HAL
open science

Le surfactant pulmonaire, une barrière déterminante de la réponse des cellules à l'exposition aux nanoparticules

Fanny Mousseau

To cite this version:

Fanny Mousseau. Le surfactant pulmonaire, une barrière déterminante de la réponse des cellules à l'exposition aux nanoparticules. Physique [physics]. Université Sorbonne Paris Cité, 2017. Français. NNT : 2017USPCC125 . tel-02010525

HAL Id: tel-02010525

https://theses.hal.science/tel-02010525v1

Submitted on 7 Feb 2019

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.

Thèse de doctorat de l'Université Sorbonne Paris Cité
Préparée à l'Université Paris Diderot
Ecole doctorale *Physique en Île-de-France* (ED 564)
Laboratoire Matière et Systèmes Complexes (MSC), UMR 7057

Le surfactant pulmonaire, une barrière déterminante de la réponse des cellules à l'exposition aux nanoparticules

Par Fanny Mousseau

Thèse de doctorat de Physique

Dirigée par Jean-François Berret
Présentée et soutenue publiquement au Laboratoire Matière et Systèmes Complexes, le 26 Janvier 2017

Présidente du jury : **Baeza-Squiban, Armelle** - Université Paris Diderot
Rapporteur : **Gradzielski, Michael** - Technische Universität, Berlin
Rapporteur : **Tsapis, Nicolas** - Faculté de Pharmacie Paris Sud
Examinatrice : **Bassereau, Patricia** - Institut Curie, Paris
Examinatrice : **Ménager, Christine** - Université Pierre et Marie Curie, Paris
Examinateur : **Pérez-Gil, Jesús** - Universidad Complutense de Madrid
Directeur de thèse : **Berret, Jean-François** - Université Paris Diderot

Ce travail est protégé par la licence *Creative Commons* (www.creativecommons.fr/licences/)

« L'avenir n'est pas ce qui va arriver mais ce que nous allons en faire »
Henri Bergson

Le surfactant pulmonaire, une barrière déterminante
de la réponse des cellules à l'exposition aux nanoparticules

Résumé :
Les particules fines émises par l'activité humaine sont la cause de diverses pathologies pulmonaires et cardiaques. Les particules de taille inférieure à 100 nm, appelées nanoparticules, sont particulièrement nocives car une fois inhalées, elles peuvent atteindre les alvéoles pulmonaires, lieux des échanges gazeux. Dans les alvéoles, les nanoparticules entrent d'abord en contact avec le surfactant pulmonaire. Ce fluide biologique tapisse les cellules épithéliales des alvéoles sur une épaisseur de quelques centaines de nanomètres et est composé de phospholipides et de protéines, les phospholipides étant assemblés sous forme de vésicules et corps multi-lamellaires.
Dans ce travail, nous avons sélectionné des nanoparticules modèles de nature différente connues pour leur toxicité cellulaire (latex, oxydes métalliques, silice). Leur interaction avec un fluide pulmonaire mimétique administré aux prématurés (Curosurf®) a été étudiée en détail par microscopie optique et électronique, et par diffusion de la lumière. Nous avons mis en évidence que cette interaction est non spécifique et d'origine électrostatique. La diversité des structures hybrides obtenues entre particules et vésicules témoigne cependant de la complexité de cette interaction. En contrôlant cette interaction, nous avons formulé des particules couvertes d'une bicouche supportée de Curosurf® qui possèdent des propriétés remarquables de stabilité et de furtivité en milieu biologique.
Dans une seconde partie, nous avons étudié le rôle du surfactant pulmonaire sur l'interaction entre particules et cellules épithéliales alvéolaires (A459). A l'aide d'expériences de biologie cellulaire réalisées *in vitro*, nous avons observé que la présence de surfactant diminue de manière significative le nombre de particules internalisées par les cellules. Dans le même temps, nous avons constaté une augmentation importante de la viabilité cellulaire. Une conclusion majeure de notre travail concerne la mise en évidence du rôle protecteur joué par le surfactant pulmonaire dans les mécanismes d'interaction des nanoparticules avec l'épithélium alvéolaire.

Mots Clés : poumon, surfactant pulmonaire, nanoparticule, Curosurf®, bicouche lipidique supportée, agrégat, cellules A549, toxicité, internalisation.

Abstract :
Particulate matter emitted by human activity are the cause of various pulmonary and cardiac diseases. After inhalation, nanoparticles (ie particles smaller than 100 nm) can reach the pulmonary alveoli, where the gas exchanges take place. In the alveoli, the

nanoparticles first encounter the pulmonary surfactant which is the fluid that lines the epithelial cells. Of a few hundreds of nanometers in thickness, the pulmonary fluid is composed of phospholipids and proteins, the phospholipids being assembled in multilamellar vesicles.
In this work, we considered model nanoparticles of different nature (latex, metal oxides, silica). Their interaction with a mimetic pulmonary fluid administered to premature infants (Curosurf®) was studied by light scattering and by optical and electron microscopy. We have shown that the interaction is non-specific and mainly of electrostatic origin. The wide variety of hybrid structures found in this work attests however of the complexity of the phospholipid/particle interaction. In addition, we succeeded in formulating particles covered with a Curosurf® supported bilayer. These particles exhibit remarkable stability and stealthiness in biological environment.
In a second part, we studied the role of the pulmonary surfactant on the interactions between nanoparticles and alveolar epithelial cells (A459). With cellular biology assays, we observed that the number of internalized particles decreases dramatically in presence of surfactant. At the same time, we found a significant increase in the A459 cell viability. Our study shows the importance of the pulmonary surfactant in protecting the alveolar epithelium in case of nanoparticle exposure.

Key Words : lungs, pulmonary surfactant, nanoparticle, Curosurf®, supported lipid bilayer, corona, aggregate, cells A549, toxicity, internalization.

Remerciements

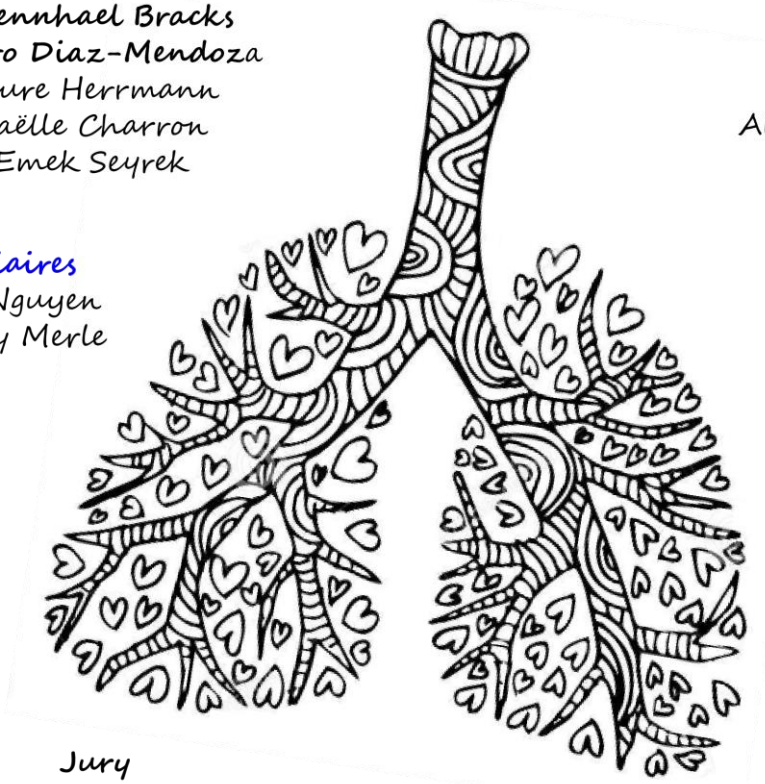
Equipe
Evdokia Oikonomou
Leticia Vitorazi
Frédéric Loosli
Alexandra Lanièce
Chloé Puisney
Bettina Roellinger
Gwennhael Bracks
Alvaro Diaz-Mendoza
Laure Herrmann
Gaëlle Charron
Emek Seyrek

Stagiaires
Diep Nguyen
Mélody Merle

Jury
Armelle Baeza-Squiban
Tsapis Nicolas
Michael Gradzielski
Patricia Bassereau
Jesus Pérez-Gil
Christine Ménager

Thésards
Thomas Auger
Maxime Costalonga
David Perreira
Mourtaza K. Houssene
Simon Merminod
Nicolas Chastrette
Adrien Hallou

Directeur de thèse
Jean-François Berret



Travail à la paillasse
Booboo
Nathalie Luciani
Alain Richert
Carine Vias
Guillaume Wang
Rémi Leborgne
Annie Vacher
Xavier Baudin
Gaëlle Pemboung

Hôpital Kremlin Bicêtre
Mostafa Makhtari
et ses collaborateurs

Bureau 828A
Valentina Peschatola
Leonardo Gordillo
Chiho Watanabe
François Mazuel
Jeanne Volatron
Ana Espinosa
Nicolas Chevalier
Solène Song
Gaëtan Mary
Alba Nicolas-Boluda
Sophie Richard
Iris Marangon
Alberto Curcio
Valentin Busson
Dan Elgrabli

Marraine pour l'enseignement
Delphine Onidas

Parrain de thèse
Valentin Leroy

Proches
Quentin Vagne
Ma soeur
Mes parents
Ma famille
Ma "famille" parisienne
Mes amis de longue date
Mes amis de l'ESPCI

Accompagnement à la recherche
Loïc Auvray
Laurent Limat
Administration
Atelier de mécanique

Table des matières

Chapitre 1

I. Introduction 21
1) Contexte 21
2) Structure et fonction des poumons 22
a) Généralités 22
b) Les alvéoles 24
II. Inhalation de particules 26
1) Transport et dépôt 26
2) Devenir des particules 27
III. Impact des nanoparticules sur le vivant au niveau local 29
1) Observations *in vivo* 29
2) Observations *in vitro* 30
3) Lacunes 32
IV. Interaction entre particules et surfactant pulmonaire 32
1) Le surfactant pulmonaire 32
a) Composition 33
b) Cycle de vie 34
c) Fonction physiologique 35
2) Interaction entre particules et surfactant à l'interface air-liquide 37
3) Passage des nanoparticules à travers l'interface air-liquide 39
4) Interaction entre particules et hypophase du surfactant 41
a) Généralités sur l'interaction nanoparticules/liposomes 41
b) Interaction entre nanoparticules et surfactant pulmonaire 42
V. Conclusion 43
Bibliographie 45

Chapitre 2

I. Caractérisation des nanoparticules 59
1) Taille des particules 59
2) Concentration en particules 60
3) Densité structurale surfacique de charges 61
4) Stabilité des particules 61
5) Résultats 62
II. Diagramme de phase entre particules et surfactant pulmonaire 62
III. Formulation de particules enrobées (nanoBLSs) 63
1) Principe 63
2) Protocole 64

IV. Marquage fluorescent du Curosurf 65
1) Principe 65
2) Optimisation du marquage 66
V. Culture cellulaire 66
1) Généralités 66
2) Protocole de culture 67
3) Protocole de comptage 67
4) Croissance des cellules 68
VI. Test de viabilité cellulaire 70
1) Principe 70
2) Optimisation du protocole 71
3) Protocole du test WST-1 72
VII. Internalisation des particules Silica (+) : quantification 73
1) Principe 73
2) Nombre de cellules à ensemencer 73
3) Détection des particules fluorescentes 74
4) Protocole 75
Annexe A : Matériels 77
Annexe B : Equipements 79
Annexe C : Cartes d'identité des nanoparticules 83
Bibliographie 89

Chapitre 3

I. Substituts du surfactant pulmonaire 95
1) Généralités 95
2) Le Curosurf comme surfactant pulmonaire modèle 96
3) Caractérisation du Curosurf 97
a) Structure du Curosurf – Distribution de taille des vésicules 97
b) Stabilité du Curosurf vis-à-vis de la dilution 101
c) Température de fusion du Curosurf 103
II. Extrusion du Curosurf 104
1) Généralités 104
2) Caractérisation du Curosurf extrudé 105
a) Nombre d'extrusion et concentration du Curosurf 105
b) Extrusion à travers des pores de différentes tailles 106
3) Modèle géométrique de l'extrusion 107
4) Observation de la structure fine du Curosurf extrudé 109
III. Surfactant pulmonaire synthétique 111
1) Choix des phospholipides 111
2) Préparation et caractérisation du surfactant synthétique 111

IV. Modifications des surfactants pulmonaires modèles 112
1) Marquage fluorescent du Curosurf 112
2) Propriétés physico-chimiques en fonction du pH 113
3) Vieillissement des surfactants modèles 115
a) Congélation du Curosurf 115
b) Evolution temporelle des trois surfactants 116
V. Conclusion 117
Bibliographie 119

Chapitre 4

I. Introduction 127
II. Formulation des nanoBLSs – preuve de concept 128
1) Généralités 128
2) Premier test 128
3) Deuxième test 129
III. Optimisation de la formulation des nanoBLSs 131
1) Généralités 131
2) Caractérisation des nanoBLSs en fonction de X_S 131
a) Résultats 131
b) Décalage contre-intuitif des courbes de DCS 133
c) Conclusion 133
3) Calcul de l'épaisseur de l'enrobage des nanoBLSs 134
4) Autre détermination expérimentale de l'épaisseur de la BLS 136
a) Observation des nanoBLSs par cryoMET 136
b) Détermination de l'épaisseur de la BLS 137
c) Présence de vésicules après formulation des nanoBLSs 138
IV. Stabilité des nanoBLSs 138
V. Interaction entre nanoBLSs et surfactant pulmonaire 139
VI. Conclusion 140
Annexe A : Calcul de l'épaisseur de l'enrobage des nanoBLSs 141
Annexe B : Nombre de vésicules restantes après formulation des nanoBLSs 144
Bibliographie 145

Chapitre 5

I. Introduction 153
II. Interaction entre particules nues et surfactants pulmonaires 153
1) Surfactants pulmonaires, particules et températures de travail 154
2) Interaction entre surfactant pulmonaire et particules Alumina (+) 154
3) Généralisation de l'interaction entre particules nues et surfactants 155
a) Résultats 156

b) Cas des particules positives 156
c) Cas des particules négatives 157
d) Conclusion 158
III. Structures issues de l'interaction entre nanoparticules et Curosurf 158
1) Méthodes expérimentales 158
2) Microscopie optique 159
a) Curosurf natif et Silica (-) 159
b) Curosurf extrudé et Alumina (+) 160
c) Curosurf natif et Silica (+) 160
3) Microscopie électronique à transmission 162
a) Curosurf extrudé et Alumina (+) 162
b) Curosurf extrudé et Silica (+) 163
4) Microscopie cryo-électronique à transmission 164
a) Curosurf natif et Silica (+) 159
b) Curosurf extrudé et Silica (+) 164
c) Curosurf natif et Silica (-) 165
IV. Conclusion 165
Annexe A : Interaction entre Curosurf natif et Latex 1 (-) 169
Annexe B : Résumé des données 170
Bibliographie 171

Chapitre 6

I. Introduction 177
II. Toxicité des nanoparticules 177
1) Généralités 177
2) Résultats 178
3) Interprétation des résultats 180
a) Composition chimique et état de surface 180
b) Etat d'agrégation 181
c) Conclusion 182
III. Toxicité des nanoparticules en présence de biofluides 183
1) Incubation des cellules avec des particules en présence de sérum 183
2) Incubation des cellules avec du Curosurf 183
3) Incubation des cellules avec des particules en présence de Curosurf 184
a) Résultats 184
b) Rôles des propriétés physico-chimiques des particules 186
IV. Internalisation de particules de silice fluorescente 187
1) Quantification de l'internalisation 188
a) Nanoparticules nues 188
b) Agrégats Nps/Curosurf et nanoBLSs 189

c) Comparaison des résultats 192
2) Observation des systèmes internalisés en microscopie électronique 193
a) Nanoparticules nues 193
b) Agrégats Nps/Curosurf 194
c) NanoBLSs 194
V. Conclusion 197
Annexe A : Récapitulatif de la littérature 199
Annexe B : Viabilité des A549 exposées aux Nps dispersées dans du sérum 200
Annexe C : Viabilité des A549 exposées aux Nps dispersées dans du Curosurf 202
Annexe D : Viabilité des A549 exposées aux nanoBLSs et aux agrégats 204
Bibliographie 205

Conclusion 211
Articles 217

Abréviations

BLS	Bicouche lipidique supportée
cryoMET	Microscopie cryo-électronique à transmission
DCS	Sédimentation Différentielle par Centrifugation
D_H	Diamètre hydrodynamique
DLS	Diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering)
DPPC	1,2-Dipalmitoylphosphatidylcholine
DSC	Calorimétrie Différentielle à Balayage (Differential Scanning Calorimetry)
FI	Force ionique
IC_{50}	Concentration inhibitrice médiane
MET	Microscopie électronique à transmission
NIOSH	« Institut national pour la sécurité et la santé au travail
Nps	Nanoparticules
NTA	Suivi individuel de particules (Nanoparticle Tracking Analysis)
Resp.	Respectivement
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène (Reactive Oxygen Species)
SP	Surfactant pulmonaire
Tm	Température de fusion (melting temperature)
u. a.	Unité arbitraire

Chapitre 1
Etat de l'art

Table des matières

I. Introduction 21
1) Contexte 21
2) Structure et fonction des poumons 22
a) Généralités 22
b) Les alvéoles 24
II. Inhalation de particules 26
1) Transport et dépôt 26
2) Devenir des particules 27
III. Impact des nanoparticules sur le vivant au niveau local 29
1) Observations *in vivo* 29
2) Observations *in vitro* 30
3) Lacunes 32
IV. Interaction entre particules et surfactant pulmonaire 32
1) Le surfactant pulmonaire 32
a) Composition 33
b) Cycle de vie 34
c) Fonction physiologique 35
2) Interaction entre particules et surfactant à l'interface air-liquide 37
3) Passage des nanoparticules à travers l'interface air-liquide 39
4) Interaction entre particules et hypophase du surfactant 41
a) Généralités sur l'interaction nanoparticules/liposomes 41
b) Interaction entre nanoparticules et surfactant pulmonaire 42
V. Conclusion 43
Bibliographie 45

I. Introduction

1) Contexte

Dans son traité sur l'anatomie, Léonard de Vinci (1452 –1519) a annoté l'un de ces dessins du poumon par la mention « la poussière est dangereuse ». Aujourd'hui, nous savons qu'il avait raison.

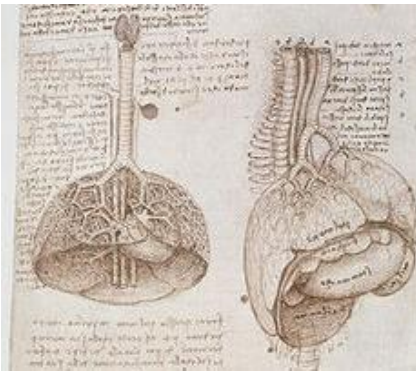


Figure 1 : Dessins de poumon par Léonard de Vinci

Alors que les poumons sont la principale cible de la pollution atmosphérique, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) constate en 2016 que 92% des êtres humains vivent dans des lieux où l'air n'est pas de bonne qualité[1]. En 2008, elle rapportait le fait que 13.6% des décès dans le monde sont dus à des maladies respiratoires[2].

Cette institution estime la qualité de l'air à partir de la concentration en particules de diamètre inférieur à 2.5 µm ($PM_{2.5}$, PM étant l'abréviation de « Particule Matter »). La raison de ce choix est simple : les $PM_{2.5}$ sont les particules qui atteignent les zones du poumon où les échanges gazeux ont lieu. Ces particules ont des provenances diverses[3], la moitié étant produites par l'activité des entreprises, des institutions et des foyers (*Figure 2*).

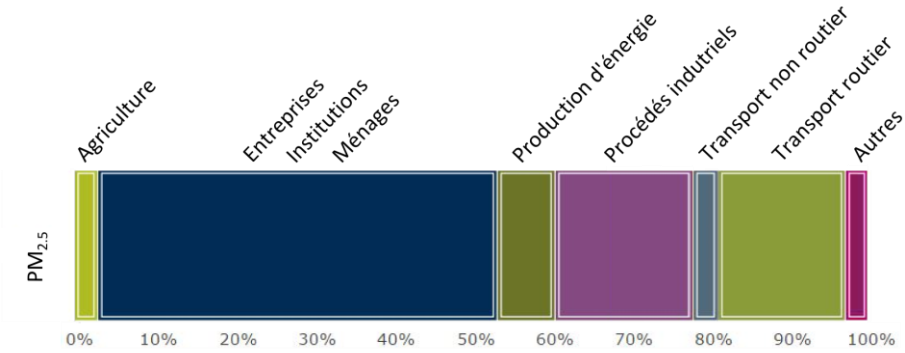


Figure 2 : Secteurs d'émission des particules fines $PM_{2.5}$. Adapté de la référence [3] avec la permission de l'EEA.

