porc (2g/L) (Sigma Aldrich) en eau de versene (Life technologies). Au sein de cette solution, les larves sont hachées finement avec des microciseaux de dissection et placées durant 30 minutes sous agitation. A la fin de l'incubation, les échantillons sont placés à 4°C et l'action de la trypsine est neutralisée par l'addition de SVF. Les surnageants sont filtrés et les amalgames de larve homogénéisés sur un tamis cellulaire ayant un maillage de 40µm (ThermoFischer). Les suspensions cellulaires sont ensuite lavées par un cycle de centrifugation (400g 8mn 4°C) et re-suspendues en PBS1X contenant 4% de SVF. Avant le passage dans le cytomètre de flux LSR II (BD Bioscience), du DAPI est ajouté (2.5µg/mL) pour exclure les cellules mortes.

Les acquisitions ont ensuite été analysées avec le logiciel FlowJo v7.6.5.

## **Injection intraveineuse de nanoparticules chez le poisson-zèbre adulte.**

Des poissons-zèbre adultes d'au moins 1 an ont été utilisés. L'injection est réalisée à la main grâce à une seringue à aiguille pointue et d'un diamètre interne de 130 µm, d'une capacité de 10µL et en verre borosilicate (HAMILTON – 80300).

Brièvement, comme décrit dans la littérature (309), les poissons sont anesthésiés dans une solution de tricaine à 24 mg/100mL durant 5-10mn jusqu'à la réduction de la fréquence des battements branchiaux. Une fois endormi, ils sont positionnés sur leur flanc gauche, la tête vers la droite, au-dessus d'une éponge humide. L'injection de 6µL d'une suspension de

nanoparticules à 1% en PBS1X est réalisée dans le sinus veineux rétro-orbital. Cela représente une administration de  $1.14 \cdot 10^{10}$  nanoparticules. Les poissons sont ensuite mis au repos dans un bac contenant de l'eau d'animalerie à 28°C.

La vérification du succès de l'injection est réalisée 1h après l'administration et nécessite une nouvelle étape d'anesthésie. Une fois endormis, les poissons sont positionnés sur une lamelle au sein d'une goutte d'anesthésiant et observés avec un microscope inversé à épifluorescence Nikon TiE motorisé (Nikon). Une injection réussie se traduit par la présence de nanoparticules dans le système circulatoire de la région caudale.

### **Histologie – Interactions des nanoparticules de PLA avec le système réticulo-endothélial après injection intraveineuse chez le poisson-zèbre adulte.**

Plusieurs conditions d'injection intraveineuse ont été réalisées afin de tirer bénéfice de différentes lignées transgéniques (2 poissons / condition).

- Des nanoparticules de PLA nues, contenant du fluorophore DY-630 (Dyomics) avec un ratio fluorophore/polymère de 0.1%, à 1% ont été administrées chez des poissons adultes de la lignée transgénique mpeg1:RFP. Au sein de la [Figure 69](#) les nanoparticules affichent une fausse couleur verte.
- Des nanoparticules de PLA nues, contenant du CELLTRACE BODIPY TR METHYLESTER avec un ratio fluorophore/polymère de 0.04%, à 1% ont été administrées chez des poissons adultes de la lignée transgénique mpx:GFP.
- Des nanoparticules de PLA nues, contenant du CELLTRACE BODIPY TR METHYLESTER avec un ratio fluorophore/polymère de 0.04%, à 1% ont été administrées chez des poissons adultes de la lignée transgénique CMH2:GFP.
- Des nanoparticules de PLA nues, contenant du BODIPY 500/510 C4, C9 avec un ratio fluorophore/polymère de 0.04%, à 1% ont été administrées chez des poissons adultes « wild-type ».

Les poissons des différentes lignées transgéniques ont été mis à mort, par excès d'anesthésiant, après 2 heures de repos post-injection dans de l'eau d'animalerie. Les poissons « wild-type » ont été conservés vivants pendant une semaine dans un bac isolé sans recirculation d'eau à l'intérieur de l'animalerie, puis mis à mort par surdose d'anesthésiant.

Après la mise à mort, les poissons ont été fixés, cryoprotégés, congelés puis cryosectionnés (30µm).

Les lames provenant des poissons « wildtype » et des lignées transgéniques mpeg1:RFP, CMH2:GFP ont été traitées avec du DAPI et montées avec du milieu de montage vectashield.

Les lames provenant des poissons de la lignée transgénique mpx:GFP ont été traitées avec de la phalloïdine-dylight633 et du DAPI. Elles ont ensuite été montées avec du milieu de montage vectashield.

Les acquisitions ont été réalisées avec un microscope confocal spectral droit SP5 (Leica) et analysées avec le logiciel ImageJ.

## 4. Conclusion

Dans l'ensemble, les résultats obtenus ont révélé plusieurs interactions entre les nanoparticules de PLA et les systèmes vasculaire et réticulo-endothélial. Par exemple leur internalisation très rapide par les cellules endothéliales a pu être démontrée *in vivo*, ou encore un éventuel de transfert de nanoparticules entre les cellules endothéliales et des macrophages.

De plus, ces données ont permis d'avoir un aperçu de leur devenir *in vivo* au niveau subcellulaire. En effet, des informations ont pu être récoltées concernant les voies impliquées dans leur internalisation et leur dégradabilité au cours du temps.

En résumé, ces études sur la biodistribution des nanoparticules de PLA chez le poisson-zèbre après injection intraveineuse, devraient permettre de renforcer la compréhension du devenir des nanoparticules de PLA au sein du Vivant.

## 4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---

L'utilisation des nanoparticules pour la vectorisation de principes actifs est en plein essor grâce aux nombreux avantages que procurent ces nanobiotechnologies, comme une augmentation de la spécificité des traitements ou encore la possibilité d'administrer des drogues hydrophobes (18,19). Néanmoins, comme l'illustre la (*Figure 14*) pour l'utilisation des nanoparticules de PLA, les études réalisées *in vivo* ne sont pas fréquentes, tandis que celles qui s'intéressent à la biodistribution sont encore plus rares. Ainsi dans le domaine des nanoparticules de PLA, l'analyse des effets thérapeutiques semble prépondérante sur la caractérisation de la biodistribution. Il en ressort que la biodistribution des nanoparticules de PLA est principalement documentée *in vitro*, et au sein des tissus *in vivo*. Dans ce contexte, les analyses de la biodistribution *in vivo* au niveau cellulaire et subcellulaire réalisées durant le projet de thèse sont susceptibles d'enrichir les connaissances sur le devenir des nanoparticules au sein du Vivant. Il est possible que la méthodologie employée et les données obtenues soient bénéfiques pour caractériser la biodistribution d'autres types de nanosystème.

### 1- Analyse de la biodistribution des nanoparticules de PLA après administration muqueuse chez le poisson-zèbre adulte

#### **Pénétration des muqueuses par les nanoparticules de PLA**

Lors de la réalisation d'administration de nanoparticules de PLA par baignation, nous avons pu observer leur capacité à pénétrer les différentes muqueuses, ce qui est en accord avec la littérature publiée sur les mammifères et décrite dans l'étude bibliographique. De même, cette pénétration au sein des muqueuses branchiale, cutanée, intestinale et olfactive, semble suivre un motif commun, où les nanoparticules sont internalisées par des cellules épithéliales de la couche superficielle et accumulées au sein de phagocytes dans les strates inférieures (*Publication*). Ce type de prise en charge est en accord avec plusieurs études réalisées chez le poisson-zèbre et d'autres téléostéens, où sont étudiées l'internalisation muqueuse de microsphères, de bactéries et de nanoliposomes (278,310–312).

Cependant, le devenir des nanoparticules une fois à l'intérieur des muqueuses soulève des interrogations. Les modalités de leur prise en charge par les différents phagocytes restent à définir. Il serait intéressant de déterminer si cette prise en charge implique la formation de

prolongement cytoplasmique par les phagocytes pour échantillonner l'environnement extérieur comme chez les mammifères (313). De même, les mécanismes impliqués dans la progression des nanoparticules dans les muqueuses, dans les branchies par exemple où elles sont capables de pénétrer la circulation sanguine, reste à investiguer. Il est possible que ce transport implique la formation d'argosomes, vésicules excrétées spécifiquement par la membrane plasmique de la région basolatérale de cellules épithéliales et dont la taille semble supérieure à celle des exosomes (30-100nm) (314).

## **Prise en charge des nanoparticules de PLA par des tissus lymphoïdes systémiques**

En plus d'être capable de franchir les barrières muqueuses, les nanoparticules de PLA atteignent également différents organes possédant des fonctions immunitaires. Au sein du foie, qui représente un organe lymphoïde alternatif (244), les nanoparticules sont accumulées au sein de cellules morphologiquement différentes des hépatocytes. Le poisson-zèbre ne possédant pas de cellules de Kupffer, et la localisation de ces accumulations au niveau de l'espace de Disse suggèrent une possible prise en charge par les cellules hépatiques stellées (Ito cells). Chez les mammifères, ces cellules sont capables d'internaliser des nanoparticules et ont été décrites comme des cellules présentatrices d'antigène (243,315,316). Une identification approfondie de ces cellules responsables de ces accumulations hépatiques de nanoparticules demeure nécessaire. Le parcours emprunté par les nanoparticules pour atteindre le foie reste également à investiguer. En effet, lors de l'injection de nanoparticules dans le sang, très peu de nanoparticules ont pénétré le foie. Cela suggère que lors d'une administration par immersion, la prise en charge hépatique puisse-être indépendante de la circulation sanguine. Chez les mammifères, le foie est très riche en vaisseaux lymphatiques et dont la lymphe provient majoritairement des sinusoides (317). Il serait intéressant de déterminer si cette structure est conservée chez le poisson-zèbre et si ces vaisseaux peuvent potentiellement être impliqués dans la prise en charge hépatique des nanoparticules lors d'une balnéation.

Nous avons pu également montrer la présence de nanoparticules de PLA dans le rein, qui est le principal organe lymphoïde primaire chez le poisson-zèbre (262). L'imagerie en flux a montré que les cellules rénales positives aux nanoparticules possèdent des prolongements cellulaires faisant penser à des dendrites. Il est possible que les nanoparticules soient à l'intérieur de cellules dendritiques. L'importance de la présence des nanoparticules dans le rein sur le système immunitaire reste à évaluer. De même, il se pose la question du transport des

nanoparticules jusqu'au rein. Il est envisageable que les nanoparticules soient transportées par des cellules présentatrices d'antigène les ayant prises en charge au niveau des muqueuses (318) ou bien qu'elles aient été transportées par la circulation sanguine. Lors d'injection intraveineuse, nous avons pu observer, dans le rein, l'accumulation de nanoparticules au sein de cellules s'apparentant à des macrophages et aucune dans les structures excrétrices.

Les nanoparticules de PLA sont également internalisées au sein de cellules dendritiques corticales du thymus. Néanmoins les conséquences de cette prise en charge sont inconnues. Cet organe est responsable du développement des lymphocytes T et où est mise en place la tolérance centrale (319). Néanmoins, avec la présence de cellules  $IgZ^+$ , son contact direct avec les pathogènes extérieurs et la prise en charge des nanoparticules dans des cellules dendritiques font que l'on ne peut exclure la possibilité que le thymus puisse être impliqué dans d'hypothétiques inductions de réponses immunitaires. Ce point souligne la nécessité de déterminer les conséquences de la prise en charge de nanoparticules dans le rein, le foie et le thymus sur le système immunitaire.

## Pénétration des muqueuses par les nanoparticules de PLA

En plus de pouvoir pénétrer les muqueuses et d'atteindre des organes ayant des fonctions immunitaires, les nanoparticules de PLA sont internalisées par des cellules présentatrices d'antigènes muqueuses. Dans les branchies, les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules  $IgZ^+$  constituent 25% des cellules positives aux nanoparticules. La prise en charge de nanoparticules par les cellules du lignage lymphocytaire B  $IgZ^+$  est en accord avec la littérature (271,272,320) où leur capacité à effectuer la phagocytose et la neutralisation de pathogènes a été décrite. Il serait intéressant de regarder si les nanoparticules de PLA sont également internalisées par les lymphocytes B  $IgM^+$ , au sein de la lignée transgénique  $IgM1:eGFP$  par exemple (272). Bien que les macrophages aient une fonction de nettoyeur de l'organisme, ils n'en demeurent pas moins capables de participer à l'induction de réponses immunitaires. La prise en charge des nanoparticules de PLA dans ces cellules est de bon augure pour une possible utilisation de ces nanoparticules pour la vaccination muqueuse.

Le point le plus important réside dans la forte participation des cellules dendritiques dans la prise en charge des nanoparticules. Avec plus de 65% des cellules dendritiques ayant internalisées des nanoparticules, elles représentent plus de 10% des cellules positives aux nanoparticules. Chez les mammifères, ces cellules sont capables d'activer les lymphocytes T et sont très impliquées dans les processus permettant d'obtenir une protection vaccinale. Bien

qu'un tropisme vers ces acteurs clés de l'induction de réponses immunitaires soit très encourageant pour l'utilisation des nanoparticules de PLA pour la vaccination muqueuse, il sera nécessaire de vérifier la capacité de cette prise en charge à induire des réponses immunitaires car les cellules dendritiques sont également impliquées dans l'induction de la tolérance (321). Cela pourrait être réalisé par une étude transcriptomique par qPCR sur des populations de cellules dendritiques NP<sup>+</sup> isolées par tri cellulaire.

## Perspectives

L'ensemble des résultats indiquent que les nanoparticules de PLA seraient des vecteurs de choix pour la vaccination muqueuse. Elles sont capables de pénétrer les différentes muqueuses exposées, d'être accumulées par les cellules présentatrice d'antigènes, et d'atteindre des organes lymphoïdes systémiques sans l'aide d'agent de ciblage. Néanmoins de nombreuses recherches sont encore à réaliser.

Pour la vaccination, il est nécessaire d'évaluer la capacité de nanoparticules de PLA véhiculant un antigène à induire une réponse immunitaire de qualité lors d'une administration par immersion. Cette étape est prévue dans un projet financé par l'agence nationale de la recherche (ANR Fish-RNA<sub>vac</sub>). De même, à cause des différences structurelles du système immunitaire et des muqueuses entre les poissons et les mammifères, il serait intéressant d'appliquer les études réalisées durant le travail de thèse chez la souris par exemple, et plus particulièrement la quantification de l'implication des cellules présentatrices d'antigènes dans la prise en charge des nanoparticules de PLA après une administration muqueuse. Les résultats obtenus l'ont été avec des nanoparticules non-formulées. Chez les mammifères, la co-administration d'immunomodulateurs avec les nanoparticules de PLA a permis d'augmenter la qualité de réponses immunitaires après administration de nanoparticules (74,322). Il est possible que l'ajout d'immunomodulateur puisse impacter la biodistribution des nanoparticules, ce point nécessiterait de plus amples investigations. Enfin, étudier l'influence de la variation de différents paramètres d'administration sur la biodistribution, comme le temps d'exposition ou la concentration en nanoparticules (278), ou encore l'emploi d'une administration ciblée comme par exemple par voie intra-nasale (323) ou par la nébulisation cutanée (324), pourrait apporter de nouvelles informations sur la potentielle utilisation des nanoparticules de PLA pour la vaccination muqueuse.

D'un point de vue fondamental, de nombreuses interrogations ont été soulevées par les résultats obtenus. Elles concernent majoritairement le déplacement des nanoparticules au sein des muqueuses et de l'organisme, la manière dont elles sont prises en charge par les cellules présentatrices d'antigènes ou encore la préservation de leur intégrité particulaire. Pour éclaircir

ces inconnues, il sera nécessaire d'explorer le devenir des nanoparticules à l'échelle subcellulaire et au cours du temps. Cela devrait impliquer l'utilisation de nouvelles technologies hautement résolutive comme la microscopie super-résolutive (325).

## 2- Développement de stratégies de ciblage capables d'influer sur la biodistribution des nanoparticules de PLA lors d'une administration muqueuse.

### **Adsorption des lectines sur les nanoparticules de PLA**

Les stratégies de ciblage qui ont été étudiées reposent sur l'adsorption des lectines LTA et PNA sur les nanoparticules de PLA. En accord avec l'expertise du laboratoire du Dr. VERRIER sur l'adsorption de protéines ayant un fort poids moléculaire, seule l'utilisation d'une faible quantité de lectine a permis d'obtenir des formulations nanoparticulaires stables en condition de stockage (*Figure 55* et *Figure 56*). Cette faible quantité de protéine utilisée a empêché l'utilisation des kits de dosage protéique disponible au sein du laboratoire à cause des seuils de détections inadaptés. Une variation d'un microgramme lors de la détection représentait une fluctuation de 10-20% du taux d'adsorption. Nous n'avons donc pas pu évaluer dans quelle proportion les lectines étaient adsorbées ou libres. L'utilisation de la technique ELISA devrait permettre de lever le voile sur la proportion de lectines adsorbées. Néanmoins, plusieurs observations confortent l'idée d'une adsorption efficace des lectines. L'augmentation du diamètre des nanoparticules après l'adsorption est une conséquence d'une modification des nanoparticules, à cause du volume de la protéine par exemple. Dans le cas de la lectine PNA, l'utilisation de la lectine soluble n'a pas eu le même effet sur la prise en charge des nanoparticules de PLA par les branchies et la peau que la lectine adsorbée, ce qui suggère qu'au moins une partie des lectines PNA est toujours présente en surface des nanoparticules. Enfin, il s'est également posé la question de la stabilité des formulations dans l'eau d'animalerie et le fait qu'il semble rester de la lectine PNA en surface des nanoparticules lors de l'immersion ne signifie pas qu'aucune désorption n'ait pu se réaliser. En effet, bien que l'eau d'animalerie ne représente pas un environnement chaotropique, il n'est pas impossible que les lectines puissent se décrocher des nanoparticules lors de l'immersion.

### **Biodistribution des nanoparticules de PLA-LTA et PLA-PNA dans la muqueuse intestinale**

Lors de l'évaluation préliminaire de la biodistribution des nanoparticules formulées avec les lectines LTA et PNA, respectivement, de nouveaux tropismes ont pu être observés. Dans les intestins, la présence des lectines LTA ou PNA adsorbées semble intensifier la pénétration des nanoparticules dans la *lamina propria* de l'intestin intermédiaire antérieur. Néanmoins, une prise en charge en charge similaire, bien que paraissant moins intense, fut également observée pour les nanoparticules de PLA nues dans cette expérience. Cela contraste avec les observations obtenues dans la première partie du projet de thèse ([Publication](#)) où la prise en charge au sein de la *lamina propria* n'est pas aussi marquée. Il est possible que cela ait un lien avec la faible quantité de PBS ajoutée lors de l'immersion (+12 mOsm/L), la force ionique pouvant déstabiliser l'étanchéité des épithéliums muqueux (326). Cette nouvelle observation concorde avec une étude réalisée sur l'administration de nanoparticules de PLGA par gavage hyperosmotique chez le poisson-zèbre adulte (327). Dans cette étude, les nanoparticules de PLGA sont exclusivement observées au sein de la *lamina propria* intestinale. En contraste, plusieurs études indiquent qu'une immersion hyperosmotique n'augmente la prise en charge par les muqueuses que d'antigènes solubles mais pas d'antigènes particuliers (326,328). De même, une autre étude a observé que l'augmentation de la force ionique est sans effet sur la prise en charge de microsphère de polystyrène chez la truite (278).

L'adsorption de la lectine LTA sur des nanoparticules est utilisée chez les mammifères pour favoriser le passage des nanoparticules par les cellules M intestinales (329) car ces cellules possèdent des motifs d' $\alpha$ -fucose à leur surface. L'absence d'une augmentation flagrante de la prise en charge de nanoparticules par les entérocytes spécialisés, qui sont des équivalents fonctionnels des cellules M, rend envisageable l'absence de ce motif à la surface de leur membrane plasmique apical.

De fortes accumulations de nanoparticules dans la *lamina propria* sont également observées lors de l'administration de nanoparticules de PLA avec de la PNA adsorbée, tandis que la prise en charge par les entérocytes spécialisés est préservée. Ces résultats diffèrent de ceux présentés dans une étude (304) où des nanoparticules de polystyrène recouverte de PNA adsorbées covalamment ont été administrées par voie orale dans un modèle murin. Les auteurs ont observé une augmentation de l'adhésion de leurs nanoparticules à la surface de l'épithélium intestinal d'une muqueuse inflammée, et aucune adhésion sur un tissu sain. Il est possible que les entérocytes du poisson-zèbre exposent naturellement des séquences « Gal- $\beta$ (1-3)-GalNAc » au niveau de leur bordure en brosse, ou bien que la fixation covalente qui a été réalisé puisse

interférer avec le bon fonctionnement de la lectine, par encombrement stérique des sites de reconnaissance du substrat par exemple.

Il serait pertinent d'identifier les cellules de la *lamina propria* ayant internalisées les nanoparticules de PLA-LTA et de PLA-PNA. De nombreuses cellules immunitaires résident dans cette région (263).

## **Biodistribution des nanoparticules de PLA-PNA dans les muqueuses branchiale et cutanée**

Lors de l'administration par balnéation de nanoparticules de PLA-PNA, d'intenses accumulations de nanoparticules ont été observées dans la couche épithéliale ou sub-épithéliale des lamelles de branchies. Toutefois, les cellules responsables de cette prise en charge restent à identifier. Dans cette région résident plusieurs types cellulaires : des cellules pavimenteuses en surface, des cellules immunitaires infiltrées sous la couche superficielle ou bien des cellules piliers au niveau de l'endothélium vasculaire. Bien que dans les branchies la lectine PNA puisse se fixer en surface de certains ionocytes, comme l'indiquent certains protocoles servant à isoler ces cellules (330), il est peu probable que ces cellules soient responsables de ces accumulations parce qu'elles sont distribuées à la surface des filaments et absentes de celle des lamelles (231,330).

Dans la muqueuse cutanée, les nanoparticules de PLA-PNA ont été observées à l'intérieur de cellules de la couche basale de l'épiderme. Bien que l'épiderme de la peau de mammifère soit recouvert par une couche de cellules mortes (couche cornée), une étude chez les mammifères a montré que la lectine PNA se lie au niveau des microvilli à la surface de kératinocytes (331) tandis qu'une autre a démontré la capacité de la lectine à se fixer aux cellules de la couche basale, du *stratum spinosum* et des follicules pileux (332) de l'épiderme de chien. Il est possible que ces interactions privilégiées avec des cellules de l'épiderme de mammifère soient conservées au sein de la peau de poisson-zèbre. Ce qui pourrait potentiellement être lié à la capacité des nanoparticules de PLA-PNA d'interagir avec les kératinocytes et les cellules de la couche basale de l'épiderme de poisson-zèbre.

L'évaluation par cytométrie en flux de la prise en charge des nanoparticules de PLA-PNA révèle une augmentation d'un facteur 2 de la quantité moyenne de nanoparticules par cellules dans les branchies, mais aucune influence sur la quantité de cellules positives aux nanoparticules. Ce résultat est prometteur pour une potentielle application en vaccination muqueuse. Dans un cadre vaccinal, l'augmentation de la quantité d'antigène pénétrant

l'organisme favorise l'induction d'une réponse immunitaire de meilleure qualité (333). Il sera toutefois nécessaire de s'assurer que l'adsorption de la lectine PNA n'interfère pas avec l'internalisation des nanoparticules par les cellules présentatrices d'antigènes.

Dans la muqueuse cutanée, il est possible que la prise en charge des nanoparticules soit potentiellement augmentée. Une augmentation du nombre d'échantillon devrait permettre de valider ou d'infirmer cette observation. Néanmoins, au sein des poissons ayant internalisé le plus les nanoparticules de PLA-PNA, une sous-population de cellules NP<sup>+</sup> est détectée. La réalisation d'un tri cellulaire sur cette sous-population devrait permettre ultérieurement d'en identifier le type cellulaire par microscopie électronique ou cytopspin.

De la même manière, la co-administration de la lectine PNA soluble semblent augmenter quantité de cellule prenant en charge les nanoparticules de PLA nues dans les branchies et la quantité de nanoparticules par cellule. Bien que ces observations soient proches du seuil de significativité, seule une augmentation du nombre d'échantillon permettra d'approfondir cette évaluation. Aucun effet de la lectine PNA soluble n'a été observé dans la muqueuse cutanée.

### **Mécanisme d'action de la lectine PNA adsorbée sur les nanoparticules de PLA au sein des muqueuses branchiale et cutanée**

Malgré les potentiels bénéfiques que peut apporter l'adsorption de la lectine PNA sur les nanoparticules de PLA. Les mécanismes impliqués sont inconnus. L'utilisation d'un marquage anti-PNA a toutefois permis de révéler que lors de l'immersion, la lectine PNA recouvre spécifiquement certaines cellules épithéliales branchiales et cutanées. Cette spécificité envers certaines cellules épithéliales est intrigante. Cela pourrait être lié à un état pro-inflammatoire du microenvironnement de ces cellules. Dans l'étude ayant utilisé de la lectine liée covalamment à des nanoparticules de polystyrène (304), les auteurs ont soumis l'hypothèse que les cellules épithéliales d'un tissu inflammées exposeraient de l'antigène T (Thomsen-Friedenreich antigen) sur leur membrane plasmique et que la lectine PNA serait capable de reconnaître et fixer ce disaccaride (Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1) . Il serait intéressant de réaliser des expériences complémentaires sur des poissons provenant de la lignée transgénique fluorescente reportrice de l'expression d'IL1 $\beta$  (294). Il est également possible que la lectine PNA soit fixée au récepteur TLR4. Il a été montré que la lectine PNA possède, chez les mammifères, un effet agoniste du récepteur TLR4 (306). De même, le TLR4 est exprimé par les cellules épithéliales

des muqueuses nasale, pulmonaire, vaginale et intestinale chez les mammifères (334). Il sera toutefois nécessaire de vérifier la conservation de la reconnaissance de la PNA par le TLR4 chez le poisson-zèbre. Il est aussi possible que cette susceptibilité à la PNA soit liée au degré de maturité des cellules épithéliales. La lectine PNA est utilisée chez les mammifères pour sa capacité à lier les lymphocytes T immatures des lymphocytes et non ceux matures (335), et il a été montré que le marquage avec la lectine PNA augmenté avec la maturation des cellules épithéliales de l'œsophage de souris (336). L'utilisation de galactose, qui est un inhibiteur de la fixation de la lectine PNA par un effet de compétition, lors d'immersion devrait permettre d'éclaircir les mécanismes impliqués.

Enfin, la lectine PNA est également observée au sein des phagocytes ayant accumulé les nanoparticules de PLA. Ce résultat est intéressant car le récepteur TLR peut aussi être distribué à la surface de vésicules d'internalisation (334). En plus d'un potentiel effet de ciblage, il est possible que la lectine PNA puisse également participer à l'activation de cellules immunitaires, comme cela fut observé *in vitro* au sein de macrophage par l'adsorption de la lectine PNA sur des nanoparticules d'oxyde de magnésium (305).

## Perspectives

Dans l'ensemble, les résultats obtenus demeurent, pour la plupart, préliminaires et nécessitent de plus amples caractérisations. L'augmentation du nombre d'échantillon permettrait d'obtenir une meilleure significativité par exemple, tandis que l'utilisation des marquages des cellules immunitaires développés précédemment devrait permettre d'identifier les acteurs impliqués dans la prise en charge des nanoparticules.

De même, il serait intéressant d'approfondir les modalités d'administration de ces stratégies de ciblage. La quantité de lectine utilisée dans ces expériences est infime, il faudrait étudier la biodistribution de ces formulations de nanoparticules en augmentant la concentration en lectine, mais cela serait aux dépens de la qualité des formulations. Il serait aussi intéressant d'observer si la co-administration de lectine soluble et de lectine adsorbée sur des nanoparticules de PLA puisse avoir un effet synergique, un effet inhibiteur ou bien aucune incidence sur la biodistribution des nanoparticules de PLA.

L'utilisation d'une infime quantité de lectine PNA en surface des nanoparticules de PLA a permis d'augmenter leur prise en charge par les branchies. Etre capable d'orienter la

biodistribution des nanoparticules avec peu d'agents de ciblage pourrait ouvrir de nombreuses perspectives d'utilisation. Cela pourrait permettre d'augmenter la charge d'antigène pénétrant l'organisme pour les vaccins tout en induisant potentiellement un effet adjuvant supplémentaire. De même, cela pourrait permettre de réduire les quantités de nanoparticules administrées pour un effet thérapeutique équivalent.

Plusieurs études ont montré que la lectine PNA est capable de se lier en surface de différentes muqueuses de mammifères (332), de même le récepteur TLR4 est exprimé par les cellules épithéliales muqueuses (334), il serait donc pertinent d'étudier ces stratégies de ciblage lors d'une administration muqueuse dans un modèle mammifère.

Au sein de nombreux cancers, les cellules tumorales surexpriment des motifs glycanes sur leur membrane plasmique et notamment l'antigène T. La lectine PNA est d'ailleurs utilisée pour identifier des cellules cancéreuses (337). L'adsorption de la lectine PNA pourrait potentiellement favoriser la rétention des nanoparticules de PLA au sein de tumeurs.

Au niveau fondamental, il sera important de comprendre les mécanismes induit par l'adsorption de la lectine PNA. Il serait pertinent d'étudier par qPCR l'expression de gènes pro-inflammatoires, de gènes liés à la production d'antigène-T ou bien des gènes impliqués dans la signalisation du TLR4, au sein des cellules épithéliales recouvertes par la lectine PNA et isolées par tri cellulaire. D'une manière plus générale, les mécanismes en jeu semblent complexes et il est possible que pour mieux les appréhender, il soit nécessaire de réaliser des expériences *in vitro* sur des lignées cellulaires épithéliales et des lignées de cellules immunitaires. Cela pourrait permettre de comprendre les bases du mode d'action de cette stratégie de ciblage avant de pouvoir émettre des hypothèses sur le fonctionnement *in vivo*.

### **3- Analyse de la biodistribution des nanoparticules de PLA après administration intraveineuse chez le poisson-zèbre adulte.**

## Prise en charge des nanoparticules de PLA par les cellules endothéliales et les macrophages

Lors de la réalisation d'administrations par injection intraveineuse au sein de larves de poisson-zèbre, les nanoparticules de PLA sont rapidement internalisées par les cellules endothéliales après une brève circulation dans le flux sanguin. Cette observation n'est pas documentée *in vivo* dans la littérature. Certaines cellules endothéliales possèdent un comportement « scavenger » et sont impliquées dans la clairance du sang. Principalement distribuées au niveau du cœur, du rein et des branchies chez les téléostéens, ces cellules sont possiblement impliquées dans la prise en charge d'éléments plus petits que 500 nm par pinocytose, comme les virus (338). Il serait intéressant de déterminer chez le poisson-zèbre si ce phénotype peut être induit au sein des cellules endothéliales veineuses et artérielles. Certains des récepteurs impliqués comme ceux « scavenger » du type F sont décrits au sein de cellules endothéliales de poisson-zèbre (339,340). Comme décrit au sein d'une review par Sørensen et *al* (338), ces cellules endothéliales sont des spécialistes de la macropinocytose et de l'endocytose par la voie des clathrines, néanmoins elles sont également capables de phagocyter des bactéries (341). Les prises en charge de nanoparticules de PLA par les cellules endothéliales qui ont été observées par microscopie électronique, suggèrent l'implication de ces 3 processus d'internalisation. Enfin, cette observation suggère aussi que lors de la réalisation d'études de biodistribution à l'échelle des organes, il est possible que les nanoparticules détectées résident au sein des cellules endothéliales irrigant l'organe plutôt qu'à l'intérieur de l'organe.

Les macrophages sont des phagocytes impliqués dans la clairance générale de l'organisme. L'internalisation rapide des nanoparticules de PLA circulante dans le flux sanguin était attendue. Des nanoparticules de PLGA chargées avec un antibiotique et injectées par intraveineuse chez la larve de poisson-zèbre infectés par *mycobacterium marinum*, sont internalisées au sein de macrophages infectés (211). Il est possible que le système du complément soit impliqué dans cette prise en charge (342), même si les anticorps ne sont pas encore présent à ce stade de développement du poisson-zèbre.

Néanmoins, il a été montré que les macrophages internalisent des nanoparticules de PLA de manière constante dans les premières 24h suivant l'injection intraveineuse. Les nanoparticules de PLA n'étant plus circulante après 30mn, la question de cette prise en charge continue s'est posée. Le passage de nanoparticules d'une cellule endothéliale à un macrophage a pu être

observé. Toutefois les mécanismes impliqués sont inconnus. Une étude a montré que les macrophages et les cellules endothéliales sont capables de fusionner leur membrane plasmique et d'échanger du matériel par le biais de microtubules (343). Le transfert d'organelles de cellules à cellules peut également impliquer la formation de nanotubes de transfert (Tunneling nanotubes) composés de microtubules et de filaments d'actines et dont le diamètre peut atteindre plusieurs centaines de nanomètre (344,345). Il a d'ailleurs été montré que des endosomes tardifs et des lysosomes peuvent être échangés par ce processus (346). L'utilisation d'une lignée double transgénique mettant en valeur les cellules endothéliales et les macrophages avec un marquage de la tubuline pourrait apporter plus d'informations. De même, l'usage de la microscopie à super-résolution et de la microscopie corrélative pourrait également permettre de mieux appréhender ce phénomène. Il est également envisageable d'éteindre certains gènes impliqués dans les échanges de matériels entre cellules par vivo-morpholino avant d'injecter les nanoparticules de PLA, comme la protéine Tau qui est impliquée dans la stabilisation des microtubules et la formation des nanotubes de transfert (347). Il est possible de se demander si ce mécanisme pourrait être impliqué dans le transport des nanoparticules de PLA à travers les muqueuses qui a été observé lors des administrations par immersion chez le poisson-zèbre adulte. Enfin, cette observation souligne également l'existence d'un risque que la charge thérapeutique se libère ou soit altérée dans les cellules endothéliales plutôt que d'atteindre les macrophages.

## Dégradation *in vivo* des nanoparticules de PLA internalisées

Les nanoparticules de PLA (D,L) sont reconnues pour leur stabilité *in vitro*. Leur disparition totale n'est observée qu'au bout de 104 semaines d'incubation dans du PBS1X, à pH 7,4 et à 37°C (348). Dans cette étude, il a été montré que l'intégrité particulaire est perdue, tandis que seul 15% du PLA a été dégradé au bout des 104 semaines. Les nanoparticules ont été dégradées en oligomères. Les nanoparticules de PLA (D,L) élaborée au sein du laboratoire du Dr. VERRIER sont stables durant plus d'un an en conditions de stockage (4°C en PBS1X ou en eau distillée). Néanmoins, aucune donnée n'existe dans la littérature sur la dégradation de ces nanoparticules après leur internalisation par une cellule *in vivo*. Lors de l'utilisation de la microscopie électronique à transmission pour caractériser le devenir des nanoparticules de PLA après leur injection intraveineuse chez la larve de poisson-zèbre, nous avons observé la perte progressive de l'intégrité nanoparticulaire en seulement une semaine après leur internalisation par les cellules endothéliales. Ce résultat contraste avec l'image de grande stabilité véhiculée

par les nanoparticules de PLA (D,L). L'acidité favorisant l'hydrolyse du PLA, il est possible que cette dégradation soit causée par le pH acide de certains compartiments endomembranaires (Endosome tardif : pH 6,5 / Lysosome : pH 5) où peuvent être accumulées les nanoparticules. Il serait donc intéressant d'identifier dans quelle compartiment du système endomembranaire évolue les nanoparticules internalisées au cours du temps, que ce soit par marquage histologique (Lysotracker) ou bien par des protocoles d'isolation des organelles (349). De même, il serait pertinent de déterminer au bout de combien de temps l'acide lactique est entièrement métabolisé *in vivo*, avec une étude similaire à celle présentée dans l'étude bibliographique portant sur des nanoparticules de PLGA (194). Enfin, cette dégradation en une semaine de la stabilité particulière des nanoparticules de PLA *in vivo* pourrait être bénéfique dans le cas de traitement nécessitant des administrations chroniques, souvent sujet à des problèmes d'accumulations des agents thérapeutiques.

### **Devenir des nanoparticules de PLA dans le système réticuloendothélial du poisson-zèbre adulte.**

En accord avec la littérature (248), les nanoparticules sont prises en charge principalement par le rein et la rate après leur injection intraveineuse chez le poisson-adulte. Le point intrigant est la formation de rassemblement de cellules positives aux nanoparticules une semaine après l'injection intraveineuse. Ces rassemblements ont été observés au niveau de tissus ayant des fonctions immunes, à l'intérieur du rein, de la rate et dans la cavité branchiale, à l'intérieur de centres névralgiques de la présentation d'antigènes que constituent les centres de mélanomacrophages (265). Il serait pertinent d'identifier ces cellules ayant accumulées les nanoparticules et s'il y a la présence de lymphocyte T au niveau de ces rassemblements. De même, il serait également intéressant de déterminer si l'injection intraveineuse de nanoparticules de PLA véhiculant un antigène permet d'induire une réponse immunitaire au niveau de la rate, du rein et de la cavité branchiale. Bien que ce type d'administration soit peu pratique pour la vaccination, l'hypothétique formation de centres de mélanomacrophages constitués de cellules ayant internalisées des nanoparticules, au sein de deux organes lymphoïdes systémiques et d'une muqueuse est un événement immunologique non négligeable (350). Une étude sur le devenir des nanoparticules une semaine après administration par immersion serait également pertinente, ayant pour but de déterminer s'il y a également formation de regroupement de cellules NP+.

### **Perspective**

Dans l'ensemble, les résultats obtenus ont permis de se projeter sur le devenir des nanoparticules à l'échelle cellulaire et subcellulaire. Quasi-inexplorée, de nombreuses caractérisations sont encore à réaliser, comme le mécanisme d'échange des nanoparticules entre cellules ou encore déterminer si elles peuvent pénétrer les vaisseaux lymphatiques. De même, la présence de forte accumulation de nanoparticules au sein d'une même cellule et la possible dégradation des nanoparticules de PLA en une semaine soulève la question d'une potentielle toxicité locale ? Il serait intéressant d'évaluer l'apoptose au sein des cellules endothéliales *in vivo* par la technique TUNNEL et l'orange acrydine (351).

Lors d'injection intraveineuse, des cellules circulantes dans le flux sanguin et chargées en nanoparticules de PLA ont été observées. L'identification de ces cellules pourrait augmenter la compréhension des mécanismes de défenses de l'organisme contre les pathogènes circulants. Non-montrées, des expériences préliminaires semblent indiquer l'implication des thrombocytes, de monocytes et de très petites cellules ayant la morphologie de lymphocytes. L'identification de ces cellules pourrait être réalisée par l'intermédiaire d'un tri cellulaire suivi d'une analyse par imagerie en flux, par cytopspin ou bien par microscopie électronique, et par l'utilisation de lignées transgéniques illuminant les différents types de cellules immunitaires circulantes (275).

L'internalisation des nanoparticules de PLA par les cellules endothéliales ouvre de nombreuses perspectives d'application. En particulier pour le traitement de pathogènes provoquant des perturbations hémorragiques ou ayant un tropisme pour les cellules endothéliales. Enfin, l'utilisation de nanoparticules de PLA fluorescentes pourrait également constituer une alternative biocompatible et biodégradable pour le marquage des vaisseaux sanguins pour les chirurgiens.

## 5. CONCLUSION

---

Le développement des nanobiotechnologies permet d'établir de nouvelles thérapies prometteuses pour la vaccination et la délivrance de médicaments. L'utilisation de nanovecteurs biodégradables et biocompatibles, comme ceux à base de poly(acide lactique) (PLA), peut potentialiser l'utilisation des agents thérapeutiques hydrophobes et amplifier la qualité de traitements préexistants. Le laboratoire du Dr. VERRIER possède une grande expérience sur l'utilisation de nanoparticules de PLA pour l'administration de vaccins et d'agents thérapeutiques. Cependant, l'optimisation de ces nanosystèmes est freinée par une compréhension lacunaire de leur biodistribution *in vivo*. Le projet de thèse se positionne dans un contexte où le devenir des nanoparticules de PLA au sein d'un organisme, est majoritairement étudié à l'échelle des organes et des tissus.

Ce travail de thèse avait pour objectifs : d'étudier la biodistribution *in vivo* de nanoparticules de PLA à l'échelle tissulaire et cellulaire après administration muqueuse et intraveineuse, et de définir des stratégies capables d'infléchir sur leurs interactions avec le vivant. Dans l'idée de pouvoir enrichir les champs d'application et d'optimisation de ces nanovecteurs. Le projet de thèse a été établi sur l'utilisation d'un modèle animal particulièrement adapté aux études sur individu entier, le poisson-zèbre, et le développement d'une méthodologie rigoureuse d'analyse de la biodistribution de nanoparticules basée sur l'emploi conjoint de technologies complémentaires.

Ces outils ont permis de démontrer que les nanoparticules de PLA interagissent fortement avec les acteurs du système immunitaire. Après une administration muqueuse par balnéation, les nanoparticules de PLA pénètrent efficacement les muqueuses exposées et certains organes ayant des fonctions immunitaires. Elles sont également internalisées par des cellules présentatrices d'antigènes muqueuses, avec un fort tropisme naturel pour les cellules dendritiques. De même, lors d'injection intraveineuse, les nanoparticules de PLA sont prises en charge par le système réticuloendothélial et sont accumulées au sein de structures potentiellement immunes. Nous avons également pu montrer que les nanoparticules de PLA possèdent des relations privilégiées des nanoparticules avec le système circulatoire, où elles sont internalisées par les cellules endothéliales, aussi bien après une administration par immersion qu'après une injection intraveineuse. Des informations ont également été obtenues sur le devenir de ces nanoparticules et les processus impliqués dans leurs internalisations et leurs transports au niveau cellulaire et subcellulaire *in vivo*. Enfin, nous avons pu également

mettre en valeur l'utilisation des lectines comme agents de ciblage susceptibles de potentialiser la prise en charge des nanoparticules au sein de diverses muqueuses.

Dans l'ensemble, cette étude interdisciplinaire sur les nanoparticules et le poisson-zèbre a permis de souligner le potentiel prometteur de ces nanoparticules pour l'administration de vaccins par voie muqueuse. De même, il est possible que les données fondamentales obtenues et les outils développés puissent également participer à faire progresser la compréhension et l'étude de la biodistribution des nanobiotechnologies à usages vétérinaire et humaine. Néanmoins, certaines des études réalisées ont besoin d'être consolidées comme l'évaluation des stratégies de ciblage. Tandis que certaines observations bénéficieraient d'être approfondies, comme le devenir des nanoparticules à l'échelle subcellulaire et l'applicabilité des résultats obtenus chez les mammifères.

En perspective, ces nanoparticules pourraient permettre de développer des formulations vaccinales chez les mammifères, mais également pour le domaine piscicole. En effet, selon l'organisation des Nations-Unies pour l'alimentation et l'agriculture, la consommation de poissons provenant de l'aquaculture surpassera celles provenant de la pêche traditionnelle ces prochaines années, or le domaine de la pisciculture demeure sensible aux épidémies à cause du manque de vaccins disponibles. D'un point de vue fondamental, nous avons pu apercevoir l'existence d'une dimension quasiment inexplorée des nanoparticules qui mériteraient d'être étudiée en détails : l'aspect subcellulaire.

## 6. ANNEXE

---

### **REVUE SCIENTIFIQUE**

## Review

For reprint orders, please contact: [reprints@futuremedicine.com](mailto:reprints@futuremedicine.com)

## Poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) particles as versatile carrier platforms for vaccine delivery

The development of safe and effective vaccines for cancer and infectious diseases remains a major goal in public health. Over the last two decades, controlled release of vaccine antigens and immunostimulant molecules has been achieved using nanometer or micron-sized delivery vehicles synthesized using biodegradable polymers. In addition to achieving a depot effect, enhanced vaccine efficacy using such delivery vehicles has been attributed to efficient targeting of antigen presenting cells such as dendritic cells. Biodegradable and biocompatible poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) polymers belong to one such family of polymers that have been a popular choice of material used in the design of these delivery vehicles. This review summarizes research findings from ourselves and others highlighting the promise of poly(lactic acid)- and poly(lactic-co-glycolic acid)-based vaccine carriers in enhancing immune responses.

**Keywords:** adjuvants • biodegradable • controlled release • immune response • particles • PLA • PLGA • vaccine delivery

Over the last two decades, nanoparticle (NP) and microparticle (MP) based delivery systems have received much attention for applications in the fields of biology and medicine and appear to show promise as vaccine vehicles. Particulate materials, including aluminum salts (referred to as 'alum'), calcium phosphate, emulsions and biodegradable polymeric particles, are the most widely used and studied vehicle adjuvants [1].

Despite the fact that aluminum compounds have been used with a large number of antigens and are capable of increasing humoral responses to high titer in most cases, these adjuvants have shown limitations in the development of vaccines for viral infections, cancer or other intracellular infections where CD8<sup>+</sup> T-cell responses are critical. The adjuvant activity of alum is generally thought to be improved when antigens are adsorbed to the aluminum particles, although this is not the case for all antigens [2,3]. Limitations of alum as adjuvant include lack of effectiveness for some antigens, requirement for booster

doses, incapacity to elicit mucosal IgA antibodies (Abs) and local hypersensitivity reaction in some subjects [4]. This has led to the development of new research in the design of innovative adjuvants to improve existing vaccines and to support the newer and often less immunogenic antigens under development.

Biodegradable polymer particles, most commonly micro- or nano-particles, carrying peptide or protein antigens, have been studied for more than 20 years since the ability to control the release of antigens over time was recognized, potentially allowing the elimination of booster doses [5].

As antigen delivery systems, particles have demonstrated enormous potential for the development of improved vaccines. Their benefits are manifold, including the sustained delivery of antigens for extended periods of time, the potential to reduce the number of booster injections and passive or active targeting of antigen-presenting cells (APCs) through nonspecific or receptor-mediated phagocytosis, respectively.

Vincent Pavot<sup>1</sup>, Morgane Berthet<sup>2</sup>, Julien Rességuier<sup>2</sup>, Sophie Legaz<sup>2</sup>, Nadège Handké<sup>2</sup>, Sarah C Gilbert<sup>1</sup>, Stéphane Paul<sup>3</sup> & Bernard Verrier<sup>\*2</sup>

<sup>1</sup>The Jenner Institute, University of Oxford, Oxford, UK

<sup>2</sup>Institut de Biologie & Chimie des Protéines - LBTI, UMR 5305 – CNRS/University of Lyon, Lyon, France

<sup>3</sup>Groupe Immunité des Muqueuses & Agents Pathogènes – INSERM CIE3 Vaccinologie, Faculté de Médecine de Saint-Etienne, France

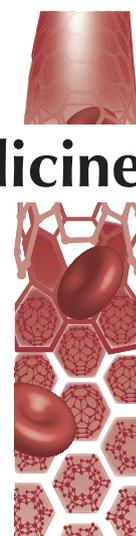
\*Author for correspondence:

Tel.: +33 0 4 72 72 26 36

Fax: +33 0 4 72 72 26 04

[bernard.verrier@ibcp.fr](mailto:bernard.verrier@ibcp.fr)

# Nanomedicine



A variety of polymers exists from which NPs and MPs for drug delivery can be prepared. However, the most commonly studied polymers are poly(lactic-*co*-glycolic acid) (PLGA) and poly(lactic acid) (PLA) [6]. These biodegradable and biocompatible polymers have been licensed for human use (e.g., as sutures, bone implants and screws as well as implants for sustained drug delivery) and are approved by US FDA [7,8].

Furthermore, PLA and PLGA polymers have been extensively studied for their use in the formulation of vaccine antigens (proteins, peptides, DNA) [8–11] and there is a large body of literature demonstrating the advantages of such particles for antigen delivery [8,12–13]. These particles can be tailored to degrade over a range of rates and can act as a depot from which the loaded antigen/ligand is gradually released [14]. Additionally, these particles allow the encapsulation of hydrophobic molecules and may protect encapsulated antigens [11,15] and preclinical studies have shown that PLA NPs can induce systemic Ab titers comparable to those of aluminum salts or MF59<sup>®</sup> (Novartis, Basel, Switzerland), a more recently licensed adjuvant [10,16–17]. The objective of this review is to provide an overview of the use of PLA/PLGA particles in vaccination.

### Desired immune responses to vaccines

Vaccines provoke immunity by imitating an infection (e.g., attenuated or viral vector-based vaccines) or by simply inducing antigen-specific immune responses (e.g., subunit vaccines). Vaccination does not cause illness, but results in the production of T-lymphocytes and Abs. Long-term immunity is conferred by the maintenance of antigen-specific immune effectors and/or by the induction of immune memory cells that may be sufficiently efficient and rapidly reactivated into immune effectors in case of subsequent pathogen exposure.

The majority of vaccines result in the production of Abs, produced by plasma cells and capable of binding specifically to a toxin or a pathogen. This is referred to as ‘humoral immunity’ [18]. Whereas specific Abs are able to neutralize extracellular pathogens, specific cellular immune responses are important for the control of intracellular pathogens after infection, or for the control of cancer. Therefore, induction by vaccination of cytotoxic CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (CTL) that may limit the spread of infectious agents by recognizing and killing infected cells or tumor cells, or secreting specific antiviral cytokines is of interest. The generation and maintenance of both B and CD8<sup>+</sup> T-cell responses are supported by growth factors and signals provided by CD4<sup>+</sup> T helper (Th) lymphocytes, which are commonly subdivided into T helper 1 (Th1) and T helper 2 (Th2) subtypes (Figure 1).

### Preparation of PLA/PLGA particles

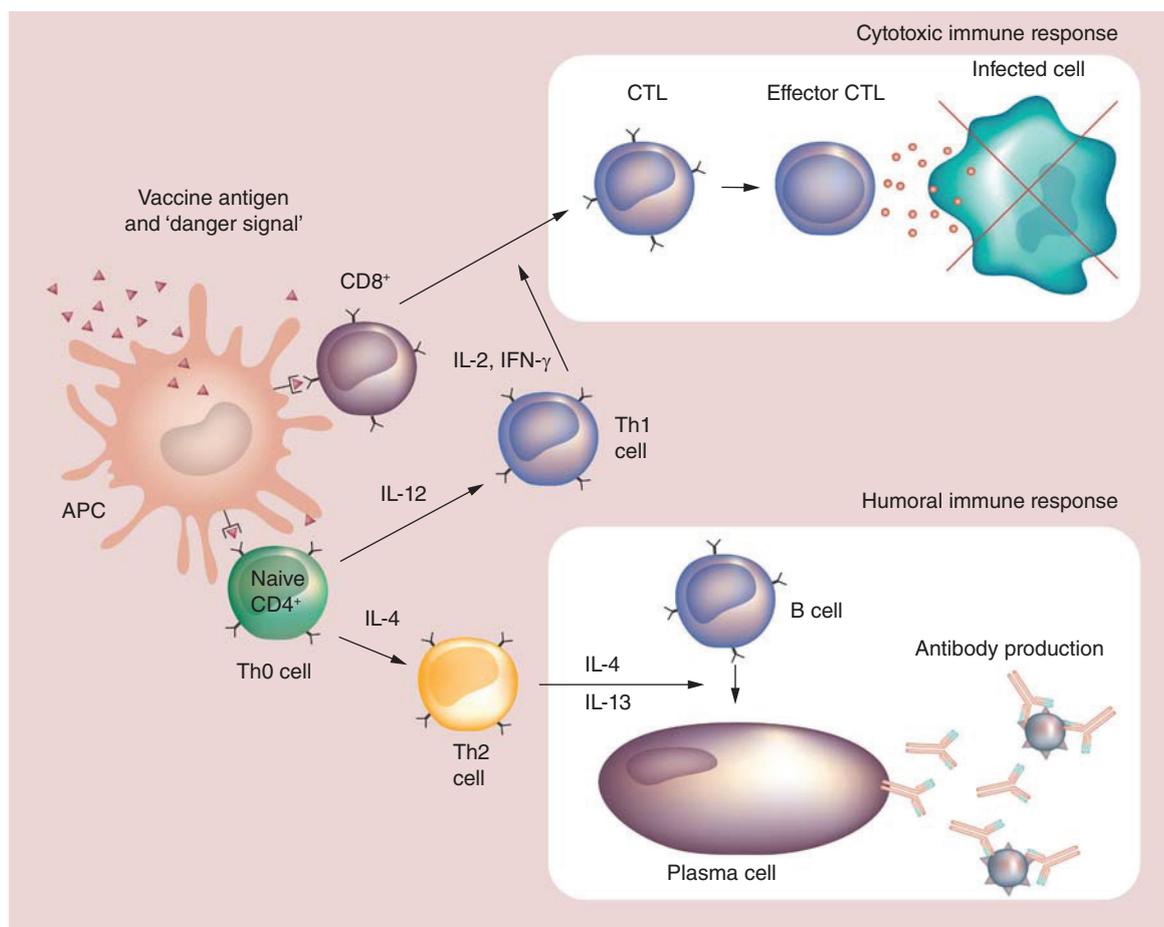
The encapsulation of compounds including protein and peptide vaccine antigens into PLA/PLGA particles is a very attractive strategy. The choice of the method to prepare PLA/PLGA particles will mainly depend on the choice of the vaccine immunogen, its physico-chemical properties and the desired association with the particles. Drugs can be entrapped into the core of a ‘micro/nanocapsule’, into the core of a polymeric matrix of a ‘micro/nanosphere’, or adsorbed onto the surface of particles (Figure 2).

Hydrophobic drugs, such as some immunostimulating molecules or even peptides, are usually entrapped into particles to prevent their rapid degradation and elimination. The choice of protocol for the preparation of these particles depends predominantly on the solubility of the drug in a water-miscible, or in a nonwater-miscible solvent, volatile or not.

If the drug is soluble in a water-miscible solvent (e.g., acetone, acetonitrile and tetrahydrofuran) along with PLA and PLGA, nanoprecipitation, also known as ‘solvent displacement’, diafiltration or salting-out, can be applied.

The nanoprecipitation of PLA/PLGA was developed and patented by Fessi *et al.* [19]. This method permits the preparation of monodisperse particles, by controlling the precipitation of the hydrophobic polymers into an aqueous phase. Briefly, it requires the use of two miscible phases: an organic phase in which the polymer is dissolved and an aqueous phase where the polymer is not soluble. The organic phase is injected under moderate flow into the aqueous phase and the particles are immediately formed under the influence of the solvent displacement into the aqueous phase. Preferably, the solvent chosen is volatile, to facilitate removal by evaporation under reduced pressure, but alternatively solvents can also be removed by dialysis. This one-step manufacturing process has the major advantage of being instantaneous, allowing the reproducible formation of nanometric, monodisperse particles exhibiting a high hydrophobic drug loading capacity. Additionally, this method has the advantage that no surfactant need be added. The size and size distribution of the particles can be easily adjusted by changing the preparation conditions, such as initial polymer concentration, ratio of water to organic solvent, polymer molecular weight or solvent evaporation rate. The organic solvent can also be changed to modulate the size of particles, by changing its diffusion rate in water [20].

If the drug is not soluble in a volatile, water-miscible solvent, the diafiltration method can be used to prepare particles by dialysis of the organic phase dissolving PLA/PLGA. Although this is less easily controlled than the nanoprecipitation method, the par-



**Figure 1. Desired immune responses elicited by prophylactic vaccines.** Vaccines against extra- or intra-cellular pathogens must target antigens and danger signals to immature DCs at the administration site and/or into the draining lymph nodes. DCs then present antigen through MHC class I or II complexes to CD8<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup> T cells, respectively. Danger signals stimulate DCs, which consequently express costimulatory molecules and secrete cytokines leading to T-cell stimulation and Th1 or Th2 orientation. Activated Th2 cells, produce B cell-stimulating cytokines that support differentiation of antigen-primed B cells. This facilitates/induces B-cell differentiation into memory B cells and plasma cells that produce large amounts of antibodies that prevent future virus infection. CD8<sup>+</sup> lymphocytes acquire a cytotoxic phenotype, known as CTL, which is able to cause infected cell lysis directly. APC: Antigen-presenting cell; CTL: Cytotoxic CD8<sup>+</sup> T lymphocyte; DC: Dendritic cell.

particle sizes can be better controlled when the solution is precipitated prior to use.

The salting-out process was developed by Ibrahim [21]. Briefly, an emulsion of an organic phase in an aqueous phase containing a stabilizer and a highly concentrated electrolyte (salt, sucrose), in which the organic solvent is not soluble, is prepared with vigorous stirring. Pure water is then added to allow the solvent to diffuse into the aqueous phase leading to the formation of particles. This method allows for better control of the particle size, by controlling the stabilizer concentration, the stirring rate and the polymer concentration [22,23]. However, an additional purification step is necessary to remove the electrolyte used for the saturation of the aqueous phase. The other components (active molecule and active surfactant) must also

be compatible with the electrolyte, which must also be nontoxic.

When the antigen or the active molecule is preferentially soluble in a nonwater-miscible solvent like dichloromethane (DCM), single emulsion solvent evaporation can be performed. The single emulsification process involves an oil-in-water (o/w) emulsion. The first step consists in dissolving the polymer in a nonwater miscible organic phase (e.g., DCM). This polymer solution is then dispersed into an aqueous phase commonly containing a surfactant (e.g., polyvinyl alcohol and Poloxamer), in order to create an o/w emulsion with larger droplets. The emulsion is then treated by homogenizers or ultrasound in order to obtain smaller droplets. To replace the chlorinated solvent commonly used for the single emulsion sol-

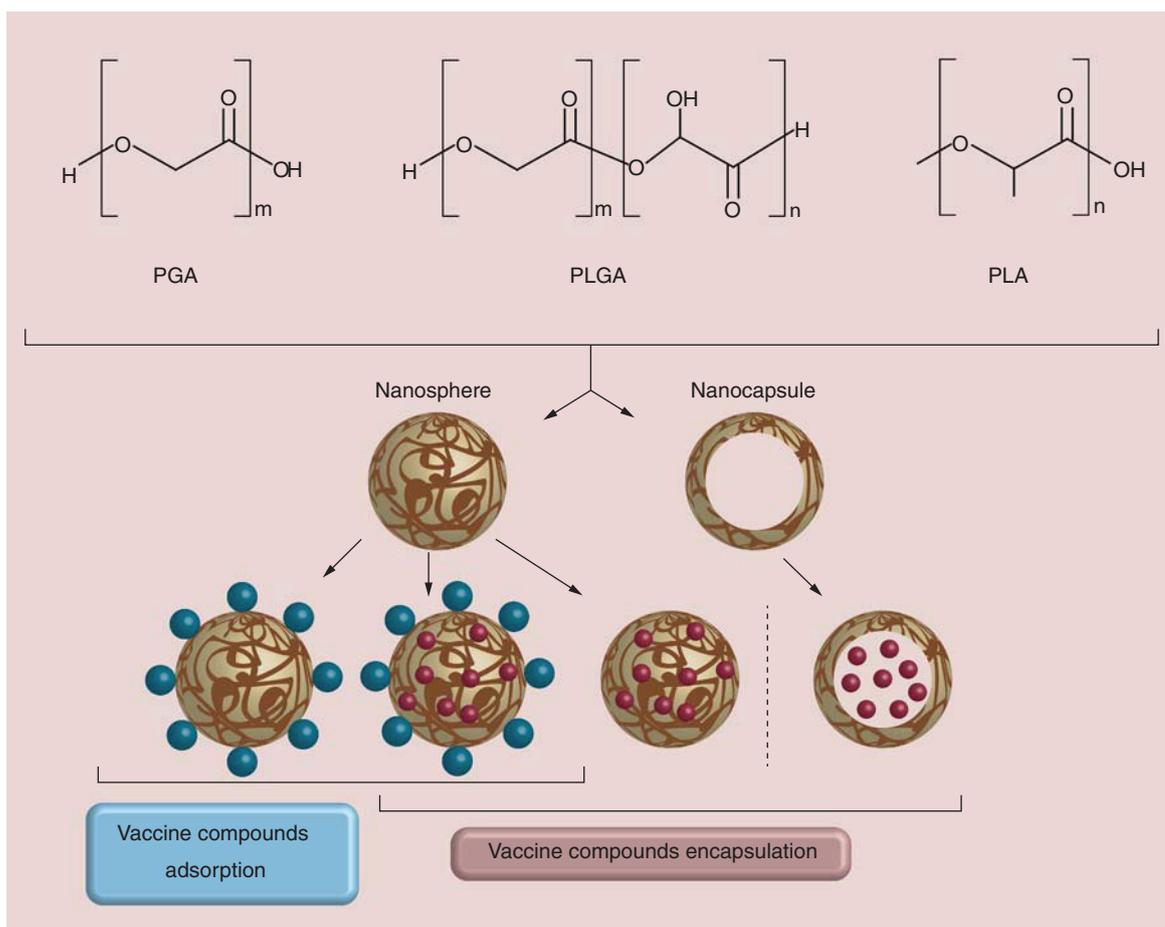
vent evaporation methods, emulsion-solvent diffusion using a partially water-miscible solvent less toxic than dichloromethane, such as ethyl acetate, can be used instead. The main drawback of these two methods is the required use of surfactant to stabilize emulsions, often leading to the requirement to remove their excess for further *in vitro* or *in vivo* trials.

As peptide or nucleic acid antigens are generally highly water soluble, the former methods often lead to poor yield as the drug becomes deposited on the particle surface and in the polymer matrix during the process, and rapidly diffuses into the aqueous phase.

Therefore the encapsulation of such compounds becomes quite challenging. Indeed, their successful encapsulation, as for hydrophobic drug encapsulation, requires high drug loading in the NPs/MPs, predictable release of the drug compound from the particle and most of all requires the prevention of protein degradation during the encapsulation process. Currently, the most common technique used for the encapsula-

tion of water-soluble vaccine antigens in PLA/PLGA particles is the double emulsification solvent evaporation [24,25]. An aqueous phase containing the drug is added to an organic phase composed of PLGA or PLA in DCM with vigorous stirring to create the water-in-oil emulsion. The w/o/w emulsion is created by adding the previous w/o emulsion into a large volume of water with an emulsifier to stabilize the emulsified polyvinyl alcohol and create the w/o/w emulsion. The particles are obtained after the solvent has been removed by evaporation. As for o/w emulsion method, the disadvantage of w/o/w emulsion processes is the presence of emulsifiers which if not removed, lead to toxicity. Furthermore, this strategy requires high energy to create the emulsions, which can lead to the denaturation of the protein antigen, the use of surfactants and the poor drug loading into particles.