Les $PM_{0.1}$ (particules < 100 nm), appellées « nanoparticules », sont majoritaires en nombre parmi les $PM_{2.5}$. Elles ont un temps de vie dans l'atmosphère plus long que les $PM_{2.5}$ et elles peuvent être transportées sur des milliers de kilomètres. Elles ont également un rapport surface/volume très élevé. Pour finir, elles atteignent les alvéoles lorsqu'elles sont inhalées et peuvent alors pénétrer dans le sang.

Malgré le danger représenté par les nanoparticules (Nps), leur incorporation dans les produits à usage quotidien ne fait qu'augmenter[4], et leur production est donc en forte

hausse (*Figure 3*). Quand les nanoparticules sont générées à l'échelle industrielle, une partie contamine l'atmosphère sous forme d'aérosols[5–10]. Les ouvriers travaillant sur les zones de production sont alors exposés si les usines n'ont pas mis en place des stratégies de prévention.

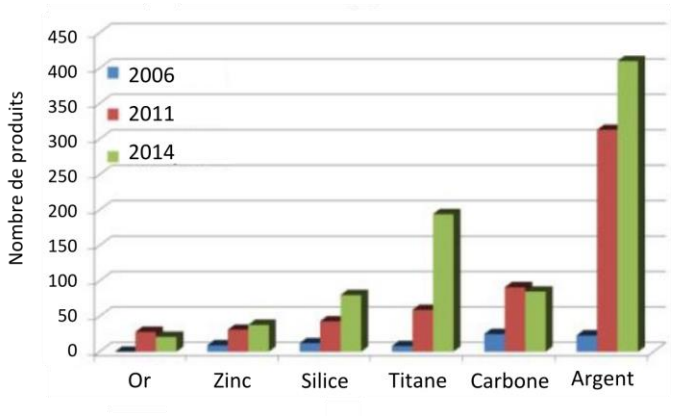


Figure 3 : Nombre de produits du marché contenant des nanoparticules en fonction de la composition chimique des particules. Adapté de la référence [4] avec la permission de Springer.

De nombreuses études épidémiologiques montrent que les nanoparticules sont la cause de maladies pulmonaires et cardiaques[11–19]. Les Nps induisent notamment la diminution des fonctions pulmonaires et l'augmentation de la vasoconstriction. Leur inhalation également liée à l'augmentation du nombre de cancers pulmonaires, d'hospitalisations et de décès[20,21]. Les personnes ayant des maladies respiratoires comme l'asthme et la broncho-pneumopathie chronique obstructive sont plus sensibles au dépôt des Nps inhalées. Ce phénomène aggrave généralement les symptômes des malades[22–26].
Au-delà de l'aspect humain, l'OMS et l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE) estiment que la pollution en Europe induit des frais de santé de 1 400 milliards d'euros par an[27]. Les particules fines constituent donc un réel problème de société.

2) Structure et fonction des poumons

a) Généralités

L'appareil respiratoire est composé du nez, de la bouche, du pharynx, du larynx, de la trachée, des poumons et du diaphragme. L'homme possède deux poumons : le droit, composé de trois lobes, et le gauche, composé de deux lobes. La fonction principale des poumons est la respiration. Cependant, ils remplissent aussi des fonctions métaboliques, permettent d'éliminer certaines substances contenues dans le sang et maintiennent le pH sanguin à la valeur physiologique de 7.4[28].
Les poumons ont une structure fractale contenant 23 niveaux de division. Ils sont formés par les bronches, les bronchioles et les sacs alvéolaires, eux même composés

d'alvéoles (*Figure 4*). Les bronches et bronchioles conduisent l'air jusqu'aux alvéoles, où les échanges gazeux avec le sang ont lieu grâce à la présence d'un réseau très développé de capillaires[29].
Les poumons sont également connectés au système lymphatique qui est composé de nombreux vaisseaux transportant la lymphe. La fonction de ce dernier est de conserver l'homéostasie du système respiratoire et de protéger le corps contre des pathogènes aériens. Les échanges entre poumons et lymphe ont lieu via les nœuds lymphatiques[30].

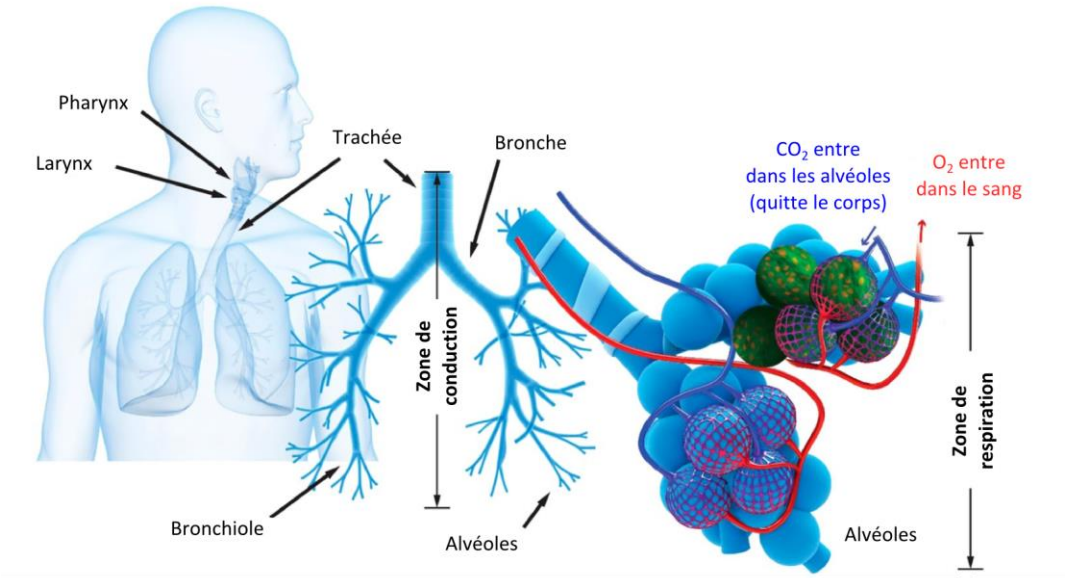


Figure 4 : Représentation schématique du poumon, de la structure fractale des bronches et bronchioles et de l'organisation en « grappe » des alvéoles fortement vascularisées. Adapté de la référence [29] avec la permission de l'ACS.

Le poumon est constitué d'une quarantaine de cellules différentes et de matrice extracellulaire. On trouve notamment des cellules épithéliales, endothéliales, nerveuses ou lymphoïdes, des fibroblastes et des cellules du système immunitaire (macrophages, cellules dendritiques, …)[31]. La matrice extracellulaire a un rôle important puisqu'elle participe au maintien de l'intégrité et de l'homéostasie des organes. Dans les poumons, cette matrice est principalement produite par les fibroblastes. Elle est entre autres composée de collagène I et III, qui participent à la résistance à la traction, de collagène IV et de laminine qui se situent principalement au niveau de la membrane basale, et de nombreuses protéines, comme par exemple l'élastine, qui contribue à l'élasticité des tissus pulmonaires[29].
L'épithélium est la première barrière cellulaire rencontrée par les particules[32,33]. La variété des cellules qui le composent et leurs différences en fonction de leur localisation dans le poumon témoignent de la complexité de cet organe[27] (*Figure 5*). Par exemple, l'épithélium bronchique est relativement épais (25 à 40 µm). Il sécrète du mucus, qui

peut être évacué vers la trachée par le battement des cils de cellules spécifiques appelées cellules ciliées. Ce mouvement des cils et du mucus constitue «l'escalier muco-ciliaire». A l'inverse, les cellules des alvéoles sont fines (200 nm environ) et le fluide sécrété par l'épithélium alvéolaire n'est pas évacué hors de l'organisme.

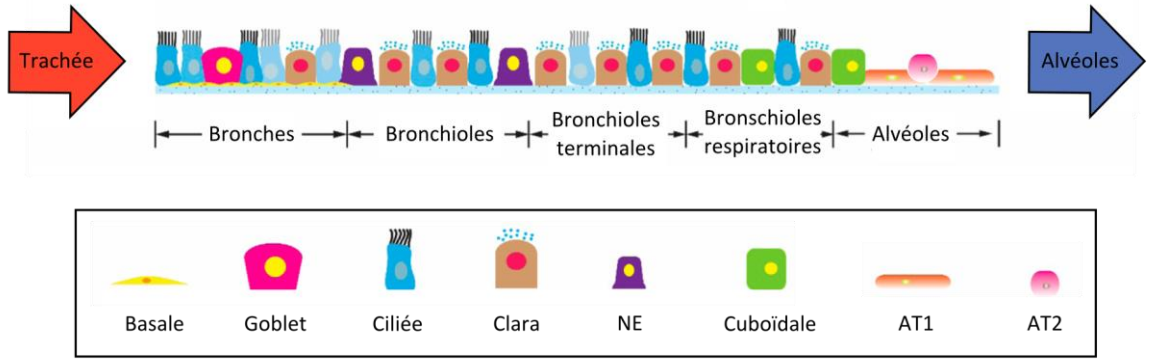


Figure 5 : Représentation des principales cellules épithéliales du poumon, de la trachée aux alvéoles. Adapté de la référence [29] avec la permission de l'ACS.

b) Les alvéoles

Les alvéoles ont un rôle capital puisqu'elles sont le siège des échanges gazeux. La description qui suit est basée sur plusieurs revues[29,34–36]. On dénombre environ 480 millions d'alvéoles par poumon[37]. De forme polyédrique, elles sont serrées les unes contre les autres dans les sacs alvéolaires (*Figure 6a*). Elles mesurent environ 200 µm de diamètre[37] et sont entourées de capillaires sanguins (*Figure 6b*). Ces derniers contiennent les globules rouges, transporteurs du dioxygène. Cette structure spécifique permet de développer une surface destinée à la respiration estimée entre 50 et 100 m^2 pour un poumon humain. Lors de l'expiration, le volume des poumons diminue de 10% et la surface alvéolaire de 20%.

Les alvéoles contiennent des macrophages qui assurent la défense immunitaire. L'épithélium alvéolaire (*Figure 6d*) est quant à lui composé de deux types de cellules : les pneumocytes de type 1 (AT1) et de type 2 (AT2). Les cellules AT1 représentent 10% en nombre de la population cellulaire des alvéoles mais couvrent 90% de leur surface. De par leur faible épaisseur (< 0.2 µm[34]), elles permettent les échanges gazeux par diffusion. Les cellules AT2 représentent 15% en nombre des cellules des alvéoles et 7% de leur surface. Leur fonction première est de produire le surfactant pulmonaire, qui est alors sous forme de corps lamellaires.

Le surfactant pulmonaire tapisse les alvéoles sur 100 à 500 nm d'épaisseur[34]. Il est composé de phospholipides, de protéines du sérum et de protéines spécifiques du poumon. Sa concentration totale est de 35 g L^{-1} [34,38]. Il peut être divisé en deux phases : la phase aqueuse, dite hypophase, et la phase « film » composée de phospholipides adsorbés à l'interface air-liquide (*Figure 6c*). Le surfactant joue un rôle primordial.

Outre sa fonction de défense de l'organisme, il permet d'éviter l'effondrement ou l'explosion des alvéoles.

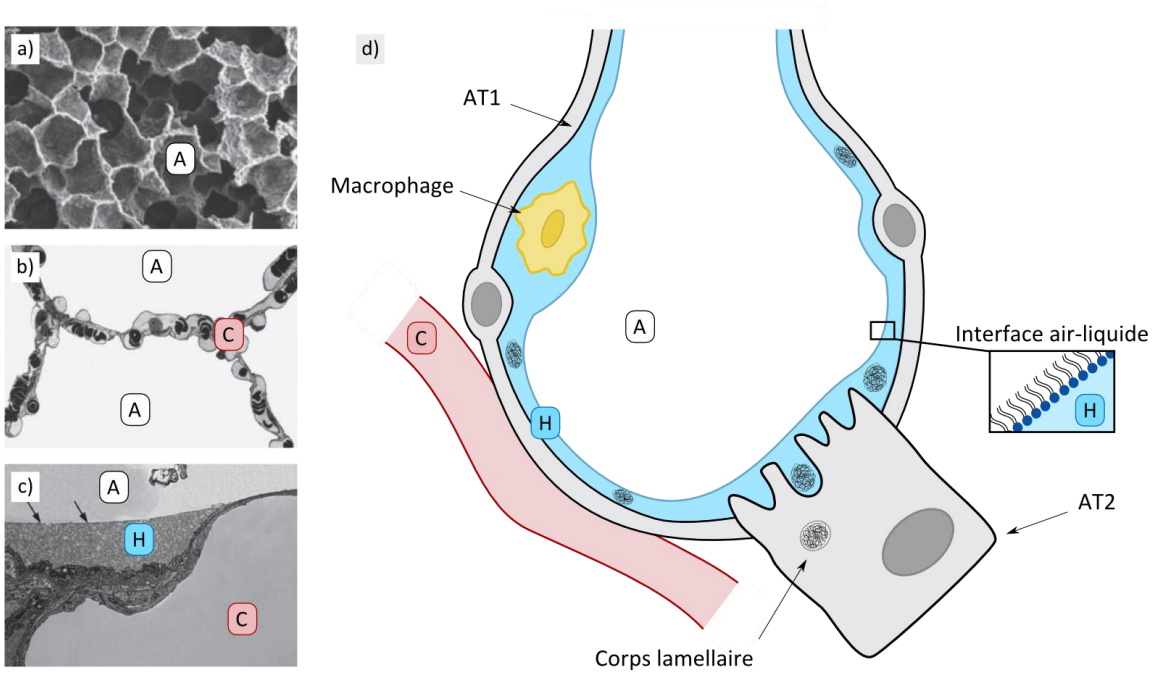


Figure 6 : a) Image de microscopie à balayage des alvéoles (A). Grossissement : x60. b) Image d'alvéoles (A) et des capillaires sanguins (C) observés en microscopie électronique à transmission. Les points noirs sont des globules rouges. Grossissement : x500. c) Image de microscopie électronique d'une alvéole (A) et d'un capilaire sanguin (C). L'alvéole est tapissée de surfactant pulmonaire. L'hypophase (H) est visible et l'interface air-liquide est indiquée par les flèches noires. Grossissement : x7000. Les images a, b et c sont adaptées de la référence [35]. d) Représentation schématique d'une alvéole. Adapté de la référence [36] avec la permission de Elsevier.

Ce dernier constat peut s'expliquer avec la loi de Laplace. Considérons deux alvéoles sphériques, connectées entre elles et de diamètres R_S et R_L tels que $R_S < R_L$ (*Figure 7*). On suppose que la tension de surface σ est la même dans ces alvéoles. On note P_S et P_L les pressions gazeuses à l'intérieur de la petite et de la grande alvéole respectivement.
En appliquant la loi de Laplace, on trouve que P_S est supérieure à P_L. Pour des tensions de surface de l'ordre de grandeur de celle de l'eau (70 mN m^{-1}), l'équilibre des pressions induit alors l'effondrement des petites alvéoles et l'expansion des plus grandes. La surface dédiée aux échanges gazeux est ainsi diminuée. Cependant, ce phénomène n'est pas observé *in vivo*, grâce à la phase film du surfactant. Dans les poumons, le fluide pulmonaire impose une tension de surface très faible (quelques mN m^{-1}) dont la valeur varie suivant la taille des alvéoles. La présence du surfactant pulmonaire réduit alors les effets de capilarité[34].

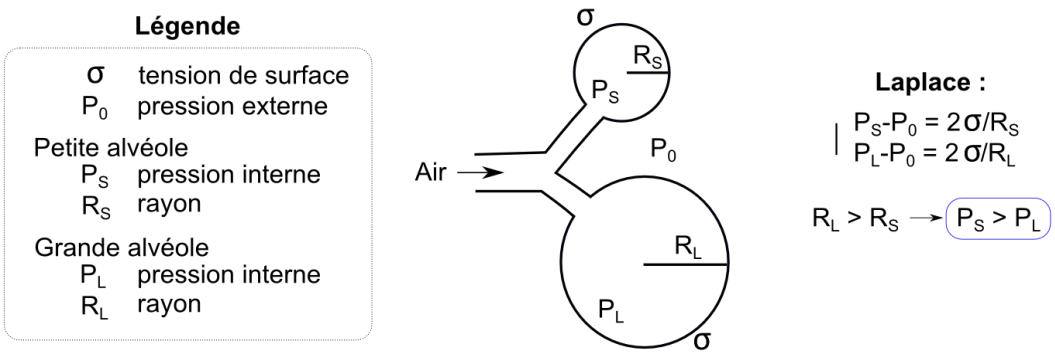


Figure 7 : Instabilité alvéolaire d'après la loi de Laplace. Adapté de la référence [34].

II. Inhalation de particules

1) Transport et dépôt

Le transport et la déposition des aérosols dans l'appareil respiratoire dépendent principalement de la taille, de la forme et de la densité des particules[39]. Typiquement, il a été prédit que les Nps de taille inférieure à 5 nm et supérieure à 1 µm se déposent majoritairement dans le nez, le pharynx et le larynx. Celles entre 1 et 10 nm se retrouvent surtout dans les bronches et les bronchioles. Les nanoparticules de 10 à 200 nm atteignent quant à elles les alvéoles (*Figure 8*). Différents modèles, validés par l'expérience, confirment ces prédictions[40].

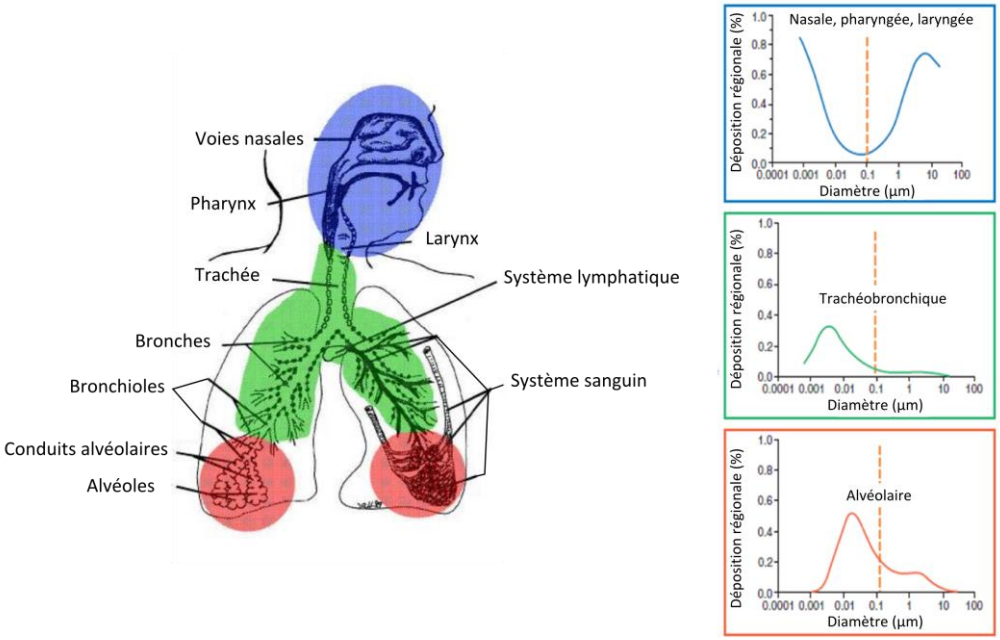


Figure 8 : Prédiction de la déposition de particules inhalées le long des voies respiratoires. Les résultats sont fondés sur les données de la Commission Internationale de Protection Radiologique (1994). Ils sont donnés en pourcentage de la dose inhalée. Adapté de la référence [39].

Les figures de déposition de Nps s'expliquent de la façon suivante[41]. Les particules denses ou supérieures à la centaine de nanomètres ont soit une inertie importante par rapport au flux d'air, soit une tendance à subir les effets de la gravité. Elles dévient donc rapidement de l'écoulement gazeux produit par l'inspiration et se déposent dans la partie haute de l'appareil respiratoire. La déposition due à l'inertie est appelée « impact inertiel » et celle due à la gravité est dite « sédimentation gravitationnelle ».
Les particules entre 10 et 100 nm sont transportées par convection (*Figure 9a*). Elles suivent alors le flux d'air jusqu'aux alvéoles. A cause de la géométrie de ces dernières, le flux devient circulaire et un mélange chaotique entre l'air résiduel présent dans les alvéoles et l'air inhalé provoque le dépôt des particules[42] (*Figure 9b*).