One of the disadvantages of all of these encapsulation techniques is the poor encapsulation efficiencies of drugs and the initial rapid release of drug (burst effect)



**Figure 2. Illustrative representation of the architecture of different nanostructured poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) particles.** These include nanospheres, in which the molecule is dissolved, adsorbed or dispersed throughout the matrix, attached to the surface or attached to the polymer matrix; nanocapsules, in which the molecule is in solution and surrounded by a shell-like wall.

PGA: Poly(glycolic acid); PLA: Poly(lactic acid); PLGA: Poly(lactic-co-glycolic acid).

due to the diffusion of the drug present at the interface of particles after dilution into media.

An alternative strategy for the efficient presentation of protein on particles is adsorption onto the surface of 'empty particles.' With this strategy, all the methods previously described to encapsulate hydrophobic drugs can be used to prepare the particles of the desired size and with the appropriate surface charge for the adsorption of protein antigen.

Many studies have also been conducted to obtain particle formulation that could be sterile filtered, lyophilized and resuspended to the initial size with excipients appropriate for use as a vaccine formulation [26,27].

In brief, molecules of interest (e.g., vaccine antigens and immunostimulant molecules) can be incorporated into the particles during the particle production (encapsulation) or adsorbed/chemically bound after their production. These methods are dependent on the hydrophobic/hydrophilic nature of the active drug (Ag or ligand). In the event of a hydrophobic Ag, it will be encapsulated within the polymer matrix during the formation of particles following methods precipitation/evaporation of solvent, emulsion (o/w). In the event of a hydrophilic Ag, the double emulsion (w/o/w) is used to encapsulate in the core of particles. Finally, the adsorption of hydrophilic Ag (or ligands) on the particles surface is one possible approach.

### PLA/PLGA particles as vaccine antigen carrier systems

Most licensed vaccines rely on multiple dose immunization schedules which can be difficult and costly to achieve. In such a scenario, biodegradable polymer particle based vaccine delivery systems provide a viable alternative to single-dose vaccines [28]. In particular, PLA and PLGA polymers have been used successfully in preclinical studies as vaccine delivery systems for many years and are particularly well-suited to vaccine design because of their known adjuvant activity [6,29,30].

Already used in many medical devices (drug delivery implants, suture material and microspheres) [31,32], these biodegradable polymers are probably the most studied materials for parenteral and mucosal antigen delivery. The initial motivation for using PLA/PLGA particles for antigen delivery came from the desire to reduce the number of repeated administrations required for long-term protection, through prolonged antigen release [33]. Another important advantage would be the reduction in mass vaccination costs.

As PLA/PLGA particles are efficiently phagocytosed by APCs *in vitro* and *in vivo* [17,34,35] they have been studied mainly for the delivery of antigens to DCs and macrophages aiming at inducing CTL responses.

Despite the encouraging immunological performances of PLA/PLGA-based MPs and NPs, the harsh conditions such as organic solvent/water interfaces, shear or cavitation forces, excessive heat, freezing and drying involved in the encapsulation methods often causes significant aggregation or degradation of vaccine antigens [30,36–38]. Moreover, the degradation of the polymers generates acidic monomers and acidification of the inner polymer environment can cause protein degradation and consequent loss of tertiary structure, which is a central issue in the development of these devices for drug delivery [36,39,40]. These problems have been partially solved by optimized manufacturing methods [41,42] or addition of stabilizing agents such as Mg(OH)<sub>2</sub>, other proteins, surfactants or sugars [43–46].

To address the limitations of antigen encapsulation, another strategy based on surface adsorption of antigens on PLA/PLGA particles was developed to avoid exposure of the proteins to organic solvents and shear forces during the emulsification step [47,48]. Mechanistic studies determined that protein adsorption on PLA/PLGA surface is driven by electrostatic and hydrophobic interactions [48,49]. Therefore, adsorption of the proteins can be optimized by modulating ionic strength and pH. However, surface adsorption of antigen does not allow controlled release of antigen for single immunization vaccines; PLA/PLGA particles are instead used as an adjuvant for particulate delivery of antigen to the immune cells similar to alum, but the ease of encapsulating or adsorbing single or multiple antigens or ligands in PLA/PLGA particles (compared with alum) explains the renewed interest in vaccine approaches using these particulate systems [40].

In the last 10 years, micro and nanoparticles have been used mainly to carry vaccine antigens for parenteral administration (subcutaneous, intradermal and intramuscular). Major efforts are being made to develop new mucosal candidate vaccines by selecting appropriate antigen delivery systems with high immunogenicity, designing new mucosal routes of administration and selecting immune-stimulatory adjuvant molecules. The versatility for delivery of PLA/PLGA NPs has led to their study as potential vaccine delivery systems for mucosal administration [11,50]. Indeed, it has been shown that these particles were able to carry antigens to microfold cells (M cells) at the surface of Peyer's patches into the intestinal mucosa, leading to their uptake and delivery to mucosal APCs making them efficient antigen carrier systems for mucosal immunization [35].

### Immune responses to PLA/PLGA carried antigens

Many different antigens encapsulated or adsorbed on PLA/PLGA particles have been shown to induce broad

and potent humoral immune responses (Table 1). The majority of published pre-clinical studies are on tetanus toxoid (TT) or focused on more model antigens such as ovalbumin (OVA) and bovine serum albumin (BSA). Other antigens of interest were of bacterial origin: *Escherichia coli* detached fimbriae, pertussis toxoid, diphtheria toxoid (DT), subunit antigens from *Haemophilus influenzae* type B, *Yersinia pestis* and *Mycobacterium tuberculosis*; viral origin: subunit antigens from human and simian immunodeficiency virus (HIV, SIV), hepatitis B virus surface antigen (HBsAg), influenza A virus, measles virus, parainfluenza virus, respiratory syncytial virus; and parasitological origin: subunit antigens from *Plasmodium* species (malaria) and *Leishmania*.

TT represents one of the most frequently used microencapsulated antigen for parenteral or mucosal immunization and in most preclinical studies, a single injection of TT-loaded particles induced high Ab titers maintained over several months, generally up to 1 year or more [51,52,56,57]. Encapsulated toxoid induced low but continuous levels of neutralizing Abs (NABs), whereas those obtained with the control alum-TT decreased after reaching the maximum level at 14 weeks. Moreover, the administration of a mixture of encapsulated and adsorbed TT led to significantly higher and more prolonged NAB levels than those measured for the adsorbed toxoid. Analysis of the Ab isotypes revealed dominance of IgG1 (pro-Th2) over IgG2a (pro-Th1); this pattern was consistent with that observed in the group injected with alum-TT.

A study performed by Saini *et al.* aimed to compare the humoral and cell-mediated immune responses between recombinant HBsAg adsorbed PLA MPs vaccine (single shot) and alum-HBsAg vaccine (two doses) [54]. Specific humoral immune responses (IgM and IgG) and cell-mediated immune responses were determined. Based on these findings, it was concluded that a single injection (using the subcutaneous route – sc.) of the polymeric MPs produced a better immune response (both humoral and cell mediated) than two injections of a conventional alum-HBsAg vaccine, in the mouse model. These data demonstrate the high potential of polymeric MPs for their use as a carrier adjuvant for hepatitis B vaccine.

The rabbit model was used in a quantitative and qualitative comparison of the Ab responses induced by PLA NPs or by the emulsion adjuvant MF59 using three HIV-1 antigens: p24gag, wild-type (WT) Tat and a mutated, detoxified form of Tat [10]. All antigen and adjuvants led to the induction of similar level of IgG titers in sera when injected by subcutaneous route. The p24 antigen, but not Tat, also induced fecal IgG in rabbits when formulated with PLA particles or MF59. The nature of the adjuvant had consequences on the

spectrum of specificity induced, depending on the antigen: PLA adjuvant focused the anti-p24 response to an immunodominant domain when compared with MF59. With WT Tat, no difference between adjuvants was observed in the spectrum of specificity induced. However, detoxified Tat coated on PLA NPs increased the number of epitopes recognized by serum IgG compared with MF59. The impact of these qualitative differences depending on the antigen/adjuvant associations is important to take into account for further designs of vaccine formulation using particulate adjuvants.

In summary, for the antigens studied, strong Ab responses were observed after a single administration. Responses were frequently comparable to that elicited by gold-standard formulations, such as antigen in alum, MF59 or Freund's adjuvant, given once or twice [10,17,58–60]. Thus, the particle preparations proved to be highly suitable for a large variety of antigens, derived from various sources and having very different structural features. Besides inducing strong and functional humoral immune responses, PLA/PLGA particles are of particular interest in releasing antigens over extended periods of time and thereby providing prolonged stimulation of the immune system.

Whereas specific Abs appear necessary to block pathogen invasion, specific cellular immune responses are important for the control of virus replication and viral load after infection, and also for therapeutic cancer vaccines. Particulate vaccines are recognized as extracellular antigens and are taken up by APCs by one of the endocytic mechanisms – receptor-dependent or receptor-independent endocytosis – and placed into a membrane-delimited compartment of the endocytic pathway [61]. This compartment undergoes a series of modifications and finally fuses with lysosomes or MHC class II compartments leading to peptide presentation to antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells but no CD8<sup>+</sup> T cells. Hence, it appears that particulate formulations alone are poor inductors of CTL responses. To improve immune responses, the use of additional stimuli, such as pattern recognition receptors (PRRs) ligands, appears to be crucial; in particular to induce cross-presentation of extracellular Ags to CD8<sup>+</sup> T cells [62].

### Potentiating the immune response with PLA/PLGA particles carrying pattern recognition receptor ligands

Most successful vaccines induce persistent Ab responses that can last a lifetime. The mechanisms involved remain unclear, but emerging evidence indicates that they activate immune cells (especially DCs) via PRRs including Toll-like receptors (TLRs),

**Table 1. Examples of studies demonstrating that carrying of antigens by poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) particles potentiate specific immune responses *in vivo*.**

Nanocarrier	Antigen	Model/ immunization route	Immune response	Ref.
PLA or PLGA micro- or nanoparticles	Encapsulated TT	Wistar rats/im.	– Particles encapsulating TT elicited higher anti-TT Ab titers than TT alone – Titers persisted for more than 5 months	[51]
PLGA NPs	Encapsulated TT and QS	Rabbits/in.	– The serum IgG titer induced with PLGA(TT) was higher than TT solution – IgG titers induced with PLGA(TT + QS) was higher than PLGA(TT)	[52]
PLA or PLGA MPs	Encapsulated DT	Guinea pig/sc.	– PLGA(DT) made with the relatively hydrophilic PLGA 50:50 exhibited specific and sustained Ab responses over 40 weeks, comparable with the responses to alum(DT)	[53]
PLA MPs	Adsorbed HBsAg	Mouse/sc.	– A single injection of the PLA-HBsAg produced better immune response (both humoral and cellular) than two injections of a conventional alum-HBsAg vaccine	[54]
PLA or PLGA NPs	Adsorbed HBsAg	Rat/pulmonary delivery	– Hydrophobic particles >500 nm elicited a more robust increase in secretory IgA, IL-2 and IFN- $\gamma$ levels compared with hydrophilic particles <500 nm	[55]
PLA NPs	Adsorbed HIV-1 antigens: p24gag, WT Tat and a mutated, detoxified form of Tat	Rabbit/sc.	– PLA NPs and MF59 <sup>®</sup> (Novartis, Basel, Switzerland) adjuvant led to the induction of similar level of IgG titers – PLA adjuvant focused the anti-p24 response to an immunodominant domain when compared with MF59	[10] [10]
PLA NPs	Adsorbed HIV-1 p24	Mouse/sc.	– After boosting PLA-p24 induced significantly higher IgG titers compared with the gold standard alum-p24	[17]
PLA NPs	Adsorbed HIV-1 p24	Macaque, rabbit, mouse/sc.	– PLA-p24 induced high Ab titers (>10 <sup>6</sup> ) in mice, rabbits and macaques – PLA-p24 elicited strong CTL responses and a Th1-biased cytokine release in mice – p24 protein generates a more Th1-oriented response when coated onto PLA NPs than adjuvanted with Freund's adjuvant – The ability of PLA-p24 particles to induce Th1 responses was confirmed in the macaque model	[16]

Ab: Antibody; Alum: Aluminium salts; CTL: Cytotoxic CD8<sup>+</sup> T lymphocytes; DT: Diphtheria toxoid; HBsAg: Hepatitis B virus surface antigen; im.: Intramuscular; in.: intranasal; MP: Microparticle; NP: Nanoparticle; PLA: Poly(lactic acid); PLGA: Poly(lactic-co-glycolic acid); QS: Quillaja saponins; sc.: subcutaneous; TT: Tetanus toxoid; WT: Wild-type.

NOD-like receptors (NLRs), C-type lectin receptors (CLRs) and RIG-I-like receptors (RLRs) [63,64]. Triggering specific combinations of PRRs in DCs can induce synergistic production of cytokines, which can result in enhanced T-cell responses (Th1, Th2 and Th17) [65–67] and/or reversal of the immunosuppressive action of regulatory T cells (T<sub>reg</sub>) [68–70]. The inclu-

sion of such adjuvants within vaccines can enhance vaccine-induced protection by providing strong and long-term immune responses, broadening protection or providing cross-protection against related pathogens, improving immune responses in poorly responsive populations and potentially reducing the amount of antigen required. Reducing the dose enables an

increase in the manufacturing capacity and offers a potential for greater distribution of the given vaccine. This section describes the potential of targeting PRRs by PLA/PLGA particulate vectors to promote immune responses and outlines the progress being made toward the development of PRR-based adjuvants for use in clinical-grade vaccines (Figure 3).

A number of studies addressing this question have been performed *in vitro* and *in vivo*. As an example, Heit *et al.* determined *in vitro* that full maturation and cytokine secretion by APCs as well as cross-presentation of antigen were enhanced when coencapsulation into PLGA particles of antigen with TLR7 and 9 ligands was used [71]. Wischke *et al.*, as well as our group, recently showed that PLGA microencapsulated (~5 µm) or PLA nanoencapsulated (~200 nm) NOD ligands (respectively) induce an *in vitro* maturation of human monocyte-derived DCs to a proinflammatory phenotype with high levels of released cytokines compared with the soluble ligands [17,72].

Moreover, *in vivo* studies have been performed in different animal models in order to improve humoral and/or cellular immune responses (Table 2). In a study from Demento *et al.* [73], PLGA NPs loaded with recombinant West Nile virus envelope protein and surface modified with CpG ODN (TLR9 ligand) were used to immunize mice subcutaneously. The animals showed robust humoral responses polarized toward Th1 immune responses compared with predominately Th2-biased responses with the alum adjuvant. Immunizations with PLGA-CpG ODN resulted in a greater number of circulating effector T cells and greater activity of antigen-specific lymphocytes than unmodified NPs or alum. Last, compared with alum, this system offered superior protection in a mouse model of West Nile virus encephalitis.

PLGA NPs containing poly(I:C) or CpG ODN together with OVA have also been studied for the induction of CTL responses in a cancer vaccine study [75]. Immunization of mice (intravenous) with the PLGA(poly(I:C)) or (CpG ODN) together with OVA elicited potent OVA-specific CTL activity compared with particles containing OVA only. In accordance with these results, those formulations exerted potent antitumor activity in mice that were subcutaneously implanted with EG7.OVA tumor cells. These results show that encapsulation of poly(I:C) or CpG ODN together with antigen in biodegradable PLGA NPs is an effective approach for the induction of potent antigen-specific CTL responses *in vivo*.

In addition to improving parenteral immunizations, PLA/PLGA particles carrying PRR ligands have also been studied for the purpose of improving mucosal vaccine administration. Zhu *et al.* designed PLGA par-

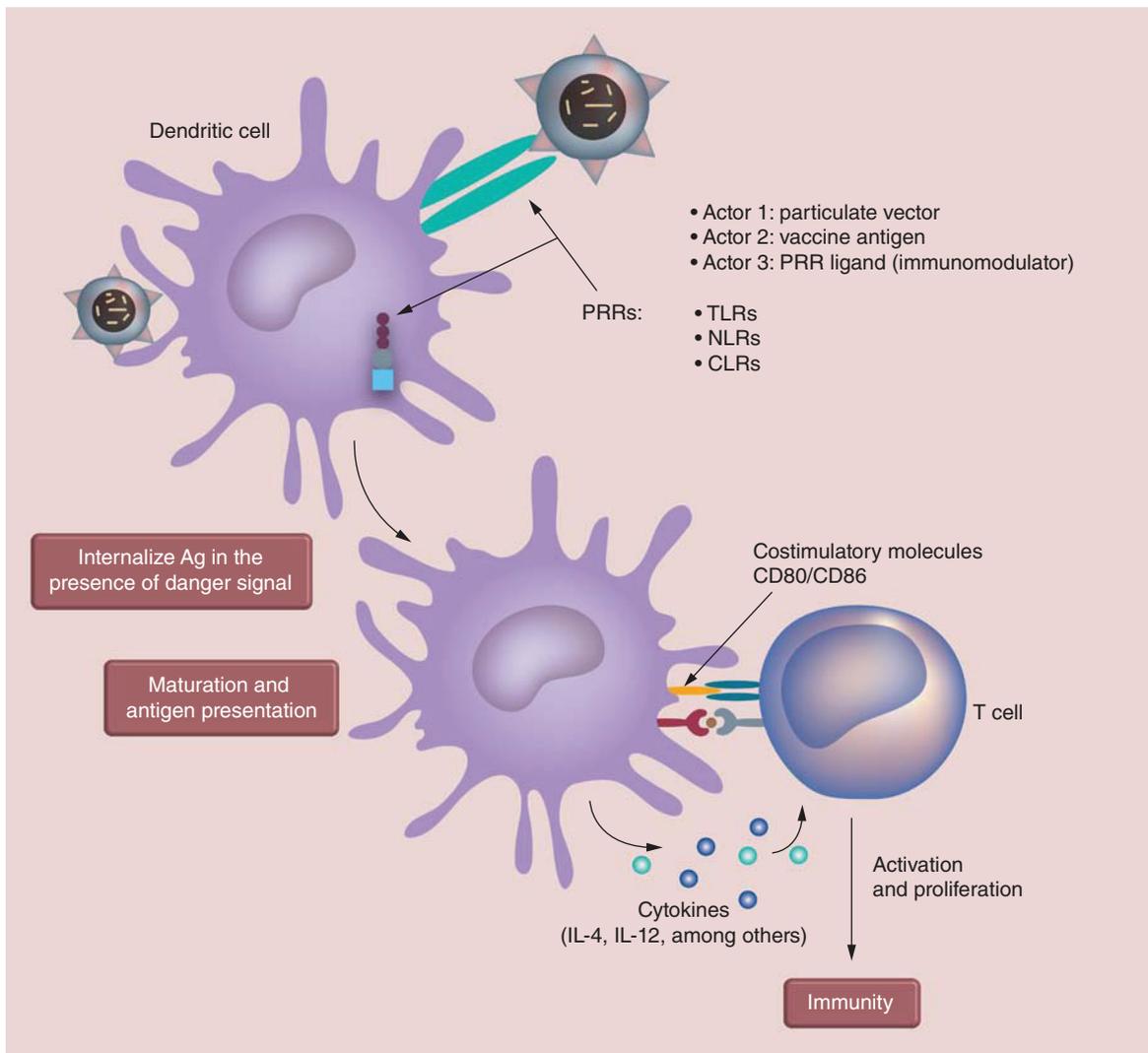
ticles carrying PRR ligands and able to target the large intestine after oral delivery in the mouse model [11]. The particles were coated with methacrylate-based polymer Eudragit FS30D to bypass the harmful effects of digestive low pH and enzymatic destruction and to selectively deliver the particles to the lower GI tract. The PLGA particles containing the ligands macrophage-activating lipoprotein (MALP-2) for TLR2, polyinosine-polycytidylic acid (poly(I:C)) for TLR3 and the CpG ODN for TLR9, were able to induce colorectal immunity and protected against rectal or vaginal viral challenge with the vaccinia virus vPE-16, which expresses the HIV Env epitope used in the peptide vaccine.

However, despite the fact that numerous studies have used codelivery systems (antigen and PRR ligand(s) in the same particle), others have shown that coadministration (antigen and PRR ligand(s) in different particles) has equivalent and even better effect. In this manner, Kazzaz *et al.* [76] observed that codelivery of HIV-1 gp120 and MPLA (TLR4 ligand) or RC529 (synthetic form of MPLA) encapsulated within the same particle and coadministration of PLGA(gp120) and PLGA(MPLA) (or RC529) within different particles have an equivalent immune potency for specific-IgG and IgG2a production in mice.

More recently and consistent with previous observations [76,77], Kasturi *et al.* showed, in their supplementary data, that coadministration of PLGA(OVA) and PLGA(MPLA+R837(TLR7)) induced stronger IgG2c and IgG1 production than codelivery of PLGA(OVA+MPLA+R837) after subcutaneous administration in the mouse model [15]. Moreover, PLGA(OVA) plus PLGA(MPLA+R837) induced synergistic increases in antigen-specific, NABs compared with immunization with NPs containing antigens plus a single TLR ligand. In addition to OVA, they also used the protective antigen (PA) from *Bacillus anthracis* and hemagglutinin (HA) from avian influenza H5N1 virus. As observed with OVA, there was a synergistic enhancement in the antigen-specific Ab responses after immunization with PLGA(MPLA+R837) plus PLGA(PA) or PLGA(HA). These responses completely protected mice against lethal avian and swine influenza virus strains, and induced robust immunity against pandemic H1N1 influenza in rhesus macaques.

Data supporting the idea that antigen and PRR ligand(s) can be delivered on separate particles have also been observed recently using ultrasmall Pluronic-stabilized poly(propylene sulfide) [78] or PLGA [79].

Despite all these observations, questions still remain concerning the codelivery or the coadministration strategies. This warrants further consideration and needs intensive investigations but probably depends



**Figure 3. Potentiating the immune response with poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) particles carrying pattern recognition receptor ligands.** The actual concept comprises target dendritic cells with immunostimulant molecules and vaccine antigen carried by a poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) particulate vector to trigger specific immune responses against the corresponding pathogen.

CLR: C-type lectin receptor; NLR: NOD-like receptor; PRR: Pattern recognition receptor; TLR: Toll-like receptor.

on the type of particle system, antigen, administration route and of course the immunostimulatory molecule(s) used.

### Strategies to improve cell & tissue targeting by PLA/PLGA particles

As discussed above, DCs are a key component in the induction of strong and long-lasting immune responses toward specific antigens. Being able to specifically deliver antigens and/or immunostimulant molecules to those cells by PLA or PLGA particles is a popular strategy [80–82]. However this delivery could be further improved by the presence of ligands included on the surface of particles to target specific tissues or cell surface antigens and reduce nonspecific distribu-

tion. In this context a large number of ligands are currently being assessed including proteins, peptides, Abs, polysaccharides, glycolipids, glycoproteins and lectins [8].

The use of lectins capable of targeting CLRs is a very attractive strategy to enhance the efficacy of vaccines. These molecules are highly specific internalization receptors that facilitate antigen uptake, processing and loading on MHC class I and II molecules leading to antigen presentation toward Th1 or Th2 orientation [83].

This was the objective of the recent study from Gupta *et al.* who used DT- and TT-encapsulated PLA particles with adsorbed soybean agglutinin (SBagg) lectins that resulted in a better association of polymer

particles with DCs [84]. In the mouse model, immunizations (im.) with PLA-SBagg-antigens elicited a stronger Ab response than with plain particles entrapping antigens (also higher than alum adsorbed antigens). The improved immunogenicity of PLA-SBagg-antigens was attributed to the N-linked glycan-mediated targeting of polymer particles to DCs. Other *in vivo* studies using varied particulate vectors demonstrated how CLR targeting can be employed for cell-specific antigen delivery and can result in enhanced humoral and cellular immune responses [85–88].

Several studies have also demonstrated the successful use of antilectin antibody-grafted nanoparticles to increase the uptake of these carriers by DCs. As an example, Cruz *et al.* tested various Abs recognizing the DC-specific receptor DC-SIGN (type II CLR) to study the effects of PEG copolymer shielding and

Ab type on antibody–receptor interactions [89]. While they found that shielding can lessen the efficacy of the targeted delivery through Abs, they also showed that particles with a coat of Abs targeting the carbohydrate recognition domain of the DC-SIGN were more efficiently taken up by DCs than those targeting the receptor’s neck domain. However both formulations bound selectively to DCs and were able to induce a stronger cytokine production toward Th1 than Th2.

Mannosylation of particles is also a promising strategy to selectively target vaccine antigens to the mannose receptor expressed on DCs. PLGA NPs decorated with mannan (*Saccharomyces cerevisiae*), are able to simultaneously enhance antigen-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses compared with nondecorated NPs [90]. Mannose-PEG(3)-NH(2) grafting can also

**Table 2.** Examples of studies demonstrating that carrying of antigens and pattern recognition receptor ligands by poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) particles potentiate specific immune responses *in vivo*.

Nanocarrier	Antigen/immunostimulant molecule(s)	Model/immunization route	Immune response	Ref.
PLGA NPs	Adsorbed rWNVE and CpG ODN (TLR9 ligand)	Mouse/sc.	– Humoral responses polarized toward Th1 responses compared with predominately Th2-biased responses with alum adjuvant – Compared with alum, this system offered superior protection against WN virus encephalitis	[73]
PLGA NPs	– Adsorbed HA or OVA  – Encapsulated MPLA (TLR4) and/or R837 (TLR7)	Mouse, rhesus macaques/sc.	– PLGA(MPLA+R837) + PLGA(Ag) induces synergistic increases in NABs compared with immunization with NPs containing Ags + a single ligand – Immunization protected completely against lethal influenza virus strains in mice – Induced robust immunity against pandemic H1N1 influenza in macaques	[15]
PLGA NPs	Encapsulated PeptAg/ MALP-2 (TLR2), poly(I:C) (TLR3) and CpG ODN (TLR9)	Mouse/oral	– Colorectal immunity – Protection against rectal or vaginal viral challenge	[11]
PLA NPs	– Adsorbed HIV-1 p24 – Encapsulated NOD1/NOD2 ligands	Mouse/sc.	– Encapsulated NOD1/2 ligands increased anti-p24 IgG responses up to 100-times compared with the free ligands, alum-p24 or PLA-p24 alone	[17]
PLGA NPs	Encapsulated HBcAg + MPLA (TLR4)	Mouse/sc.	– PLGA(MPLA+HBcAg) induced a stronger Th1 cellular immune response than HBcAg alone or PLGA(HBcAg)	[74]
PLGA NPs	Encapsulated OVA + poly(I:C) or CpG ODN	Mouse/iv.	– PLGA(OVA+poly(I:C) or CpG ODN) elicited potent specific CTL activity compared with PLGA(OVA) – PLGA(OVA+poly(I:C) or CpG ODN) exerted potent antitumor activity in mice	[75]

Ag: Antigen; CpG ODN: CpG oligodeoxynucleotides; CTL: Cytotoxic CD8<sup>+</sup> T lymphocytes; HA: Hemagglutinin; HBcAg: Hepatitis B virus core antigen; iv.: intravenous; MPLA: Monophosphoryl lipid A; NP: Nanoparticle; OVA: Ovalbumin; PLA: Poly(lactic acid); PLGA: Poly(lactic-co-glycolic acid); poly(I:C): Polyinosinic-polycytidylic acid; rWNVE: West Nile virus envelope protein; sc.: subcutaneous; WN: West Nile.

enhance the uptake of PLGA MS, with a variable relative contribution of specific and nonspecific uptake mechanism [91].

While targeting DCs during parenteral administrations has shown to be effective, to achieve such a goal by mucosal administration (e.g., enteral or nasal route), seems to be more complex [92].

The ability of M cells to take up and transcytose diverse numbers of microorganisms to APCs have made M cells an ideal target for vaccine delivery to the mucosal immune system [93]. Those cells are found in the follicle-associated epithelium of the Peyer's patches as well as in nasopharyngeal-associated lymphoid tissue (NALT) and bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) [94]. It has been shown that the lectins *Ulex europaeus* 1 (UEA-1) and the *Lotus tetragonolobus* agglutinin (LTA) are able to selectively bind to  $\alpha$ -L-fucose targets on mouse M cells and are rapidly endocytosed and transported to M cell basolateral membranes. Therefore, oral administration (mouse model) of UEA-1 or LTA grafted PLGA NPs encapsulating HBsAg result in higher mucosal and systemic responses compared with uncoated NPs [58,95]. However, UEA-1 selectively binds to mouse M cells but not human [96].

New PLGA formulations were then developed to target the  $\beta$ 1 integrins expressed at the apical side of human M cells [97,98] via an RGD peptide that enhances the transport of those particles by 3.5-fold compared with particles without RGD peptides [99]. *In vivo* studies showed these NPs concentrate in Peyer's patches and were able to induce the production of specific IgG. Other M cell homing peptide (CKS9) or Abs (CA19.9) have also been studied [93,100].

Promising outcomes have been achieved with particle-based vaccine targeting M cells through mucosal administration. By applying the knowledge gained from studies on DC particle targeting, further major advances should arise in the field of mucosal vaccines. The dual targeting of M cells and DCs with codelivery or coadministration of immunostimulants seems to be a promising approach.

Vaccination strategy not only benefits from major advances in antigen/ligand formulation and administration, but also a better comprehension of the relationship between modulating particle physical properties and immune cells uptake. It has been established that rendering PLGA nanoparticles mucoadherent, by shifting their charge to positive through glycol-chitosan coating, induces higher systemic and mucosal immune response after nasal immunization in mice than the naked PLGA counterpart, presumably linked to their higher bioavailability due to a lower clearance [101].

It has also been demonstrated that modulating the size of the particles can influence the immune

response outcome [102–105]. Using PLGA particles sized at 300 nm, 1  $\mu$ m, 7  $\mu$ m and 17  $\mu$ m formulated with OVA and CpG ODN in *in vitro* and *in vivo* studies, it has been observed that 300 nm sized particles were the most efficiently taken up by DCs leading to efficient antigen delivery and DC activation, compared with bigger particles [106]. The systemic antigen-specific immune response to vaccination was also measured in mice. PLGA particles sized 300 nm generated the highest antigen-specific cytotoxic T-cell responses. These mice also showed the highest antigen-specific IgG2a:IgG1 ratio. This study suggests that the smaller the PLGA particle used to deliver antigen and adjuvants the stronger the antigen-specific cytotoxic T-cell response generated.

However this study did not establish the lower size limit for efficient uptake. Will 50 nm particles be more efficient than those of 300 nm?

### Conclusion & future perspective

Over the last couple of decades, many groups have contributed to the development of PLA/PLGA controlled release NPs and MPs for antigens delivery to compensate their poor immunogenicity. These particle-based vaccines are now well established for their ability to provide persistent levels of Abs and to exhibit immunological memory. For designing new vaccines against viral infections and cancers, or intracellular pathogens, several strategies have been employed, from inclusion of different immunostimulatory molecules (essentially PRR ligands) to specific targeting of PLA/PLGA particles to APCs. This has led to the induction of both humoral and cellular immune responses, in animal models ranging from rodents to nonhuman primates. The induction of both types of responses may be a prerequisite for future vaccination strategies based on these eco-compatible polymers. It is also worth noting both, their potential interest and drawbacks toward alternative delivery systems already on the market, such as virosomes, emulsions or aluminum salts. Indeed, PLA/PLGA particles have a very short history in clinical studies and in some cases, sophisticated design of vaccine formulations associated to complex regulatory requirements could be major limitations for their development as vaccine delivery systems for human use. It is therefore essential that further research on such multifunctional vaccine delivery platform addresses these questions to be envisioned as a viable alternative method for vaccine delivery.