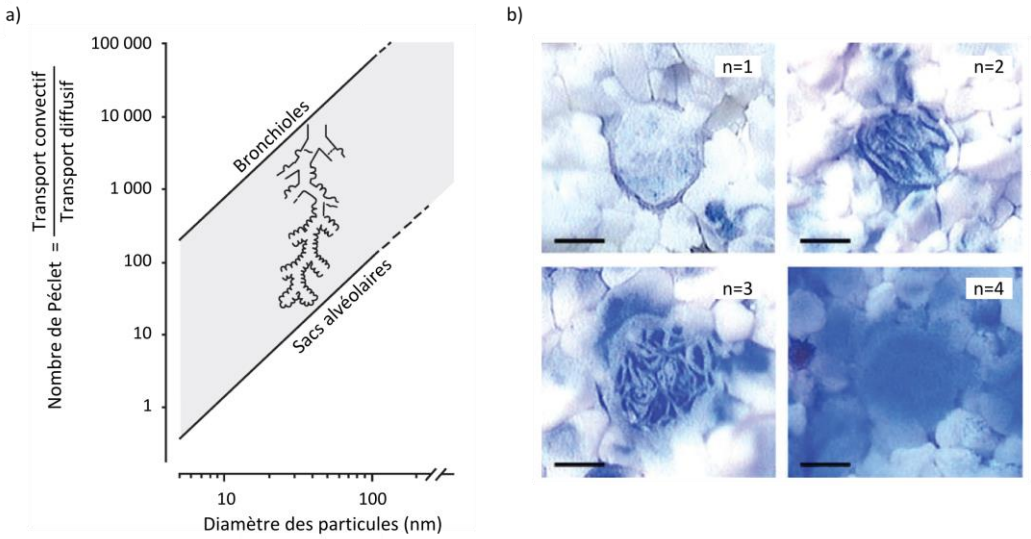


Figure 9 : a) Nombre de Péclet des nanoparticules dans les bronchioles et alvéoles en fonction de la taille des particules. Adapté de la référence [41]. b) Figure observée chez le rat lorsque l'air résiduel des alvéoles (incolore sur la figure à n = 1) se mélange à l'air inspiré (marqué en bleu), après n = 1 à 4 cycles de ventilation. La rapidité de mélange des fluides ainsi que les figures obtenues témoignent d'un processus hydrodynamique chaotique. Barres d'échelle : 100 nm. Adapté de la référence [42].

Les nanoparticules de taille inférieure à 10 nm sont quant à elles transportées par diffusion. Les particules entre 5 et 10 nm diffusent jusqu'aux bronches et bronchioles alors que les particules plus petites se déposent dans le nez, le pharynx et le larynx.

2) Devenir des particules

Les informations présentées dans cette partie sont issues des revues publiées par Bajaj *et al.* et par Kreyling *et al.*[29,43]. Les particules de taille supérieure au micron, principalement déposées dans les voies respiratoires, restent à la surface de l'épithélium. En moins d'une journée, la majorité de ces microparticules est éliminée grâce à

l'escalier muco-ciliaire et la toux. En revanche, les particules déposées dans le nez peuvent être internalisées par les cellules nerveuses olfactives et atteindre le cerveau[44].
Le temps d'élimination des microparticules augmente avec leur profondeur de pénétration dans les poumons. Deux raisons expliquent cette observation : le chemin vers le milieu extérieur est allongé et la vitesse de transport du mucus diminue.
Au niveau des alvéoles, pour les particules non solubles, plusieurs mécanismes d'élimination existent (*Figure 10*). Les particules les plus grosses sont phagocytées par les macrophages alvéolaires et transportées vers l'épithélium bronchique. Les macrophages sont alors évacués de l'organisme grâce à l'escalier muco-ciliaire. Les particules les plus petites échappent à la vigilance des macrophages. Quelques-unes d'entre elles (moins de 0.5%) sont transportées vers les nœuds lymphatiques ou dans le sang, quelques heures seulement après inhalation. Ces particules, peu nombreuses, s'accumulent alors dans les organes secondaires, les tissus et les os[45–49].
La majorité des nanoparticules pénètre en quelques heures dans l'épithélium alvéolaire où elles restent piégées plusieurs mois. Elles sont ensuite relâchées dans le surfactant puis capturées par les macrophages alvéolaires. Le taux d'élimination de ces particules est de 1 à 3% après inhalation puis décline avec le temps. Ainsi, plus de 6 mois après inhalation, 10% des particules sont toujours présentes dans les poumons.

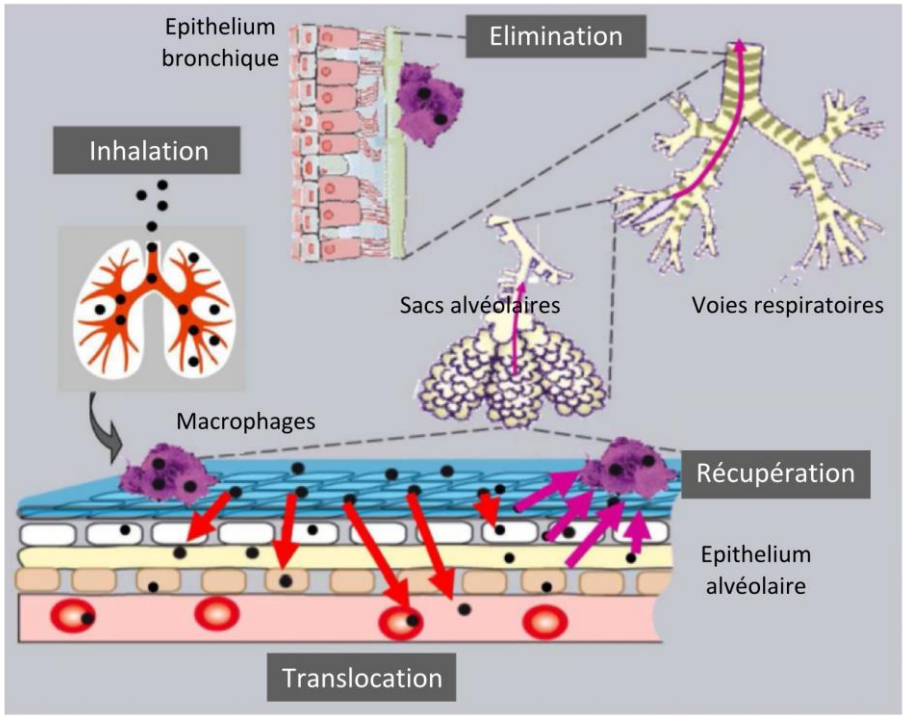


Figure 10 : Devenir des nanoparticules après déposition dans les alvéoles. Adapté de la référence [43] avec la permission de l'ACS.

III. Impact des nanoparticules sur le vivant au niveau local

1) Observations *in vivo*

Les nanoparticules peuvent être retenues plusieurs mois dans l'épithélium pulmonaire avant d'être éliminées[43]. Des études *in vivo* ont été réalisées afin de prévoir l'impact de cette rétention sur la santé.

Généralement, des rongeurs sont exposés à des nanomatériaux par inhalation ou instillation. Les échantillons utilisés sont variés (particules manufacturées[50,51], polluants atmosphériques[52–54], ...). Les analyses sont réalisées soit à l'échelle du poumon soit à celle des alvéoles. Dans le second cas, le surfactant pulmonaire est récupéré par lavage broncho-alvéolaire puis est étudié en profondeur.

Ces expérimentations animales ont permis de montrer que de nombreux effets sont induits par l'exposition aux nanoparticules. On peut citer les exemples suivants : endommagement de l'épithélium pulmonaire[51,55], perturbation du métabolisme et du catabolisme du surfactant[56], diminution du nombre de cellules (ciliées et non ciliées)[53], diminution des capacités d'inspiration et d'expiration[50,57], fibrose[57], granulomes[50], augmentation de la coagulation sanguine[57], épaississement[50] et perte de l'élasticité[57] des parois alvéolaires, production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS en anglais)[52,55], stress oxydatif[54,57], inflammation[50,55,57], activation du système immunitaire (recrutement des lymphocytes, activation des macrophages, ...)[51] et perte d'efficacité de ce dernier[50,53].

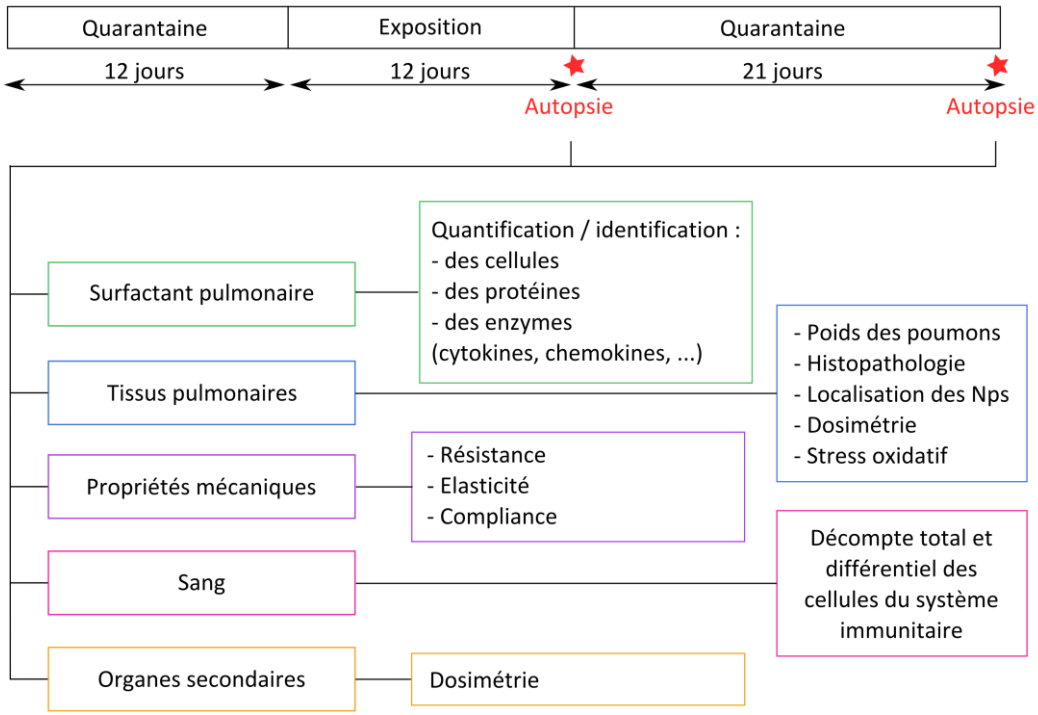


Figure 11 : Plan d'expérience pour une étude *in vivo* complète de l'impact des Nps inhalées. Adapté de la référence [50] avec la permission de Wiley.

Outre le fait que ces données s'appuient sur trop peu d'études, la question de la légitimité du modèle murin se pose[43]. Il est donc urgent d'obtenir plus d'informations sur les effets des Nps et de comprendre les mécanismes pathogéniques qu'elles induisent. Pour cela, Adamcakova-Dodd *et al.* ont proposé un plan d'expérience (*Figure 11*) prescrivant une analyse extensive de chaque animal sacrifié (analyse du surfactant pulmonaire, des tissus du poumon, de leur mécanique, du sang et des organes secondaires)[50].

2) Observations *in vitro*

L'impact des nanoparticules sur les cellules pulmonaires a largement été étudié *in vitro*. Il a été montré que l'interaction particule/poumon dépend de certaines propriétés physicochimiques des Nps. On peut notamment citer l'impact de la taille, de l'état d'agrégation, de la forme, de la composition chimique, de l'état cristallin, de la charge de surface, ainsi que de la dissolution et de la réactivité de surface en milieu physiologique[58,59]. Cependant, la caractérisation des nanomatériaux en amont d'une étude *in vitro* n'est pas encore systématique.

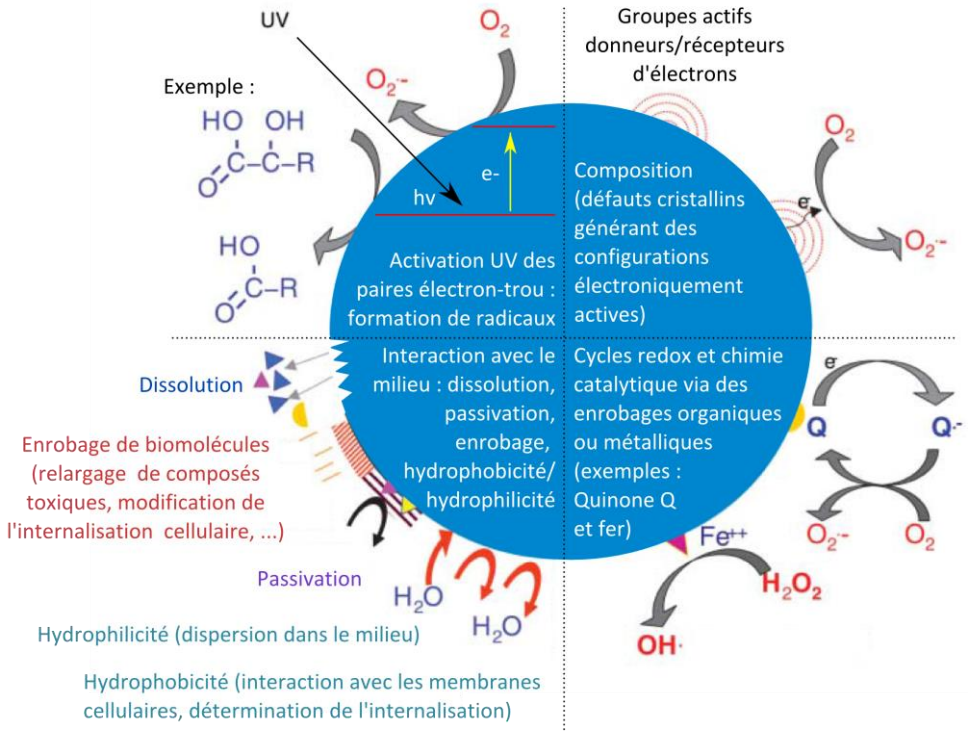


Figure 12 : Mécanismes possibles d'interaction entre nanomatériaux et tissus biologiques. Les exemples illustrent l'importance de la composition de la particule, de sa structure électronique, des espèces liées à la surface, de l'enrobage (actif ou passif), de la solubilité et de la réactivité avec le milieu extérieur. Adapté de la référence [59] avec la permission de l'AAAS.

Le principal effet des Nps dans les cellules est la production d'espèces réactives de l'oxygène (*Figure 12*). Ces molécules peuvent induire du stress oxydatif, de l'inflammation, de la cytotoxicité, de la génotoxicité et la mort cellulaire. La production de ROS, l'activation des voies de signalisation et l'apoptose pourraient être la cause des maladies pulmonaires observées chez l'humain[35].

L'adéquation des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* pour les mêmes particules est relativement faible[60,61]. Le fait que les cellules soient exposées *in vitro* à des doses de Nps particulièrement élevées pourrait contribuer à ces observations. De plus, jusqu'à présent, les études *in vitro* étaient réalisées en diluant simplement les nanoparticules d'intérêt dans du « milieu physiologique »[62]. Les particules étaient alors généralement très agrégées.

A l'inverse, *in vivo*, les Nps sont probablement dispersées dans le surfactant pulmonaire puisqu'elles sont inhalées à de très faibles doses. Ainsi, l'état de dispersion des particules est différent *in vivo* et *in vitro*. Cette discordance contribue à diminuer la pertinence des tests cellulaires.

En 2005, l'« Institut national pour la sécurité et la santé au travail » aux Etats-Unis (NIOSH) publie un communiqué sur les protocoles *in vitro*[63]. Il est proposé de disperser les nanomatériaux dans du DPPC, phospholipide majoritaire du surfactant pulmonaire. La préoccupation du NIOSH est principalement de limiter l'agrégation des particules[64] dans l'optique d'améliorer les tests cellulaires (*Figure 13*).

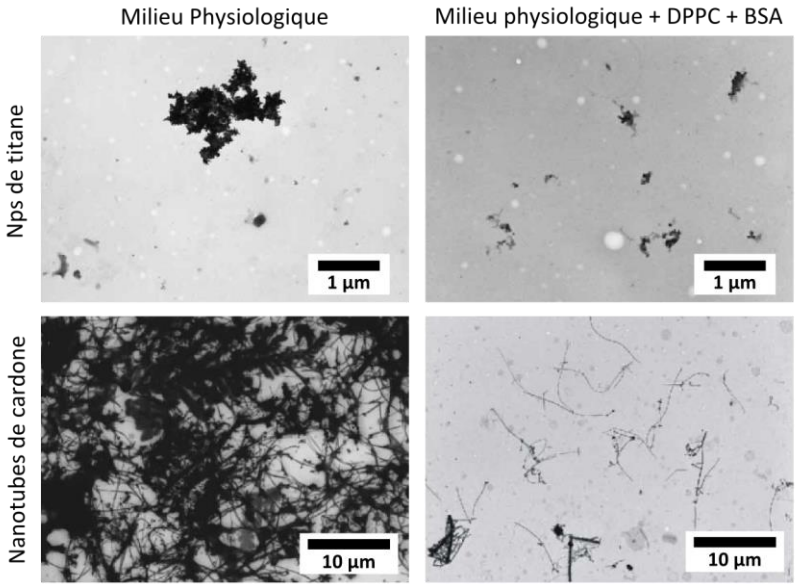


Figure 13 : Nanoparticules de titane et nanotubes de carbone dilués dans du milieu physiologique ou soniqués dans du milieu physiologique contenant du DPPC et de la protéine BSA. Adapté de la référence [64] avec la permission de Taylor & Francis Ldt.

Le protocole de l'Institut NIOSH constitue une avancée significative dans le domaine de la toxicité des particules inhalées. En effet, il a été montré *in vivo* que les nanomatériaux atteignant les alvéoles interagissent avec le fluide pulmonaire[65]. En outre, l'interaction entre Nps et biomolécules est connue pour modifier le comportement des particules vis-à-vis des cellules[66–71]. L'introduction de surfactant pulmonaire dans les tests *in vitro* semble donc nécessaire pour mieux appréhender l'*in vivo*.

Récemment, différentes équipes ont montré que la pré-incubation de nanoparticules avec des composants du surfactant pulmonaire modifie la toxicité ou l'internalisation des Nps par les macrophages alvéolaires ou par les cellules épithéliales[65,72–85]. Souvent, les nanomatériaux sont simplement soniqués dans du surfactant modèle et les objets obtenus ne sont pas caractérisés en détail. De plus, les proportions entre particules et surfactant ainsi que les modèles de fluides pulmonaires utilisés, varient d'un groupe à l'autre. La simple application du « protocole NIOSH » ne semble alors pas suffisante pour comprendre l'interaction entre nanoparticules, surfactant et cellules.

3) Lacunes

De nombreux pans de connaissance restent à combler dans la compréhension du devenir des nanoparticules après dépôts dans les alvéoles[62,86]. On peut notamment suggérer les axes de recherche suivants :

- ✓ Etude toxicologique utilisant des protocoles normalisés, et appliquant des doses pertinentes de nanoparticules
- ✓ Exposition chronique, notamment pour déterminer l'impact de l'accumulation à long terme de nanoparticules dans les organes secondaires
- ✓ Etude des mécanismes qui déterminent le transport des Nps à travers les différentes barrières (surfactant, cellules pulmonaires, endothélium et épithélium sanguin,…) et le relargage à long terme dans le surfactant des Nps piégées dans l'épithélium alvéolaire
- ✓ Bio-cinétiques d'élimination à court et long terme chez l'humain
- ✓ Rôle du surfactant pulmonaire dans la toxicité des particules, leur interaction avec les cellules, leur translocation vers le sang, leur capture par les macrophages, …

Dans cette thèse, nous avons choisi de nous intéresser à ce dernier point en nous focalisant sur l'interaction entre nanoparticules et surfactant pulmonaire.

IV. Interaction entre particules et surfactant pulmonaire

1) Le surfactant pulmonaire

Le surfactant pulmonaire est un biofluide complexe. Sa composition, son « cycle de vie » et sa fonction physiologique ont été décrits dans plusieurs revues[2,87–90].

a) Composition

Le surfactant pulmonaire est composé en masse de 88% de phospholipides, 5% de lipides (cholestérol) et 7% de protéines[91] (*Figure 14*).

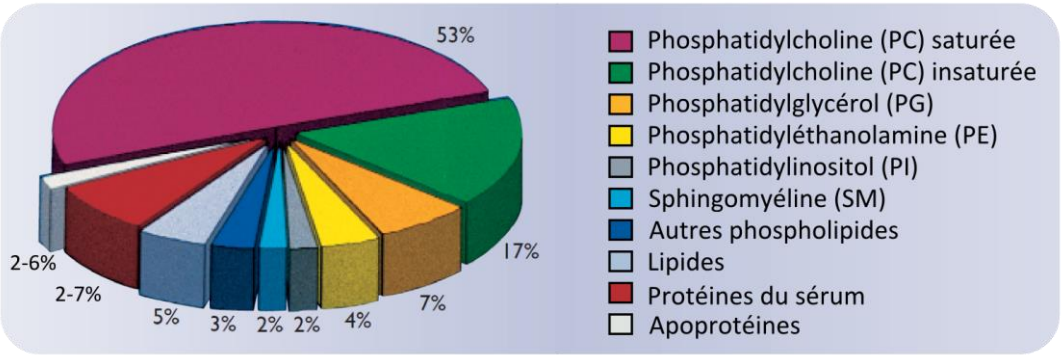


Figure 14 : Composition du surfactant pulmonaire humain. Abréviations : phosphatidylcholine – PC ; phosphatidylglycérol – PG ; phosphatidyléthanolamine – PE ; phosphatidylinositol - PI ; sphingomyéline – SM. Adapté de la référence [91].

Les phospholipides[92] sont des molécules amphiphiles composées d'une tête polaire et de deux chaines aliphatiques, pouvant être saturées ou non (*Figure 15*). Ils s'auto-assemblent en bicouches, qui donnent naissance à des vésicules dans le cas du surfactant pulmonaire. Cet aspect sera détaillé par la suite.

Le dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) est le phospholipide le plus abondant du fluide pulmonaire. Il représente 40% en masse du surfactant. Il est essentiel dans le fonctionnement du poumon et dans l'embryogénèse. Le surfactant contient en nombre autant de cholestérol et de phospholipides insaturés que de phospholipides saturés. Les phospholipides anioniques (PG et PI) ont un rôle important de par la charge négative qu'ils confèrent aux membranes.

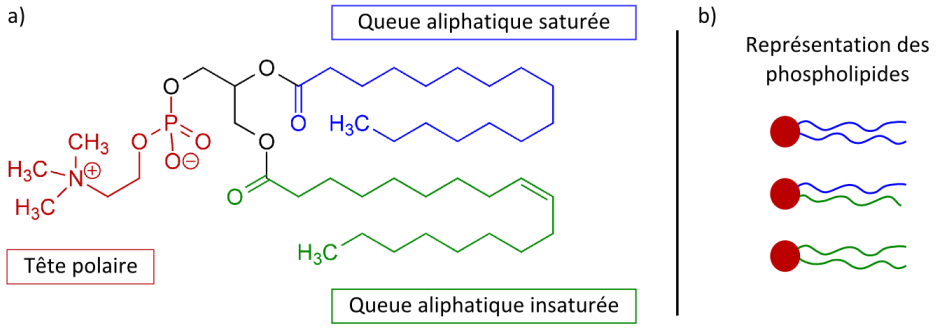


Figure 15 : a) Structure chimique du phospholipide 1-Palmitoyl-3-oleoyl-phosphatidylcholine. b) Représentation schématique des phospholipides saturés et insaturés. Adapté de la référence [92].

Le surfactant pulmonaire contient des protéines du sérum, et des protéines spécifiques du poumon, appelées protéines SP-A, SP-B, SP-C et SP-D. Les protéines SP-A et SP-D, de la famille des collectines, sont hydrophiles. Elles représentent respectivement 3 - 5% et 0.5% en masse du surfactant. Elles sont assemblées à partir de plusieurs sous-unités monomériques de 26 - 38 kDa et 43 kDa respectivement. Les protéines SP-A et SP-D sont sécrétées directement dans l'espace alvéolaire. Leur rôle principal est de se lier aux pathogènes (virus, bactéries, fungi) afin d'améliorer leur reconnaissance par les macrophages.
Les protéines SP-B et SP-C sont hydrophobes et chargées positivement. Elles sont de petite taille (8.7 et 4.2 kDa resp.) et représentent 0.7% et 0.5% en masse du surfactant. La protéine SP-B est composée de 4 hélices α reliées par des boucles non structurées. La SP-C est constituée d'une hélice α et d'un segment terminal. Ces hélices leur permettent de s'insérer dans les bicouches de phospholipides du surfactant. Ces deux protéines sont sécrétées par les cellules AT2, en même temps que les phospholipides. La protéine SP-B est indispensable à la maturation et au fonctionnement du surfactant.

b) Cycle de vie

Le surfactant pulmonaire est synthétisé par les pneumocytes AT2 des alvéoles. Il est alors sous forme de bicouches très compactes, appelées corps lamellaires, contenant les phospholipides et les protéines SP-B et SP-C. Les corps lamellaires sont libérés par exocytose dans l'hypophase et donnent naissance à des structures appelées « larges agrégats » (*Figure 16*). Ces larges agrégats regroupent des vésicules multilamellaires denses (*Figure 16f et g*) mais aussi des structures organisées peu denses (myélines tubulaires)[93]. La transition entre corps lamellaires et larges agrégats n'est pas bien comprise. Elle est supposée être liée à des changements de pH, de concentration en calcium et d'hydratation des phospholipides.
Les bicouches des larges agrégats s'adsorbent à l'interface air-liquide afin de former une monocouche de phospholipides[93]. Ce film donne naissance à un réseau 3D interconnecté de bicouches favorisant la diffusion du dioxygène jusqu'à l'épithélium. Les protéines SP-A sont supposées aider à transporter les larges agrégats jusqu'à l'interface air-liquide. L'adsorption des phospholipides, peu favorable énergétiquement, est possible grâce aux protéines SP-B et SP-C (*Figure 17*).
Lors des cycles de respiration, le film interfacial se compresse et s'expand. Des phospholipides sont alors éjectés de la monocouche sous forme de vésicules unilamellaires appauvries en protéines SP-B et C, appelées « petits agrégats » (SA). Ces vésicules sont dirigées, probablement grâce aux protéines SP-D, vers les macrophages où elles sont détruites et vers les pneumocytes AT2 où les phospholipides sont recyclés. Le temps de renouvellement du surfactant pulmonaire est estimé entre 4 et 11 h et les protéines du surfactant participent au maintien de son homéostasie.

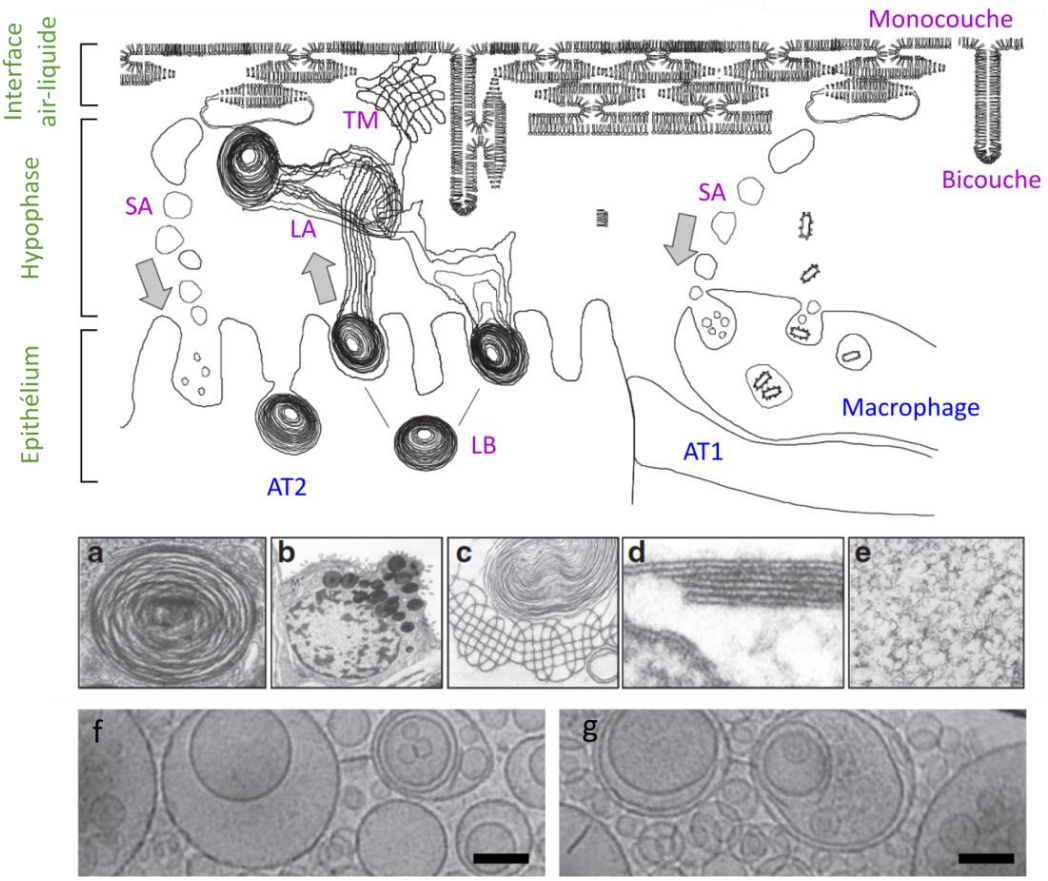


Figure 16 : Cycle de vie du surfactant pulmonaire. Abréviations : LB – corps lamellaire (lamellar bodies) ; TM – myéline tubulaire ; SA – petits agrégats (small aggregates) ; LA – larges agrégats. a-e) Images de microscopie électronique d'un corps lamellaire LB (a), de l'exocytose des corps lamellaires par les cellules AT2 (b), des myélines tubulaires et des vésicules multilamellaires de l'hypophase (c), du film à l'interface air/liquide (d) et des petits agrégats SA (e). Adapté de la référence [90] avec la permission de Elsevier. f-g) Images de microscopie cryo-électronique à transmission de l'hypophase du surfactant pulmonaire de rat. Barres d'échelle : 400 nm. Adapté de la référence [93] avec la permission de Wiley.

c) Fonction physiologique

La principale fonction du surfactant pulmonaire est de diminuer la tension de surface dans les alvéoles pour éviter leur effondrement ou leur éclatement. Durant l'inspiration, la tension de surface atteint 20 à 25 mN m^{-1}. Lors de l'expiration, elle est inférieure à 2 mN m^{-1}. Le DPPC, phospholipide majoritaire du surfactant, permet d'atteindre des valeurs aussi basses. En effet, ses deux chaines aliphatiques insaturées s'alignent parfaitement grâce aux interactions hydrophobes, ce qui permet un fort taux de compression.

Les membranes de DPPC sont à l'état solide à température physiologique. Le cholestérol et les autres phospholipides du surfactant fluidifient les bicouches de DPPC et permettent le repli du film interfacial en multicouches. La température de fusion du

surfactant est de 37.2 °C. A température physiologique, le surfactant exhibe une séparation de phase à l'échelle du micron, entre une phase ordonnée et une phase désordonnée plus fluide (*Figure 17b*). Plus précisément, les phospholipides du surfactant sont présents en phase gel, liquide condensé, liquide ordonné, liquide désordonné et liquide expansé. Le DPPC est principalement contenu dans les phases « rigides ». Ces dernières permettent d'atteindre une faible tension de surface lors de l'expiration. Les phospholipides insaturés sont quant à eux majoritaires dans les phases « fluides » qui permettent au film de se replier en multicouches (*Figure 17c*). Le cholestérol est présent dans les deux types de phases. Il modère la séparation en fluidifiant les phases rigides et en rigidifiant les phases fluides.

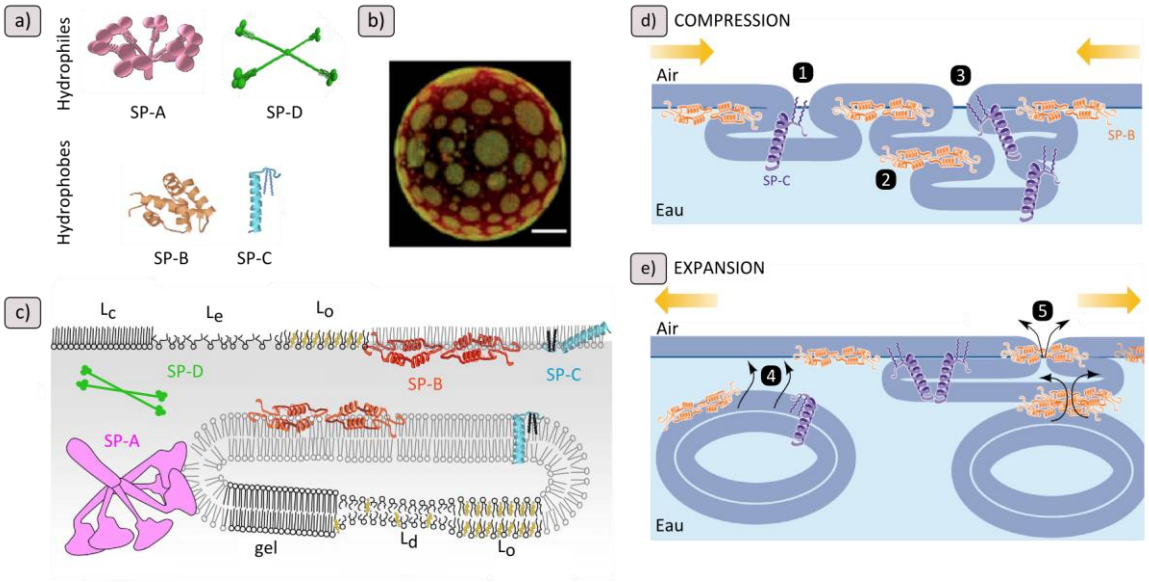


Figure 17 : a) Représentation schématique des protéines spécifiques du surfactant. b) Vésicule unilamellaire de surfactant d'origine porcine à 37 °C. Les phases désordonnées et ordonnées sont marquée par fluorescence en vert et en rouge respectivement. Adaptés de la référence [90] avec la permission de Elsevier. c) Structure des phases lipidiques du surfactant pulmonaire et de leur association avec les protéines spécifiques SP-A, B, C et D. Abréviations : L_c – liquide condensé ; L_o - liquide ordonné ; L_d – liquide désordonné ; L_e – liquide expansé. Adapté des références [88] et [2] avec la permission de Elsevier. d-e) Illustration de la dynamique du surfactant lors de la respiration. Le repliement des membranes durant l'expiration est facilité par les protéines SP-C et SP-B (1 et 2 resp.). SP-C promeut l'association des zones ordonnées exclues grâce à son segment terminal (3). L'insertion de nouvelles vésicules à l'interface et l'expansion de cette dernière lors de l'inspiration sont facilitées par les deux protéines SP-B et C (4 et 5). Adaptés de la référence [89].

Les protéines SP-A se lient aux domaines « rigides » et les SP-B et SP-C s'insèrent dans les membranes fluides (*Figure 17c*). La protéine SP-C est transmembranaire alors que les hélices de la protéine SP-B sont parallèles aux bicouches. La protéine SP-B perturbe la compacité des phospholipides, ce qui favorise la fuite des milieux aqueux

intra-vésiculaires, l'échange de phospholipides entre membranes et la fusion de vésicules entre elles ou avec le film interfacial, qu'elle stabilise par ailleurs. La protéine SP-C facilite les échanges entre les réservoirs et le film, maintient serrées entre elles les multicouches du film et aide à son expansion durant l'inspiration.
Pour finir, le surfactant pulmonaire peut être inactivé par plusieurs mécanismes : dysfonctionnements lors de la synthèse ou de la sécrétion par les AT2, oxydation des phospholipides et des protéines suite à une exposition répétée à l'air, adsoption compétitive de protéines provenant du système sanguin (albumine) suite à un endommagement de l'épithélium. L'inactivation du surfactant est la cause ou la conséquence de différentes pathologies.

2) Interaction entre particules et surfactant à l'interface air-liquide

Lorsque les nanoparticules atteignent les alvéoles, elles rencontrent en premier lieu le film de phospholipides à l'interface air-liquide. Les Nps sont connues pour induire localement des changements de phase. Il a été montré que des membranes composées de phospholipides de la famille des PC sont gelées localement lorsqu'elles sont en contact avec des Nps négatives alors que leur fluidité augmente en présence de particules positives[94,95]. Il est donc probable que l'inhalation de nanomatériaux affecte l'activité du surfactant pulmonaire.
L'influence de particules sur les propriétés du film interfacial a alors été largement étudiée. Généralement, les études portent sur l'élaboration de diagramme pression surface Π-A de monocouches de surfactants modèles contenant ou non des Nps. Certaines études sont menées sur un surfactomètre à bulles pulsatif et les surfaces sont parfois observées par microscopie à force atomique (AFM). Ainsi, des particules de titane, de polymères, de noir de carbone, d'hydroxyapatite, de silice, d'oxydes d'aluminium, et de zinc, d'or, de graphène, ainsi que des nanotubes de carbone ont été mises en contact avec du DPPC, des mélanges phospholipidiques DPPC/DPPG, DPPC/DOPC, DPPC/POPG et DPPC/cholestérol, des substituts thérapeutiques (Curosurf, …) et du surfactant endogène murin[56,96–107]. Les effects principaux des particules sur les monocouches phospholipidiques sont l'augmentation de la tension de surface et la diminution de la vitesse d'adsorption des phospholipides à l'interface air-liquide. De plus, il a été montré que le nombre et la taille des domaines fluides diminue (*Figure 18*). Les effets augmentent avec le temps d'interaction et la dose de particules.
Fan *et al.* ont étudié les mécanismes d'interaction entre des particules d'hydroxyapatite et un film de surfactant thérapeutique[101]. En plus des effets précédemment cités, ils ont observé que la structure latérale du film est modifiée par la présence des particules, notamment au niveau de la formation des multicouches adjacentes. Ils ont constaté que les dysfonctions du passage monocouche-multicouche durant les cycles de respiration sont corrélées à l'adsorption des protéines du surfactant sur les Nps. En outre, ces

résultats sont observés à des doses où les particules ne présentent pas de toxicité pour les cellules.

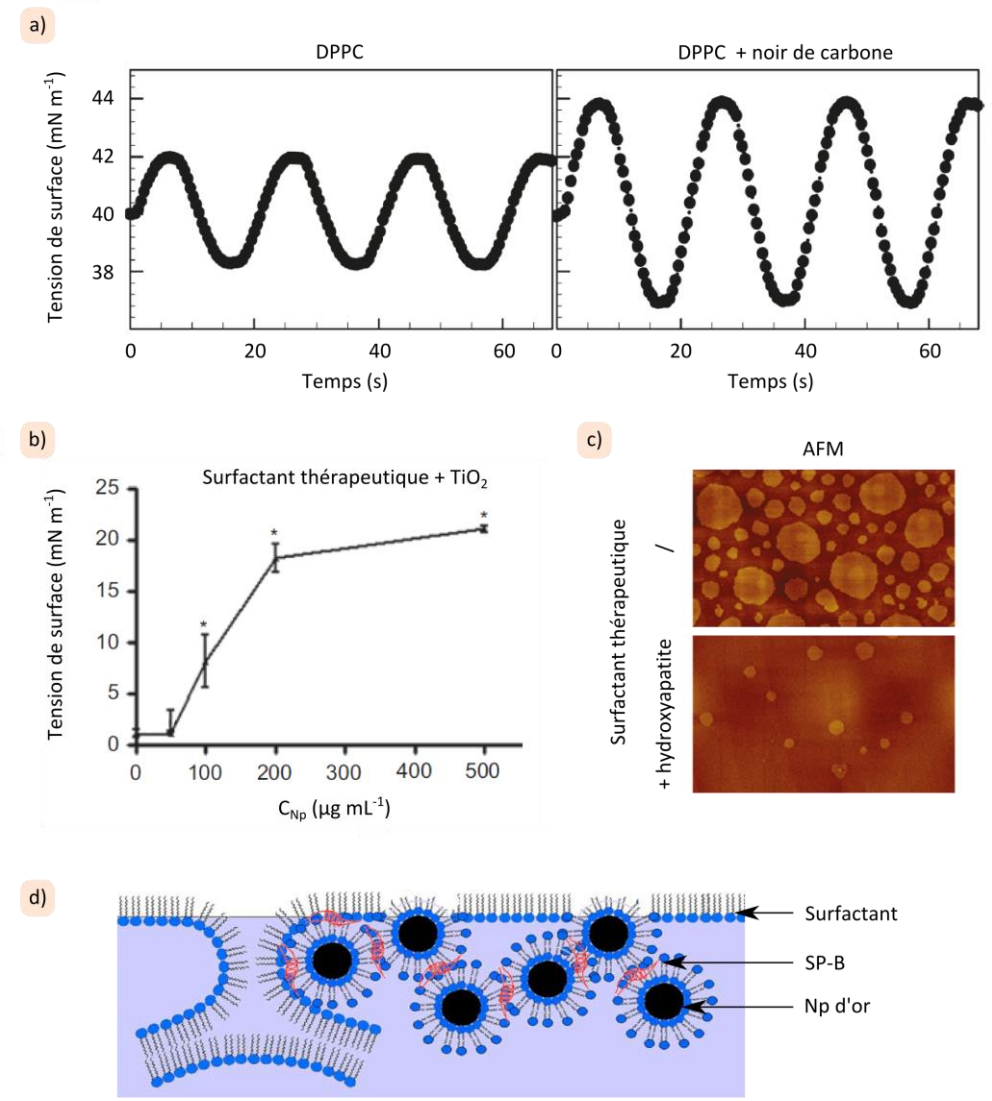


Figure 18 : a) Réponse de la tension de surface d'un film de DPPC à une variation de l'aire du film de 1% à 0.05 Hz. Adapté de la référence [98]. b) Effet de nanoparticules de titane sur la tension de surface d'un surfactant thérapeutique à la taille de bulle minimum (expérience menée sur un surfactomètre à bulle soumis à des cycles). Adapté de la référence [122]. c) Images de microscopie à force atomique (AFM) de surfactant thérapeutique pur ou exposé 3h à des nanoparticules d'hydroxyapatite, comprimé à 40 mN m^{-1}. Adapté de la référence [101]. d) Illustration de l'inhibition du surfactant par des particules d'or. Adapté de la référence [97]. Figures adaptées avec les permissions de l'ACS et de Elsevier.