First, the chemistry behind particle synthesis should be kept scalable, with simple design that will not impair cost, reproducibility and safety issues. Second, the choice of immunostimulatory molecules should be focused on well-studied candidates, with strong preclin-

ical data, as prototype PRR ligands could have varied effects, depending on dose and route of administration, among others. Last, more basic science is required to decipher the mechanisms of particle uptake by APCs, transport to the lymphoid system, biodistribution and degradation of particles in the organism. In this respect, the particle formulation process facilitates the labeling of PLA/PLGA particles with different probes (such as fluorescent or radioactive probes). These labeled particles will constitute effective tools to understand the molecular basis of vaccine immunity through live imaging studies and to fine tune vaccine formulations through a back and forth scientific approach.

As illustrated in this review, the huge amount of preclinical data gathered with PLA/PLGA vaccine

platform provides strong hope that these particles will overcome the current challenges, potentially becoming key components among the vaccine armada of the future.

#### Financial & competing interests disclosure

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending or royalties.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

### Executive summary

#### Background

- The development of safe and effective vaccines for cancer and infectious diseases remains a major goal in global public health.
- One of the most important areas of research is the design of new generation of adjuvants.
- Particulate compounds including poly(lactic acid) (PLA) and poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nano- and micro-particles have been shown to possess significant potential as antigen and immunostimulant molecule delivery systems to antigen-presenting cells (APCs).

#### PLA & PLGA particles as versatile carrier platforms for vaccine delivery

- Ease of encapsulating or adsorbing single or combination of antigen and ligands in PLA/PLGA particles.
- Potential of targeting pattern recognition receptors by PLA/PLGA particulate vectors to promote immune responses and outline the progress being made toward the development of pattern recognition receptor-based adjuvants for use in clinical-grade vaccines.
- New selective targeting of PLA/PLGA particles to APCs has been successfully achieved, and elevated humoral and cellular immune responses have been attained in preclinical models.

#### Conclusion & future perspective

- Nanoparticles can be optimized to improve their uptake and immunogenicity; understanding the role of nanoparticle's immunoproperties is important to fine tune these materials before their use in vaccine formulations.
- Thorough characterization and standardized preparation methods are critical to create an accurate knowledge base about PLA/PLGA particulate vector effects on the immune system.
- More basic science is required to decipher the mechanism of particle uptake by APCs, transport to the lymphoid system, biodistribution and toxicity.

### References

- 1 Mckee AS, Munks MW, Marrack P. How do adjuvants work? Important considerations for new generation adjuvants. *Immunity* 27(5), 687–690 (2007).
- 2 Clapp T, Siebert P, Chen D, Jones Braun L. Vaccines with aluminum-containing adjuvants: optimizing vaccine efficacy and thermal stability. *J. Pharm. Sci.* 100(2), 388–401 (2011).
- 3 Reed SG, Orr MT, Fox CB. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat. Med.* 19(12), 1597–1608 (2013).
- 4 Kool M, Fierens K, Lambrecht BN. Alum adjuvant: some of the tricks of the oldest adjuvant. *J. Med. Microbiol.* 61(Pt 7), 927–934 (2012).
- 5 Leleux J, Roy K. Micro and nanoparticle-based delivery systems for vaccine immunotherapy: an immunological and materials perspective. *Adv. Healthc. Mater.* 2(1), 72–94 (2013).
- 6 De Temmerman ML, Rejman J, Demeester J, Irvine DJ, Gander B, De Smedt SC. Particulate vaccines: on the quest for optimal delivery and immune response. *Drug Discov. Today* 16(13–14), 569–582 (2011).
- 7 Athanasiou KA, Niederauer GG, Agrawal CM. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* 17(2), 93–102 (1996).
- 8 Silva JM, Videira M, Gaspar R, Preat V, Florindo HF. Immune system targeting by biodegradable nanoparticles for cancer vaccines. *J. Control. Release* 168(2), 179–199 (2013).
- 9 Lamalle-Bernard D, Munier S, Compagnon C et al. Coadsorption of HIV-1 p24 and gp120 proteins to surfactant-free anionic PLA nanoparticles preserves antigenicity and immunogenicity. *J. Control. Release* 115(1), 57–67 (2006).

- 10 Guillon C, Mayol K, Terrat C *et al.* Formulation of HIV-1 Tat and p24 antigens by PLA nanoparticles or MF59 impacts the breadth, but not the magnitude, of serum and faecal antibody responses in rabbits. *Vaccine* 25(43), 7491–7501 (2007).
- 11 Zhu Q, Talton J, Zhang G *et al.* Large intestine-targeted, nanoparticle-releasing oral vaccine to control genitoretal viral infection. *Nat. Med.* 18(8), 1291–1296 (2012).
- 12 Xu FH, Zhang Q. Recent advances in the preparation progress of protein/peptide drug loaded PLA/PLGA microspheres. *Yao Xue Xue Bao* 42(1), 1–7 (2007).
- 13 Wischke C, Schwendeman SP. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *Int. J. Pharm.* 364(2), 298–327 (2008).
- 14 Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55(3), 329–347 (2003).
- 15 Kasturi SP, Skountzou I, Albrecht RA *et al.* Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature* 470(7335), 543–547 (2011).
- 16 Ataman-Onal Y, Munier S, Ganee A *et al.* Surfactant-free anionic PLA nanoparticles coated with HIV-1 p24 protein induced enhanced cellular and humoral immune responses in various animal models. *J. Control. Release* 112(2), 175–185 (2006).
- 17 Pavot V, Rochereau N, Primard C *et al.* Encapsulation of Nod1 and Nod2 receptor ligands into poly(lactic acid) nanoparticles potentiates their immune properties. *J. Control. Release* 167(1), 60–67 (2013).
- 18 Cooper NR, Nemerow GR. The role of antibody and complement in the control of viral infections. *J. Invest. Dermatol.* 83(1 Suppl.), s121–s127 (1984).
- 19 Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* 55(1), R1–R4 (1989).
- 20 Legrand P, Lesieur S, Bochot A *et al.* Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. *Int. J. Pharm.* 344(1–2), 33–43 (2007).
- 21 Ibrahim H BC, Doelker E, Buri P, Gurny R. Aqueous nanodispersions prepared by a salting-out process. *Int. J. Pharm.* 87(1–3), 239–246 (1992).
- 22 Rivera PA, Martinez-Oharriz MC, Rubio M, Irache JM, Espuelas S. Fluconazole encapsulation in PLGA microspheres by spray-drying. *J. Microencapsul.* 21(2), 203–211 (2004).
- 23 Dinarvand R, Sepehri N, Manoochehri S, Rouhani H, Atyabi F. Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *Int. J. Nanomed.* 6, 877–895 (2011).
- 24 Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Preat V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J. Control. Release* 161(2), 505–522 (2012).
- 25 Johansen P, Men Y, Merkle HP, Gander B. Revisiting PLA/PLGA microspheres: an analysis of their potential in parenteral vaccination. *Eur. J. Pharm. Biopharm* 50(1), 129–146 (2000).
- 26 Wendorf J, Singh M, Chesko J *et al.* A practical approach to the use of nanoparticles for vaccine delivery. *J. Pharm. Sci.* 95(12), 2738–2750 (2006).
- 27 Holzer M, Vogel V, Mantele W, Schwartz D, Haase W, Langer K. Physico-chemical characterisation of PLGA nanoparticles after freeze-drying and storage. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72(2), 428–437 (2009).
- 28 Cleland JL. Single-administration vaccines: controlled-release technology to mimic repeated immunizations. *Trends Biotechnol.* 17(1), 25–29 (1999).
- 29 O'Hagan DT, Singh M. Microparticles as vaccine adjuvants and delivery systems. *Expert Rev. Vaccines* 2(2), 269–283 (2003).
- 30 Jiang W, Gupta RK, Deshpande MC, Schwendeman SP. Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57(3), 391–410 (2005).
- 31 Okada H, Toguchi H. Biodegradable microspheres in drug delivery. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 12(1), 1–99 (1995).
- 32 Putney SD, Burke PA. Improving protein therapeutics with sustained-release formulations. *Nat. Biotechnol.* 16(2), 153–157 (1998).
- 33 Aguado MT, Lambert PH. Controlled-release vaccines--biodegradable polylactide/polyglycolide (PL/PG) microspheres as antigen vehicles. *Immunobiology* 184(2–3), 113–125 (1992).
- 34 Newman KD, Elamanchili P, Kwon GS, Samuel J. Uptake of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres by antigen-presenting cells *in vivo*. *J. Biomed. Mater. Res.* 60(3), 480–486 (2002).
- 35 Primard C, Rochereau N, Luciani E *et al.* Traffic of poly(lactic acid) nanoparticulate vaccine vehicle from intestinal mucus to sub-epithelial immune competent cells. *Biomaterials* 31(23), 6060–6068 (2010).
- 36 Schwendeman SP. Recent advances in the stabilization of proteins encapsulated in injectable PLGA delivery systems. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 19(1), 73–98 (2002).
- 37 Jiang W, Schwendeman SP. Stabilization of tetanus toxoid encapsulated in PLGA microspheres. *Mol. Pharm.* 5(5), 808–817 (2008).
- 38 Johansen P, Men Y, Audran R, Corradin G, Merkle HP, Gander B. Improving stability and release kinetics of microencapsulated tetanus toxoid by co-encapsulation of additives. *Pharm. Res.* 15(7), 1103–1110 (1998).
- 39 Fu K, Pack DW, Klibanov AM, Langer R. Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres. *Pharm. Res.* 17(1), 100–106 (2000).
- 40 Jain S, O'Hagan DT, Singh M. The long-term potential of biodegradable poly(lactide-co-glycolide) microparticles as the next-generation vaccine adjuvant. *Expert Rev. Vaccines* 10(12), 1731–1742 (2011).
- 41 Almeida AJ, Alpar HO, Brown MR. Immune response to nasal delivery of antigenically intact tetanus toxoid

- associated with poly(L-lactic acid) microspheres in rats, rabbits and guinea-pigs. *J. Pharm. Pharmacol.* 45(3), 198–203 (1993).
- 42 Butler SM, Tracy MA, Tilton RD. Adsorption of serum albumin to thin films of poly(lactide-co-glycolide). *J. Control. Release* 58(3), 335–347 (1999).
- 43 Audran R, Men Y, Johansen P, Gander B, Corradin G. Enhanced immunogenicity of microencapsulated tetanus toxoid with stabilizing agents. *Pharm. Res.* 15(7), 1111–1116 (1998).
- 44 Zhu G, Schwendeman SP. Stabilization of proteins encapsulated in cylindrical poly(lactide-co-glycolide) implants: mechanism of stabilization by basic additives. *Pharm. Res.* 17(3), 351–357 (2000).
- 45 Zhu G, Mallery SR, Schwendeman SP. Stabilization of proteins encapsulated in injectable poly(lactide-co-glycolide). *Nat. Biotechnol.* 18(1), 52–57 (2000).
- 46 Jiang W, Schwendeman SP. Stabilization and controlled release of bovine serum albumin encapsulated in poly(D, L-lactide) and poly(ethylene glycol) microsphere blends. *Pharm. Res.* 18(6), 878–885 (2001).
- 47 Kazzaz J, Neidleman J, Singh M, Ott G, O'Hagan DT. Novel anionic microparticles are a potent adjuvant for the induction of cytotoxic T lymphocytes against recombinant p55 gag from HIV-1. *J. Control. Release* 67(2–3), 347–356 (2000).
- 48 Singh M, Kazzaz J, Ugozzoli M, Malyala P, Chesko J, O'Hagan DT. Polylactide-co-glycolide microparticles with surface adsorbed antigens as vaccine delivery systems. *Curr. Drug Deliv.* 3(1), 115–120 (2006).
- 49 Singh M, Chesko J, Kazzaz J *et al.* Adsorption of a novel recombinant glycoprotein from HIV (Env gp120dV2 SF162) to anionic PLG microparticles retains the structural integrity of the protein, whereas encapsulation in PLG microparticles does not. *Pharm. Res.* 21(12), 2148–2152 (2004).
- 50 Slutter B, Bal S, Keijzer C *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* 28(38), 6282–6291 (2010).
- 51 Raghuvanshi RS, Katare YK, Lalwani K, Ali MM, Singh O, Panda AK. Improved immune response from biodegradable polymer particles entrapping tetanus toxoid by use of different immunization protocol and adjuvants. *Int. J. Pharm.* 245(1–2), 109–121 (2002).
- 52 Mohaghegh M, Tafaghodi M. Dextran microspheres could enhance immune responses against PLGA nanospheres encapsulated with tetanus toxoid and Quillaja saponins after nasal immunization in rabbit. *Pharm. Dev. Technol.* 16(1), 36–43 (2011).
- 53 Johansen P, Moon L, Tamber H, Merkle HP, Gander B, Searcic D. Immunogenicity of single-dose diphtheria vaccines based on PLA/PLGA microspheres in guinea pigs. *Vaccine* 18(3–4), 209–215 (1999).
- 54 Saini V, Jain V, Sudheesh MS *et al.* Humoral and cell-mediated immune-responses after administration of a single-shot recombinant hepatitis B surface antigen vaccine formulated with cationic poly(l-lactide) microspheres. *J. Drug Target* 18(3), 212–222 (2010).
- 55 Thomas C, Rawat A, Hope-Weeks L, Ahsan F. Aerosolized PLA and PLGA nanoparticles enhance humoral, mucosal and cytokine responses to hepatitis B vaccine. *Mol. Pharm.* 8(2), 405–415 (2011).
- 56 Quintilio W, Takata CS, Sant'anna OA, Da Costa MH, Raw I. Evaluation of a diphtheria and tetanus PLGA microencapsulated vaccine formulation without stabilizers. *Curr. Drug Deliv.* 6(3), 297–204 (2009).
- 57 Tobio M, Schwendeman SP, Guo Y, McIver J, Langer R, Alonso MJ. Improved immunogenicity of a core-coated tetanus toxoid delivery system. *Vaccine* 18(7–8), 618–622 (1999).
- 58 Gupta PN, Khatri K, Goyal AK, Mishra N, Vyas SP. M-cell targeted biodegradable PLGA nanoparticles for oral immunization against hepatitis B. *J. Drug Target* 15(10), 701–713 (2007).
- 59 Demento SL, Cui W, Criscione JM *et al.* Role of sustained antigen release from nanoparticle vaccines in shaping the T cell memory phenotype. *Biomaterials* 33(19), 4957–4964 (2012).
- 60 Salvador A, Igartua M, Hernandez RM, Pedraz JL. An overview on the field of micro- and nanotechnologies for synthetic peptide-based vaccines. *J. Drug Deliv.* 2011, 181646 (2011).
- 61 Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell. Mol. life Sci.* 66(17), 2873–2896 (2009).
- 62 Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 12(8), 557–569 (2012).
- 63 Geddes K, Magalhaes JG, Girardin SE. Unleashing the therapeutic potential of NOD-like receptors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8(6), 465–479 (2009).
- 64 Duthie MS, Windish HP, Fox CB, Reed SG. Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. *Immunol. Rev.* 239(1), 178–196 (2011).
- 65 Timmermans K, Plantinga TS, Kox M *et al.* Blueprints of signaling interactions between pattern recognition receptors: implications for the design of vaccine adjuvants. *Clin. Vaccine Immunol.* 20(3), 427–432 (2013).
- 66 Napolitani G, Rinaldi A, Bertoni F, Sallusto F, Lanzavecchia A. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat. Immunol.* 6(8), 769–776 (2005).
- 67 Mount A, Koernig S, Silva A, Drane D, Maraskovsky E, Morelli AB. Combination of adjuvants: the future of vaccine design. *Expert Rev. Vaccines* 12(7), 733–746 (2013).
- 68 Dai J, Liu B, Li Z. Regulatory T cells and Toll-like receptors: what is the missing link? *Int. Immunopharmacol.* 9(5), 528–533 (2009).
- 69 Liu G, Zhang L, Zhao Y. Modulation of immune responses through direct activation of Toll-like receptors to T cells. *Clin. Exp. Immunol.* 160(2), 168–175 (2010).
- 70 Warger T, Osterloh P, Rechtsteiner G *et al.* Synergistic activation of dendritic cells by combined Toll-like receptor ligation induces superior CTL responses *in vivo*. *Blood* 108(2), 544–550 (2006).

- 71 Heit A, Schmitz F, Haas T, Busch DH, Wagner H. Antigen co-encapsulated with adjuvants efficiently drive protective T cell immunity. *Eur. J. Immunol.* 37(8), 2063–2074 (2007).
- 72 Wischke C, Mathew S, Roch T, Frentsch M, Lendlein A. Potential of NOD receptor ligands as immunomodulators in particulate vaccine carriers. *J. Control. Release* 164(3), 299–306 (2012).
- 73 Demento SL, Bonafe N, Cui W *et al.* TLR9-targeted biodegradable nanoparticles as immunization vectors protect against West Nile encephalitis. *J. Immunol.* 185(5), 2989–2997 (2010).
- 74 Chong CS, Cao M, Wong WW *et al.* Enhancement of T helper type 1 immune responses against hepatitis B virus core antigen by PLGA nanoparticle vaccine delivery. *J. Control. Release* 102(1), 85–99 (2005).
- 75 Lee YR, Lee YH, Kim KH, Im SA, Lee CK. Induction of potent antigen-specific cytotoxic T cell response by PLGA-nanoparticles containing antigen and TLR agonist. *Immune Netw.* 13(1), 30–33 (2013).
- 76 Kazzaz J, Singh M, Ugozzoli M, Chesko J, Soenawan E, O'Hagan DT. Encapsulation of the immune potentiators MPL and RC529 in PLG microparticles enhances their potency. *J. Control. Release* 110(3), 566–573 (2006).
- 77 Singh M, Chakrapani A, O'Hagan D. Nanoparticles and microparticles as vaccine-delivery systems. *Expert Rev. Vaccines* 6(5), 797–808 (2007).
- 78 De Titta A, Ballester M, Julier Z *et al.* Nanoparticle conjugation of CpG enhances adjuvancy for cellular immunity and memory recall at low dose. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 110(49), 19902–19907 (2013).
- 79 Ilyinskii PO, Roy CJ, O'Neil CP *et al.* Adjuvant-carrying synthetic vaccine particles augment the immune response to encapsulated antigen and exhibit strong local immune activation without inducing systemic cytokine release. *Vaccine* 32(24), 2882–2895 (2014).
- 80 Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56(11), 1649–1659 (2004).
- 81 Hu L ZY, Gao C. Influence of structures and properties of polymer nanoparticles on their cellular uptake and cell functions. *Prog. Chem.* 21, 1254–1267 (2009).
- 82 Lee YR, Lee YH, Im SA, Kim K, Lee CK. Formulation and characterization of antigen-loaded PLGA nanoparticles for efficient cross-priming of the antigen. *Immune Netw.* 11(3), 163–168 (2011).
- 83 Geijtenbeek TB, Gringhuis SI. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 9(7), 465–479 (2009).
- 84 Gupta RK, Goswami DG, Singh RR, Surolia A, Panda AK. Soybean agglutinin coated PLA particles entrapping candidate vaccines induces enhanced primary and sustained secondary antibody response from single point immunization. *Eur. J. Pharm. Sci.* 45(3), 282–295 (2012).
- 85 Ramakrishna V, Trembl JF, Vitale L *et al.* Mannose receptor targeting of tumor antigen pmel17 to human dendritic cells directs anti-melanoma T cell responses via multiple HLA molecules. *J. Immunol.* 172(5), 2845–2852 (2004).
- 86 He LZ, Crocker A, Lee J *et al.* Antigenic targeting of the human mannose receptor induces tumor immunity. *J. Immunol.* 178(10), 6259–6267 (2007).
- 87 Maglinao M, Eriksson M, Schlegel MK *et al.* A platform to screen for C-type lectin receptor-binding carbohydrates and their potential for cell-specific targeting and immune modulation. *J. Control. Release* 175, 36–42 (2014).
- 88 Lepenies B, Lee J, Sonkaria S. Targeting C-type lectin receptors with multivalent carbohydrate ligands. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65(9), 1271–1281 (2013).
- 89 Cruz LJ, Tacke PJ, Fokkink R, Figdor CG. The influence of PEG chain length and targeting moiety on antibody-mediated delivery of nanoparticle vaccines to human dendritic cells. *Biomaterials* 32(28), 6791–6803 (2011).
- 90 Hamdy S, Haddadi A, Shayeganpour A, Samuel J, Lavasanifar A. Activation of antigen-specific T cell-responses by mannan-decorated PLGA nanoparticles. *Pharm. Res.* 28(9), 2288–2301 (2011).
- 91 Brandhonneur N, Chevanne F, Vie V *et al.* Specific and non-specific phagocytosis of ligand-grafted PLGA microspheres by macrophages. *Eur. J. Pharm. Sci.* 36(4–5), 474–485 (2009).
- 92 Pavot V, Rochereau N, Genin C, Verrier B, Paul S. New insights in mucosal vaccine development. *Vaccine* 30(2), 142–154 (2012).
- 93 Azizi A, Kumar A, Diaz-Mitoma F, Mestecky J. Enhancing oral vaccine potency by targeting intestinal M cells. *PLoS Pathog.* 6(11), e1001147 (2010).
- 94 Gebert A, Pabst R. M cells at locations outside the gut. *Semin. Immunol.* 11(3), 165–170 (1999).
- 95 Mishra N, Tiwari S, Vaidya B, Agrawal GP, Vyas SP. Lectin anchored PLGA nanoparticles for oral mucosal immunization against hepatitis B. *J. Drug Target* 19(1), 67–78 (2011).
- 96 Clark MA, Jepson MA, Simmons NL, Hirst BH. Selective binding and transcytosis of *Ulex europaeus* 1 lectin by mouse Peyer's patch M-cells *in vivo*. *Cell Tissue Res.* 282(3), 455–461 (1995).
- 97 Gullberg E, Leonard M, Karlsson J *et al.* Expression of specific markers and particle transport in a new human intestinal M-cell model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279(3), 808–813 (2000).
- 98 Gullberg E, Keita AV, Salim SY *et al.* Identification of cell adhesion molecules in the human follicle-associated epithelium that improve nanoparticle uptake into the Peyer's patches. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319(2), 632–639 (2006).
- 99 Garinot M, Fievez V, Pourcelle V *et al.* PEGylated PLGA-based nanoparticles targeting M cells for oral vaccination. *J. Control. Release* 120(3), 195–204 (2007).
- 100 Jiang T, Singh B, Li HS *et al.* Targeted oral delivery of BmpB vaccine using porous PLGA microparticles coated with M cell homing peptide-coupled chitosan. *Biomaterials* 35(7), 2365–2373 (2014).
- 101 Pawar D, Mangal S, Goswami R, Jaganathan KS. Development and characterization of surface modified PLGA nanoparticles for nasal vaccine delivery: effect of mucoadhesive coating on antigen uptake and immune adjuvant activity. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85(3 Pt A), 550–559 (2013).

- 102 Audran R, Peter K, Dannull J *et al.* Encapsulation of peptides in biodegradable microspheres prolongs their MHC class-I presentation by dendritic cells and macrophages *in vitro*. *Vaccine* 21(11–12), 1250–1255 (2003).
- 103 Kanchan V, Panda AK. Interactions of antigen-loaded polylactide particles with macrophages and their correlation with the immune response. *Biomaterials* 28(35), 5344–5357 (2007).
- 104 Champion JA, Walker A, Mitragotri S. Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. *Pharm. Res.* 25(8), 1815–1821 (2008).
- 105 Petros RA, Desimone JM. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9(8), 615–627 (2010).
- 106 Joshi VB, Geary SM, Salem AK. Biodegradable particles as vaccine delivery systems: size matters. *AAPS J.* 15(1), 85–94 (2013).



## Cutting Edge: New Chimeric NOD2/TLR2 Adjuvant Drastically Increases Vaccine Immunogenicity

This information is current as of December 9, 2016.

Vincent Pavot, Nicolas Rochereau, Julien Rességuier, Alice Gutjahr, Christian Genin, Gerard Tiraby, Eric Perouzel, Thierry Lioux, Fabienne Vernejoul, Bernard Verrier and Stéphane Paul

*J Immunol* 2014; 193:5781-5785; Prepublished online 12 November 2014;  
doi: 10.4049/jimmunol.1402184  
<http://www.jimmunol.org/content/193/12/5781>

- 
- Supplementary Material** <http://www.jimmunol.org/content/suppl/2014/11/11/jimmunol.1402184.DCSupplemental.html>
- References** This article **cites 34 articles**, 15 of which you can access for free at: <http://www.jimmunol.org/content/193/12/5781.full#ref-list-1>
- Subscriptions** Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at: <http://jimmunol.org/subscriptions>
- Permissions** Submit copyright permission requests at: <http://www.aai.org/ji/copyright.html>
- Email Alerts** Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at: <http://jimmunol.org/cgi/alerts/etoc>



## Cutting Edge: New Chimeric NOD2/TLR2 Adjuvant Drastically Increases Vaccine Immunogenicity

Vincent Pavot,<sup>\*,†</sup> Nicolas Rochereau,<sup>†</sup> Julien Rességuier,<sup>\*</sup> Alice Gutjahr,<sup>\*,†,‡</sup> Christian Genin,<sup>†</sup> Gerard Tiraby,<sup>‡</sup> Eric Perouzel,<sup>‡</sup> Thierry Lioux,<sup>‡</sup> Fabienne Vernejoul,<sup>‡</sup> Bernard Verrier,<sup>\*</sup> and Stéphane Paul<sup>†</sup>

TLR ligands are critical activators of innate immunity and are being developed as vaccine adjuvants. However, their usefulness in conjunction with NOD-like receptor agonists remains poorly studied. In this study, we evaluated a new ligand that targets both TLR2 and NOD2 receptors. We assessed its ability to enhance dendritic cell maturation in vitro in addition to improving systemic and mucosal immune responses in mice. The chimeric NOD2/TLR2 ligand induced synergistic upregulation of dendritic cell maturation markers, costimulatory molecules, and secretion of proinflammatory cytokines compared with combinations of separate ligands. Furthermore, when coadministered with biodegradable nanoparticles carrying a model Ag, the ligand was able to induce high Ag-specific IgA and IgG titers at both systemic and mucosal sites after parenteral immunizations. These findings point out the potential utility of chimeric molecules TLR/NOD as adjuvants for vaccines to induce systemic and mucosal immune responses. *The Journal of Immunology*, 2014, 193: 5781–5785.

New directions in vaccine research concern the improvement of Ag immunogenicity and the design of new adjuvants. Recombinant protein subunits or synthetic peptides are being tested in new vaccine strategies and offer many advantages, such as a reduced toxicity compared with live-attenuated vaccines. However, they often remain poorly immunogenic when administered alone, particularly with regard to their capacity to induce mucosal immune responses. The enhancement of Ag-specific immune responses through the development of improved vaccine adjuvants remains an important challenge (1).

The discovery of the role of TLRs and NOD-like receptors (NLRs) in the action of certain adjuvants has provided new insights for vaccine development (2, 3). These observations are particularly important with regard to the cross-talk between NLRs and TLRs, which has been the subject of numerous investigations in recent years (4).

Although TLR ligands are pyrogenic and crucial for the induction of inflammatory cytokines, NLR ligands have a poor capacity to trigger these pathways without a synergistic boost from TLR ligands in vitro (5–7). Despite these apparently weak stimulatory properties, the presence of NLR subfamily NOD1 and NOD2 ligands positively triggers the potential of some immune adjuvants, including TLR ligands (8–10). Therefore, the interaction between NLRs and TLRs seems to be more crucial for adaptive immunity than previously appreciated. An interesting new area in the field of adjuvants could be the combination of immunostimulatory agents that target different pattern recognition receptor pathways (11).

Our purpose was to target both TLR2 and NOD2, aiming at inducing systemic and mucosal immune responses after parenteral immunization. Indeed, TLR2 appears to have a special role in T cell polarization and differentiation (especially T<sub>H</sub>17) (12), mucosal homing receptor expression, and IgA production by human B cells (13), whereas NOD2 has a role in the production of proinflammatory cytokines and autophagy (14, 15) and is highly expressed at the mucosal level (3, 10).

In this study, we evaluated the potential synergistic effects of NOD2 and TLR2 stimulation by a chimeric ligand on the induction of dendritic cell (DC) maturation and proinflammatory cytokine secretion in vitro, as well as the induction of systemic and mucosal immune responses after parenteral immunization in mice in the context of a nanoparticle (NP)-based vaccine carrying the Gag p24 (HIV-1) Ag.

### Materials and Methods

*NOD2, TLR2, chimeric NOD2/TLR2 ligands, and p24-coated polymeric NPs*

CL429 is a novel chimeric compound that was designed to stimulate both TLR2 and NOD2. This compound is composed of Murabutide (NOD2 ligand) covalently linked to Pam2C (TLR2 ligand) via a spacer (Supplemental Fig. 1A). Murabutide, Pam2C, and CL429 were developed and manufactured by InvivoGen.

The ligands' specific activity was determined using the HEK-Blue-hTLR2, HEK-Blue-hNOD2, and RAW-Blue reporter cell lines (InvivoGen) to monitor the activation of the NF- $\kappa$ B and AP-1 pathways using a secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP). Stimulation with ligands activates NF- $\kappa$ B and

\*Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5305, Université de Lyon, Lyon F-69007, France; †Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes, INSERM Centre d'Investigation Clinique en Vaccinologie 1408, Université de Lyon, Saint-Etienne F-42023, France; and ‡Cayla-InvivoGen, Toulouse F-31000, France

Received for publication September 11, 2014. Accepted for publication October 13, 2014.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Stéphane Paul, Faculté de Médecine de Saint Etienne, 15 rue Ambroise Paré, Saint Etienne 42023, France. E-mail address: stephane.paul@chu-st-etienne.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: DC, dendritic cell; MHC-II, MHC class II; MoDC, monocyte-derived DC; NLR, NOD-like receptor; NP, nanoparticle; PLA, poly(lactic acid); PLA-p24, p24 adsorbed on PLA NP; SEAP, secreted embryonic alkaline phosphatase.

Copyright © 2014 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/14/\$16.00

AP-1, which induce the production of SEAP. The level of SEAP can be easily quantified with a detection medium that turns purple/blue in the presence of alkaline phosphatase (HEK-Blue Detection; InvivoGen).

HIV-1 p24 Ag was produced and purified by PX<sup>3</sup>Therapeutics (Protein'Expert, Grenoble, France).

Poly(lactic acid) (PLA) NPs (180 nm) were prepared by nanoprecipitation, as previously described (16), and provided by Adjuvatis (Lyon, France). P24 protein and PLA particles were diluted in PBS at 200 µg/ml and 5 mg/ml, respectively. The two solutions were mixed volume to volume. The adsorption reaction occurred within 2 h at room temperature, with moderate overhead stirring. Endotoxin contents were assessed using an Endosafe test (Charles River) and were <5 EU/ml.