Brakshi *et al.* ont couplé les analyses de surfactométrie à bulle avec de la microscopie à transmission électronique. Ils ont montré que l'inhibition d'un mélange phospholipides/protéine SP-B par des nanoparticules d'or résulte du fait que les Nps se

couvent de phospholipides et agrègent à cause des protéines. Yue *et al.* ont obtenu des résultats similaires en modélisation moléculaire[108].
Sachan *et al.* ont étudié la répartition de particules hydrophobes de poly-organosiloxane dans un film de phospholipides DPPC/DPPG. A faible taux de compression, les particules sont dans les phases fluides du film. Elles se retrouvent dans les multicouches attenantes au film à fort taux de compression. De plus, la présence de particules diminue le taux d'adsorption de vésicules de l'hypophase venant renouveler le film. Pour finir, ils ont mesuré le passage lent des particules dans la phase aqueuse au cours de l'application de cycles répétés de compression/expansion.
Aucune de ces expériences ne considère le cas où des particules sous forme d'aérosols se déposent sur le film. En général, les particules en solution sont déposées sur le film ou injectée dans la phase aqueuse qui se situe sous le film. Dans certains cas, les particules ont été mélangées avec les phospholipides, et les solutions ont été soniquées avant la formation du film. Comme nous le verrons dans le Chapitre 4, la sonication modifie drastiquement l'interaction entre nanomatériaux et phospholipides. L'ensemble de ces résultats est donc à considérer avec précaution.

3) Passage des nanoparticules à travers l'interface air-liquide

Il est important de connaitre le devenir des Nps déposées sur le film interfacial de phospholipides pour comprendre leur toxicité. Des modélisations moléculaires traitent de ce sujet[106,109–112]. Les études considèrent généralement une monocouche de DPPC, en expansion et compression, sur laquelle arrivent des particules, sphériques ou non, hydrophobes ou hydrophiles. Il a été montré que les particules hydrophobes restent piégées dans le film ou le traversent en se couvrant de phospholipides alors que les particules hydrophiles sont toujours « nues » lorsqu'elles atteignent l'hypophase. Hu *et al.* ont modélisé une monocouche plus complexe, contenant des phospholipides DPPC et POPG et des protéines SP-B (*Figure 19a*). Ils se sont penchés sur l'influence de la charge des Nps. Le passage des particules à travers le film interfacial semble relativement indépendant de la charge de ces dernières. Ils ont également montré que les protéines SP-B peuvent s'adsorber sur les particules hydrophiles. Le film est alors appauvri en protéines lors de la translocation des particules[104]. Ce phénomène est probablement la cause des dysfonctionnements du film observés en présence de particules.
Très peu d'équipes ont étudié expérimentalement le passage des Nps à travers le film de surfactant. Svensson *et al.* ont généré des aérosols d'or qu'ils ont déposés sur un film de surfactant pulmonaire endogène[113]. L'analyse des particules passées dans la phase aqueuse révèle que les nanoparticules ne sont pas agrégées et qu'elles sont couvertes de protéines. Ces résultats suggèrent que les Nps d'or se couvrent d'une couronne de biomolécules durant le passage à travers le film interfacial, et que cette couronne les protège contre l'agrégation. Dans ce travail, les auteurs n'ont pas cherché à déterminer

si des phospholipides étaient adsorbés ou non sur les Nps. Cet article représente néanmoins une avancée significative dans l'étude expérimentale de la translocation des particules à travers le surfactant pulmonaire.

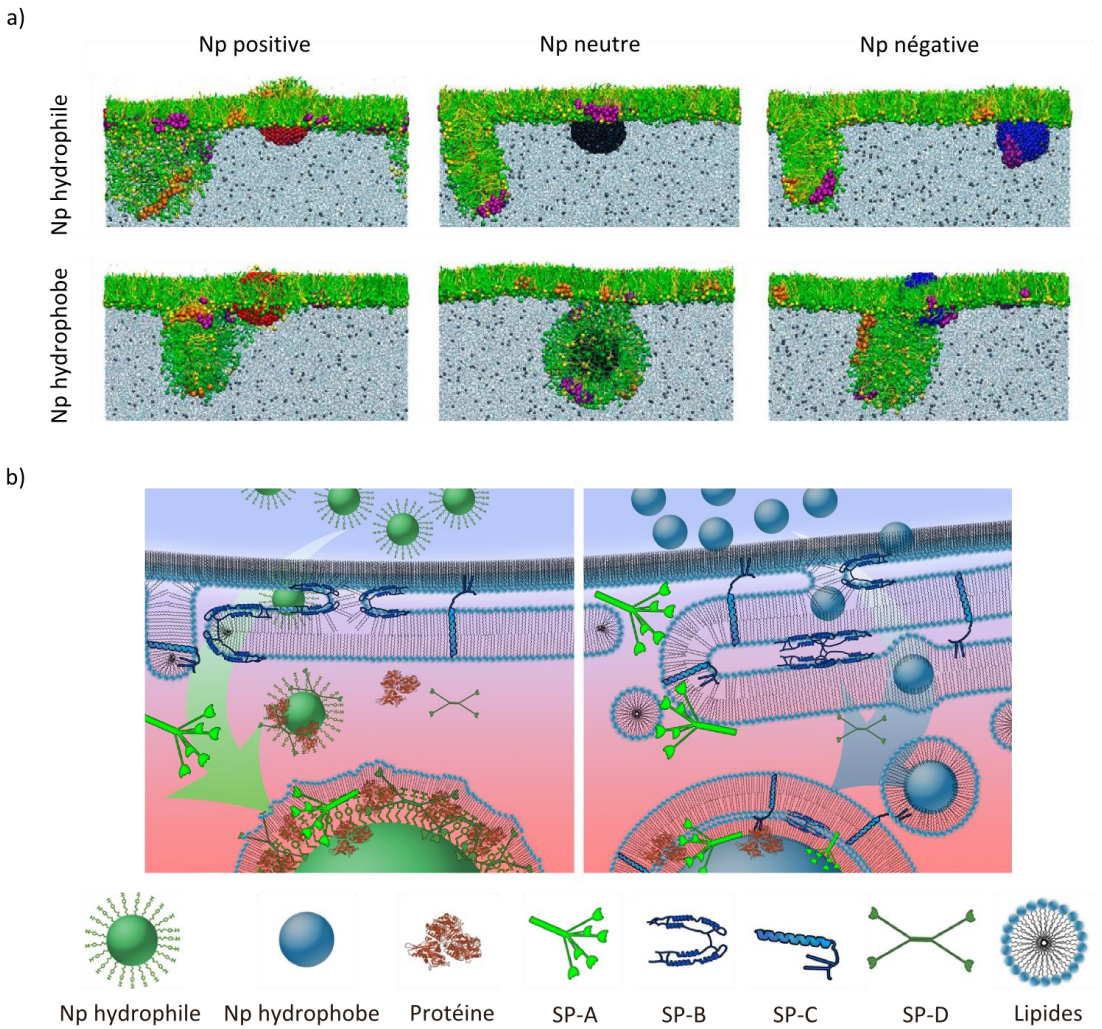


Figure 19 : a) Modélisation moléculaire de la translocation de particules positives (rouge), neutres (noire) ou négatives (bleue) à travers une monocouche de DPPC (vert) et de POPG (jaune) contenant des protéines SP-B (violet) et SP-C (orange). b) Représentation schématique du passage de nanoparticules hydrophiles et hydrophobes à travers le film de phospholipides à l'interface air-liquide des alvéoles. Adaptés des références [104] et [114] avec les permissions de l'ACS.

Raesch *et al.* ont étudié la couronne de biomolécules formée dans du surfactant pulmonaire endogène sur des particules polymériques aux propriétés de surface variées (*Figure 19b*). Une analyse détaillée des lipides et protéines présents dans la couronne de chaque particule a mené aux conclusions suivantes. Lors du passage à travers le film interfacial, les particules hydrophiles se retrouvent nues dans l'hypophase. Des protéines s'adsorbent alors à leur surface et induisent l'interaction avec les

phospholipides. A l'inverse, les particules hydrophobes se trouvent couvertes de phospholipides lors de leur translocation vers la phase aqueuse du surfactant. L'adsorption de protéines s'effectue en second lieu[114]. Ces résultats, très spéculatifs, confirment les données obtenues par simulation. Pour conclure, les informations sur l'état des particules après passage à travers le film de phospholipides sont trop peu nombreuses pour établir des conclusions avec certitude. Dans cette thèse, nous ferons l'hypothèse suivante : lorsque les Nps transloquent vers l'hypophase du surfactant, elles peuvent être couvertes ou non de phospholipides et/ou de protéines.

4) Interaction entre particules et hypophase du surfactant

a) Généralités sur l'interaction nanoparticules/liposomes

L'hypophase du surfactant est composée de myélines tubulaires et de vésicules multilamellaires. Une première approche pour comprendre le devenir des particules dans les alvéoles est d'étudier l'interaction entre particules et vésicules de la famille des phosphatidylcholines (PC), composant majoritaire du surfactant[115–120].

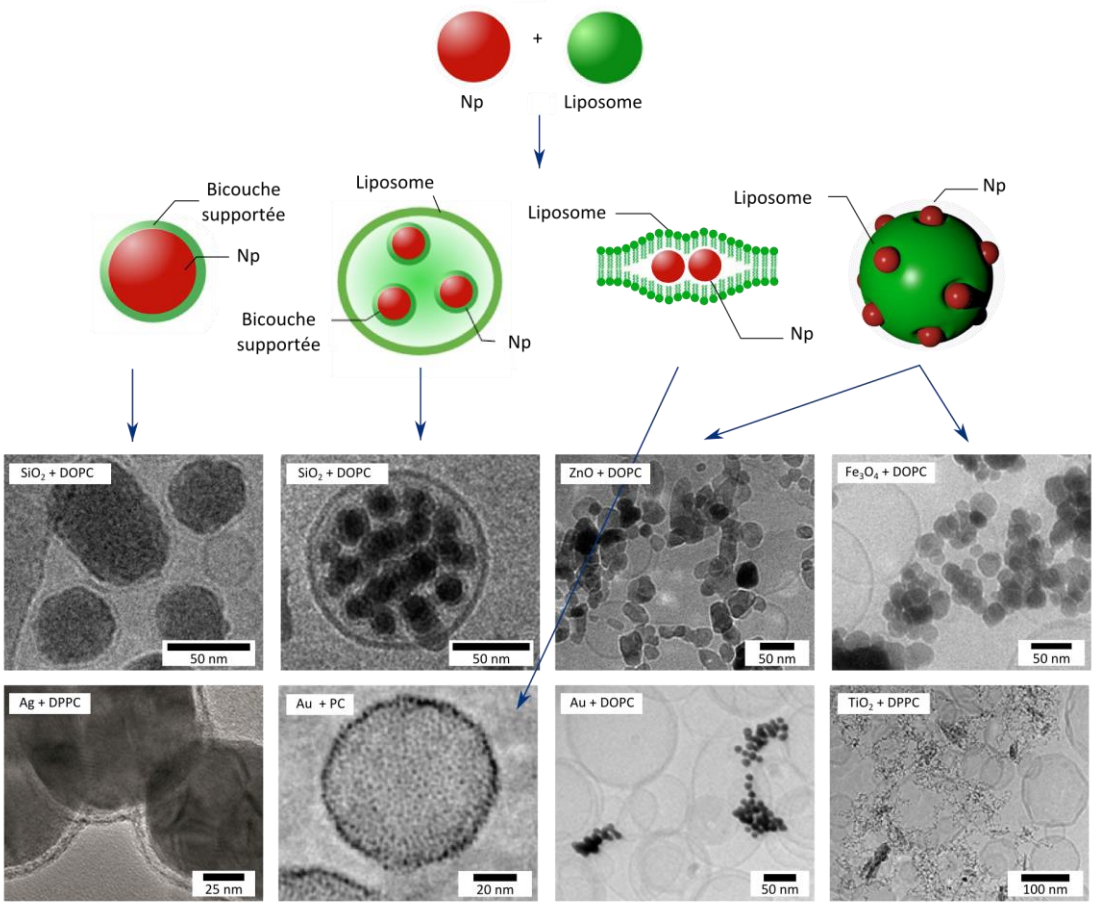


Figure 20 : Représentation schématique et images de cryo-microscopie à transmission électronique des structures résultant de l'interaction Nps/liposomes. Adapté des références [115] à [120] avec les permissions de Elsevier, Wiley et de l'ACS.

La *Figure 20* illustre les structures formées lorsque des nanoparticules sont en présence de liposomes de DPPC ou de DOPC. Plusieurs cas de figures se présentent. Une bicouche supportée de phospholipides peut se déposer sur les particules. Les Nps peuvent aussi être internalisées par les liposomes. Elles se retrouvent alors couvertes d'une bicouche de phospholipides. Il est possible que les particules se trouvent piégées dans les bicouches ou alors qu'elles s'adsorbent à la surface externe des liposomes. Dans ce dernier cas, les Nps confèrent aux liposomes une certaine stabilité ou au contraire induisent leur agrégation. Les particules peuvent également détruire les vésicules[121]. Le résultat de l'interaction Nps/vésicules dépend des propriétés physicochimiques des particules, de la composition phospholipidique des vésicules, du rapport de taille entre Nps et vésicules et du milieu dispersant (pH, force ionique).

b) Interaction entre nanoparticules et surfactant pulmonaire

Le surfactant n'est pas composé de liposomes de taille contrôlée contenant un seul type de phospholipides mais de vésicules multilamellaires disperses en taille, composées de différents phospholipides et protéines. Il parait donc difficile de prévoir si les résultats de l'interaction en Nps et SP présentés ci-dessus sont transposables au cas du SP.
A notre connaissance, très peu d'articles caractérisent l'état des particules et de l'hypophase après interaction. Schleh *et al.* et Fan *et al.* ont étudié par microscopie électronique à transmission l'impact respectif de particules de titane et de particules d'hydroxyapatite sur des surfactants endogènes thérapeutiques[101,122]. Ils ont observé une diminution moyenne de la taille des vésicules et une altération de leur structure multilamellaires (*Figure 21a*).

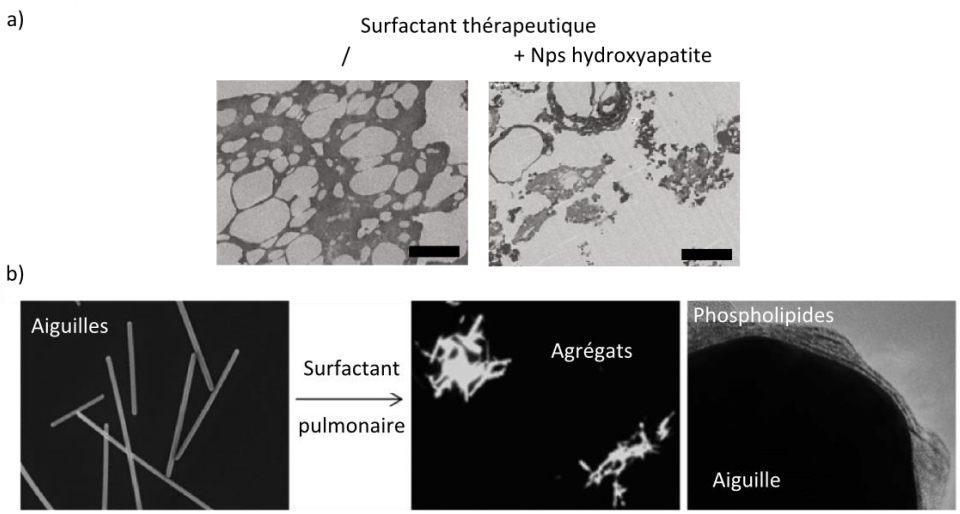


Figure 21 : a) Surfactant thérapeutique avant et après interaction avec des nanoparticules d'hydroxyapatite. b) Aiguille d'argent avant et après interaction avec du surfactant pulmonaire murin. Adaptés des références [101] et [84] avec la permission de l'ACS.

Theodorou *et al.* ont dispersé des nanotubes d'argent dans du surfactant endogène murin[84]. Ils ont observé l'agrégation des aiguilles et l'enrobage de ces dernières par des bicouches de phospholipides (*Figure 21b*). Kumar *et al.* ont également observé l'adsorption de phospholipides sur des particules polymériques ou de silice, après incubation avec du surfactant thérapeutique[123]. Dans ces deux exemples, les auteurs n'ont pas cherché à savoir si les protéines du surfactant étaient présentes dans les enrobages phospholipidiques.

Dans les résultats cités, les nanomatériaux sont directement mélangés à la phase aqueuse du surfactant. Si on considère le chemin suivi par les particules inhalées, ces expériences reproduisent l'arrivée dans l'hypophase de nanoparticules ayant traversé le film phospholipidique interfacial sans se couvrir de biomolécules. Dans nos recherches, nous n'avons trouvé aucune étude s'intéressant à l'interaction entre hypophase et particules couvertes de biomolécules suite à leur translocation à travers l'interface air-liquide.[42]

V. Conclusion

Les particules fines sont émises par les activités humaines et représentent un problème sociétal d'importance. Par exemple, l'augmentation du nombre de personnes atteintes de maladies respiratoires est corrélée à celle de la pollution. Dans ce contexte, les particules de taille inférieure à 100 nm, dites « nanoparticules » (Nps), sont les plus nocives pour les humains. Lorsqu'elles sont inhalées, elles peuvent atteindre les alvéoles, siège des échanges gazeux, puis transloquer dans le système sanguin. Lors de leur arrivée dans les alvéoles, les Nps rencontrent d'abord le surfactant pulmonaire, biofluide phopholipidique et protéique qui assure diverses fonctions physiologiques dans le poumon. Dans un premier temps, les particules se déposent sur le film de phospholipides marquant l'interface air-liquide. Il a été montré qu'elles altèrent en partie son activité. Elles traversent ensuite ce film et se retrouvent alors dans l'hypophase de surfactant pulmonaire (SP). Lors de cette étape, elles peuvent ou non adsorber des biomolécules du film interfacial. Ensuite, les Nps nues ou enrobées interagissent potentiellement avec les vésicules multilamellaires du surfactant, ce qui donne naissance à des structures hybrides Nps/SP. Les cellules épithéliales alvéolaires sont exposées à ces structures hybrides et leur réponse diffère du cas où elles sont simplement incubées avec des particules nues. Ce cheminement global établi récemment ne fait pas complètement consensus au sein de la communauté scientifique. Les mécanismes de l'ensemble de ces processus sont encore mal connus et leur compréhension nécessite de mettre en place une approche pluridisciplinaire[124].

Dans cette thèse, nous travaillons avec des systèmes modèles de particules, de surfactant pulmonaire et de cellules dans le but de rationaliser l'interaction

Nps/SP/cellule. Dans un premier temps, nous caractérisons le surfactant thérapeutique modèle choisi dans cette étude (Curosurf). Ensuite, nous nous intéressons à l'interaction entre particules et hypophase dans le cas où les particules sont nues et dans celui où elles sont enrobées par les phospholipides du surfactant. Nous présentons en outre la méthode que nous avons développée pour recouvrir les Nps d'une bicouche lipidique supportée. Finalement, nous étudions la toxicité et l'internalisation des nanoparticules en présence ou en absence de surfactant afin de mieux comprendre le rôle joué *in vivo* par ce fluide.

Bibliographie

1. Le Monde. *92% de la population mondiale respire un air ambiant trop pollué* (2016).
2. Lopez-Rodriguez, E. & Pérez-Gil, J. Structure-function relationships in pulmonary surfactant membranes: From biophysics to therapy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1838,** 1568–1585 (2014).
3. European Environment Agency (EEA). *National emissions reported to the Convention on Long-range Transboundary Air Pollution* (2012).
4. Royce, S. G. *et al.* Modeling population exposures to silver nanoparticles present in consumer products. *J. Nanoparticle Res.* **16,** (2014).
5. Maynard, A. D. *et al.* Exposure to carbon nanotube material: Aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material. *J. Toxicol. Environ. Health A* **67,** 87–107 (2004).
6. Maynard, A. D. & Kuempel, E. D. Airborne nanostructured particles and occupational health. *J. Nanoparticle Res.* **7,** 587–614 (2005).
7. Han, J. H. *et al.* Monitoring multiwalled carbon nanotube exposure in carbon nanotube research facility. *Inhal. Toxicol.* **20,** 741–749 (2008).
8. Old, L. & Methner, M. M. Engineering case reports: Effectiveness of Local Exhaust Ventilation (LEV) in controlling engineered nanomaterial emissions euring reactor cleanout operations. *J. Occup. Environ. Hyg.* **5,** 63–69 (2008).
9. Johnson, D. R., Methner, M. M., Kennedy, A. J. & Steevens, J. A. Potential for occupational exposure to engineered carbon-based nanomaterials in environmental laboratory studies. *Environ. Health Perspect.* **118,** 49–54 (2009).
10. Elihn, K., Berg, P. & Lidén, G. Correlation between airborne particle concentrations in seven industrial plants and estimated respiratory tract deposition by number, mass and elemental composition. *J. Aerosol Sci.* **42,** 127–141 (2011).
11. Pope, C. A., Dockery, D. W. & Schwartz, J. Review of epidemiological evidence of health effects of particulate air pollution. *Inhal. Toxicol.* **7,** 1–18 (1995).
12. Peters, A., Wichmann, H. E., Tuch, T., Heinrich, J. & Heyder, J. Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **155,** 1376–1383 (1997).
13. Peters, A., Dockery, D. W., Muller, J. E. & Mittleman, M. A. Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation* **103,** 2810–2815 (2001).
14. Oberdörster G. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int Arch Occup Env. Health* **74,** 1–8 (2001).
15. Zanobetti, A. *et al.* The temporal pattern of respiratory and heart disease mortality in response to air pollution. *Environ. Health Perspect.* **111,** 1188–1193 (2003).
16. Analitis A. *et al.* Short-term effects of ambient particles on cardiovascular and respiratory mortality. *Epidemiology* **17,** 230–233 (2006).

17. Dominici F. *et al.* Fine particulate air pollution and hospital admission for cardiovascular and respiratory diseases. *J. Am. Med. Assoc.* **295,** 1127–1134 (2006).
18. Peters, A. Ambient particulate matter and the risk for cardiovascular disease. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **53,** 327–333 (2011).
19. Shah, A. S. *et al.* Global association of air pollution and heart failure: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet* **382,** 1039–1048 (2013).
20. Beeson, W. L., Abbey, D. E. & Knutsen, S. F. Long-term concentrations of ambient air pollutants and incident lung cancer in California adults: Results from the AHSMOG study. Adventist Health Study on Smog. *Environ. Health Perspect.* **106,** 813 (1998).
21. Pietropaoli, A. P. *et al.* Pulmonary function, diffusing capacity, and inflammation in healthy and asthmatic subjects exposed to ultrafine particles. *Inhal. Toxicol.* **16,** 59–72 (2004).
22. Anderson P. J., Wilson J. D. & Hiller F. C. Respiratory tract deposition of ultrafine particles in subjects with obstructive or restrictive lung disease. *Chest* **97,** 1115–1120 (1990).
23. Chalupa, D. C., Morrow, P. E., Oberdörster, G., Utell, M. J. & Frampton, M. W. Ultrafine particle deposition in subjects with asthma. *Environ. Health Perspect.* **112,** 879–882 (2004).
24. Silkoff, P. E. *et al.* Winter air pollution and disease parameters in advanced chronic obstructive pulmonary disease panels residing in Denver, Colorado. *J. Allergy Clin. Immunol.* **115,** 337–344 (2005).
25. Inoue, K. & Takano, H. Facilitating effects of nanoparticles/materials on sensitive immune-related lung disorders. *J. Nanomater.* **2011,** 1–6 (2011).
26. Brown, J. S., Zeman, K. L. & Bennett, W. D. Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2012).
27. Le monde. *L'impact sanitaire de la pollution de l'air coûte chaque année 1 400 milliards d'euros à l'Europe* (2015).
28. Silbernagl S. & Despopoulos A. *Atlas de poche de Physiologie.* (Flammarion, 1992).
29. Bajaj, P., Harris, J. F., Huang, J.-H., Nath, P. & Iyer, R. Advances and challenges in recapitulating human pulmonary systems: At the cusp of biology and materials. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2,** 473–488 (2016).
30. Schraufnagel, D. E. Lung lymphatic anatomy and correlates. *Pathophysiology* **17,** 337–343 (2010).
31. Breeze R. G. & Wheeldon E. B. The Cells of the Pulmonary Airways. *Am. Rev. Respir. Dis.* **116,** 705–777 (1977).
32. Schneeberger, E. E. & Lynch, R. D. Tight junctions. Their structure, composition, and function. *Circ. Res.* **55,** 723–733 (1984).

33. Rothen-Rutishauser, B., Clift, M. J. D., Jud, C., Fink, A. & Wick, P. Human epithelial cells *in vitro* – Are they an advantageous tool to help understand the nanomaterial-biological barrier interaction? *Euro-NanoTox-Lett.* **4,** 1–19 (2012).
34. Notter, R. H. *Lung Surfactant: Basic Science and Clinical Applications.* **149,** (CRC Press: Boca Raton, FL, 2000).
35. Tsuda A. & Gehr, P. in *Nanoparticles in the lung - Environmental exposure and drug delivery (Chapter 3)* 21–46 (Taylor & Francis Group, 2015).
36. Piknova, B., Schram, V. & Hall, S. Pulmonary surfactant: Phase behavior and function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12,** 487–494 (2002).
37. Ochs, M. *et al.* The number of alveoli in the human lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **169,** 120–124 (2004).
38. MacIntyre, N. R. Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. in *Seminars in respiratory and critical care medicine* **16,** 47–52 (1995).
39. Oberdörster, G., Oberdörster, E. & Oberdörster, J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* **113,** 823–839 (2005).
40. Hofmann, W. Modelling inhaled particle deposition in the human lung—A review. *J. Aerosol Sci.* **42,** 693–724 (2011).
41. Tsuda A. & Gehr, P. in *Nanoparticles in the Lung - Environmental Exposure and Drug Delivery (Chapter 2)* 5–19 (Taylor & Francis Group, 2015).
42. Tsuda, A., Rogers, R. A., Hydon, P. E. & Butler, J. P. Chaotic mixing deep in the lung. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99,** 10173–10178 (2002).
43. Kreyling, W. G., Semmler-Behnke, M., Takenaka, S. & Möller, W. Differences in the biokinetics of inhaled nano- versus micrometer-sized particles. *Acc. Chem. Res.* **46,** 714–722 (2013).
44. Tsuda A. & Gehr, P. in *Nanoparticles in the Lung - Environmental Exposure and Drug Delivery (Chapter 7)* 107–132 (Taylor & Francis Group, 2015).
45. Kreyling, W. G. *et al.* Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J. Toxicol. Environ. Health A* **65,** 1513–1530 (2002).
46. Oberdörster, G. *et al.* Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J. Toxicol. Environ. Health A* **65,** 1531–1543 (2002).
47. Oberdörster, G. *et al.* Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal. Toxicol.* **16,** 437–445 (2004).
48. Semmler, M. *et al.* Long-term clearance kinetics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from the rat lung, including transient translocation into secondary organs. *Inhal. Toxicol.* **16,** 453–459 (2004).
49. Choi, H. S. *et al.* Rapid translocation of nanoparticles from the lung airspaces to the body. *Nat. Biotechnol.* **28,** 1300–1303 (2010).

50. Adamcakova-Dodd, A., Thorne, P. S. & Grassian, V. H. in *General, applied and systems toxicology* - In vivo *toxicity studies of metal and metal oxide nanoparticles* (John Wiley & Sons, Ltd, 2011).
51. Bezemer, G. F. G. *et al.* Activation of pulmonary dendritic cells and Th2-type inflammatory responses on instillation of engineered, environmental diesel emission source or ambient air pollutant particles *in vivo*. *J. Innate Immun.* **3,** 150–166 (2011).
52. Kadiiska, M. B., Mason, R. P., Dreher, K. L., Costa, D. L. & Ghio, A. J. *In vivo* evidence of free radical formation in the rat lung after exposure to an emission source air pollution particle. *Chem. Res. Toxicol.* **10,** 1104–1108 (1997).
53. Harrod, K. S. Inhaled diesel engine emissions reduce bacterial clearance and exacerbate lung disease to pseudomonas aeruginosa infection *in vivo*. *Toxicol. Sci.* **83,** 155–165 (2004).
54. Samara, C. *et al.* Ultrastructural alterations in the mouse lung caused by real-life ambient PM10 at urban traffic sites. *Sci. Total Environ.* **532,** 327–336 (2015).
55. Li, X. Y., Gilmour, P. S., Donaldson, K. & MacNee, W. *In Vivo* and *in vitro* proinflammatory effects of particulate air pollution (PM10). *Environ. Health Perspect.* **105,** 1279–1283 (1977).
56. Schleh, C. & Hohlfeld, J. M. Interaction of nanoparticles with the pulmonary surfactant system. *Inhal. Toxicol.* **21,** 97–103 (2009).
57. Andujar, P., Lanone, S., Brochard, P. & Boczkowski, J. Respiratory effects of manufactured nanoparticles. *Rev. Mal. Respir.* **28,** 66–75 (2011).
58. Braakhuis, H. M., Park, M. V., Gosens, I., De Jong, W. H. & Cassee, F. R. Physicochemical characteristics of nanomaterials that affect pulmonary inflammation. *Part. Fibre Toxicol.* **11,** 18 (2014).
59. Nel, A. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* **311,** 622–627 (2006).
60. Sayes, C. M., Marchione, A. A., Reed, K. L. & Warheit, D. B. Comparative pulmonary toxicity assessments of C_{60} water suspensions in rats: Few differences in fullerene toxicity *in vivo* in contrast to *in vitro* profiles. *Nano Lett.* **7,** 2399–2406 (2007).
61. Sayes, C. M., Reed, K. L. & Warheit, D. B. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: Comparing *in vitro* measurements to *in vivo* pulmonary toxicity profiles. *Toxicol. Sci.* **97,** 163–180 (2007).
62. Tsuda A. & Gehr, P. in *Nanoparticles in the Lung - Environmental Exposure and Drug Delivery (Chapter 4)* 47–72 (Taylor & Francis Group, 2015).
63. Wallace, W. E., Keane, M. J. & Ong, T. M. Phospholipid lung surfactant dispersion of NP for retention of size and structural properties in bioassay: Lessons from diesel particulate material in vitro genotoxicity. *2nd Int. Symp. Nanotechnol. Occup. Health* (2005).

64. Porter, D. *et al.* A biocompatible medium for nanoparticle dispersion. *Nanotoxicology* **2,** 144–154 (2008).
65. Kapralov, A. A. *et al.* Adsorption of surfactant lipids by single-walled carbon nanotubes in mouse lung upon pharyngeal aspiration. *ACS Nano* **6,** 4147–4156 (2012).
66. Vranic, S. *et al.* Impact of serum as a dispersion agent for *in vitro* and *in vivo* toxicological assessments of TiO_2 nanoparticles. *Arch. Toxicol.* (2016).
67. Davoren, M. *et al. In vitro* toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. *Toxicol. In Vitro* **21,** 438–448 (2007).
68. Murdock, R. C., Braydich-Stolle, L., Schrand, A. M., Schlager, J. J. & Hussain, S. M. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to *in vitro* exposure using Dynamic Light Scattering technique. *Toxicol. Sci.* **101,** 239–253 (2008).
69. Fede, C. *et al.* The toxicity outcome of silica nanoparticles (Ludox®) is influenced by testing techniques and treatment modalities. *Anal. Bioanal. Chem.* **404,** 1789–1802 (2012).
70. Hsiao, I.-L. & Huang, Y.-J. Effects of serum on cytotoxicity of nano- and micro-sized ZnO particles. *J. Nanoparticle Res.* **15,** 1829–1844 (2013).
71. Lesniak, A. *et al.* Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells. *ACS Nano* **6,** 5845–5857 (2012).
72. Wang, L. *et al.* Dispersion of single-walled carbon nanotubes by a natural lung surfactant for pulmonary *in vitro* and *in vivo* toxicity studies. *Part. Fibre Toxicol.* **7,** 31–40 (2010).
73. Ruge, C. A. *et al.* Uptake of nanoparticles by alveolar macrophages is triggered by surfactant protein A. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **7,** 690–693 (2011).
74. Ruge, C. A. *et al.* The interplay of lung surfactant proteins and lipids assimilates the macrophage clearance of nanoparticles. *PLoS ONE* **7,** 40775–40784 (2012).
75. Schleh, C. *et al.* Surfactant protein D modulates allergen particle uptake and inflammatory response in a human epithelial airway model. *Respir Res* **13,** 18–27 (2012).
76. Gasser, M. *et al.* Pulmonary surfactant coating of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) influences their oxidative and pro-inflammatory potential *in vitro*. *Part Fibre Toxicol* **9,** 17–29 (2012).
77. Cho, W.-S. *et al.* Zeta potential and solubility to toxic ions as mechanisms of lung inflammation caused by metal/metal oxide nanoparticles. *Toxicol. Sci.* **126,** 469–477 (2012).
78. Vranic, S. *et al.* Internalization of SiO_2 nanoparticles by alveolar macrophages and lung epithelial cells and its modulation by the lung surfactant substitute Curosurf®. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **20,** 2761–2770 (2013).
79. Ratoi, M., Hoet, P. H. M., Crossley, A. & Dobson, P. Impact of lung surfactant on wettability and cytotoxicity of nanoparticles. *RSC Adv.* **4,** 20573–20581 (2014).

80. Thorley, A. J., Ruenraroengsak, P., Potter, T. E. & Tetley, T. D. Critical determinants of uptake and translocation of nanoparticles by the human pulmonary alveolar epithelium. *ACS Nano* **8,** 11778–11789 (2014).
81. Sweeney, S. *et al.* Silver nanowire interactions with primary human alveolar type-II epithelial cell secretions: Contrasting bioreactivity with human alveolar type-I and type-II epithelial cells. *Nanoscale* **7,** 10398–10409 (2015).
82. Murphy, A., Sheehy, K., Casey, A. & Chambers, G. The surfactant dipalmitoylphophatidylcholine modifies acute responses in alveolar carcinoma cells in response to low-dose silver nanoparticle exposure: DPPC modifies acute response of low dose AgNP exposure. *J. Appl. Toxicol.* **35,** 1141–1149 (2015).
83. Kasper, J. Y. *et al.* Pulmonary surfactant augments cytotoxicity of silica nanoparticles: Studies on an *in vitro* air–blood barrier model. *Beilstein J. Nanotechnol.* **6,** 517–528 (2015).
84. Theodorou, I. G. *et al.* Static and dynamic microscopy of the chemical stability and aggregation state of silver nanowires in components of *murine* pulmonary surfactant. *Environ. Sci. Technol.* **49,** 8048–8056 (2015).
85. Sweeney, S. *et al.* Pulmonary surfactant mitigates silver nanoparticle toxicity in human alveolar type-I-like epithelial cells. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **145,** 167–175 (2016).
86. Tsuda A. & Gehr, P. in *Nanoparticles in the Lung - Environmental Exposure and Drug Delivery (Chapter 12)* 197–209 (Taylor & Francis Group, 2015).
87. Pérez-Gil, J. & Keough, K. M. W. Interfacial properties of surfactant proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1408,** 203–217 (1998).
88. Pérez-Gil, J. Structure of pulmonary surfactant membranes and films: The role of proteins and lipid–protein interactions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1778,** 1676–1695 (2008).
89. Perez-Gil, J. & Weaver, T. E. Pulmonary surfactant pathophysiology: Current models and open questions. *Physiology* **25,** 132–141 (2010).
90. Casals, C. & Cañadas, O. Role of lipid ordered/disordered phase coexistence in pulmonary surfactant function. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1818,** 2550–2562 (2012).
91. www.curosurf.com, consulté le 02.10.16.
92. https://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:1-Palmitoyl-3-oleoyl-phosphatidylcholine_Structural_Formulae_V.1.png, consulté le 22.11.16.
93. Waisman, D., Danino, D., Weintraub, Z., Schmidt, J. & Talmon, Y. Nanostructure of the aqueous form of lung surfactant of different species visualized by cryo-transmission electron microscopy. *Clin. Physiol. Funct. Imaging* **27,** 375–380 (2007).
94. Wang, B., Zhang, L., Bae, S. C. & Granick, S. Nanoparticle-induced surface reconstruction of phospholipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105,** 18171–18175 (2008).

95. Montis, C., Maiolo, D., Alessandri, I., Bergese, P. & Berti, D. Interaction of nanoparticles with lipid membranes: a multiscale perspective. *Nanoscale* **6,** 6452–6457 (2014).
96. Ma, J. Y. C. & Weber, K. C. Dipalmitoyl lecithin and lung surfactant adsorption at an air-liquid interface by respirable particles. *Environ. Res.* **41,** 120–129 (1986).
97. Bakshi, M. S., Zhao, L., Smith, R., Possmayer, F. & Petersen, N. O. Metal nanoparticle pollutants interfere with pulmonary surfactant function *in vitro*. *Biophys. J.* **94,** 855–868 (2008).
98. Guzmán, E., Liggieri, L., Santini, E., Ferrari, M. & Ravera, F. Effect of hydrophilic and hydrophobic nanoparticles on the surface pressure response of DPPC monolayers. *J. Phys. Chem. C* **115,** 21715–21722 (2011).
99. Beck-Broichsitter, M. *et al.* Biophysical investigation of pulmonary surfactant surface properties upon contact with polymeric nanoparticles *in vitro*. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **7,** 341–350 (2011).
100. Guzmán, E., Liggieri, L., Santini, E., Ferrari, M. & Ravera, F. DPPC–DOPC Langmuir monolayers modified by hydrophilic silica nanoparticles: Phase behaviour, structure and rheology. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **413,** 174–183 (2012).
101. Fan, Q., Wang, Y. E., Zhao, X., Loo, J. S. C. & Zuo, Y. Y. Adverse biophysical effects of hydroxyapatite nanoparticles on natural pulmonary surfactant. *ACS Nano* **5,** 6410–6416 (2011).
102. Sachan, A. K. *et al.* High-resolution investigation of nanoparticle interaction with a model pulmonary surfactant monolayer. *ACS Nano* **6,** 1677–1687 (2012).
103. Guzmán, E., Liggieri, L., Santini, E., Ferrari, M. & Ravera, F. Mixed DPPC–cholesterol Langmuir monolayers in presence of hydrophilic silica nanoparticles. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **105,** 284–293 (2013).
104. Hu, G. *et al.* Physicochemical properties of nanoparticles regulate translocation across pulmonary surfactant monolayer and formation of lipoprotein corona. *ACS Nano* **7,** 10525–10533 (2013).
105. Valle, R. P., Huang, C. L., Loo, J. S. C. & Zuo, Y. Y. Increasing hydrophobicity of nanoparticles intensifies lung surfactant film inhibition and particle retention. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2,** 1574–1580 (2014).
106. Hu, Q. *et al.* Effects of graphene oxide nanosheets on the ultrastructure and biophysical properties of the pulmonary surfactant film. *Nanoscale* **7,** 18025–18029 (2015).
107. Melbourne, J. *et al.* An investigation of the carbon nanotube – Lipid interface and its impact upon pulmonary surfactant lipid function. *Biomaterials* **55,** 24–32 (2015).
108. Yue, T., Xu, Y., Li, S., Zhang, X. & Huang, F. Lipid extraction mediates aggregation of carbon nanospheres in pulmonary surfactant monolayers. *Phys Chem Chem Phys* **18,** 18923–18933 (2016).