#### *In vitro maturation of human monocyte-derived DCs and cytokine secretion*

Monocytes were purified from peripheral human blood and cultured in the presence of IL-4 and GM-CSF to differentiate into DCs (monocyte-derived DCs [MoDCs]) (17). After 6 d, NOD2, TLR2, or chimeric NOD2/TLR2 ligands (10 nmol/ml) were added to the MoDCs for 24 or 48 h. LPS (2.5 µg/ml) was used as a positive control. Cells were then stained with FITC-labeled anti-CD1a (DC marker), and DC maturation was assessed by cell immunostaining using PE-labeled mAbs against the maturation marker CD83, costimulatory molecules (CD80, CD86), MHC class II (MHC-II) (BD Pharmingen), and the intracellular DC-LAMP maturation marker (Dendritics). Ten thousand events were acquired by FACS with a FACSCanto II (BD), and the data were analyzed using FlowJo software. MoDC culture supernatants were collected after 24 or 48 h, and expression of IL-12p70, TNF-α, IL-6, IL-1β, and IFN-α was analyzed by Luminex using the Bio-Plex Pro assay (Bio-Rad). Autophagy was analyzed by immunofluorescence analysis of LC3. After stimulation (8 h), cells were fixed, permeabilized, incubated with LC3-specific Ab (NanoTools; clone 5F10), and incubated with secondary Ab goat anti-mouse FITC. An agent containing DAPI was added; cells were observed using fluorescent microscopy, and quantification of cells containing LC3<sup>+</sup> autophagosomes was performed.

#### *Mouse study design*

Eight-to-twelve week-old female BALB/c mice were purchased from Charles River Laboratories. Mice were divided into five groups of five animals and immunized s.c. with 10 µg p24 adsorbed on PLA NPs (PLA-p24) suspended in 100 µl PBS on days 0, 14, and 28. A total of 20 nmol ligands (NOD2, TLR2, both or chimeric) was coadministered; one group was immunized with PLA-p24 alone. Sera, vaginal lavage fluid, and fecal pellets were collected at days 0, 14, 28, and 34 and tested for the presence of p24-specific IgA, IgG, IgG1, and IgG2a by ELISA.

Serum samples were obtained from whole blood recovered by performing a small incision at the retro-orbital vein. Vaginal secretions were collected from mice with 50 µl PBS (two times) placed in the vagina of the animal using an adapted pipette (Pipette M100) and tips (CP100; both from Gilson). A total of five microliters of 25× Halt Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific) was added to the vaginal lavage fluids to protect Igs from degradation. Feces were collected and diluted at 100 mg/ml with 1× Halt Protease Inhibitor Cocktail to allow normalization.

To study acute cytokine production, new groups of mice were immunized twice, one week apart. Sera and vaginal and intestinal tissues were collected 24 h after the boost. The vaginal cell and intestine cell lysates were prepared with the Bio-Plex Cell Lysis Kit (Bio-Rad), as specified by the manufacturer. Evaluation of multiple cytokines/chemokines was performed with a Luminex 100 instrument, in combination with the Bio-Plex mouse cytokine panels (Bio-Rad). Cytokine concentrations were determined as the mean of three replicates/time point.

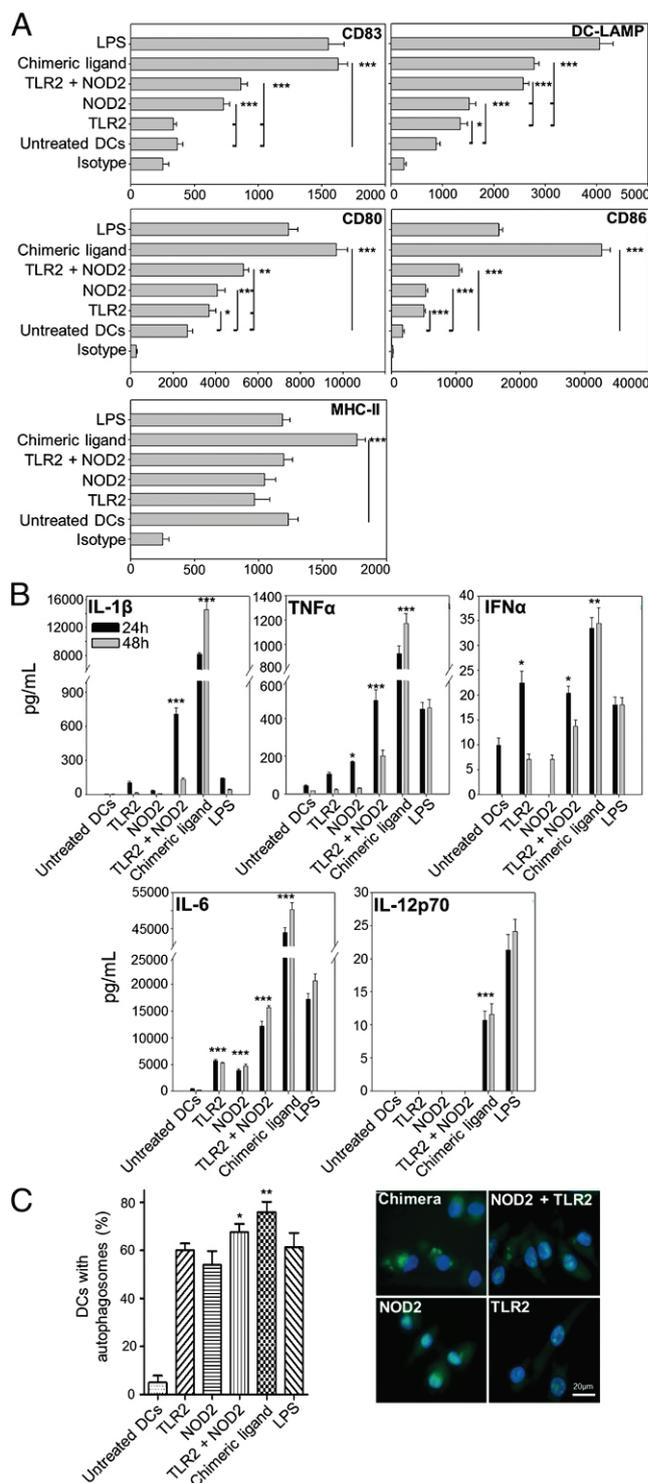
#### *Statistical analysis*

Analyses were performed using SigmaPlot software, version 11.0. Statistical data analyses were performed using one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test for comparison of pairs. Statistical significance is indicated in the figures.

## Results and Discussion

### *The chimeric ligand CL429 activates both TLR2 and NOD2*

The specific activity of each ligand at different concentrations was monitored in vitro using cell lines expressing only TLR2, NOD2, or both. As shown in Supplemental Fig. 1B, HEK cell line activation was dose dependent, and the TLR2 ligand (Pam2C) was able to stimulate only HEK cells expressing



**FIGURE 1.** Maturation-related patterns expressed by human MoDCs upon exposure to NOD2, TLR2, or chimeric NOD2/TLR2 ligands. (A) Phenotypes of MoDCs were determined after 24 h of stimulation, and mean expression of maturation markers (CD83 and DC-LAMP), costimulatory molecules (CD80 and CD86), and MHC-II were analyzed. (B) Quantification of cytokine-secretion pattern of MoDCs by a Bio-Plex Pro assay. The supernatants were collected, and the concentrations of IL-6, TNF-α, IL-1β, IL-12p70, and IFN-α were analyzed. Data are means + SD ( $n = 3$ ). (C) Chimera molecule NOD2/TLR2 improves autophagy induction in DCs. DCs were incubated in the presence of the ligands for 8 h. Cells were stained with Ab to LC3, and cells containing LC3<sup>+</sup> autophagosomes were quantified. Data are mean ± SD from eight independent counts. Data are representative of more than three independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

TLR2, whereas the NOD2 ligand (Murabutide) was able to stimulate only HEK cells expressing NOD2. Both cell lines were efficiently stimulated with the chimeric ligand CL429, meaning that the chimeric ligand can activate both TLR2 and NOD2 and induce NF- $\kappa$ B and/or AP-1 signaling. Moreover, stimulation of the RAW Blue cell line expressing both receptors showed that the chimeric ligand was significantly more efficient than separated ligands.

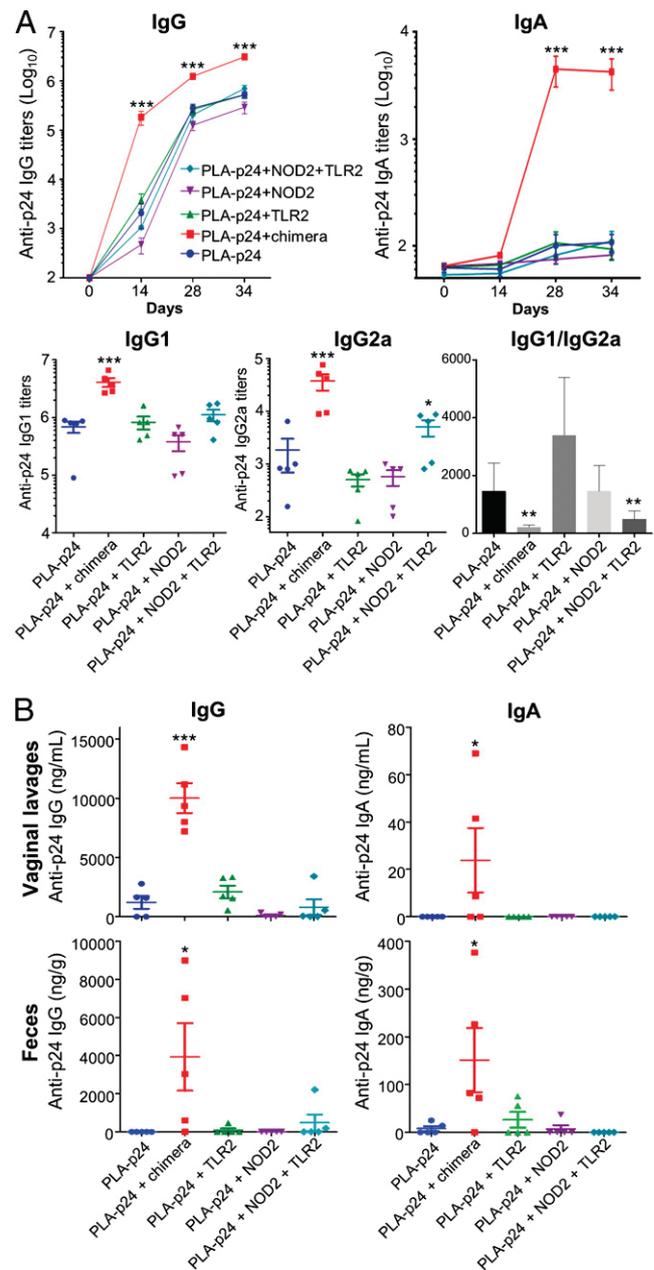
*The chimeric ligand NOD2/TLR2 induces synergistic human DC maturation in vitro*

Adjuvants and vaccine-delivery systems address the interface between innate and adaptive immune responses, where the extent and direction of innate immune activation determine the quality and magnitude of the resulting adaptive response. DCs play a major role at this interface; their maturation is correlated with the presentation of Ag fragments by MHC molecules, as well as with the expression of specific cell markers. To determine the adjuvant potential of NOD2 and/or TLR2 ligands to stimulate human DCs in vitro, expression of the cell markers of maturation was assessed by flow cytometry 24 h after equimolar ligand addition. As shown in Fig. 1A, a statistically significant increase in the expression of CD80, CD86, and DC-LAMP was observed in MoDCs incubated with NOD2 or TLR2 ligand alone ( $p < 0.05$ ). CD83 expression was enhanced to a statistically significant extent by the NOD2 ligand ( $p < 0.001$ ), whereas the amount of MHC-II was not modified by the NOD2 or TLR2 ligand. The combination of the two ligands significantly increased the expression of CD86, CD80, and DC-LAMP markers, but not CD83, compared with NOD2 alone, suggesting a cumulative effect of these ligands ( $p < 0.01$ ). With the notable exception of DC-LAMP, the expression of DC maturation markers was synergistically and significantly upregulated by the use of the chimeric ligand containing both NOD2 and TLR2 in comparison with monospecific (TLR2 or NOD2) and combination (TLR2 + NOD2) of molecules ( $p < 0.001$ ). Moreover, this chimeric ligand was the only molecule able to increase MHC-II expression.

DC maturation triggered by external signals is accompanied by the expression of different cytokines that modulate the immune responses. For this reason, we compared the impact of different combinations of the NOD2 and TLR2 ligands on the production of different cytokines. We obtained data after 24 and 48 h of ligand exposure for IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IL-6, and IL-12p70 (Fig. 1B). In comparison with untreated cells, NOD2 or TLR2 ligands significantly increased the amount of IL-6 in MoDC culture medium ( $p < 0.001$ ), as well as TNF- $\alpha$  and IFN- $\alpha$ , respectively ( $p < 0.05$ ); their impact was more disparate for other cytokines. With both ligands, an additive effect was significantly detectable for IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$  ( $p < 0.001$ ). Contrary to monospecific ligands, the chimeric NOD2/TLR2 molecule synergistically increased (2- to 30-fold) the secretion of these cytokines ( $p < 0.001$ ).

As already shown, NOD2 stimulation is able to induce autophagy in DCs (15). In this study, we showed that stimulation with the chimeric ligand induced high autophagosome formation in MoDCs (Fig. 1C). This observation is in accordance with the high cytokine production observed, as autophagy was shown to promote innate cytokine expression in DCs (18).

This strong adjuvant effect could be explained by improved NOD2 agonist uptake by DCs. Although TLR2 receptors are expressed on the cell surface and so widely exposed to ligands, NOD2 receptors are within the cytoplasm and are exposed to few diffusing NOD2 agonists. We hypothesized that the chimera is taken up through its TLR2 agonist domain in lipid rafts and internalized within endosomes (19, 20), enabling more NOD2 ligands to enter the cells. How the NOD2 agonist domain of the chimera interacts with the NOD2 receptor after endosomal internalization is still beyond our comprehension and requires further study, but involvement of



**FIGURE 2.** Specific anti-p24 IgG and IgA in sera and mucosal samples of mice immunized with PLA-p24 alone or coadministered with NOD2, TLR2 ligands, or chimeric NOD2/TLR2. Animals ( $n = 5$ /group) received three s.c. administrations of 10  $\mu$ g of PLA-p24 codelivered with 20 nmol of ligands. For each animal, the Ab amount was determined individually in sera (A) and mucosal samples (B).  $p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ .

the SLC15A3 and SLC15A4 transporters seems to be crucial (21, 22).

Although it is well known that stimulation of NOD2 and TLR2 activates NF- $\kappa$ B and AP1 signaling pathways, it is still not fully understood where the synergy takes place. Recent discoveries point out that the ser/thr kinase TAK1 is involved in the TLR2 signaling pathways (23) and Hasegawa et al. (24) postulated that NOD2 activation recruits RIP2 allowing recruitment and activation of the TAK1 complex, leading to proinflammatory cytokine secretion. This double activation could be part of the synergistic mechanisms between these two receptors.

*NOD2/TLR2 chimeric ligand enhances systemic and mucosal immune responses against HIV-1 p24 Ag*

Numerous studies validated the vaccine potential of PLA NPs as an Ag-carrier system (25). PLA NPs coated with Gag p24 (HIV-1) were evaluated for their immunostimulatory potential after s.c. coadministration with the different NOD2/TLR2 ligands in mice. At days 0, 14, 28, and 35, sera, vaginal lavage fluids, and feces were collected, and p24-specific Abs were quantified.

As shown in Fig. 2A, the chimeric NOD2/TLR2 ligand significantly increased anti-p24 IgG and IgA titers in sera, up to 2 logs in comparison with other formulations ( $p < 0.001$ ). No significant differences were observed in terms of systemic anti-p24 responses between mouse groups immunized with PLA-p24 alone or coadministered with free NOD2, TLR2, or TLR2 plus NOD2 ligands. The predominant IgG subclass was IgG1, a Th2-associated isotype, for all groups of mice. IgG1 titers in the group of mice treated with the chimeric ligand were significantly higher than in other assays ( $p < 0.001$ ). IgG2a (a Th1-associated isotype) also was significantly increased with the chimeric ligand or the combination of NOD2 and TLR2 ligands ( $p < 0.05$ ), which resulted in a significant decrease of the IgG1/IgG2a ratio with these formulations.

Mucosal immune responses also were monitored (Fig. 2B). Compared with other assays, the group of mice injected with the chimeric ligand showed a significant increase in Ab responses (IgG and IgA) in feces and vaginal lavage fluids at day 34 postimmunization. This effect is probably due to the induction of high IgG titers in sera, which lead to the transudation and/or FcRn transport to mucosal surfaces (26). The specific IgA responses at mucosal surfaces might be due to an efficient stimulation of B cells in mucosal tissues or transport of blood IgA by the polymeric IgR (27).

Consistent with the knowledge that TLR2 and NOD2 pathways act synergistically on human B lymphocytes (28) and DCs (29) to induce immune responses, as well as our *in vitro* data, the strong adjuvant effect observed *in vivo* is probably due to the induction of inflammation at the injection site, which leads to the recruitment of APCs such as macrophages and DCs. The latter are able to uptake Ag carried by PLA NPs and then migrate to draining lymph nodes to present Ag to naive T cells. Moreover, upregulation of MHC-II, as well as the costimulatory molecules CD80 and CD86, can improve the presentation to naive T cells (signal 1) and induce costimulatory signals (signal 2) necessary for the activation and survival of the lymphocytes. The production of IL-12 by the DCs stimulated by the chimeric ligand orchestrates the dif-

ferentiation of T cells into Th1 cells, leading to a decrease in the IgG1/IgG2a ratio.

To determine the ability of the vaccine to promote chemotaxis of immune effector cells, the chemokine and cytokine levels in different compartments were analyzed. The formulation PLA-p24+chimeric ligand was a potent inducer of chemokines, including G-CSF and MCP-1, as well as proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in sera (Supplemental Fig. 2A). These observations are consistent with the *in vitro* data on MoDCs showing that these cytokines were synergistically increased with the chimeric ligand. Increase of the pro-Th2 cytokines IL-5 and IL-9 in sera has also been observed in mice immunized with the chimeric ligand in comparison to other formulations. These cytokines are known to be important for mouse B cell differentiation, particularly for fate determination of terminal B cell differentiation to Ab-secreting plasma cells (30, 31), supporting the high humoral responses observed with the chimeric ligand. IL-9 also was shown to promote Th17 development (32). Despite the fact that IL-17 expression was not increased in sera, a slight, but significant increase, in the level of IL-17F was observed in vaginal tissue but not in intestinal tissue (Supplemental Fig. 2B, 2C), meaning that there was a proinflammatory reaction in the mouse vagina (33).

The NOD2 ligand induced a slight increase in IL-33, IL-23p19, MIP-3 $\alpha$ , IL-31, CD40L, and IL-21 in vaginal tissue compared with PLA-p24 alone. The expression of these cytokines was improved by coadministration of the TLR2 ligand, whereas the chimeric ligand improved the production of MIP-3 $\alpha$  and CD40L, which are known to interact with B cells via its cognate receptor to trigger Ig isotype class switching and promote their secretion and the differentiation of memory B cells (34). Pro-Th1 cytokines were not markedly different between the experimental groups.

In this article, we have described a new way to improve adjuvant activity by combining multi-pattern recognition receptor stimulation simultaneously using a chimeric molecule. The chimeric TLR2/NOD2 molecule we described possesses a very potent adjuvant activity, with no apparent toxicity, and it allows strong induction of both systemic and mucosal immunity against vaccine Ag. This activity seems to be mediated by an optimal DC maturation process, which induces strong B and T cell stimulation and autophagy.

## Disclosures

G.T., E.P., T.L., and F.V. are employees of Cayla InvivoGen. They provide molecules and test their ability to stimulate transfected cells. The other authors have no financial conflicts of interest.

## References

- Delany, I., R. Rappuoli, and E. De Gregorio. 2014. Vaccines for the 21st century. *EMBO Mol. Med.* 6: 708–720.
- Duthie, M. S., H. P. Windish, C. B. Fox, and S. G. Reed. 2011. Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. *Immunol. Rev.* 239: 178–196.
- Geddes, K., J. G. Magalhães, and S. E. Girardin. 2009. Unleashing the therapeutic potential of NOD-like receptors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8: 465–479.
- Timmermans, K., T. S. Plantinga, M. Kox, M. Vaneker, G. J. Scheffer, G. J. Adema, L. A. Joosten, and M. G. Netea. 2013. Blueprints of signaling interactions between pattern recognition receptors: implications for the design of vaccine adjuvants. *Clin. Vaccine Immunol.* 20: 427–432.
- Fritz, J. H., S. E. Girardin, C. Fitting, C. Werts, D. Mengin-Lectreulx, M. Caroff, J. M. Cavaillon, D. J. Philpott, and M. Adib-Conquy. 2005. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur. J. Immunol.* 35: 2459–2470.

6. Uehara, A., S. Yang, Y. Fujimoto, K. Fukase, S. Kusumoto, K. Shibata, S. Sugawara, and H. Takada. 2005. Muramyl dipeptide and diamino pimelic acid-containing desmuramyl peptides in combination with chemically synthesized Toll-like receptor agonists synergistically induced production of interleukin-8 in a NOD2- and NOD1-dependent manner, respectively, in human monocyte cells in culture. *Cell Microbiol.* 7: 53–61.
7. Tada, H., S. Aiba, K. Shibata, T. Ohteki, and H. Takada. 2005. Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect. Immun.* 73: 7967–7976.
8. Fritz, J. H., L. Le Bourhis, G. Sellge, J. G. Magalhaes, H. Fsihi, T. A. Kufer, C. Collins, J. Viala, R. L. Ferrero, S. E. Girardin, and D. J. Philpott. 2007. Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity* 26: 445–459.
9. Magalhaes, J. G., J. H. Fritz, L. Le Bourhis, G. Sellge, L. H. Travassos, T. Selvanantham, S. E. Girardin, J. L. Gommerman, and D. J. Philpott. 2008. Nod2-dependent Th2 polarization of antigen-specific immunity. *J. Immunol.* 181: 7925–7935.
10. Kobayashi, K. S., M. Chamaillard, Y. Ogura, O. Henegariu, N. Inohara, G. Nuñez, and R. A. Flavell. 2005. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 307: 731–734.
11. Kornbluth, R. S., and G. W. Stone. 2006. Immunostimulatory combinations: designing the next generation of vaccine adjuvants. *J. Leukoc. Biol.* 80: 1084–1102.
12. Borrello, S., C. Nicolò, G. Delogo, F. Pandolfi, and F. Ria. 2011. TLR2: a crossroads between infections and autoimmunity? *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 24: 549–556.
13. Liang, Y., H. Hasturk, J. Elliot, A. Noronha, X. Liu, L. M. Wetzler, P. Massari, A. Kantarci, H. S. Winter, F. A. Farraye, and L. M. Ganley-Leal. 2011. Toll-like receptor 2 induces mucosal homing receptor expression and IgA production by human B cells. *Clin. Immunol.* 138: 33–40.
14. Rubino, S. J., T. Selvanantham, S. E. Girardin, and D. J. Philpott. 2012. Nod-like receptors in the control of intestinal inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* 24: 398–404.
15. Cooney, R., J. Baker, O. Brain, B. Danis, T. Pichulik, P. Allan, D. J. Ferguson, B. J. Campbell, D. Jewell, and A. Simmons. 2010. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat. Med.* 16: 90–97.
16. Pavot, V., N. Rochereau, C. Primard, C. Genin, E. Perouzel, T. Lioux, S. Paul, and B. Verrier. 2013. Encapsulation of Nod1 and Nod2 receptor ligands into poly(lactic acid) nanoparticles potentiates their immune properties. *J. Control. Release* 167: 60–67.
17. Bohnenkamp, H. R., and T. Noll. 2003. Development of a standardized protocol for reproducible generation of matured monocyte-derived dendritic cells suitable for clinical application. *Cytotechnology* 42: 121–131.
18. Morris, S., M. S. Swanson, A. Lieberman, M. Reed, Z. Yue, D. M. Lindell, and N. W. Lukacs. 2011. Autophagy-mediated dendritic cell activation is essential for innate cytokine production and APC function with respiratory syncytial virus responses. *J. Immunol.* 187: 3953–3961.
19. Triantafyllou, M., M. Manukyan, A. Mackie, S. Morath, T. Hartung, H. Heine, and K. Triantafyllou. 2004. Lipoteichoic acid and toll-like receptor 2 internalization and targeting to the Golgi are lipid raft-dependent. *J. Biol. Chem.* 279: 40882–40889.
20. Nilsen, N. J., S. Deininger, U. Nonstad, F. Skjeldal, H. Husebye, D. Rodionov, S. von Aulock, T. Hartung, E. Lien, O. Bakke, and T. Espevik. 2008. Cellular trafficking of lipoteichoic acid and Toll-like receptor 2 in relation to signaling: role of CD14 and CD36. *J. Leukoc. Biol.* 84: 280–291.
21. Lee, J., I. Tattoli, K. A. Wojtal, S. R. Vavricka, D. J. Philpott, and S. E. Girardin. 2009. pH-dependent internalization of muramyl peptides from early endosomes enables Nod1 and Nod2 signaling. *J. Biol. Chem.* 284: 23818–23829.
22. Nakamura, N., J. R. Lill, Q. Phung, Z. Jiang, C. Bakalarski, A. de Mazière, J. Klumperman, M. Schlatter, L. Delamarre, and I. Mellman. 2014. Endosomes are specialized platforms for bacterial sensing and NOD2 signalling. *Nature* 509: 240–244.
23. Landström, M. 2010. The TAK1-TRAF6 signalling pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42: 585–589.
24. Hasegawa, M., Y. Fujimoto, P. C. Lucas, H. Nakano, K. Fukase, G. Nuñez, and N. Inohara. 2008. A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF- $\kappa$ B activation. *EMBO J.* 27: 373–383.
25. Zhao, L., A. Seth, N. Wibowo, C. X. Zhao, N. Mitter, C. Yu, and A. P. Middelberg. 2014. Nanoparticle vaccines. *Vaccine* 32: 327–337.
26. Kuo, T. T., K. Baker, M. Yoshida, S. W. Qiao, V. G. Aveson, W. I. Lencer, and R. S. Blumberg. 2010. Neonatal Fc receptor: from immunity to therapeutics. *J. Clin. Immunol.* 30: 777–789.
27. Johansen, F. E., and C. S. Kaetzel. 2011. Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor and IgA transport: new advances in environmental factors that stimulate pIgR expression and its role in mucosal immunity. *Mucosal Immunol.* 4: 598–602.
28. O'Neill, L. A. 2011. Synergism between NOD-like receptors and Toll-like receptors in human B lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* 89: 173–175.
29. Takada, H., and A. Uehara. 2006. Enhancement of TLR-mediated innate immune responses by peptidoglycans through NOD signaling. *Curr. Pharm. Des.* 12: 4163–4172.
30. Takatsu, K., T. Kouro, and Y. Nagai. 2009. Interleukin 5 in the link between the innate and acquired immune response. *Adv. Immunol.* 101: 191–236.
31. Goswami, R., and M. H. Kaplan. 2011. A brief history of IL-9. *J. Immunol.* 186: 3283–3288.
32. Elyaman, W., E. M. Bradshaw, C. Uyttenhove, V. Dardalhon, A. Awasthi, J. Imitola, E. Bettelli, M. Oukka, J. van Snick, J. C. Renaud, et al. 2009. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3<sup>+</sup> natural regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 12885–12890.
33. Dubin, P. J., and J. K. Kolls. 2008. Th17 cytokines and mucosal immunity. *Immunol. Rev.* 226: 160–171.
34. Elgueta, R., M. J. Benson, V. C. de Vries, A. Wasiuk, Y. Guo, and R. J. Noelle. 2009. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol. Rev.* 229: 152–172.

## 7. BIBLIOGRAPHIE

---

1. Vert M, Doi Y, Hellwich K-H, Hess M, Hodge P, Kubisa P, Rinaudo M, Schué F. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure Appl Chem* (2012) **84**:377–410. doi:10.1351/PAC-REC-10-12-04
2. Huang H-C, Barua S, Sharma G, Dey SK, Rege K. Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy. *J Control Release* (2011) **155**:344–357. doi:10.1016/j.jconrel.2011.06.004
3. Letchford K. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur J Pharm Biopharm* (2007) **65**:259–269. doi:10.1016/j.ejpb.2006.11.009
4. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov* (2005) **4**:145–160. doi:10.1038/nrd1632
5. Benvegnu T, Lemiègre L, Cammas-Marion S. New generation of liposomes called archaeosomes based on natural or synthetic archaeal lipids as innovative formulations for drug delivery. *Recent Pat Drug Deliv Formul* (2009) **3**:206–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19534669> [Accessed August 17, 2016]
6. Salvador A, Igartua M, Hernández RM, Pedraz JL. An overview on the field of micro- and nanotechnologies for synthetic Peptide-based vaccines. *J Drug Deliv* (2011) **2011**:181646. doi:10.1155/2011/181646
7. Huang R, Liu S, Shao K, Han L, Ke W, Liu Y, Li J, Huang S, Jiang C, Shcharbin D G KB and BM, et al. Evaluation and mechanism studies of PEGylated dendrigraft poly-L-lysines as novel gene delivery vectors. *Nanotechnology* (2010) **21**:265101. doi:10.1088/0957-4484/21/26/265101
8. Vauthier C, Bouchemal K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharm Res* (2009) **26**:1025–1058. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19107579>
9. Asif M, Arayne MS, Sultana N, Hussain F. Fabrication of nanoparticles within polymeric pores for controlled release of drug. *Pak J Pharm Sci* (2006) **19**:73–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16632458> [Accessed August 17, 2016]
10. Paillard A, Passirani C, Saulnier P, Kroubi M, Garcion E, Benoît J-P, Betbeder D. Positively-Charged, Porous, Polysaccharide Nanoparticles Loaded with Anionic Molecules Behave as “Stealth” Cationic Nanocarriers. *Pharm Res* (2010) **27**:126–133. doi:10.1007/s11095-009-9986-z
11. Agostoni V, Horcajada P, Noiray M, Malanga M, Aykaç A, Jicsinszky L, Vargas-Berenguel A, Semiramoth N, Daoud-Mahammed S, Nicolas V, et al. A “green” strategy to construct non-covalent, stable and bioactive coatings on porous MOF nanoparticles. *Sci Rep* (2015) **5**:7925. doi:10.1038/srep07925

12. Ma C, Rossman GR, Miller JA. THE ORIGIN OF COLOR IN "FIRE" OBSIDIAN. *Can Mineral* (2007) **45**:551–557. doi:10.2113/gscanmin.45.3.551
13. Angelini I, Artioli G, Bellintani P, Diella V, Gemmi M, Polla A, Rossi A. Chemical analyses of Bronze Age glasses from Frattesina di Rovigo, Northern Italy. *J Archaeol Sci* (2004) **31**:1175–1184. doi:10.1016/j.jas.2004.02.015
14. Brun N, Mazerolles L, Pernot M. Microstructure of opaque red glass containing copper. *J Mater Sci Lett* (1991) **10**:1418–1420. doi:10.1007/BF00735696
15. Polette-Niewold LA, Manciu FS, Torres B, Alvarado M, Chianelli RR. Organic/inorganic complex pigments: Ancient colors Maya Blue. *J Inorg Biochem* (2007) **101**:1958–1973. doi:10.1016/j.jinorgbio.2007.07.009
16. Paciotti GF, Kingston DGI, Tamarkin L. Colloidal gold nanoparticles: a novel nanoparticle platform for developing multifunctional tumor-targeted drug delivery vectors. *Drug Dev Res* (2006) **67**:47–54. doi:10.1002/ddr.20066
17. Felice B, Prabhakaran MP, Rodríguez AP, Ramakrishna S. Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective. *Mater Sci Eng C* (2014) **41**:178–195. doi:10.1016/j.msec.2014.04.049
18. Singh R, Lillard JW. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol* (2009) **86**:215–23. doi:10.1016/j.yexmp.2008.12.004
19. Shi J, Votruba AR, Farokhzad OC, Langer R. Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications. *Nano Lett* (2010) **10**:3223–3230. doi:10.1021/nl102184c
20. Kreuter J. Nanoparticles--a historical perspective. *Int J Pharm* (2007) **331**:1–10. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.10.021
21. Birrenbach G, Speiser PP. Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology. *J Pharm Sci* (1976) **65**:1763–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1036442> [Accessed August 18, 2016]
22. Gurny R, Peppas NA, Harrington DD, Banker GS. Development of Biodegradable and Injectable Latices for Controlled Release of Potent Drugs. *Drug Dev Ind Pharm* (1981) **7**:1–25. doi:10.3109/03639048109055684
23. Wang Y, Rajala A, Cao B, Ranjo-Bishop M, Agbaga M-P, Mao C, Rajala RVS. Cell-Specific Promoters Enable Lipid-Based Nanoparticles to Deliver Genes to Specific Cells of the Retina In Vivo. *Theranostics* (2016) **6**:1514–27. doi:10.7150/thno.15230
24. Phua KKL, Staats HF, Leong KW, Nair SK. Intranasal mRNA nanoparticle vaccination induces prophylactic and therapeutic anti-tumor immunity. *Sci Rep* (2014) **4**:5128. doi:10.1038/srep05128
25. Duchene D, Cavalli R, Gref R. Cyclodextrin-based Polymeric Nanoparticles as Efficient Carriers for Anticancer Drugs. *Curr Pharm Biotechnol* (2016) **17**:248–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26517333> [Accessed August 18, 2016]
26. Ladavière C, Gref R. Toward an optimized treatment of intracellular bacterial infections: input of nanoparticulate drug delivery systems. *Nanomedicine (Lond)* (2015) doi:10.2217/nnm.15.128

27. Kreuter J, Speiser PP. New adjuvants on a polymethylmethacrylate base. *Infect Immun* (1976) **13**:204–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1248871> [Accessed August 18, 2016]
28. Pavot V, Rochereau N, Primard C, Genin C, Perouzel E, Lioux T, Paul S, Verrier B. Encapsulation of Nod1 and Nod2 receptor ligands into poly(lactic acid) nanoparticles potentiates their immune properties. *J Control Release* (2013) **167**:60–7. doi:10.1016/j.jconrel.2013.01.015
29. Vranic S, Boggetto N, Contremoulins V, Mornet S, Reinhardt N, Marano F, Baeza-Squiban A, Boland S. Deciphering the mechanisms of cellular uptake of engineered nanoparticles by accurate evaluation of internalization using imaging flow cytometry. *Part Fibre Toxicol* (2013) **10**:2. doi:10.1186/1743-8977-10-2
30. Doshi N, Mitragotri S. Designer Biomaterials for Nanomedicine. *Adv Funct Mater* (2009) **19**:3843–3854. doi:10.1002/adfm.200901538
31. Gratton SEA, Ropp PA, Pohlhaus PD, Luft JC, Madden VJ, Napier ME, DeSimone JM. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc Natl Acad Sci* (2008) **105**:11613–11618. doi:10.1073/pnas.0801763105
32. Beningo KA, Wang Y. Fc-receptor-mediated phagocytosis is regulated by mechanical properties of the target. *J Cell Sci* (2002) **115**:849–56. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.593
33. Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv Drug Deliv Rev* (2001) **47**:65–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11251246> [Accessed August 20, 2016]
34. Devine D V, Wong K, Serrano K, Chonn A, Cullis PR. Liposome-complement interactions in rat serum: implications for liposome survival studies. *Biochim Biophys Acta* (1994) **1191**:43–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8155683> [Accessed August 20, 2016]
35. Canton I, Battaglia G. Endocytosis at the nanoscale. *Chem Soc Rev* (2012) **41**:2718–39. doi:10.1039/c2cs15309b
36. Verma A, Stellacci F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small* (2010) **6**:12–21. doi:10.1002/smll.200901158
37. Villanueva A, Cañete M, Roca AG, Calero M, Veintemillas-Verdaguer S, Serna CJ, Morales M del P, Miranda R. The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells. *Nanotechnology* (2009) **20**:115103. doi:10.1088/0957-4484/20/11/115103
38. Miller CR, Bondurant B, McLean SD, McGovern KA, O'Brien DF. Liposome-cell interactions in vitro: effect of liposome surface charge on the binding and endocytosis of conventional and sterically stabilized liposomes. *Biochemistry* (1998) **37**:12875–83. doi:10.1021/bi980096y
39. Bannunah AM, Vllasaliu D, Lord J, Stolnik S. Mechanisms of Nanoparticle Internalization and Transport Across an Intestinal Epithelial Cell Model: Effect of Size and Surface Charge. *Mol Pharm* (2014) **11**:4363–4373. doi:10.1021/mp500439c
40. Xia T, Kovoichich M, Liong M, Zink JI, Nel AE. Cationic polystyrene nanosphere toxicity depends on cell-specific endocytic and mitochondrial injury pathways.

ACS Nano (2008) **2**:85–96. doi:10.1021/nn700256c

41. Yuan H, Li J, Bao G, Zhang S. Variable Nanoparticle-Cell Adhesion Strength Regulates Cellular Uptake. *Phys Rev Lett* (2010) **105**:138101. doi:10.1103/PhysRevLett.105.138101
42. Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WCW. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Lett* (2006) **6**:662–668. doi:10.1021/nl052396o
43. Scholzen A, Minigo G, David C, Apostolopoulos V, Mottram PL. Pathogen recognition and development of particulate vaccines: Does size matter? *Methods* (2006) **40**:1–9. doi:10.1016/j.ymeth.2006.05.016
44. Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Iltis Ipe B, Bawendi MG, Frangioni J V. Renal clearance of quantum dots. *Nat Biotechnol* (2007) **25**:1165–70. doi:10.1038/nbt1340
45. Longmire M, Choyke PL, Kobayashi H. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. *Nanomedicine (Lond)* (2008) **3**:703–17. doi:10.2217/17435889.3.5.703
46. Krummen M, Balkow S, Shen L, Heinz S, Loquai C, Probst H-C, Grabbe S. Release of IL-12 by dendritic cells activated by TLR ligation is dependent on MyD88 signaling, whereas TRIF signaling is indispensable for TLR synergy. *J Leukoc Biol* (2010) **88**:189–99. doi:10.1189/jlb.0408228
47. Nembrini C, Stano A, Dane KY, Ballester M, van der Vlies AJ, Marsland BJ, Swartz MA, Hubbell JA. Nanoparticle conjugation of antigen enhances cytotoxic T-cell responses in pulmonary vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011) **108**:E989–97. doi:10.1073/pnas.1104264108
48. Song X, Zhao X, Zhou Y, Li S, Ma Q. Pharmacokinetics and disposition of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles. *Curr Drug Metab* (2010) **11**:859–69. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21208172> [Accessed December 7, 2011]
49. Ensign LM, Cone R, Hanes J. Nanoparticle-based drug delivery to the vagina: A review. *J Control Release* (2014) **190**:500–514. doi:10.1016/j.jconrel.2014.04.033
50. Ensign LM, Cone R, Hanes J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: the gastrointestinal mucus barriers. *Adv Drug Deliv Rev* (2012) **64**:557–70. doi:10.1016/j.addr.2011.12.009
51. Cone RA. Barrier properties of mucus. *Adv Drug Deliv Rev* (2009) **61**:75–85. doi:10.1016/j.addr.2008.09.008
52. Lai SK, Wang Y-Y, Hida K, Cone R, Hanes J. Nanoparticles reveal that human cervicovaginal mucus is riddled with pores larger than viruses. *Proc Natl Acad Sci* (2010) **107**:598–603. doi:10.1073/pnas.0911748107
53. Primard C, Rochereau N, Luciani E, Genin C, Delair T, Paul S, Verrier B. Traffic of poly(lactic acid) nanoparticulate vaccine vehicle from intestinal mucus to sub-epithelial immune competent cells. *Biomaterials* (2010) **31**:6060–8. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.04.021
54. Sheng J, He H, Han L, Qin J, Chen S, Ru G, Li R, Yang P, Wang J, Yang VC.

- Enhancing insulin oral absorption by using mucoadhesive nanoparticles loaded with LMWP-linked insulin conjugates. *J Control Release* (2016) **233**:181–90. doi:10.1016/j.jconrel.2016.05.015
55. Liu M, Zhang J, Shan W, Huang Y. Developments of mucus penetrating nanoparticles. *Asian J Pharm Sci* (2015) **10**:275–282. doi:10.1016/j.ajps.2014.12.007
56. Ewaschuk JB, Naylor JM, Zello GA. D-lactate in human and ruminant metabolism. *J Nutr* (2005) **135**:1619–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15987839> [Accessed September 4, 2016]
57. Brown M, Farrar D. Development of bioresorbable polymers in orthopaedics. *Plast Rubber Compos* (2008) **37**:46–49. doi:10.1179/174328908X283339
58. Young A. Effects on plasma glucose and lactate. *Adv Pharmacol* (2005) **52**:193–208. doi:10.1016/S1054-3589(05)52010-6
59. Xiao L, Wang B, Yang G, Gauthier M. "Poly(Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications," in *Biomedical Science, Engineering and Technology* (InTech). doi:10.5772/23927
60. Jamshidian M, Tehrani EA, Imran M, Jacquot M, Desobry S. Poly-Lactic Acid: Production, Applications, Nanocomposites, and Release Studies. *Compr Rev Food Sci Food Saf* (2010) **9**:552–571. doi:10.1111/j.1541-4337.2010.00126.x
61. Lemoine D, Francois C, Kedzierewicz F, Preat V, Hoffman M, Maincent P. Stability study of nanoparticles of poly(epsilon-caprolactone), poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials* (1996) **17**:2191–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8922605> [Accessed September 9, 2016]
62. Hrenovic J, Ivankovic T. Toxicity of anionic and cationic surfactant to *Acinetobacter junii* in pure culture. *CEJB* (2007) **2**:405–414. doi:10.2478/s11535-007-0029-7
63. Rebello S, Asok AK, Mundayoor S, Jisha MS. Surfactants: toxicity, remediation and green surfactants. *Environ Chem Lett* (2014) **12**:275–287. doi:10.1007/s10311-014-0466-2
64. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm* (2010) **385**:113–142. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.10.018
65. Lamalle-Bernard D, Munier S, Compagnon C, Charles M-H, Kalyanaraman VS, Delair T, Verrier B, Ataman-Onal Y. Coadsorption of HIV-1 p24 and gp120 proteins to surfactant-free anionic PLA nanoparticles preserves antigenicity and immunogenicity. *J Control Release* (2006) **115**:57–67. doi:10.1016/j.jconrel.2006.07.006
66. European Pharmacopoeia, 5th Edition. Available at: <https://fr.scribd.com/doc/314755827/European-Pharmacopoeia-5th-Editon>
67. Treuel L, Eslahian KA, Docter D, Lang T, Zellner R, Nienhaus K, Nienhaus GU, Stauber RH, Maskos M. Physicochemical characterization of nanoparticles and their behavior in the biological environment. *Phys Chem Chem Phys Phys Chem Chem Phys* (2014) **16**:15053–15067. doi:10.1039/c4cp00058g
68. Docter D, Westmeier D, Markiewicz M, Stolte S, Knauer SK, Stauber RH. The

nanoparticle biomolecule corona: lessons learned - challenge accepted?  
*Chem Soc Rev* (2015) **44**:6094–121. doi:10.1039/c5cs00217f

69. Reifarh M, Pretzel D, Schubert S, Weber C, Heintzmann R, Hoepfener S, Schubert US, Uhrich KE, Cannizzaro SM, Langer RS, et al. Cellular uptake of PLA nanoparticles studied by light and electron microscopy: synthesis, characterization and biocompatibility studies using an iridium( iii ) complex as correlative label. *Chem Commun* (2016) **52**:4361–4364. doi:10.1039/C5CC09884J
70. Rancan F, Papakostas D, Hadam S, Hackbarth S, Delair T, Primard C, Verrier B, Sterry W, Blume-Peytavi U, Vogt A. Investigation of polylactic acid (PLA) nanoparticles as drug delivery systems for local dermatotherapy. *Pharm Res* (2009) **26**:2027–36. doi:10.1007/s11095-009-9919-x
71. Pavot V, Rochereau N, Ressayguier J, Gutjahr A, Genin C, Tiraby G, Perouzel E, Lioux T, Vernejoul F, Verrier B, et al. Cutting edge: New chimeric NOD2/TLR2 adjuvant drastically increases vaccine immunogenicity. *J Immunol* (2014) **193**:5781–5. doi:10.4049/jimmunol.1402184
72. Munier S, Messai I, Delair T, Verrier B, Ataman-Onal Y. Cationic PLA nanoparticles for DNA delivery: comparison of three surface polycations for DNA binding, protection and transfection properties. *Colloids surfaces B Biointerfaces* (2005) **43**:163–173. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15941652>
73. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Préat V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release* (2012) **161**:505–22. doi:10.1016/j.jconrel.2012.01.043
74. Pavot V, Climent N, Rochereau N, Garcia F, Genin C, Tiraby G, Vernejoul F, Perouzel E, Lioux T, Verrier B, et al. Directing vaccine immune responses to mucosa by nanosized particulate carriers encapsulating NOD ligands. *Biomaterials* (2016) **75**:327–339. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.10.034
75. Jain AK, Goyal AK, Mishra N, Vaidya B, Mangal S, Vyas SP. PEG-PLA-PEG block copolymeric nanoparticles for oral immunization against hepatitis B. *Int J Pharm* (2010) **387**:253–62. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.12.013
76. Lotfipour F, Valizadeh H, Milani M, Bahrami N, Ghotaslou R. Study of Antimicrobial Effects of Clarithromycin Loaded PLGA Nanoparticles against Clinical Strains of *Helicobacter pylori*. *Drug Res (Stuttg)* (2015) **66**:41–45. doi:10.1055/s-0035-1548910
77. Laroui H, Theiss AL, Yan Y, Dalmaso G, Nguyen HTT, Sitaraman S V., Merlin D. Functional TNF $\alpha$  gene silencing mediated by polyethyleneimine/TNF $\alpha$  siRNA nanocomplexes in inflamed colon. *Biomaterials* (2011) **32**:1218–1228. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.09.062
78. Laroui H, Dalmaso G, Nguyen HTT, Yan Y, Sitaraman S V., Merlin D. Drug-Loaded Nanoparticles Targeted to the Colon With Polysaccharide Hydrogel Reduce Colitis in a Mouse Model. *Gastroenterology* (2010) **138**:843–853.e2. doi:10.1053/j.gastro.2009.11.003
79. Jiang L, Li X, Liu L, Zhang Q. Thiolated chitosan-modified PLA-PCL-TPGS nanoparticles for oral chemotherapy of lung cancer. *Nanoscale Res Lett* (2013) **8**:66. doi:10.1186/1556-276X-8-66

80. Luo YY, Xiong XY, Tian Y, Li ZL, Gong YC, Li YP. A review of biodegradable polymeric systems for oral insulin delivery. *Drug Deliv* (2015) 1–10. doi:10.3109/10717544.2015.1052863
81. Jain AK, Goyal AK, Mishra N, Vaidya B, Mangal S, Vyas SP. PEG-PLA-PEG block copolymeric nanoparticles for oral immunization against hepatitis B. *Int J Pharm* (2010) **387**:253–62. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.12.013
82. Das NM, Ashe S, Nayak D, Rauta PR, Nayak B. Enhanced efficacy of clindamycin hydrochloride encapsulated in PLA/PLGA based nanoparticle system for oral delivery. *IET Nanobiotechnology* (2016) **10**:254–261. doi:10.1049/iet-nbt.2015.0021
83. He H, Zhang X, Sheng Y. Enteric-coated capsule containing  $\beta$ -galactosidase-loaded polylactic acid nanocapsules: enzyme stability and milk lactose hydrolysis under simulated gastrointestinal conditions. *J Dairy Res* (2014) **81**:479–484. doi:10.1017/S0022029914000491
84. Rawat P, Ahmad I, Thomas SC, Pandey S, Vohora D, Gupta S, Ahmad FJ, Talegaonkar S. Revisiting bone targeting potential of novel hydroxyapatite based surface modified PLGA nanoparticles of risedronate: Pharmacokinetic and biochemical assessment. *Int J Pharm* (2016) **506**:253–261. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.04.049
85. Shen H, Hu X, Szymusiak M, Wang ZJ, Liu Y. Orally Administered Nanocurcumin to Attenuate Morphine Tolerance: Comparison between Negatively Charged PLGA and Partially and Fully PEGylated Nanoparticles. *Mol Pharm* (2013) **10**:4546–4551. doi:10.1021/mp400358z
86. Sun D, Xue A, Zhang B, Xue X, Zhang J, Liu W. Enhanced oral bioavailability of acetylpuerarin by poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles optimized using uniform design combined with response surface methodology. *Drug Des Devel Ther* (2016) 2029. doi:10.2147/DDDT.S108185
87. Ibrahim MM, Abd-Elgawad A-EH, Soliman OA-E, Jablonski MM. Pharmaceutical Nanotechnology Nanoparticle-Based Topical Ophthalmic Formulations for Sustained Celecoxib Release. *J Pharm Sci* (2013) **102**:1036–1053. doi:10.1002/jps.23417
88. Kompella UB, Bandi N, Ayalasomayajula SP. Subconjunctival Nano- and Microparticles Sustain Retinal Delivery of Budesonide, a Corticosteroid Capable of Inhibiting VEGF Expression. *Investig Ophthalmology Vis Sci* (2003) **44**:1192. doi:10.1167/iovs.02-0791
89. Araújo J, Vega E, Lopes C, Egea MA, Garcia ML, Souto EB. Effect of polymer viscosity on physicochemical properties and ocular tolerance of FB-loaded PLGA nanospheres. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* (2009) **72**:48–56. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.03.028
90. Gu J, Yang S, Ho EA. Biodegradable Film for the Targeted Delivery of siRNA-Loaded Nanoparticles to Vaginal Immune Cells. *Mol Pharm* (2015) **12**:2889–2903. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00073
91. Destache CJ, Mandal S, Yuan Z, Kang G, Date AA, Lu W, Shibata A, Pham R, Bruck P, Rezich M, et al. Topical Tenofovir Disoproxil Fumarate Nanoparticles Prevent HIV-1 Vaginal Transmission in a Humanized Mouse Model. *Antimicrob Agents Chemother* (2016) **60**:3633–3639. doi:10.1128/AAC.00450-16

92. Srinivasan P, Zhang J, Martin A, Kelley K, McNicholl JM, Buckheit RW, Smith JM, Ham AS. Safety and Pharmacokinetics of Quick-Dissolving Polymeric Vaginal Films Delivering the Antiretroviral IQP-0528 for Preexposure Prophylaxis. *Antimicrob Agents Chemother* (2016) **60**:4140–4150. doi:10.1128/AAC.00082-16
93. Jiang Y, Cao S, Bright DK, Bever AM, Blakney AK, Suydam IT, Woodrow KA. Nanoparticle-Based ARV Drug Combinations for Synergistic Inhibition of Cell-Free and Cell-Cell HIV Transmission. *Mol Pharm* (2015) **12**:4363–74. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00544
94. Kovarova M, Council OD, Date AA, Long JM, Nochii T, Belshan M, Shibata A, Vincent H, Baker CE, Thayer WO, et al. Nanoformulations of Rilpivirine for Topical Pericoital and Systemic Coitus-Independent Administration Efficiently Prevent HIV Transmission. *PLoS Pathog* (2015) **11**:e1005075. doi:10.1371/journal.ppat.1005075
95. Thomas C, Rawat A, Hope-Weeks L, Ahsan F. Aerosolized PLA and PLGA Nanoparticles Enhance Humoral, Mucosal and Cytokine Responses to Hepatitis B Vaccine. *Mol Pharm* (2011) **8**:405–415. doi:10.1021/mp100255c
96. Craparo EF, Di Gioia S, Trapani A, Cellamare S, Belgiovine G, Mandracchia D, Giammona G, Cavallaro G, Conese M. Realization of polyaspartamide-based nanoparticles and in vivo lung biodistribution evaluation of a loaded glucocorticoid after aerosolization in mice. *Int J Pharm* (2016) **510**:263–270. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.06.042
97. Amini MA, Faramarzi MA, Gilani K, Moazeni E, Esmaeilzadeh-Gharehdaghi E, Amani A. Production, characterisation, and *in vitro* nebulisation performance of budesonide-loaded PLA nanoparticles. *J Microencapsul* (2014) **31**:422–429. doi:10.3109/02652048.2013.871358
98. Said-Elbahr R, Nasr M, Alhnan MA, Taha I, Sammour O. Nebulizable colloidal nanoparticles co-encapsulating a COX-2 inhibitor and a herbal compound for treatment of lung cancer. *Eur J Pharm Biopharm* (2016) **103**:1–12. doi:10.1016/j.ejpb.2016.03.025
99. Ravikumar P, Menon JU, Punnakitikashem P, Gyawali D, Togao O, Takahashi M, Zhang J, Ye J, Moe OW, Nguyen KT, et al. Nanoparticle facilitated inhalational delivery of erythropoietin receptor cDNA protects against hyperoxic lung injury. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* (2016) **12**:811–821. doi:10.1016/j.nano.2015.10.004
100. Lee C, Seo J, Hwang HS, Thao LQ, Lee S, Lee ES, Lee EH, Choi H-G, Youn YS. Treatment of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by inhaled tacrolimus-loaded chitosan-coated poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles. *Biomed Pharmacother* (2016) **78**:226–233. doi:10.1016/j.biopha.2016.01.027
101. Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* (2005) **11**:S45–S53. doi:10.1038/nm1213
102. Hanson LR, Frey WH, II. Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease. *BMC Neurosci* (2008) **9 Suppl 3**:S5. doi:10.1186/1471-2202-9-S3-S5
103. Liu L, Zhang X, Li W, Sun H, Lou Y, Zhang X, Li F. Transferrin receptor antibody-modified  $\alpha$ -cobrotoxin-loaded nanoparticles enable drug delivery across the

- blood–brain barrier by intranasal administration. *J Nanoparticle Res* (2013) **15**:2059. doi:10.1007/s11051-013-2059-6
104. Zhang X, Liu L, Chai G, Zhang X, Li F. Brain pharmacokinetics of neurotoxin-loaded PLA nanoparticles modified with chitosan after intranasal administration in awake rats. *Drug Dev Ind Pharm* (2013) **39**:1618–1624. doi:10.3109/03639045.2012.727828
105. Wen Z, Yan Z, Hu K, Pang Z, Cheng X, Guo L, Zhang Q, Jiang X, Fang L, Lai R. Odorranalectin-conjugated nanoparticles: Preparation, brain delivery and pharmacodynamic study on Parkinson's disease following intranasal administration. *J Control Release* (2011) **151**:131–138. doi:10.1016/j.jconrel.2011.02.022
106. Bian J, Yuan Z, Chen X, Gao Y, Xu C, Shi J. Preparation of surface multiple-coated polylactide acid drug-loaded nanoparticles for intranasal delivery and evaluation on its brain-targeting efficiency. *Drug Deliv* (2016) **23**:269–276. doi:10.3109/10717544.2014.910566
107. Pawar D, Mangal S, Goswami R, Jaganathan KS. Development and characterization of surface modified PLGA nanoparticles for nasal vaccine delivery: Effect of mucoadhesive coating on antigen uptake and immune adjuvant activity. *Eur J Pharm Biopharm* (2013) doi:10.1016/j.ejpb.2013.06.017
108. Renukaradhya G, Binjawadagi B, Dwivedi V, Manickam C, Ouyang K, Wu Y, Lee J, Torrelles J. Adjuvanted poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticle-entrapped inactivated porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine elicits cross-protective immune response in pigs. *Int J Nanomedicine* (2014) **6**:679. doi:10.2147/IJN.S56127
109. Zhang C, Chen J, Feng C, Shao X, Liu Q, Zhang Q, Pang Z, Jiang X. Intranasal nanoparticles of basic fibroblast growth factor for brain delivery to treat Alzheimer's disease. *Int J Pharm* (2014) **461**:192–202. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.11.049
110. Mainardes RM, Khalil NM, Gremião MPD. Intranasal delivery of zidovudine by PLA and PLA–PEG blend nanoparticles. *Int J Pharm* (2010) **395**:266–271. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.05.020
111. Primard C, Poecheim J, Heuking S, Sublet E, Esmaeili F, Borchard G. Multifunctional PLGA-based nanoparticles encapsulating simultaneously hydrophilic antigen and hydrophobic immunomodulator for mucosal immunization. *Mol Pharm* (2013) **10**:2996–3004. doi:10.1021/mp400092y
112. Wang G, Pan L, Zhang Y, Wang Y, Zhang Z, Lü J, Zhou P, Fang Y, Jiang S. Intranasal delivery of cationic PLGA nano/microparticles-loaded FMDV DNA vaccine encoding IL-6 elicited protective immunity against FMDV challenge. *PLoS One* (2011) **6**:e27605. doi:10.1371/journal.pone.0027605
113. Mahajan N, Sakarkar D, Manmode A, Pathak V, Ingole R, Dewade D. Biodegradable Nanoparticles for Targeted Delivery in Treatment of Ulcerative Colitis. *Adv Sci Lett* (2011) **4**:349–356. doi:10.1166/asl.2011.1247
114. Anselmo AC, Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic. *Bioeng Transl Med* (2016) **1**:10–29. doi:10.1002/btm2.10003
115. Ehrlich A, Booher S, Becerra Y, Borris DL, Figg WD, Turner ML, Blauvelt A. Micellar paclitaxel improves severe psoriasis in a prospective phase II pilot study. *J Am*

- Acad Dermatol* (2004) **50**:533–540. doi:10.1016/j.jaad.2003.09.018
116. Ma P, Mumper RJ. Paclitaxel Nano-Delivery Systems: A Comprehensive Review. *J Nanomed Nanotechnol* (2013) **4**:1000164. doi:10.4172/2157-7439.1000164
117. Danhier F, Lecouturier N, Vroman B, Jérôme C, Marchand-Brynaert J, Feron O, Pr at V. Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation. *J Control Release* (2009) **133**:11–7. doi:10.1016/j.jconrel.2008.09.086
118. Sakai T, Kohno H, Ishihara T, Higaki M, Saito S, Matsushima M, Mizushima Y, Kitahara K. Treatment of experimental autoimmune uveoretinitis with poly(lactic acid) nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate. *Exp Eye Res* (2006) **82**:657–663. doi:10.1016/j.exer.2005.09.003
119. Wang J, Wang H, Li J, Liu Z, Xie H, Wei X, Lu D, Zhuang R, Xu X, Zheng S. iRGD-Decorated Polymeric Nanoparticles for the Efficient Delivery of Vandetanib to Hepatocellular Carcinoma: Preparation and in Vitro and in Vivo Evaluation. *ACS Appl Mater Interfaces* (2016) **8**:19228–19237. doi:10.1021/acsami.6b03166
120. Ye M, Wang X, Tang J, Guo Z, Shen Y, Tian H, Zhu W-H. Dual-channel NIR activatable theranostic prodrug for in vivo spatiotemporal tracking thiol-triggered chemotherapy. *Chem Sci* (2016) **7**:4958–4965. doi:10.1039/C6SC00970K
121. Ling X, Huang Z, Wang J, Xie J, Feng M, Chen Y, Abbas F, Tu J, Wu J, Sun C. Development of an itraconazole encapsulated polymeric nanoparticle platform for effective antifungal therapy. *J Mater Chem B* (2016) **4**:1787–1796. doi:10.1039/C5TB02453F
122. Samonina-Kosicka J, Weitzel DH, Hofmann CL, Hendargo H, Hanna G, Dewhirst MW, Palmer GM, Fraser CL. Luminescent Difluoroboron  $\beta$ -Diketonate PEG-PLA Oxygen Nanosensors for Tumor Imaging. *Macromol Rapid Commun* (2015) **36**:694–699. doi:10.1002/marc.201500022
123. Branquinho RT, Mosqueira VCF, Oliveira-Silva JCV d., Simoes-Silva MR, Saude-Guimaraes DA, Lana M d. Sesquiterpene Lactone in Nanostructured Parenteral Dosage Form Is Efficacious in Experimental Chagas Disease. *Antimicrob Agents Chemother* (2014) **58**:2067–2075. doi:10.1128/AAC.00617-13
124. Chang R-A, Chen Z, Li Z-F. Role of HGF-loaded nanoparticles in treating rat acute hepatic failure. *Hepatogastroenterology* (2013) **60**:1720–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24634942> [Accessed September 13, 2016]
125. Nakagawa K, Miyazawa T, Harigae T, Onuma R, Kimura F, Fujii T, Miyazawa T. Distribution of  $\beta$ -carotene-encapsulated polysorbate 80-coated poly(D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles in rodent tissues following intravenous administration. *Int J Nanomedicine* (2015) 7223. doi:10.2147/IJN.S94336
126. Nakano Y, Matoba T, Tokutome M, Funamoto D, Katsuki S, Ikeda G, Nagaoka K, Ishikita A, Nakano K, Koga J, et al. Nanoparticle-Mediated Delivery of Irbesartan Induces Cardioprotection from Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury by Antagonizing Monocyte-Mediated Inflammation. *Sci Rep* (2016) **6**:29601. doi:10.1038/srep29601
127. Jogala S, Rachamalla SS, Aukunuru J. Development of PEG-PLGA based