109. Choe, S., Chang, R., Jeon, J. & Violi, A. Molecular dynamics simulation study of a pulmonary surfactant film interacting with a carbonaceous nanoparticle. *Biophys. J.* **95,** 4102–4114 (2008).
110. Lin, X., Bai, T., Zuo, Y. Y. & Gu, N. Promote potential applications of nanoparticles as respiratory drug carrier: Insights from molecular dynamics simulations. *Nanoscale* **6,** 2759–2767 (2014).
111. Lin, X., Zuo, Y. Y. & Gu, N. Shape affects the interactions of nanoparticles with pulmonary surfactant. *Sci. China Mater.* **58,** 28–37 (2015).
112. Yue, T., Wang, X., Zhang, X. & Huang, F. Molecular modeling of interaction between lipid monolayer and graphene nanosheets: Implications for pulmonary nanotoxicity and pulmonary drug delivery. *RSC Adv* **5,** 30092–30106 (2015).
113. Svensson, C. R. *et al.* Direct deposition of gas phase generated aerosol gold nanoparticles into biological fluids - Corona formation and particle size shifts. *PLoS ONE* **8,** 74702–74712 (2013).
114. Raesch, S. S. *et al.* Proteomic and lipidomic analysis of nanoparticle corona upon contact with lung surfactant reveals differences in protein, but not lipid composition. *ACS Nano* **9,** 11872–11885 (2015).
115. Rasch, M. R. *et al.* Hydrophobic gold nanoparticle self-assembly with phosphatidylcholine lipid: Membrane-loaded and janus vesicles. *Nano Lett.* **10,** 3733–3739 (2010).
116. Michel, R. & Gradzielski, M. Experimental aspects of colloidal interactions in mixed systems of liposome and inorganic nanoparticle and their applications. *Int. J. Mol. Sci.* **13,** 11610–11642 (2012).
117. Leo, B. F. *et al.* The stability of silver nanoparticles in a model of pulmonary surfactant. *Environ. Sci. Technol.* **47,** 11232–11240 (2013).
118. Michel, R., Kesselman, E., Plostica, T., Danino, D. & Gradzielski, M. Internalization of silica nanoparticles into fluid liposomes: Formation of interesting hybrid colloids. *Angew. Chem.* **126,** 12649–12653 (2014).
119. Jiménez-Rojo, N. *et al.* Lipidic nanovesicles stabilize suspensions of metal oxide nanoparticles. *Chem. Phys. Lipids* **191,** 84–90 (2015).
120. Liu, J. Interfacing zwitterionic liposomes with inorganic nanomaterials: Surface forces, membrane integrity, and applications. *Langmuir* **32,** 4393–4404 (2016).
121. Wei, X. *et al.* Effects of SiO_2 nanoparticles on phospholipid membrane integrity and fluidity. *J. Hazard. Mater.* **287,** 217–224 (2015).
122. Schleh, C. *et al.* The effect of titanium dioxide nanoparticles on pulmonary surfactant function and ultrastructure. *Respir. Res.* **10,** 90–100 (2009).
123. Kumar, A. *et al.* Enrichment of immunoregulatory proteins in the biomolecular corona of nanoparticles within human respiratory tract lining fluid. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **12,** 1033–1043 (2016).

124. Muhlfeld, C. *et al.* Interactions of nanoparticles with pulmonary structures and cellular responses. *AJP Lung Cell. Mol. Physiol.* **294,** 817–829 (2008).

Chapitre 2
Matériels et méthodes

Table des matières

I. Caractérisation des nanoparticules....59
1) Taille des particules....59
2) Concentration en particules....60
3) Densité structurale surfacique de charges....61
4) Stabilité des particules....61
5) Résultats....62
II. Diagramme de phase entre particules et surfactant pulmonaire....62
III. Formulation de particules enrobées (nanoBLSs)....63
1) Principe....63
2) Protocole....64
IV. Marquage fluorescent du Curosurf....65
1) Principe....65
2) Optimisation du marquage....66
V. Culture cellulaire....66
1) Généralités....66
2) Protocole de culture....67
3) Protocole de comptage....67
4) Croissance des cellules....68
VI. Test de viabilité cellulaire....70
1) Principe....70
2) Optimisation du protocole....71
3) Protocole du test WST-1....72
VII. Internalisation des particules Silica (+) : quantification....73
1) Principe....73
2) Nombre de cellules à ensemencer....73
3) Détection des particules fluorescentes....74
4) Protocole....75
Annexe A : Matériels....77
Annexe B : Equipements....79
Annexe C : Cartes d'identité des nanoparticules....83
Bibliographie....89

Dans ce chapitre, nous présentons la caractérisation des nanoparticules (Nps) étudiées dans cette thèse, les protocoles de physico-chimie optimisés et l'ensemble des protocoles utilisés ou mis au point en culture cellulaire. Les parties « Matériels » et « Equipements » à proprement parler sont détaillées en **Annexe A et B** respectivement.
Ce chapitre est divisé en trois parties. La première est consacrée à la caractérisation des particules étudiées (taille, charge, stabilité). La seconde se penche sur les interactions du surfactant pulmonaire avec les nanoparticules. La troisième porte sur la culture cellulaire ainsi que sur les protocoles de toxicité et de quantification des particules internalisées.

I. Caractérisation des nanoparticules

Au début de ce travail, il nous semblait important d'explorer un large éventail de particules manufacturées afin de déterminer les paramètres pertinents dans l'interaction entre nanoparticules et surfactant pulmonaire. Nous avons sélectionné 7 nanoparticules de taille similaire (environ 50 nm) mais de composition chimique et charge de surface différentes. La provenance et les protocoles de préparation des particules sont détaillés en **Annexe A**. Nous avons choisi de travailler avec des oxydes de titane, de silicium et d'aluminium car ces nanoparticules ont été incluses par l'OCDE dans la liste des 13 nanomatériaux dont la toxicité est à étudier en priorité[1]. Les oxydes de titane et d'aluminium sont notés respectivement Titania (+) et Alumina (+). Les particules de silice ont une charge négative ou positive et sont notées respectivement Silica (-) et Silica (+). Des Nps de latex sont également considérées pour introduire des composés organiques dans notre étude. Elles sont de charge négative ou positive et sont notées Latex 1 (-), Latex 2 (-) et Latex (+). Dans cette partie nous présentons les protocoles mis au point pour caractériser les Nps. L'**Annexe C** résume sous forme de « cartes d'identité » les caractéristiques majeures de chaque particule.

1) Taille des particules

La taille des particules est déterminée par différentes techniques telles que la diffusion de la lumière (DLS) et la microscopie électronique à transmission (MET). En DLS, les particules sont diluées entre 0.1 et 1 g L^{-1} dans de l'eau MilliQ. En MET, les dilutions sont comprises entre 0.01 et 0.1 g L^{-1}. 30 µL de suspension sont déposés sur les grilles de MET et laissés évaporer pendant une nuit. Des histogrammes de taille sont construits à partir de l'analyse des images de MET. Plus de 100 particules sont mesurées pour établir chaque distribution. La dispersité des distributions de taille, notée « s », est définie par le rapport entre la déviation standard de la distribution et le diamètre moyen obtenu.

2) Concentration en particules

Pour déterminer précisément la concentration en particules, nous utilisons la spectrométrie UV-visible et la fluorimétrie. Des courbes de calibration sont construites à partir de solutions de concentrations connues.

a) Calibration par mesure de la fluorescence

Les Silica (+) sont fluorescentes. Leurs spectres en excitation et en émission sont déterminés à l'aide d'un spectromètre Cary Eclipse (Agilent). Les Silica (+) sont excitées à $\lambda_{ex1} = 533$ nm et $\lambda_{ex2} = 595$ nm et émettent en fluorescence à $\lambda_{em} = 590$ nm. Pour ces particules, la courbe de calibration est construite de manière classique : l'intensité de fluorescence à $\lambda_{em} = 590$ nm est tracée en fonction de la concentration en Nps. Pour cela, les Silica (+) sont diluées par de l'eau MilliQ entre 0.6 et 5 g L^{-1} et la fluorescence est mesurée pour une illumination à 550 W.

b) Calibration par mesure de l'absorbance

Pour les particules non fluorescentes, nous employons une méthode mise au point au laboratoire. Elle permet une détermination plus précise de la concentration que les calibrations classiques. Les particules sont diluées par de l'eau MilliQ à des concentrations typiquement comprises entre 0.1 g L^{-1} et la concentration de la solution initiale. L'absorbance des suspensions est mesurée entre 200 et 800 nm (spectromètre UV-visible Cary 50, Varian). Le blanc est soustrait et chaque courbe est normalisée par la concentration.

La *Figure 1* illustre les résultats obtenus pour les Silica (-). Dans cet exemple, les mesures des suspensions entre 3 et 10 g L^{-1} sont superposées le long d'une même courbe, dite « courbe maîtresse ».

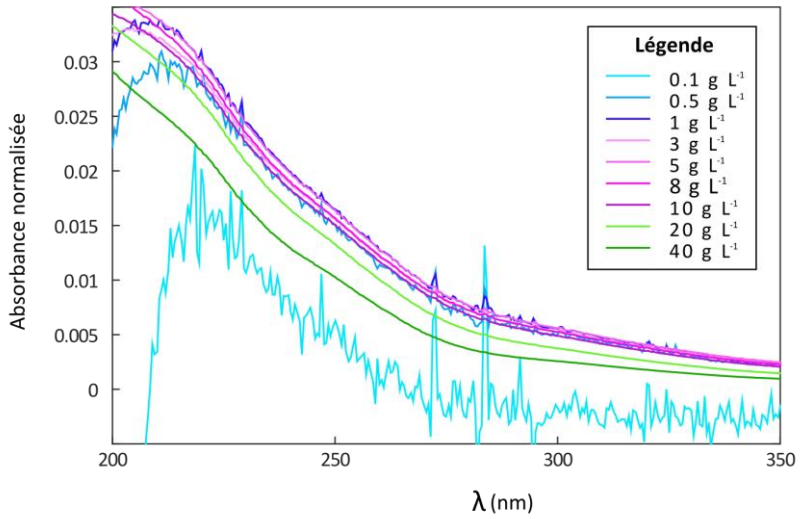


Figure 1 : Absorbance des Silica (-) pour des concentrations en particules entre 0.1 et 40 g L^{-1}. Les courbes sont normalisées par la concentration des suspensions.

Les données des solutions entre 0.1 et 1 g L^{-1} sont bruitées et se situent sous la courbe maîtresse. Ces échantillons sont trop dilués pour permettre une mesure précise de l'absorbance. Aux fortes concentrations, les dispersions sont turbides. Les courbes d'absorbance se situent également en deçà de la courbe maîtresse. La courbe de calibration est construite à partir des données non bruitées et non atténuées. La gamme de concentration donnant lieu à la courbe maîtresse est déterminée pour chaque particule.

3) Densité structurale surfacique de charges

Pour mesurer rapidement et facilement la densité surfacique de charges des particules, nous avons développé une méthode que nous appelons PACTS (Polyelectrolyte Assisted Charge Titration Spectrometry). Elle est détaillée dans notre article « Mousseau *et al.*, Journal of Colloid and Interface Science, 475, 2016 » (cf p 217).
En bref, la particule d'intérêt est mélangée à un polymère de charge opposée. Les dispersions agrègent plus ou moins fortement en fonction du rapport volumique $X = V_{polymère}/V_{Np}$, où $V_{polymère}$ et V_{Np} sont les volumes de solutions de polymères et de particules respectivement. Quand on se rapproche de stœchiométrie de charges entre particules et polymères, l'agrégation est exacerbée et l'intensité diffusée par les solutions augmente. Le rapport de Rayleigh R et le diamètre hydrodynamique D_H sont tracés en fonction de X. Les courbes présentent un pic dont le maximum correspond à une stœchiométrie de charge $Z = 1$. La détermination de la valeur de X en ce maximum permet de calculer la densité surfacique de charge σ des nanoparticules. Pour les 7 types de particules étudiées, cette densité de charge varie en valeur absolue entre 0.048 et 7.3 e nm^{-2}, densités des Latex 1 (-) et des Alumina (+) respectivement (**Annexe C**).

4) Stabilité des particules

a) Suivi visuel au cours du temps

La stabilité des particules est déterminée en fonction du pH et de la force ionique.
<u>Stabilité en fonction du pH</u>
Les particules sont diluées entre 0.03 et 3 g L^{-1} par de l'eau MilliQ, la concentration étant fixée pour une particule donnée. Le pH des suspensions est mesuré puis augmenté ou diminué. Toutes les unités de pH environ, 1 mL de solution est prélevé.
<u>Stabilité en fonction de la force ionique</u>
Les particules sont diluées entre 0.3 et 30 g L^{-1} dans de l'eau MilliQ, la concentration étant fixée pour une particule donnée. Une solution de chlorure de sodium à 2 M est préparée dans de l'eau MilliQ. Cette solution de sel et de l'eau MilliQ sont ajustées au pH nominal des suspensions de particules. L'eau, la solution saline et les particules sont

mélangées dans cet ordre afin d'obtenir 1 mL de solution entre 0.04 et 3 g L^{-1} et dont la force ionique est comprise entre 0 et 1 000 mM.

Suivi visuel des solutions :

La turbidité de chaque échantillon est évaluée visuellement au cours du temps. Dans le tableau récapitulatif, « T » signifie « turbide » et «-» signifie « limpide ».

b) Etat d'agrégation à l'instant initial

L'état d'agrégation à l'instant initial est déterminé en fonction du pH de manière plus quantitative. Les particules sont diluées par de l'eau MilliQ entre 0.1 et 3 g L^{-1}. Le pH est augmenté ou diminué de part et d'autre de la valeur initiale. La taille et le potentiel zéta des suspensions sont mesurés en fonction du pH, entre pH 2 et 12, en triplicata, à 25 °C, après 120 s de thermalisation.

5) Résultats

L'ensemble des résultats concernant les 7 particules utilisées dans notre travail est résumé sous forme de « carte d'identité » en **Annexe C**. Toutes les particules sont stables au pH du surfactant pulmonaire modèle utilisé dans notre étude (pH = 5.5 - 6.5). A l'exception des Silica (-), aucune Np n'est stable à 150 mM, force ionique du fluide pulmonaire[2].

II. Diagramme de phase entre particules et surfactant pulmonaire

Dans le but de déterminer la force d'interaction entre nanoparticules et surfactant pulmonaire (SP), nous avons réalisé des diagrammes de phase en faisant varier les proportions de ces deux constituants. La concentration en particules est ajustée afin que l'intensité diffusée n'excède pas 5.10^5 kcps. Cette intensité correspond à un rapport de Rayleigh de 5.10^{-3} cm^{-1}. Les conditions expérimentales dépendent des particules. Typiquement, les solutions sont préparées à 0.1 g L^{-1} dans de l'eau MilliQ pour les Nps positives et le pH est ajusté à pH 5. En revanche, pour les particules négatives, les concentrations sont comprises entre 0.1 et 1 g L^{-1} dans du tampon phosphate (pH 6.4, force ionique 5 mM). Les surfactants pulmonaires modèles sont préparés dans les mêmes conditions de solvant, de pH et de concentration que les particules.

Les solutions sont mélangées à différents rapports volumiques X, où $X = V_{SP}/V_{Np}$. V_{SP} et V_{Np} représentent respectivement les volumes de surfactant et de particules. Puisque les concentrations des solutions sont égales, le rapport X est aussi équivalent au rapport massique des deux constituants. Cette procédure permet d'explorer une large gamme de conditions de mélange ($X = 10^{-3}$ - 10^{3}) dans le régime dilué tout en gardant la concentration totale constante[3–5]. Les solutions, thermalisées à 25 ou 37 °C, sont mélangées puis étudiées en triplicata par diffusion de la lumière après 120 s de thermalisation.

La *Figure 2* illustre les différents résultats possibles. Les courbes continues en rouge et en violet représentent le cas où une interaction constructive ou destructive est mesurée. La ligne noire illustre celui où aucune interaction n'a lieu. Lorsque l'interaction est constructive, l'intensité diffusée $I(X)$ est la somme des intensités, pondérées par la concentration des différents composés :

$$I(X) = \frac{I_{Np} + I_{SP}X}{1+X}$$

où I_{Np} et I_{SP} sont les intensités diffusées par les particules et par le surfactant.

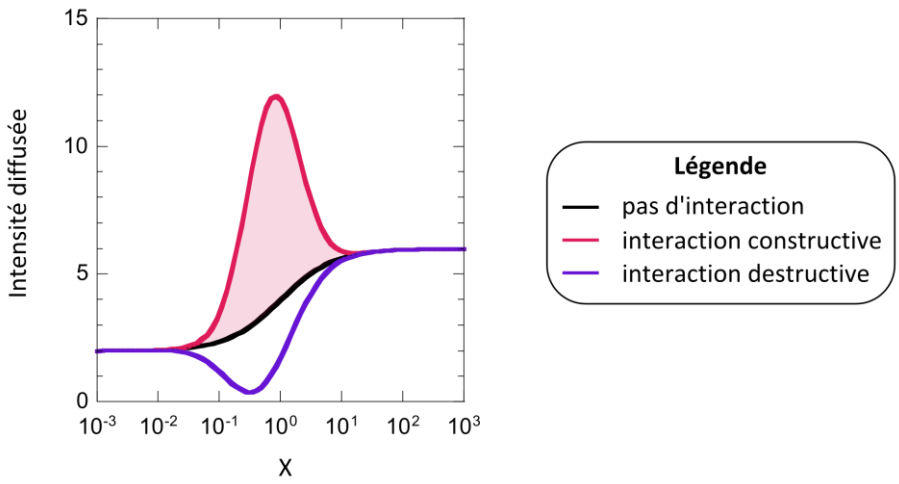


Figure 2 : Représentation schématique de l'intensité diffusée par les systèmes Nps/SP en fonction de X, après normalisation.

Pour quantifier l'interaction, l'intensité diffusée est normalisée par la concentration massique du système et par l'intensité diffusée par le surfactant modèle. Elle est alors tracée en fonction de X. Dans le cas d'une interaction constructive, nous mesurons l'aire entre la courbe expérimentale et la courbe de non-interaction (aire en rouge). Elle représente la force d'interaction entre particules et vésicules, exprimée en L g^{-1}.

III. Formulation de particules enrobées (nanoBLSs)

1) Principe

Après leur passage à travers l'interface air-liquide au niveau des alvéoles, les particules peuvent être couvertes de phospholipides. Dans cette partie, l'idée est de formuler des objets similaires aux structures hypothétiquement obtenues *in vivo*. Nous les appelons « nanoBLSs » pour « bicouches lipidiques supportées sur des nanoparticules ». Le protocole est optimisé dans le but d'enrober l'ensemble des particules Silica (+) par du Curosurf, tout en évitant qu'il reste des vésicules libres en solution.

2) Protocole

Les particules Silica (+) sont diluées à 6 g L^{-1} par de l'eau MilliQ. Le Curosurf est également dilué avec l'eau MilliQ à la concentration $C_{Curosurf}$ correspondant à un rapport surfacique X_S défini par :

$$X_S = \frac{S_{bicouches}}{S_{Nps}}$$

où $S_{bicouches}$ et S_{Nps} sont les surfaces développées par les bicouches lipidiques du Curosurf et par les particules respectivement. Les solutions sont mélangées puis soniquées pendant 90 min. La température du bain de sonication est maintenue entre 30 et 40 °C. Cette régulation permet de travailler au-delà de la température de fusion des membranes de Curosurf mais en deçà de la température de dégradation des protéines. Le nombre de vésicules restant en solution après la formulation des nanoBLSs est défini par :

$$N = \frac{N_{vésicules}}{N_{nanoBLSs} + N_{vésicules}}$$

où $N_{vésicules}$ et $N_{nanoBLSs}$ représentent le nombre de vésicules et de nanoBLSs présentes en solution à la fin de la sonication. Le *Tableau 1* résume les valeurs de X, $C_{Curosurf}$ et N calculées pour les valeurs de X_S choisies dans notre étude. Les résultats obtenus sont discutés au Chapitre 4.

X_S	X	$C_{Curosurf}$ (g L^{-1})	N (%)
0.5	0.18	0.89	/
1.1	0.39	1.96	1.6
1.3	0.46	2.32	4.6
1.5	0.54	2.68	7.4
1.7	0.61	3.04	10.0
2	0.71	3.57	13.7
5	1.79	8.93	38.9

Tableau 1 : Rapport massique X, concentration en Curosurf $C_{Curosurf}$ et pourcentage N de vésicules présentes en fin de sonication. Les données sont présentées en fonction de X_S.

IV. Marquage fluorescent du Curosurf

1) Principe

Le Curosurf est marqué par la molécule PKH 67 (Sigma Aldrich). Ce composé comporte une tête polaire fluoresçant dans le vert et une chaine aliphatique. Le PKH 67 est généralement utilisé pour marquer les membranes cellulaires. Nous avons choisi de travailler avec cette molécule car son utilisation ne nécessite pas l'ajout d'autres composés chimiques[6].