- Intravenous Low Molecular Weight Heparin (LMWH) Nanoparticles Intended to Treat Venous Thrombosis. *Curr Drug Deliv* (2016) **13**:698–710. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26777886> [Accessed September 13, 2016]
128. Aldayel AM, Naguib YW, O'Mary HL, Li X, Niu M, Ruwona TB, Cui Z. Acid-Sensitive Sheddable PEGylated PLGA Nanoparticles Increase the Delivery of TNF- $\alpha$  siRNA in Chronic Inflammation Sites. *Mol Ther Acids* (2016) **5**:e340. doi:10.1038/mtna.2016.39
  129. Sharma D, Sharma RK, Bhatnagar A, Nishad DK, Singh T, Gabrani R, Sharma SK, Ali J, Dang S. Nose to Brain Delivery of Midazolam Loaded PLGA Nanoparticles: In Vitro and In Vivo Investigations. *Curr Drug Deliv* (2016) **13**:557–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25961795> [Accessed September 13, 2016]
  130. Tomoda K, Watanabe A, Suzuki K, Inagi T, Terada H, Makino K. Enhanced transdermal permeability of estradiol using combination of PLGA nanoparticles system and iontophoresis. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* (2012) **97**:84–89. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.04.002
  131. Tiwari S, Dwivedi H, Kymonil KM, Saraf SA. Urate crystal degradation for treatment of gout: a nanoparticulate combination therapy approach. *Drug Deliv Transl Res* (2015) **5**:219–230. doi:10.1007/s13346-015-0219-1
  132. Shi L, Wang X, Tu Q, Wang H, Zhang H, Wang P, Zhang L, Huang Z, Wang X, Zhao F, et al. Treating cutaneous squamous cell carcinoma using 5-aminolevulinic acid polylactic-co-glycolic acid nanoparticle-mediated photodynamic therapy in a mouse model. *Int J Nanomedicine* (2015) 347. doi:10.2147/IJN.S71245
  133. Badihi A, Debotton N, Frušić-Zlotkin M, Soroka Y, Neuman R, Benita S. Enhanced cutaneous bioavailability of dehydroepiandrosterone mediated by nano-encapsulation. *J Control Release* (2014) **189**:65–71. doi:10.1016/j.jconrel.2014.06.019
  134. da Silva CL, Del Ciampo JO, Rossetti FC, Bentley MVLB, Pierre MBR. Improved *In vitro* and *In vivo* Cutaneous Delivery of Protoporphyrin IX from PLGA-based Nanoparticles. *Photochem Photobiol* (2013) **89**:1176–1184. doi:10.1111/php.12121
  135. Özcan İ, Azizoğlu E, Şenyiğit T, Özyazıcı M, Özer Ö. Comparison of PLGA and lecithin/chitosan nanoparticles for dermal targeting of betamethasone valerate. *J Drug Target* (2013) **21**:542–550. doi:10.3109/1061186X.2013.769106
  136. Ito F, Takahashi T, Kanamura K, Kawakami H. Possibility for the development of cosmetics with PLGA nanospheres. *Drug Dev Ind Pharm* (2013) **39**:752–761. doi:10.3109/03639045.2012.696653
  137. Shah PP, Desai PR, Patel AR, Singh MS. Skin permeating nanogel for the cutaneous co-delivery of two anti-inflammatory drugs. *Biomaterials* (2012) **33**:1607–1617. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.11.011
  138. Liu Y, Feng L, Liu T, Zhang L, Yao Y, Yu D, Wang L, Zhang N. Multifunctional pH-sensitive polymeric nanoparticles for theranostics evaluated experimentally in cancer. *Nanoscale* (2014) **6**:3231. doi:10.1039/c3nr05647c
  139. Yang N, Jiang Y, Zhang H, Sun B, Hou C, Zheng J, Liu Y, Zuo P. Active Targeting

Docetaxel-PLA Nanoparticles Eradicate Circulating Lung Cancer Stem-like Cells and Inhibit Liver Metastasis. *Mol Pharm* (2015) **12**:232–239. doi:10.1021/mp500568z

140. Liard C, Munier S, Arias M, Joulin-Giet A, Bonduelle O, Duffy D, Shattock RJ, Verrier B, Combadière B. Targeting of HIV-p24 particle-based vaccine into differential skin layers induces distinct arms of the immune responses. *Vaccine* (2011) **29**:6379–91. doi:10.1016/j.vaccine.2011.04.080
141. Ayari-Riabi S, Trimaille T, Mabrouk K, Bertin D, Gigmès D, Benlasfar Z, Zaghmi A, Bouhaouala-Zahar B, Elayeb M. Venom conjugated polylactide applied as biocompatible material for passive and active immunotherapy against scorpion envenomation. *Vaccine* (2016) **34**:1810–1815. doi:10.1016/j.vaccine.2016.02.030
142. Rosalia RA, Cruz LJ, van Duikeren S, Tromp AT, Silva AL, Jiskoot W, de Gruijl T, Löwik C, Oostendorp J, van der Burg SH, et al. CD40-targeted dendritic cell delivery of PLGA-nanoparticle vaccines induce potent anti-tumor responses. *Biomaterials* (2015) **40**:88–97. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.10.053
143. Cappellano G, Woldetsadik AD, Orilieri E, Shivakumar Y, Rizzi M, Carniato F, Gigliotti CL, Boggio E, Clemente N, Comi C, et al. Subcutaneous inverse vaccination with PLGA particles loaded with a MOG peptide and IL-10 decreases the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Vaccine* (2014) **32**:5681–5689. doi:10.1016/j.vaccine.2014.08.016
144. Margaroni M, Agallou M, Kontonikola K, Karidi K, Kammona O, Kiparissides C, Gaitanaki C, Karagouni E. PLGA nanoparticles modified with a TNF $\alpha$  mimicking peptide, soluble Leishmania antigens and MPLA induce T cell priming in vitro via dendritic cell functional differentiation. *Eur J Pharm Biopharm* (2016) **105**:18–31. doi:10.1016/j.ejpb.2016.05.018
145. Rancan F, Amselgruber S, Hadam S, Munier S, Pavot V, Verrier B, Hackbarth S, Combadière B, Blume-Peytavi U, Vogt A. Particle-based transcutaneous administration of HIV-1 p24 protein to human skin explants and targeting of epidermal antigen presenting cells. *J Control Release* (2014) **176**:115–122. doi:10.1016/j.jconrel.2013.12.022
146. Nagai N, Ito Y. Therapeutic Effects of Gel Ointments Containing Tranilast Nanoparticles on Paw Edema in Adjuvant-Induced Arthritis Rats. *Biol Pharm Bull* (2014) **37**:96–104. doi:10.1248/bpb.b13-00630
147. Vučen SR, Vuleta G, Crean AM, Moore AC, Ignjatović N, Uskoković D. Improved percutaneous delivery of ketoprofen using combined application of nanocarriers and silicon microneedles. *J Pharm Pharmacol* (2013) **65**:1451–1462. doi:10.1111/jphp.12118
148. Zaric M, Lyubomska O, Touzelet O, Poux C, Al-Zahrani S, Fay F, Wallace L, Terhorst D, Malissen B, Henri S, et al. Skin Dendritic Cell Targeting via Microneedle Arrays Laden with Antigen-Encapsulated Poly- d , l -lactide- co - Glycolide Nanoparticles Induces Efficient Antitumor and Antiviral Immune Responses. *ACS Nano* (2013) **7**:2042–2055. doi:10.1021/nn304235j
149. Kumar A, Wonganan P, Sandoval MA, Li X, Zhu S, Cui Z. Microneedle-mediated transcutaneous immunization with plasmid DNA coated on cationic PLGA nanoparticles. *J Control Release* (2012) **163**:230–239. doi:10.1016/j.jconrel.2012.08.011

150. Tomoda K, Terashima H, Suzuki K, Inagi T, Terada H, Makino K. Enhanced transdermal delivery of indomethacin using combination of PLGA nanoparticles and iontophoresis in vivo. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* (2012) **92**:50–54. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.11.016
151. Guo Y, Wang D, Song Q, Wu T, Zhuang X, Bao Y, Kong M, Qi Y, Tan S, Zhang Z. Erythrocyte Membrane-Enveloped Polymeric Nanoparticles as Nanovaccine for Induction of Antitumor Immunity against Melanoma. *ACS Nano* (2015) **9**:6918–6933. doi:10.1021/acsnano.5b01042
152. Posadowska U, Brzychczy-Włoch M, Drożdż A, Krok-Borkowicz M, Włodarczyk-Biegun M, Dobrzyński P, Chrzanowski W, Pamuła E. Injectable hybrid delivery system composed of gellan gum, nanoparticles and gentamicin for the localized treatment of bone infections. *Expert Opin Drug Deliv* (2016) **13**:613–620. doi:10.1517/17425247.2016.1146673
153. Singh SM, Alkie TN, Nagy É, Kulkarni RR, Hodgins DC, Sharif S. Delivery of an inactivated avian influenza virus vaccine adjuvanted with poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) encapsulated CpG ODN induces protective immune responses in chickens. *Vaccine* (2016) **34**:4807–4813. doi:10.1016/j.vaccine.2016.08.009
154. Zhang X, Jackson JK, Burt HM. Development of amphiphilic diblock copolymers as micellar carriers of taxol. *Int J Pharm* (1996) **132**:195–206. doi:10.1016/0378-5173(95)04386-1
155. Pandya S, Verma RK, Khare P, Tiwari B, Srinivasarao DA, Dube A, Goyal N, Misra A. Supplementation of host response by targeting nitric oxide to the macrophage cytosol is efficacious in the hamster model of visceral leishmaniasis and adds to efficacy of amphotericin B. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* (2016) **6**:125–132. doi:10.1016/j.ijpddr.2016.01.001
156. Sahoo SK, Ma W, Labhasetwar V. Efficacy of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles in a murine model of prostate cancer. *Int J Cancer* (2004) **112**:335–40. doi:10.1002/ijc.20405
157. Zhu Q, Talton J, Zhang G, Cunningham T, Wang Z, Waters RC, Kirk J, Eppler B, Klinman DM, Sui Y, et al. Large intestine-targeted, nanoparticle-releasing oral vaccine to control genitorectal viral infection. *Nat Med* (2012) **18**:1291–1296. doi:10.1038/nm.2866
158. Patel RR, Chaurasia S, Khan G, Chaubey P, Kumar N, Mishra B. Cromolyn sodium encapsulated PLGA nanoparticles: An attempt to improve intestinal permeation. *Int J Biol Macromol* (2016) **83**:249–258. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.11.084
159. Semete B, Booyesen L, Lemmer Y, Kalombo L, Katata L, Verschoor J, Swai HS. In vivo evaluation of the biodistribution and safety of PLGA nanoparticles as drug delivery systems. *Nanomedicine* (2010) **6**:662–71. doi:10.1016/j.nano.2010.02.002
160. Saini P, Ganugula R, Arora M, Kumar MNVR, Cheng CJ, Tietjen GT, Saucier-Sawyer JK, Saltzman WM, Mura S, Nicolas J, et al. The Next Generation Non-competitive Active Polyester Nanosystems for Transferrin Receptor-mediated Peroral Transport Utilizing Gambogic Acid as a Ligand. *Sci Rep* (2016) **6**:29501. doi:10.1038/srep29501
161. Navarro SM, Morgan TW, Astete CE, Stout RW, Coulon D, Mottram P, Sabliov

- CM. Biodistribution and toxicity of orally administered poly (lactic-co-glycolic) acid nanoparticles to F344 rats for 21 days. *Nanomedicine* (2016) **11**:1653–1669. doi:10.2217/nnm-2016-0022
162. Joshi G, Kumar A, Sawant K. Bioavailability enhancement, Caco-2 cells uptake and intestinal transport of orally administered lopinavir-loaded PLGA nanoparticles. *Drug Deliv* (2016) 1–13. doi:10.1080/10717544.2016.1199605
163. Garinot M, Fiévez V, Pourcelle V, Stoffelbach F, des Rieux A, Plapied L, Theate I, Freichels H, Jérôme C, Marchand-Brynaert J, et al. PEGylated PLGA-based nanoparticles targeting M cells for oral vaccination. *J Control Release* (2007) **120**:195–204. doi:10.1016/j.jconrel.2007.04.021
164. Ali H, Weigmann B, Collnot E-M, Khan SA, Windbergs M, Lehr C-M. Budesonide Loaded PLGA Nanoparticles for Targeting the Inflamed Intestinal Mucosa—Pharmaceutical Characterization and Fluorescence Imaging. *Pharm Res* (2016) **33**:1085–1092. doi:10.1007/s11095-015-1852-6
165. Pawar D, Goyal AK, Mangal S, Mishra N, Vaidya B, Tiwari S, Jain AK, Vyas SP. Evaluation of mucoadhesive PLGA microparticles for nasal immunization. *AAPS J* (2010) **12**:130–7. doi:10.1208/s12248-009-9169-1
166. Sharma D, Sharma RK, Sharma N, Gabrani R, Sharma SK, Ali J, Dang S. Nose-To-Brain Delivery of PLGA-Diazepam Nanoparticles. *AAPS PharmSciTech* (2015) **16**:1108–1121. doi:10.1208/s12249-015-0294-0
167. Sharma D, Maheshwari D, Philip G, Rana R, Bhatia S, Singh M, Gabrani R, Sharma SK, Ali J, Sharma RK, et al. Formulation and optimization of polymeric nanoparticles for intranasal delivery of lorazepam using Box-Behnken design: in vitro and in vivo evaluation. *Biomed Res Int* (2014) **2014**:156010. doi:10.1155/2014/156010
168. Csaba N, Sánchez A, Alonso MJ. PLGA: Poloxamer and PLGA: Poloxamine blend nanostructures as carriers for nasal gene delivery. *J Control Release* (2006) **113**:164–172. doi:10.1016/j.jconrel.2006.03.017
169. Vila A, Gill H, McCallion O, Alonso MJ. Transport of PLA-PEG particles across the nasal mucosa: effect of particle size and PEG coating density. *J Control Release* (2004) **98**:231–244. doi:10.1016/j.jconrel.2004.04.026
170. Pawar D, Mangal S, Goswami R, Jaganathan KS. Development and characterization of surface modified PLGA nanoparticles for nasal vaccine delivery: Effect of mucoadhesive coating on antigen uptake and immune adjuvant activity. *Eur J Pharm Biopharm* (2013) **85**:550–559. doi:10.1016/j.ejpb.2013.06.017
171. Ungaro F, d'Angelo I, Coletta C, d'Emmanuele di Villa Bianca R, Sorrentino R, Perfetto B, Tufano MA, Miro A, La Rotonda MI, Quaglia F. Dry powders based on PLGA nanoparticles for pulmonary delivery of antibiotics: Modulation of encapsulation efficiency, release rate and lung deposition pattern by hydrophilic polymers. *J Control Release* (2012) **157**:149–159. doi:10.1016/j.jconrel.2011.08.010
172. Raesch SS, Tenzer S, Storck W, Rurainski A, Selzer D, Ruge CA, Perez-Gil J, Schaefer UF, Lehr C-M. Proteomic and Lipidomic Analysis of Nanoparticle Corona upon Contact with Lung Surfactant Reveals Differences in Protein, but Not Lipid Composition. *ACS Nano* (2015) **9**:11872–11885.

173. Lee C, Seo J, Hwang HS, Thao LQ, Lee S, Lee ES, Lee EH, Choi H-G, Youn YS. Treatment of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by inhaled tacrolimus-loaded chitosan-coated poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles. *Biomed Pharmacother* (2016) **78**:226–233. doi:10.1016/j.biopha.2016.01.027
174. Aragao-Santiago L, Hillaireau H, Grabowski N, Mura S, Nascimento TL, Dufort S, Coll J-L, Tsapis N, Fattal E. Compared *in vivo* toxicity in mice of lung delivered biodegradable and non-biodegradable nanoparticles. *Nanotoxicology* (2016) **10**:292–302. doi:10.3109/17435390.2015.1054908
175. Giovino C, Ayensu I, Tetteh J, Boateng JS. An integrated buccal delivery system combining chitosan films impregnated with peptide loaded PEG-b-PLA nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces* (2013) **112C**:9–15. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.07.019
176. Liu S, Dozois MD, Chang CN, Ahmad A, Ng DLT, Hileeto D, Liang H, Reyad M-M, Boyd S, Jones LW, et al. Prolonged Ocular Retention of Mucoadhesive Nanoparticle Eye Drop Formulation Enables Treatment of Eye Diseases Using Significantly Reduced Dosage. *Mol Pharm* (2016) **13**:2897–2905. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.6b00445
177. Gupta H, Aqil M, Khar RK, Ali A, Bhatnagar A, Mittal G. Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* (2010) **6**:324–333. doi:10.1016/j.nano.2009.10.004
178. García ML, Pérez Y, Gómara MJ, Vasconcelos A, Vega E, Haro I. Conjugation of cell-penetrating peptides with poly(lactic-co-glycolic acid)-polyethylene glycol nanoparticles improves ocular drug delivery. *Int J Nanomedicine* (2015) **Volume 10**:609. doi:10.2147/IJN.S71198
179. Vega E, Egea MA, Calpena AC, Espina M, García ML. Role of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on freeze-dried and gamma-irradiated PLGA and PLGA-PEG diblock copolymer nanospheres for ophthalmic flurbiprofen delivery. *Int J Nanomedicine* (2012) **7**:1357–71. doi:10.2147/IJN.S28481
180. Cho YK, Uehara H, Young JR, Tyagi P, Kompella UB, Zhang X, Luo L, Singh N, Archer B, Ambati BK, et al. Flt23k Nanoparticles Offer Additive Benefit in Graft Survival and Anti-Angiogenic Effects When Combined with Triamcinolone. *Investig Ophthalmology Vis Sci* (2012) **53**:2328. doi:10.1167/iovs.11-8393
181. Bourges J-L, Gautier SE, Delie F, Bejjani RA, Jeanny J-C, Gurny R, BenEzra D, Behar-Cohen FF. Ocular Drug Delivery Targeting the Retina and Retinal Pigment Epithelium Using Polylactide Nanoparticles. *Investig Ophthalmology Vis Sci* (2003) **44**:3562. doi:10.1167/iovs.02-1068
182. Ensign LM, Cone R, Hanes J. Nanoparticle-based drug delivery to the vagina: a review. *J Control Release* (2014) **190**:500–14. doi:10.1016/j.jconrel.2014.04.033
183. Xu Q, Ensign LM, Boylan NJ, Schön A, Gong X, Yang J-C, Lamb NW, Cai S, Yu T, Freire E, et al. Impact of Surface Polyethylene Glycol (PEG) Density on Biodegradable Nanoparticle Transport in Mucus *ex Vivo* and Distribution in Vivo. *ACS Nano* (2015) **9**:9217–27. doi:10.1021/acsnano.5b03876
184. Cu Y, Booth CJ, Saltzman WM. *In vivo* distribution of surface-modified PLGA nanoparticles following intravaginal delivery. *J Control Release* (2011) **156**:258–264. doi:10.1016/j.jconrel.2011.06.036

185. Woodrow KA, Cu Y, Booth CJ, Saucier-Sawyer JK, Wood MJ, Mark Saltzman W. Intravaginal gene silencing using biodegradable polymer nanoparticles densely loaded with small-interfering RNA. *Nat Mater* (2009) **8**:526–533. doi:10.1038/nmat2444
186. Stan R V. Channels across Endothelial Cells. (2013)
187. Howard M, Zern BJ, Anselmo AC, Shuvaev V V., Mitragotri S, Muzykantov V. Vascular Targeting of Nanocarriers: Perplexing Aspects of the Seemingly Straightforward Paradigm. *ACS Nano* (2014) **8**:4100–4132. doi:10.1021/nn500136z
188. Davda J, Labhasetwar V. Characterization of nanoparticle uptake by endothelial cells. *Int J Pharm* (2002) **233**:51–59. doi:10.1016/S0378-5173(01)00923-1
189. Danhier F, Pourcelle V, Marchand-Brynaert J, Jérôme C, Feron O, Préat V. “Chapter eight – Targeting of Tumor Endothelium by RGD-Grafted PLGA-Nanoparticles,” in *Methods in Enzymology*, 157–175. doi:10.1016/B978-0-12-391860-4.00008-2
190. Sobczynski DJ, Charoenphol P, Heslinga MJ, Onyskiw PJ, Namdee K, Thompson AJ, Eniola-Adefeso O, Allen T, Cullis P, Hajitou A, et al. Plasma Protein Corona Modulates the Vascular Wall Interaction of Drug Carriers in a Material and Donor Specific Manner. *PLoS One* (2014) **9**:e107408. doi:10.1371/journal.pone.0107408
191. Sheng Y, Yuan Y, Liu C, Tao X, Shan X, Xu F. In vitro macrophage uptake and in vivo biodistribution of PLA–PEG nanoparticles loaded with hemoglobin as blood substitutes: effect of PEG content. *J Mater Sci Mater Med* (2009) **20**:1881–1891. doi:10.1007/s10856-009-3746-9
192. Guan Q, Sun S, Li X, Lv S, Xu T, Sun J, Feng W, Zhang L, Li Y. Preparation, in vitro and in vivo evaluation of mPEG-PLGA nanoparticles co-loaded with syringopicroside and hydroxytyrosol. *J Mater Sci Mater Med* (2016) **27**:24. doi:10.1007/s10856-015-5641-x
193. Crawford L, Higgins J, Putnam D, Xiao RZ, Pulkkinen M, Andersson-Engels S, Klinteberg C, Svanberg K, Svanberg S, Andersson-Engels S, et al. A Simple and Sensitive Method to Quantify Biodegradable Nanoparticle Biodistribution using Europium Chelates. *Sci Rep* (2015) **5**:13177. doi:10.1038/srep13177
194. Mohammad AK, Reineke JJ. Quantitative detection of PLGA nanoparticle degradation in tissues following intravenous administration. *Mol Pharm* (2013) **10**:2183–9. doi:10.1021/mp300559v
195. Grabowski N, Hillaireau H, Vergnaud J, Tsapis N, Pallardy M, Kerdine-Römer S, Fattal E. Surface coating mediates the toxicity of polymeric nanoparticles towards human-like macrophages. *Int J Pharm* (2015) **482**:75–83. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.11.042
196. Doke SK, Dhawale SC. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharm J* (2015) **23**:223–229. doi:10.1016/j.jsps.2013.11.002
197. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, Collins JE, Humphray S, McLaren K, Matthews L, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* (2013) **496**:498–503. doi:10.1038/nature12111

198. Geisler R. KIT - European Zebrafish Resource Center (EZRC) - Search Fish Lines. (2016)
199. Morpholino Antisense Oligos | Gene Tools, LLC. Available at: [http://www.gene-tools.com/morpholino\\_antisense\\_oligos](http://www.gene-tools.com/morpholino_antisense_oligos)
200. Vogan K. Zebrafish mutants versus morphants. *Nat Genet* (2015) **47**:105–105. doi:10.1038/ng.3208
201. Gemberling M, Bailey TJ, Hyde DR, Poss KD. The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. *Trends Genet* (2013) **29**:611–620. doi:10.1016/j.tig.2013.07.003
202. Renshaw SA, Trede NS. A model 450 million years in the making: zebrafish and vertebrate immunity. *Dis Model Mech* (2012) **5**:38–47. doi:10.1242/dmm.007138
203. Delaune EA, François P, Shih NP, Amacher SL. Single-cell-resolution imaging of the impact of Notch signaling and mitosis on segmentation clock dynamics. *Dev Cell* (2012) **23**:995–1005. doi:10.1016/j.devcel.2012.09.009
204. Pagnon-Minot A, Malbouyres M, Haftek-Terreau Z, Kim HR, Sasaki T, Thisse C, Thisse B, Ingham PW, Ruggiero F, Le Guellec D. Collagen XV, a novel factor in zebrafish notochord differentiation and muscle development. *Dev Biol* (2008) **316**:21–35. doi:10.1016/j.ydbio.2007.12.033
205. Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* (2007) **8**:353–367. doi:10.1038/nrg2091
206. Yoder JA, Nielsen ME, Amemiya CT, Litman GW. Zebrafish as an immunological model system. *Microbes Infect* (2002) **4**:1469–78. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12475637> [Accessed November 4, 2016]
207. Feng Y, Martin P. Imaging innate immune responses at tumour initiation: new insights from fish and flies. *Nat Rev Cancer* (2015) **15**:556–562. doi:10.1038/nrc3979
208. Sunyer JO. Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system. *Nat Immunol* (2013) **14**:320–6. doi:10.1038/ni.2549
209. Palha N, Guivel-Benhassine F, Briolat V, Lutfalla G, Sourisseau M, Ellett F, Wang C-H, Lieschke GJ, Herbomel P, Schwartz O, et al. Real-time whole-body visualization of Chikungunya Virus infection and host interferon response in zebrafish. *PLoS Pathog* (2013) **9**:e1003619. doi:10.1371/journal.ppat.1003619
210. Levraud J-P, Palha N, Langevin C, Boudinot P. Through the looking glass: witnessing host-virus interplay in zebrafish. *Trends Microbiol* (2014) **22**:490–7. doi:10.1016/j.tim.2014.04.014
211. Fenaroli F, Westmoreland D, Benjaminsen J, Kolstad T, Skjeldal FM, Meijer AH, van der Vaart M, Ulanova L, Roos N, Nyström B, et al. Nanoparticles as drug delivery system against tuberculosis in zebrafish embryos: direct visualization and treatment. *ACS Nano* (2014) **8**:7014–26. doi:10.1021/nn5019126
212. Richardson R, Slanchev K, Kraus C, Knyphausen P, Eming S, Hammerschmidt M. Adult zebrafish as a model system for cutaneous wound-healing research. *J Invest Dermatol* (2013) **133**:1655–65. doi:10.1038/jid.2013.16
213. Richardson R, Metzger M, Knyphausen P, Ramezani T, Slanchev K, Kraus C,

- Schmelzer E, Hammerschmidt M. Re-epithelialization of cutaneous wounds in adult zebrafish combines mechanisms of wound closure in embryonic and adult mammals. *Development* (2016) **143**:2077–88. doi:10.1242/dev.130492
214. Newman M, Ebrahimie E, Lardelli M. Using the zebrafish model for Alzheimer's disease research. *Front Genet* (2014) **5**:189. doi:10.3389/fgene.2014.00189
215. Makhija DT, Jagtap AG. Studies on sensitivity of zebrafish as a model organism for Parkinson's disease: Comparison with rat model. *J Pharmacol Pharmacother* (2014) **5**:39–46. doi:10.4103/0976-500X.124422
216. EURL ECVAM Recommendation on the Zebrafish Embryo Acute Toxicity Test Method (ZFET) for Acute Aquatic Toxicity Testing - European Commission. Available at: <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-zebrafish-embryo-acute-toxicity-test-method-zfet-acute-aquatic>
217. Dai Y-J, Jia Y-F, Chen N, Bian W-P, Li Q-K, Ma Y-B, Chen Y-L, Pei D-S. Zebrafish as a model system to study toxicology. *Environ Toxicol Chem* (2014) **33**:11–7. doi:10.1002/etc.2406
218. MacRae CA, Peterson RT. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* (2015) **14**:721–731. doi:10.1038/nrd4627
219. Zon LI, Peterson RT. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Drug Discov* (2005) **4**:35–44. doi:10.1038/nrd1606
220. Pardo-Martin C, Chang T-Y, Koo BK, Gilleland CL, Wasserman SC, Yanik MF. High-throughput in vivo vertebrate screening. *Nat Methods* (2010) **7**:634–636. doi:10.1038/nmeth.1481
221. Kaufman CK, Mosimann C, Fan ZP, Yang S, Thomas AJ, Ablain J, Tan JL, Fogley RD, van Rooijen E, Hagedorn EJ, et al. A zebrafish melanoma model reveals emergence of neural crest identity during melanoma initiation. *Science* (2016) **351**:aad2197. doi:10.1126/science.aad2197
222. Mimeault M, Batra SK. Emergence of zebrafish models in oncology for validating novel anticancer drug targets and nanomaterials. *Drug Discov Today* (2013) **18**:128–40. doi:10.1016/j.drudis.2012.08.002
223. Teng Y, Xie X, Walker S, White DT, Mumm JS, Cowell JK, Siegel R, Naishadham D, Jemal A, Yokota J, et al. Evaluating human cancer cell metastasis in zebrafish. *BMC Cancer* (2013) **13**:453. doi:10.1186/1471-2407-13-453
224. Mercatali L, La Manna F, Groenewoud A, Casadei R, Recine F, Miserocchi G, Pieri F, Liverani C, Bongiovanni A, Spadazzi C, et al. Development of a Patient-Derived Xenograft (PDX) of Breast Cancer Bone Metastasis in a Zebrafish Model. *Int J Mol Sci* (2016) **17**: doi:10.3390/ijms17081375
225. ZFAP -- Home Page --. Available at: <http://zebrafish.anatomyportal.org/>
226. Bio-Atlas - Bio-Atlas. Available at: <http://bio-atlas.psu.edu/zf/>
227. Menke AL, Spitsbergen JM, Wolterbeek APM, Woutersen RA. Normal Anatomy and Histology of the Adult Zebrafish. *Toxicol Pathol* (2011) **39**:759–775. doi:10.1177/0192623311409597
228. Schwendinger-Schreck J. The Zebrafish: Atlas of Macroscopic and

MicroscopicAnatomy. *Yale J Biol Med* (2013) **86**:435.

229. Hansen A, Zeiske E. The peripheral olfactory organ of the zebrafish, *Danio rerio*: an ultrastructural study. *Chem Senses* (1998) **23**:39–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9530968> [Accessed November 5, 2016]
230. Wallace KN, Akhter S, Smith EM, Lorent K, Pack M. Intestinal growth and differentiation in zebrafish. *Mech Dev* (2005) **122**:157–73. doi:10.1016/j.mod.2004.10.009
231. Wilson JM, Laurent P. Fish gill morphology: inside out. *J Exp Zool* (2002) **293**:192–213. doi:10.1002/jez.10124
232. van der Meer DLM, van den Thillart GEEJM, Witte F, de Bakker MAG, Besser J, Richardson MK, Spaik HP, Leito JTD, Bagowski CP. Gene expression profiling of the long-term adaptive response to hypoxia in the gills of adult zebrafish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2005) **289**:R1512–9. doi:10.1152/ajpregu.00089.2005
233. Horng J-L, Lin L-Y, Hwang P-P. Functional regulation of H<sup>+</sup>-ATPase-rich cells in zebrafish embryos acclimated to an acidic environment. *Am J Physiol Cell Physiol* (2009) **296**:C682–92. doi:10.1152/ajpcell.00576.2008
234. Evans DH, Piermarini PM, Choe KP. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol Rev* (2005) **85**:97–177. doi:10.1152/physrev.00050.2003
235. Hsia CCW, Schmitz A, Lambertz M, Perry SF, Maina JN. "Evolution of Air Breathing: Oxygen Homeostasis and the Transitions from Water to Land and Sky," in *Comprehensive Physiology* (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), 849–915. doi:10.1002/cphy.c120003
236. Haugarvoll E, Bjerkås I, Nowak BF, Hordvik I, Koppang EO. Identification and characterization of a novel intraepithelial lymphoid tissue in the gills of Atlantic salmon. *J Anat* (2008) **213**:202–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19172734> [Accessed July 21, 2016]
237. Le Guellec D, Morvan-Dubois G, Sire J-Y. Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (*Danio rerio*). *Int J Dev Biol* (2004) **48**:217–31. doi:10.1387/ijdb.031768dg
238. Chang W-J, Hwang P-P. Development of zebrafish epidermis. *Birth Defects Res C Embryo Today* (2011) **93**:205–14. doi:10.1002/bdrc.20215
239. Siderits D, Bielek E. Rodlet cells in the thymus of the zebrafish *Danio rerio* (Hamilton, 1822). *Fish Shellfish Immunol* (2009) **27**:539–48. doi:10.1016/j.fsi.2009.06.020
240. Schorpp M, Leicht M, Nold E, Hammerschmidt M, Haas-Assenbaum A, Wiest W, Boehm T. A zebrafish orthologue (whnb) of the mouse nude gene is expressed in the epithelial compartment of the embryonic thymic rudiment. *Mech Dev* (2002) **118**:179–185. doi:10.1016/S0925-4773(02)00241-1
241. Schlenk D, Benson WH. *Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts*. Taylor & Francis (2001).
242. Yin C, Evason KJ, Maher JJ, Stainier DYR. The basic helix-loop-helix transcription

- factor, heart and neural crest derivatives expressed transcript 2, marks hepatic stellate cells in zebrafish: analysis of stellate cell entry into the developing liver. *Hepatology* (2012) **56**:1958–70. doi:10.1002/hep.25757
243. Winau F, Hegasy G, Weiskirchen R, Weber S, Cassan C, Sieling PA, Modlin RL, Liblau RS, Gressner AM, Kaufmann SHE, et al. Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. *Immunity* (2007) **26**:117–29. doi:10.1016/j.immuni.2006.11.011
244. Hofmann J, Greter M, Du Pasquier L, Becher B. B-cells need a proper house, whereas T-cells are happy in a cave: the dependence of lymphocytes on secondary lymphoid tissues during evolution. *Trends Immunol* (2010) **31**:144–153. doi:10.1016/j.it.2010.01.003
245. Isogai S, Horiguchi M, Weinstein BM. The vascular anatomy of the developing zebrafish: an atlas of embryonic and early larval development. *Dev Biol* (2001) **230**:278–301. doi:10.1006/dbio.2000.9995
246. Yaniv K, Isogai S, Castranova D, Dye L, Hitomi J, Weinstein BM. Live imaging of lymphatic development in the zebrafish. *Nat Med* (2006) **12**:711–716. doi:10.1038/nm1427
247. Nagasawa T, Nakayasu C, Rieger AM, Barreda DR, Somamoto T, Nakao M. Phagocytosis by Thrombocytes is a Conserved Innate Immune Mechanism in Lower Vertebrates. *Front Immunol* (2014) **5**:445. doi:10.3389/fimmu.2014.00445
248. Ferguson HW, Claxton MJ, Moccia RD, Wilkie EJ. The quantitative clearance of bacteria from the bloodstream of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Vet Pathol* (1982) **19**:687–99. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7147628> [Accessed December 8, 2015]
249. Charles A Janeway J, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. The front line of host defense. (2001)
250. Broz P, Monack DM. Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol* (2013) **13**:551–565. doi:10.1038/nri3479
251. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* (2008) **9**:503–10. doi:10.1038/ni1582
252. Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat Immunol* (2014) **15**:602–11. doi:10.1038/ni.2921
253. Franken L, Schiwon M, Kurts C. Macrophages: sentinels and regulators of the immune system. *Cell Microbiol* (2016) **18**:475–87. doi:10.1111/cmi.12580
254. O'Keeffe M, Mok WH, Radford KJ. Human dendritic cell subsets and function in health and disease. *Cell Mol Life Sci* (2015) **72**:4309–25. doi:10.1007/s00018-015-2005-0
255. Climent N, Munier S, Piqué N, García F, Pavot V, Primard C, Casanova V, Gatell JM, Verrier B, Gallart T. Loading dendritic cells with PLA-p24 nanoparticles or MVA expressing HIV genes induces HIV-1-specific T cell responses. *Vaccine* (2014) **32**:6266–6276. doi:10.1016/j.vaccine.2014.09.010
256. Pizzurro GA, Barrio MM. Dendritic cell-based vaccine efficacy: aiming for hot spots. *Front Immunol* (2015) **6**:91. doi:10.3389/fimmu.2015.00091

257. Horiuchi T, Tsukamoto H, Ricklin D, Lambris J, Tsukamoto H, Horiuchi T, Hillmen P, Young N, Schubert J, Gruppo R, et al. Complement-targeted therapy: development of C5- and C5a-targeted inhibition. *Inflamm Regen* 2016 361 (2016) **36**:3831–8. doi:10.1186/S41232-016-0013-6
258. Golubovskaya V, Wu L. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers (Basel)* (2016) **8**: doi:10.3390/cancers8030036
259. Hoffman W, Lakkis FG, Chalasani G. B Cells, Antibodies, and More. *Clin J Am Soc Nephrol* (2016) **11**:137–54. doi:10.2215/CJN.09430915
260. Clem AS. Fundamentals of vaccine immunology. *J Glob Infect Dis* (2011) **3**:73–8. doi:10.4103/0974-777X.77299
261. Meeker ND, Trede NS. Immunology and zebrafish: spawning new models of human disease. *Dev Comp Immunol* (2008) **32**:745–57. doi:10.1016/j.dci.2007.11.011
262. Uribe C, Folch H, Enriquez R, Moran G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Vet Med (Praha)* **56**:2011–486.
263. Salinas I, Zhang Y-A, Sunyer JO. Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Dev Comp Immunol* (2011) **35**:1346–65. doi:10.1016/j.dci.2011.11.009
264. Davidson AJ, Zon LI. The “definitive” (and “primitive”) guide to zebrafish hematopoiesis. *Oncogene* (2004) **23**:7233–7246. doi:10.1038/sj.onc.1207943
265. Agius C, Roberts RJ. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J Fish Dis* (2003) **26**:499–509. doi:10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x
266. Rombout JHWM, Abelli L, Picchietti S, Scapigliati G, Kiron V. Teleost intestinal immunology. *Fish Shellfish Immunol* (2010) **31**:616–26. doi:10.1016/j.fsi.2010.09.001
267. Parra D, Reyes-Lopez FE, Tort L. Mucosal Immunity and B Cells in Teleosts: Effect of Vaccination and Stress. *Front Immunol* (2015) **6**:354. doi:10.3389/fimmu.2015.00354
268. Davidson GA, Ellis AE, Secombes CJ. Novel cell types isolated from the skin of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J Fish Biol* (1993) **42**:301–306. doi:10.1111/j.1095-8649.1993.tb00330.x
269. Herbomel P, Thisse B, Thisse C. Zebrafish early macrophages colonize cephalic mesenchyme and developing brain, retina, and epidermis through a M-CSF receptor-dependent invasive process. *Dev Biol* (2001) **238**:274–88. doi:10.1006/dbio.2001.0393
270. Lewis KL, Del Cid N, Traver D. Perspectives on antigen presenting cells in zebrafish. *Dev Comp Immunol* (2014) **46**:63–73. doi:10.1016/j.dci.2014.03.010
271. Li J, Barreda DR, Zhang Y-A, Boshra H, Gelman AE, Lapatra S, Tort L, Sunyer JO. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nat Immunol* (2006) **7**:1116–24. doi:10.1038/ni1389
272. Page DM, Wittamer V, Bertrand JY, Lewis KL, Pratt DN, Delgado N, Schale SE, McGue C, Jacobsen BH, Doty A, et al. An evolutionarily conserved program of B-cell development and activation in zebrafish. *Blood* (2013) **122**:e1–11.

doi:10.1182/blood-2012-12-471029

273. van der Vaart M, Spaink HP, Meijer AH. Pathogen recognition and activation of the innate immune response in zebrafish. *Adv Hematol* (2012) **2012**:159807. doi:10.1155/2012/159807
274. Ge R, Zhou Y, Peng R, Wang R, Li M, Zhang Y, Zheng C, Wang C. Conservation of the STING-Mediated Cytosolic DNA Sensing Pathway in Zebrafish. *J Virol* (2015) **89**:7696–7706. doi:10.1128/JVI.01049-15
275. Stachura DL, Traver D. "Cellular dissection of zebrafish hematopoiesis," in, 11–53. doi:10.1016/bs.mcb.2016.03.022
276. Ji J, Torrealba D, Ruyra À, Roher N. Nanodelivery Systems as New Tools for Immunostimulant or Vaccine Administration: Targeting the Fish Immune System. *Biology (Basel)* (2015) **4**:664–96. doi:10.3390/biology4040664
277. Munang'andu HM, Mutoloki S, Evensen Ø. An Overview of Challenges Limiting the Design of Protective Mucosal Vaccines for Finfish. *Front Immunol* (2015) **6**:542. doi:10.3389/fimmu.2015.00542
278. MOORE JD, OTOTAKE M, NAKANISHI T. Particulate antigen uptake during immersion immunisation of fish: The effectiveness of prolonged exposure and the roles of skin and gill. *Fish Shellfish Immunol* (1998) **8**:393–408. doi:10.1006/fsim.1998.0143
279. Fredriksen BN, Grip J. PLGA/PLA micro- and nanoparticle formulations serve as antigen depots and induce elevated humoral responses after immunization of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Vaccine* (2012) **30**:656–667. doi:10.1016/j.vaccine.2011.10.105
280. Adomako M, St-Hilaire S, Zheng Y, Eley J, Marcum RD, Sealey W, Donahower BC, Lapatra S, Sheridan PP. Oral DNA vaccination of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against infectious haematopoietic necrosis virus using PLGA [Poly(D,L-Lactic-Co-Glycolic Acid)] nanoparticles. *J Fish Dis* (2012) **35**:203–14. doi:10.1111/j.1365-2761.2011.01338.x
281. Tian J, Yu J. Poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles as candidate DNA vaccine carrier for oral immunization of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against lymphocystis disease virus. *Fish Shellfish Immunol* (2011) **30**:109–117. doi:10.1016/j.fsi.2010.09.016
282. Ruyra A, Cano-Sarabia M, García-Valtanan P, Yero D, Gibert I, Mackenzie SA, Estepa A, Maspoch D, Roher N. Targeting and stimulation of the zebrafish (*Danio rerio*) innate immune system with LPS/dsRNA-loaded nanoliposomes. *Vaccine* (2014) **32**:3955–62. doi:10.1016/j.vaccine.2014.05.010
283. Løvmo SD, Speth MT, Repnik U, Koppang EO, Griffiths GW, Hildahl JP. Translocation of nanoparticles and *Mycobacterium marinum* across the intestinal epithelium in zebrafish and the role of the mucosal immune system. *Dev Comp Immunol* (2016) doi:10.1016/j.dci.2016.06.016
284. Evensen L, Johansen PL, Koster G, Zhu K, Herfindal L, Speth M, Fenaroli F, Hildahl J, Bagherifam S, Tulotta C, et al. Zebrafish as a model system for characterization of nanoparticles against cancer. *Nanoscale* (2016) **8**:862–877. doi:10.1039/C5NR07289A
285. Fenaroli F, Westmoreland D, Benjaminsen J, Kolstad T, Skjeldal FM, Meijer AH,

- van der Vaart M, Ulanova L, Roos N, Nyström B, et al. Nanoparticles as Drug Delivery System against Tuberculosis in Zebrafish Embryos: Direct Visualization and Treatment. *ACS Nano* (2014) **8**:7014–7026. doi:10.1021/nn5019126
286. Zhao B, Sun L, Zhang W, Wang Y, Zhu J, Zhu X, Yang L, Li C, Zhang Z, Zhang Y. Secretion of intestinal goblet cells: a novel excretion pathway of nanoparticles. *Nanomedicine* (2014) **10**:839–49. doi:10.1016/j.nano.2013.10.004
287. Lugo-Villarino G, Balla KM, Stachura DL, Bañuelos K, Werneck MBF, Traver D. Identification of dendritic antigen-presenting cells in the zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) **107**:15850–5. doi:10.1073/pnas.1000494107
288. Shao T, Zhu L-Y, Nie L, Shi W, Dong W-R, Xiang L-X, Shao J-Z. Characterization of surface phenotypic molecules of teleost dendritic cells. (2015). doi:10.1016/j.dci.2014.11.010
289. El Sherbini H, Hock B, Fearnley D, McLellan A, Vuckovic S, Hart DNJ. Lectin Ligands on Human Dendritic Cells and Identification of a Peanut Agglutinin Positive Subset in Blood. *Cell Immunol* (2000) **200**:36–44. doi:10.1006/cimm.1999.1612
290. Saltis M, Criscitiello MF, Ohta Y, Keefe M, Trede NS, Goitsuka R, Flajnik MF. Evolutionarily conserved and divergent regions of the autoimmune regulator (Aire) gene: a comparative analysis. *Immunogenetics* (2008) **60**:105–14. doi:10.1007/s00251-007-0268-9
291. Ataman-Onal Y, Munier S, Ganée A, Terrat C, Durand P-Y, Battail N, Martinon F, Le Grand R, Charles M-H, Delair T, et al. Surfactant-free anionic PLA nanoparticles coated with HIV-1 p24 protein induced enhanced cellular and humoral immune responses in various animal models. *J Control Release* (2006) **112**:175–85. doi:10.1016/j.jconrel.2006.02.006
292. Nguyen-Chi M, Phan QT, Gonzalez C, Dubremetz J-F, Levraud J-P, Lutfalla G. Transient infection of the zebrafish notochord with *E. coli* induces chronic inflammation. *Dis Model Mech* (2014) **7**:871–82. doi:10.1242/dmm.014498
293. Hastie AT, Everts KB, Cho SK, Zangrilli J, Shaver JR, Pollice MB, Fish JE, Peters SP. IL-1 beta release from cultured bronchial epithelial cells and bronchoalveolar lavage cells from allergic and normal humans following segmental challenge with ragweed. *Cytokine* (1996) **8**:730–8. doi:10.1006/cyto.1996.0097
294. Meijer AH, Spaink HP. Host-pathogen interactions made transparent with the zebrafish model. *Curr Drug Targets* (2011) **12**:1000–17. doi:10.2174/138945011795677809
295. Langevin C, Blanco M, Martin SAM, Jouneau L, Bernardet J-F, Houel A, Lunazzi A, Duchaud E, Michel C, Quillet E, et al. Transcriptional responses of resistant and susceptible fish clones to the bacterial pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *PLoS One* (2012) **7**:e39126. doi:10.1371/journal.pone.0039126
296. Lepiller S, Franche N, Solary E, Chluba J, Laurens V. Comparative analysis of zebrafish *nos2a* and *nos2b* genes. *Gene* (2009) **445**:58–65. doi:10.1016/j.gene.2009.05.016
297. Rio DC, Ares M, Hannon GJ, Nilsen TW. Purification of RNA Using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harb Protoc* (2010) **2010**:pdb.prot5439-prot5439. doi:10.1101/pdb.prot5439

298. Detrich HW, Westerfield M, Zon LI. *Essential zebrafish methods : genetics and genomics*. Elsevier/Academic Press (2009).
299. Steichen SD, Caldorera-Moore M, Peppas NA. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *Eur J Pharm Sci* (2013) **48**:416–27. doi:10.1016/j.ejps.2012.12.006
300. Cheng CJ, Tietjen GT, Saucier-Sawyer JK, Saltzman WM. A holistic approach to targeting disease with polymeric nanoparticles. *Nat Rev Drug Discov* (2015) **14**:239–247. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrd4503> [Accessed December 2, 2016]
301. Dehaini D, Fang RH, Zhang L. Biomimetic strategies for targeted nanoparticle delivery. *Bioeng Transl Med* (2016) **1**:30–46. doi:10.1002/btm2.10004
302. Diesner SC, Wang X-Y, Jensen-Jarolim E, Untersmayr E, Gabor F. Use of lectin-functionalized particles for oral immunotherapy. *Ther Deliv* (2012) **3**:277–90. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3572827&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 9, 2013]
303. Mishra N, Tiwari S, Vaidya B, Agrawal GP, Vyas SP. Lectin anchored PLGA nanoparticles for oral mucosal immunization against hepatitis B. *J Drug Target* (2011) **19**:67–78. doi:10.3109/10611861003733946
304. Moulari B, Béduneau A, Pellequer Y, Lamprecht A. Lectin-decorated nanoparticles enhance binding to the inflamed tissue in experimental colitis. *J Control Release* (2014) **188**:9–17. doi:10.1016/j.jconrel.2014.05.046
305. Jebali A, Hekmatimoghaddam S, Kazemi B, Allaveisie A, Masoudi A, Daliri K, Sedighi N, Ranjbari J. Lectin coated MgO nanoparticle: its toxicity, antileishmanial activity, and macrophage activation. *Drug Chem Toxicol* (2014) **37**:400–9. doi:10.3109/01480545.2013.870192
306. Unitt J, Hornigold D. Plant lectins are novel Toll-like receptor agonists. *Biochem Pharmacol* (2011) **81**:1324–8. doi:10.1016/j.bcp.2011.03.010
307. Hu Y, Wang H, Sun W, Xie C, Wei W, Zheng J, Yao J. [Regulation of tissue factor expression in brain microvascular endothelial cells by PLA nanoparticles coating NF-kappaB decoy oligonucleotides]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* (2005) **26**:534–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16468330> [Accessed December 8, 2016]
308. Huafang W, Yu H, Wangqiang S, Changsheng X. Polylactic acid nanoparticles targeted to brain microvascular endothelial cells. *J Huazhong Univ Sci Technol [Medical Sci]* (2005) **25**:642–644. doi:10.1007/BF02896158
309. Pugach EK, Li P, White R, Zon L. Retro-orbital Injection in Adult Zebrafish. *J Vis Exp* (2009)e1645–e1645. doi:10.3791/1645
310. Zapata AG, Torroba M, Alvarez F, Anderson DP, Dixon OW, Wisniewski M. Electron microscopic examination of antigen uptake by salmonid gill cells after bath immunization with a bacterin. *J Fish Biol* (1987) **31**:209–217. doi:10.1111/j.1095-8649.1987.tb05315.x
311. Khimmakthong U, Deshmukh S, Chettri JK, Bojesen AM, Kania PW, Dalsgaard I, Buchmann K. Tissue specific uptake of inactivated and live *Yersinia ruckeri* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Visualization by immunohistochemistry

- and in situ hybridization. *Microb Pathog* (2013) **59**:33–41. doi:10.1016/j.micpath.2013.03.001
312. Korbut R, Mehrdana F, Kania PW, Larsen MH, Frees D, Dalsgaard I, Jørgensen L von G. Antigen Uptake during Different Life Stages of Zebrafish (*Danio rerio*) Using a GFP-Tagged *Yersinia ruckeri*. *PLoS One* (2016) **11**:e0158968. doi:10.1371/journal.pone.0158968
313. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* (2001) **2**:361–7. doi:10.1038/86373
314. Lakkaraju A, Rodriguez-Boulan E. Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. *Trends Cell Biol* (2008) **18**:199–209. doi:10.1016/j.tcb.2008.03.002
315. Zhang Z, Wang C, Zha Y, Hu W, Gao Z, Zang Y, Chen J, Zhang J, Dong L. Corona-directed nucleic acid delivery into hepatic stellate cells for liver fibrosis therapy. *ACS Nano* (2015) **9**:2405–19. doi:10.1021/nn505166x
316. Duong HTT, Dong Z, Su L, Boyer C, George J, Davis TP, Wang J. The use of nanoparticles to deliver nitric oxide to hepatic stellate cells for treating liver fibrosis and portal hypertension. *Small* (2015) **11**:2291–304. doi:10.1002/smll.201402870
317. Ohtani O, Ohtani Y. Lymph circulation in the liver. *Anat Rec (Hoboken)* (2008) **291**:643–52. doi:10.1002/ar.20681
318. Xu Z, Takizawa F, Parra D, Gómez D, von Gersdorff Jørgensen L, LaPatra SE, Sunyer JO. Mucosal immunoglobulins at respiratory surfaces mark an ancient association that predates the emergence of tetrapods. *Nat Commun* (2016) **7**:10728. doi:10.1038/ncomms10728
319. Sprent J, Kishimoto H. The thymus and central tolerance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* (2001) **356**:609–16. doi:10.1098/rstb.2001.0846
320. Wittamer V, Bertrand JY, Gutschow PW, Traver D. Characterization of the mononuclear phagocyte system in zebrafish. *Blood* (2011) **117**:7126–35. doi:10.1182/blood-2010-11-321448
321. Hinterleitner R, Jabri B. A dendritic cell subset designed for oral tolerance. *Nat Immunol* (2016) **17**:474–476. doi:10.1038/ni.3435
322. Pavot V, Rochereau N, Resseguier J, Gutjahr A, Genin C, Tiraby G, Perouzel E, Lioux T, Vernejoul F, Verrier B, et al. Cutting Edge: New Chimeric NOD2/TLR2 Adjuvant Drastically Increases Vaccine Immunogenicity. *J Immunol* (2014) **193**:5781–5785. doi:10.4049/jimmunol.1402184
323. LaPatra S, Kao S, Erhardt EB, Salinas I. Evaluation of dual nasal delivery of infectious hematopoietic necrosis virus and enteric red mouth vaccines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vaccine* (2015) **33**:771–776. doi:10.1016/j.vaccine.2014.12.055
324. GOULD RW, O'LEARY PJ, GARRISON RL, ROHOVEC JS, FRYER JL. Spray Vaccination: A Method for the Immunization of Fish. *Fish Pathol* (1978) **13**:63–68. doi:10.3147/jfsfp.13.63
325. van der Zwaag D, Vanparijs N, Wijnands S, De Rycke R, De Geest BG, Albertazzi

- L. Super Resolution Imaging of Nanoparticles Cellular Uptake and Trafficking. *ACS Appl Mater Interfaces* (2016) **8**:6391–6399. doi:10.1021/acsami.6b00811
326. Huising MO, Guichelaar T, Hoek C, Verburg-van Kemenade BML, Flik G, Savelkoul HFJ, Rombout JHWM. Increased efficacy of immersion vaccination in fish with hyperosmotic pretreatment. *Vaccine* (2003) **21**:4178–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14505897> [Accessed December 22, 2016]
327. Løvmo SD, Speth MT, Repnik U, Koppang EO, Griffiths GW, Hildahl JP. Translocation of nanoparticles and *Mycobacterium marinum* across the intestinal epithelium in zebrafish and the role of the mucosal immune system. *Dev Comp Immunol* (2016) doi:10.1016/j.dci.2016.06.016
328. Gao Y, Tang X, Sheng X, Xing J, Zhan W. Antigen uptake and expression of antigen presentation-related immune genes in flounder (*Paralichthys olivaceus*) after vaccination with an inactivated *Edwardsiella tarda* immersion vaccine, following hyperosmotic treatment. *Fish Shellfish Immunol* (2016) **55**:274–80. doi:10.1016/j.fsi.2016.05.042
329. Mishra N, Tiwari S, Vaidya B, Agrawal GP, Vyas SP. Lectin anchored PLGA nanoparticles for oral mucosal immunization against hepatitis B. <http://dx.doi.org.gate1.inist.fr/103109/10611861003733946> (2010)
330. Galvez F, Reid SD, Hawkings G, Goss GG. Isolation and characterization of mitochondria-rich cell types from the gill of freshwater rainbow trout. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2002) **282**:R658–68. doi:10.1152/ajpregu.00342.2001
331. Keeble S, Watt FM. Characterisation of the peanut lectin-binding glycoproteins of human epidermal keratinocytes. *Differentiation* (1990) **43**:139–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2373287> [Accessed December 5, 2016]
332. Haines DM. Peanut agglutinin lectin immunohistochemical staining of normal and neoplastic canine tissues. *Vet Pathol* (1993) **30**:333–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8212455> [Accessed December 19, 2016]
333. Munang'andu HM, Fredriksen BN, Mutoloki S, Dalmo RA, Evensen Ø. Antigen dose and humoral immune response correspond with protection for inactivated infectious pancreatic necrosis virus vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Vet Res* (2013) **44**:7. doi:10.1186/1297-9716-44-7
334. McClure R, Massari P. TLR-Dependent Human Mucosal Epithelial Cell Responses to Microbial Pathogens. *Front Immunol* (2014) **5**:386. doi:10.3389/fimmu.2014.00386
335. UNI Z, HELLER ED. Peanut Agglutinin as a Marker of Maturation and Activation of Chicken Thymic-Derived Lymphocytes. *Poult Sci* (1991) **70**:1516–1520. doi:10.3382/ps.0701516
336. Watanabe M, Muramatsu T, Shirane H, Ugai K. Discrete Distribution of binding sites for *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA) and for peanut agglutinin (PNA) in mouse organ tissues. *J Histochem Cytochem* (1981) **29**:779–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7053086> [Accessed December 22, 2016]

337. Lagardien Z. The characterisation of the peanut agglutinin an evolved plant lectin, with improved specificity to the Thompson Freidenriech antigen. (2013)
338. Sørensen KK, McCourt P, Berg T, Crossley C, Le Couteur D, Wake K, Smedsrød B. The scavenger endothelial cell: a new player in homeostasis and immunity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2012) **303**:R1217-30. doi:10.1152/ajpregu.00686.2011
339. Sumanas S, Joraniak T, Lin S. Identification of novel vascular endothelial-specific genes by the microarray analysis of the zebrafish cloche mutants. *Blood* (2005) **106**:534–41. doi:10.1182/blood-2004-12-4653
340. Fukuda M, Ohtani K, Jang S-J, Yoshizaki T, Mori K-I, Motomura W, Yoshida I, Suzuki Y, Kohgo Y, Wakamiya N. Molecular cloning and functional analysis of scavenger receptor zebrafish CL-P1. *Biochim Biophys Acta* (2011) **1810**:1150–9. doi:10.1016/j.bbagen.2011.09.016
341. Ohtani K, Suzuki Y, Eda S, Kawai T, Kase T, Keshi H, Sakai Y, Fukuoh A, Sakamoto T, Itabe H, et al. The membrane-type collectin CL-P1 is a scavenger receptor on vascular endothelial cells. *J Biol Chem* (2001) **276**:44222–8. doi:10.1074/jbc.M103942200
342. Pondman KM, Tsolaki AG, Paudyal B, Shamji MH, Switzer A, Pathan AA, Abozaid SM, Haken B Ten, Stenbeck G, Sim RB, et al. Complement Deposition on Nanoparticles Can Modulate Immune Responses by Macrophage, B and T Cells. *J Biomed Nanotechnol* (2016) **12**:197–216. doi:10.1166/jbn.2016.2124
343. Haney MJ, Zhao Y, Li S, Higginbotham SM, Booth SL, Han H-Y, Vetro JA, Mosley RL, Kabanov A V, Gendelman HE, et al. Cell-mediated transfer of catalase nanoparticles from macrophages to brain endothelial, glial and neuronal cells. *Nanomedicine (Lond)* (2011) **6**:1215–30. doi:10.2217/nnm.11.32
344. Gerdes H-H, Bukoreshtliev N V., Barroso JFV. Tunneling nanotubes: A new route for the exchange of components between animal cells. *FEBS Lett* (2007) **581**:2194–2201. doi:10.1016/j.febslet.2007.03.071
345. Gerdes H-H, Rustom A, Wang X. Tunneling nanotubes, an emerging intercellular communication route in development. *Mech Dev* (2013) **130**:381–387. doi:10.1016/j.mod.2012.11.006
346. Onfelt B, Nedvetzki S, Benninger RKP, Purbhoo MA, Sowinski S, Hume AN, Seabra MC, Neil MAA, French PMW, Davis DM. Structurally Distinct Membrane Nanotubes between Human Macrophages Support Long-Distance Vesicular Traffic or Surfing of Bacteria. *J Immunol* (2006) **177**:8476–8483. doi:10.4049/jimmunol.177.12.8476
347. Tardivel M, Bégard S, Bousset L, Dujardin S, Coens A, Melki R, Buée L, Colin M. Tunneling nanotube (TNT)-mediated neuron-to-neuron transfer of pathological Tau protein assemblies. *Acta Neuropathol Commun* (2016) **4**:117. doi:10.1186/s40478-016-0386-4
348. Zweers MLT, Engbers GHM, Grijpma DW, Feijen J. In vitro degradation of nanoparticles prepared from polymers based on dl-lactide, glycolide and poly(ethylene oxide). *J Control Release* (2004) **100**:347–356. doi:10.1016/j.jconrel.2004.09.008
349. de Araújo MEG, Lamberti G, Huber LA. Purification of Early and Late Endosomes. *Cold Spring Harb Protoc* (2015) **2015**:pdb.top074443.

doi:10.1101/pdb.top074443

350. Aly SM, Albutti AS, Rahmani AH, Atti NMA. The response of New-season Nile tilapia to *Aeromonas hydrophila* vaccine. *Int J Clin Exp Med* (2015) **8**:4508–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26064376> [Accessed December 23, 2016]
351. Hu Y-L, Qi W, Han F, Shao J-Z, Gao J-Q. Toxicity evaluation of biodegradable chitosan nanoparticles using a zebrafish embryo model. *Int J Nanomedicine* (2011) **6**:3351–9. doi:10.2147/IJN.S25853
352. UT-Austin Center for Nano- and Molecular Science. Available at: <http://www.nano.utexas.edu/resources/what-is-nanoscience/>
353. ISO/TS 80004-2:2015(fr), Nanotechnologies — Vocabulaire — Partie 2: Nano-objets. Available at: <https://www.iso.org/obp/ui/fr/#iso:std:iso:ts:80004:-2:ed-1:v1:fr>
354. Chou LYT, Ming K, Chan WCW, Smith AM, Nie SM, Eustis S, El-Sayed MA, Lu AH, Salabas EL, Schuth F, et al. Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles. *Chem Soc Rev* (2011) **40**:233–245. doi:10.1039/C0CS00003E
355. Home Page | John Simonsen. Available at: <http://people.forestry.oregonstate.edu/john-simonsen/>
356. Minchin R, Tee N, Mortimer G, Zhu Y, Martin D. Fluoromica nanoparticle cytotoxicity in macrophages decreases with size and extent of uptake. *Int J Nanomedicine* (2015) **10**:2363. doi:10.2147/IJN.S80655
357. Rashkow JT, Patel SC, Tappero R, Sitharaman B, Andersson H, Berg A, Ibuki Y, Toyooka T, Jin H, Heller D, et al. Quantification of single-cell nanoparticle concentrations and the distribution of these concentrations in cell population. *J R Soc Interface* (2014) **11**:20131152. doi:10.1098/rsif.2013.1152
358. Mao Z, Zhou X, Gao C, Lead JR, Wilkinson KJ, Graf C, Blaaderen A van, Lines MG, Hong Y, Gao C, et al. Influence of structure and properties of colloidal biomaterials on cellular uptake and cell functions. *Biomater Sci* (2013) **1**:896. doi:10.1039/c3bm00137g
359. Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat Biotechnol* (2015) **33**:941–951. doi:10.1038/nbt.3330
360. Laffleur F, Hintzen F, Shahnaz G, Rahmat D, Leithner K, Bernkop-Schnürch A. Development and *in vitro* evaluation of slippery nanoparticles for enhanced diffusion through native mucus. *Nanomedicine* (2014) **9**:387–396. doi:10.2217/nnm.13.26
361. Synthesis of Polylactide. Available at: <http://polylactide.chemvista.net/Synthesis-of-Polylactide.html>
362. Gluconeogenesis: Synthesis of New Glucose. Available at: <http://themedicalbiochemistrypage.org/gluconeogenesis.php>
363. Research Group: Colour pattern formation. Available at: <http://www.eb.tuebingen.mpg.de/research/emeriti/research-group-colour-pattern-formation.html>

364. Yonkos, L.T. ; Fisher, D.J. ; Reimschuessel, R. ; Kane AS. Digital Atlas of Fathead Minnow Histology: INTEGUMENTARY SYSTEM. (2000) Available at:  
<http://aquaticpath.php.ufl.edu/fhm/skin.html#anchor262429>
365. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* (2004) **4**:11–22. doi:10.1038/nrc1252
366. Hidalgo J, Velasco A, Sánchez Aguayo I, Amores P. Light microscopic characterization of glycoconjugates in secretory cells of the carp (*Cyprinus carpio*) gill epithelium. *Histochemistry* (1987) **88**:65–73. doi:10.1007/BF00490170
367. Wikipédia, l'encyclopédie libre. Available at:  
[https://fr.wikipedia.org/wiki/Wikip%C3%A9dia:Accueil\\_principal](https://fr.wikipedia.org/wiki/Wikip%C3%A9dia:Accueil_principal)