Pour marquer les membranes cellulaires, Sigma Aldrich conseille de mélanger des cellules en suspension avec du fluorophore en excès. Le PKH 67 s'insère simplement dans les membranes grâce à sa chaine hydrophobe (*Figure 3a*).

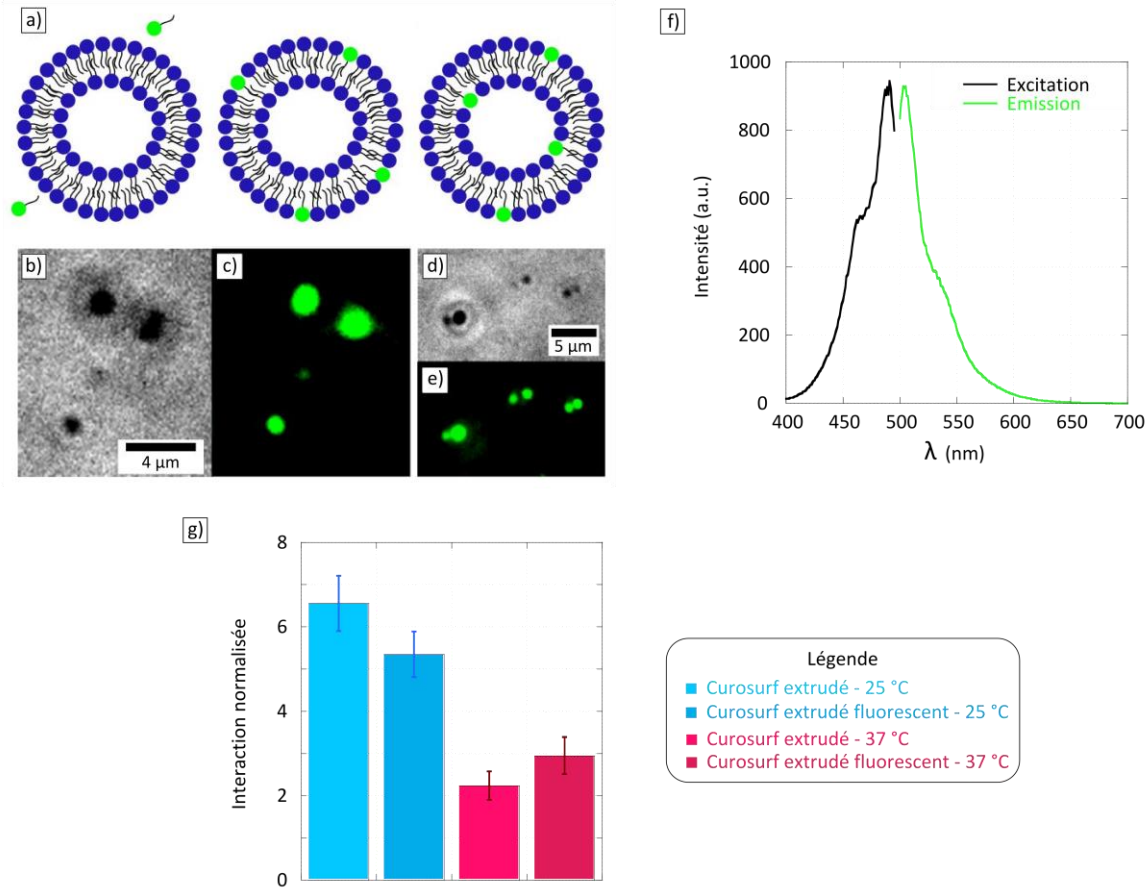


Figure 3 : a) Représentation schématique de vésicules de phospholipides en contact avec des molécules de fluorophore PKH 67, avant et après incorporation dans les membranes externes puis internes des vésicules. b-e) Vésicules de Curosurf observées en microscopie optique à contraste de phase (b,d) et à fluorescence (c,e). f) Spectres de fluorescence des vésicules de Curosurf marqué. g) Force d'interaction mesurée à 25 et 37 °C entre des particules Silica (+) et du Curosurf extrudé, fluorescent ou non.

Il est ensuite recommandé de centrifuger l'échantillon afin d'éliminer le PKH 67 resté en solution. Nous avons mesuré par diffusion de la lumière la taille du fluorophore dans

l'eau. Il forme des agrégats de 65 nm. Le Curosurf natif est par ailleurs composé de vésicules de 200 nm en moyenne. Dans notre cas, il n'est pas possible de séparer par simple centrifugation le Curosurf natif des agrégats de PKH 67. Il apparait nécessaire d'optimiser le marquage dans le but de rendre le surfactant pulmonaire fluorescent sans utiliser d'excès de fluorophore.

2) Optimisation du marquage

Après de nombreux essais, nous sommes arrivés à la conclusion suivante : 150 molécules de PKH 67 par vésicule de surfactant sont suffisantes pour avoir un bon marquage. Ce choix impose que les rapports en nombre $N_{fluorophores}/N_{phospholipides}$ et $N_{agrégats\text{-}PKH67}/N_{vésicules-Curosurf}$ sont inférieurs à 0.1% et 0.06% respectivement. Les fluorophores insérés dans les membranes de surfactant pulmonaire sont donc minoritaires en nombre par rapport aux phospholipides et ne devrait pas modifier leurs propriétés.

Observé en microscopie optique, les vésicules de Curosurf marqué sont bien visibles dans le vert et 86% des vésicules détectées en champ clair sont fluorescentes (*Figure 3b-e*). Les vésicules sont également détectables en lecteur de plaque et en analyse du suivi individuel de particules. Les spectres de fluorescence du Curosurf sont enregistrés sur un spectromètre Cary Eclipse (Agilent) et présentés en *Figure 3f*. Les vésicules sont excitées à $\lambda_{ex1} = 467$ nm et $\lambda_{ex2} = 489$ nm et émettent en fluorescence à $\lambda_{em} = 504$ nm. Ces données sont proches de celles déterminées par le fournisseur pour le PKH 67 seul.

Le Curosurf est extrudé par des pores de 50 nm puis marqué par le même protocole. Il exhibe un potentiel zéta de -18.5 mV, contre -23 mV pour le Curosurf extrudé non fluorescent. La charge des vésicules n'est donc pas significativement affectée par le marquage. Le diagramme de phase entre Silica (+) et Curosurf extrudé, fluorescent ou non, est déterminé à 25 et 37 °C. La force d'interaction résultante est montrée en *Figure 3g*. Elle ne semble pas dépendre du marquage fluorescent.

Le protocole optimisé permet donc de marquer le Curosurf et de le détecter avec un grand nombre de méthodes expérimentales sans changer notablement ses propriétés physico-chimiques.

V. Culture cellulaire

1) Généralités

Le choix du type cellulaire est primordial pour qu'une étude réalisée *in vitro* soit pertinente. Il est possible de prélever des cellules directement sur des êtres vivants. Ces cellules cultivées *in vitro* constituent alors des cultures primaires. Elles sont intéressantes car physiologiquement très proches des cellules *in vivo*. Les cellules primaires alvéolaires de type 1 et 2 peuvent être achetées chez Sciencell[7]. La culture de

ces cellules est délicate, d'autant plus qu'elles ne peuvent plus se diviser une fois qu'elles sont entrées en contact les unes avec les autres. Il est donc préférable de travailler sur des cellules dites « immortalisées ».
Aucune lignée immortalisée de pneumocytes humains de type 1 n'est commercialisée. Kemp *et al.* ont élaboré un protocole pour immortaliser des cellules AT1 mais leur réalisation nécessite des connaissances approfondies en biologie[8]. Il existe des cellules de type 2 immortalisées : les cellules A549. Elles sont issues d'un adénocarcinome pulmonaire humain et sont commercialisées par l'ATCC. Ces cellules sont généralement utilisées comme modèle de l'épithélium alvéolaire.
Des cellules A549 ont été achetées à l'ATCC sous la référence CCL-185™ par l'équipe de Sonia Boland (Laboratoire BFA, Université Paris Diderot). Les cellules, reçues congelées au passage 86, ont été amplifiées puis recongelées au passage 89 par Mathilde Delaval (Laboratoire BFA, Paris Diderot). Nous avons amplifié ces cellules et les avons congelées au passage 92 à raison de 2 millions de cellules par ampoule. Lors de la décongélation, les cellules sont ensemencées dans du milieu de culture complet (deux flasques T75 par ampoule). Le milieu est renouvelé 6 h après décongélation. Les cellules sont cultivées 2 semaines afin qu'elles recouvrent une vitesse de division dite « normale » puis elles sont utilisées durant un mois pour les expériences. Les cellules ne sont jamais conservées après le passage 110 afin de limiter la dérive génétique.

2) Protocole de culture

Les A549 sont cultivées dans du DMEM Glutamax complété par 10% et 1% volumiques de sérum décomplémenté et de Pénicilline-Streptomycine. Notre protocole de culture suit les recommandations de l'ATTC. Les cellules sont donc en T75 et les passages ont lieu 2 fois par semaine, lorsque les cellules atteignent entre 80 et 90% de confluence. Lors d'un passage, les A549 sont rincées par du PBS, puis incubées 5 min à 37 °C avec 4 mL de tripsine. Elles sont ensuite dispersées à l'aide d'une pipette puis diluées au 6ème ou au 8ème dans 15 mL de DMEM complet. Les cellules A549 sont ainsi ensemencées entre $1.5.10^4$ et 3.10^4 cellules cm^{-2}. Les cellules sont incubées à 37 °C dans une atmosphère humide régulée à 5% de CO_2.

3) Protocole de comptage

Le comptage des cellules A549 est réalisé avec une cellule de Malassez. Pour cela, les A549 sont rincées avec du PBS et incubées 5 min à 37 °C avec 4 mL de tripsine. Ensuite, 8 mL de milieu complet sont ajoutés pour inhiber la tripsine et les cellules sont centrifugées 5 min à 1 200 rpm. Le surnageant est éliminé et les cellules sont suspendues dans environ 1 mL de DMEM complet. Pour finir, 20 µL de A549 en suspension sont injectés dans la cellule de Malassez et 15 carreaux sont comptés. La concentration C en cellules A549 est donnée par la formule $C = x.10^5/15$ cellules mL^{-1} où x est le nombre total de cellules comptées.

4) Croissance des cellules

Les cellules sont sensibles à leur environnement. Leur morphologie et leur vitesse de division sont observées pour vérifier que nos conditions de culture ne modifient pas drastiquement leur phénotype.

a) Morphologie et taille des A549

Les cellules sont observées en microscopie optique, et comparées à celles fournies par l'ATCC. Nous avons ainsi pu vérifier que dans nos conditions de culture, les A549 ont bien la morphologie attendue (*Figure 4*).

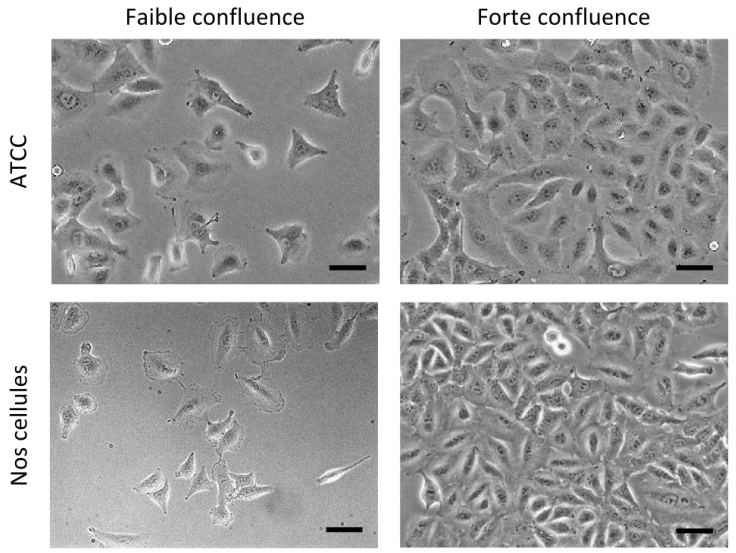


Figure 4 : Image de microscopie optique des cellules A549 à faible et forte confluence. Nos images sont comparées à celles fournies par l'ATTC. Barres d'échelle : 50 µm.

Dans nos expériences, nous avons observé que les cellules A549 semblent plus étalées à faible densité qu'à forte confluence. Les images de microscopie optique sont analysées pour valider cette observation (*Figure 5*). Une mesure de taille effectuée sur une centaine de cellules en fonction de la confluence (30% et 95%) permet de tracer les histogrammes des aires pour les A549. A une confluence de 30%, les cellules ont une aire moyenne de 1 470 µm², alors qu'à 95% leur surface moyenne est de 886 µm². L'augmentation de la confluence mène donc à une diminution de la taille des cellules.

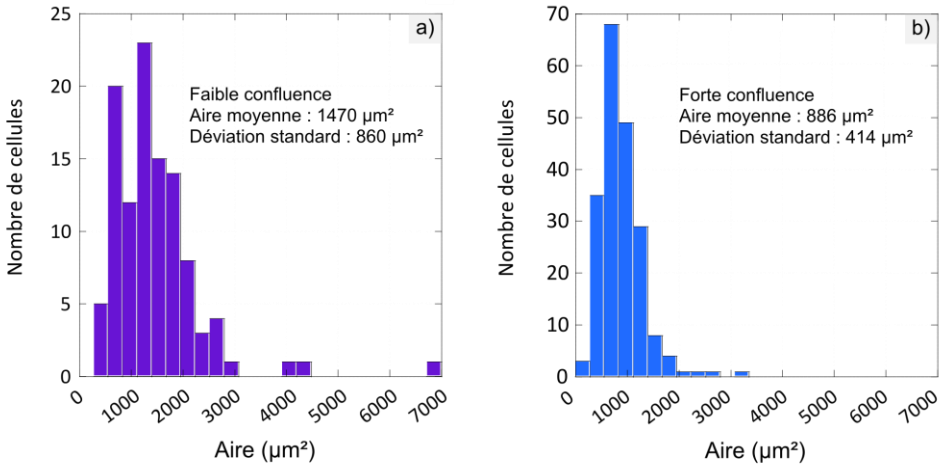


Figure 5 : Histogramme de taille de cellules à 30% (a) et 95% (b) de confluence. Les mesures sont faites à partir de l'analyse d'images de microscopie optique sur 100 et 200 cellules respectivement.

b) Vitesse de croissance des cellules A549

Les cellules sont ensemencées à 10 500 cellules cm^{-2} (soit 100 000 cellules par boîte de Petri de surface 9.6 cm^2). Elles sont cultivées et comptées selon les protocoles décrits précédemment. La *Figure 6a* rend compte de la croissance des cellules observée en microscopie optique. La *Figure 6b* montre le nombre de cellules par boite de Petri en fonction du temps de culture. Durant les 10 premières heures, les cellules ne se multiplient pas. Cette durée correspond au temps nécessaire aux cellules pour sédimenter puis adhérer au substrat avant de reprendre leur cycle de division. Ensuite, la croissance des cellules est observée.

Soit $N(t)$, le nombre de cellules en fonction du temps. Il peut être ajusté par la loi de croissance suivante[9] :

$$N(t) = \frac{N_0 2^{(t-t_c)/\tau}}{\sqrt{1+\left(\frac{N_0}{N_f}\right)^2 (2^{2(t-t_c)/\tau}-1)}}$$

où τ est le temps de duplication, t_c est le temps de culture à partir duquel la croissance commence et N_0 et N_f sont les nombres de cellules à l'ensemencement et à la confluence. L'ajustement de cette équation à nos données expérimentale pour t_c = 10 h donne les résultats suivants : τ = 20.7 h, N_0 = 1.03 10^5 et N_f = 1.56 10^6. N_0 est du même ordre de grandeur que le nombre de cellules que nous avons déposées dans chaque boîte. La valeur de N_f est aussi en bon accord avec les valeurs d'aires mesurées précédemment. Pour finir, le temps de duplication calculé est de 21 h environ. Ce résultat est proche des 22 h données par l'ATCC. On peut donc conclure que les cellules se divisent normalement dans nos conditions de culture.

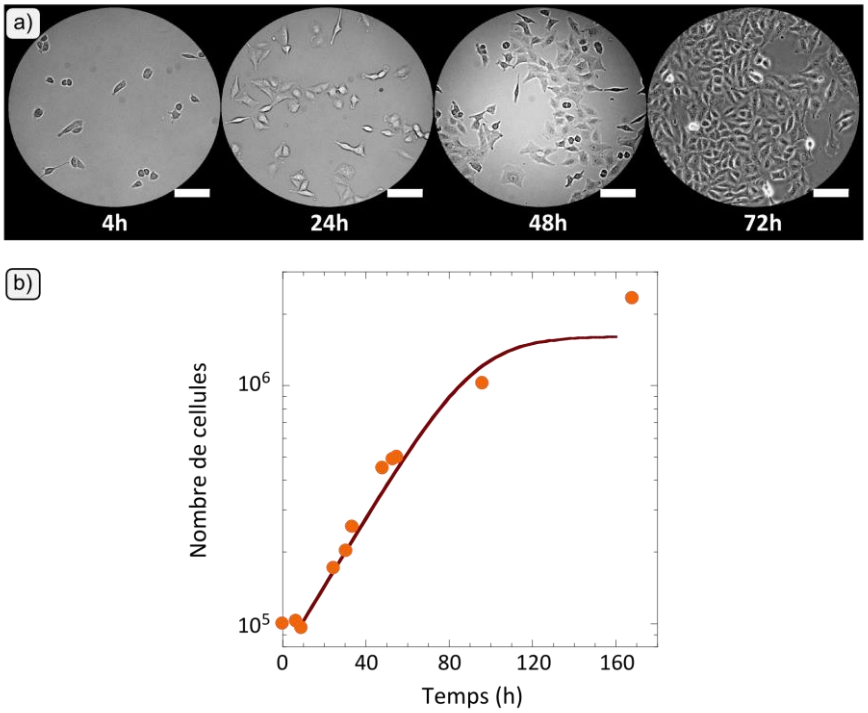


Figure 6 : a) Images de microscopie optique de la croissance des cellules. Barres d'échelle : 100 µm. b) Nombre de cellules en fonction du temps. Les points orange correspondent aux données expérimentales et la ligne continue marron à l'ajustement de la loi de croissance.

VI. Test de viabilité cellulaire

1) Principe

Pour évaluer l'impact des Nps sur les cellules, nous étudions la viabilité cellulaire à travers l'activité mitochondriale. Les cellules sont ensemencées dans des plaques 96 puits. Elles sont cultivées 24 h dans du milieu complet puis incubées 24 h avec des nanoparticules diluées dans du milieu sans sérum. La viabilité cellulaire est ensuite estimée. Pour cela, les cellules sont incubées avec du WST-1 (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche). Ce sel de tétrazolium est transformé en formazan par une réductase présente dans les mitochondries. Le formazan est détectable par UV-visible, contrairement au WST-1. L'absorbance mesurée est donc proportionnelle à l'activité des mitochondries. Elle est ensuite convertie en viabilité cellulaire. Afin de ne pas fausser l'absorbance, toutes les expériences en plaque sont réalisées dans du DMEM sans rouge de phénol, dit « DMEM blanc ».

2) Optimisation du protocole

a) *Nombre de cellules à ensemencer*

Puisque les A549 sont des cellules épithéliales, il est nécessaire de réaliser les tests à forte confluence (entre 80 et 90%). Nous devons donc déterminer le nombre de cellules à ensemencer pour être dans les bonnes conditions expérimentales lors de l'incubation avec les particules. Les cellules sont déposées dans des plaques 96 puits à 5 000, 10 000, 20 000 et 40 000 cellules par puit. Elles sont incubées 24 h dans du milieu complet et 24 h dans du milieu sans sérum. La confluence est calculée à t = 0 et estimée à t = 24 h et t = 48 h (*Tableau 2*).

	Confluence		
Nombre de cellules (t = 0)	t = 0 h	t = 24 h	t = 48 h
5 000	15%	20-25%	20-25%
10 000	25%	40%	40%
20 000	50%	90-95%	90-95%
40 000	75%	100%	100%

Tableau 2 : Estimation visuelle de la confluence des A549 en fonction du nombre de cellules ensemencées, après 24 h de culture dans du milieu complet puis 24 h additionnelles dans du milieu sans sérum. La confluence à t = 0 h est calculée à partir des tailles de cellules mesurées précédemment.

Comme attendu, le nombre de cellules double en 24 h lorsqu'elles sont incubées dans du milieu complet. Ensuite, la croissance est stoppée lorsque le milieu ne contient plus de sérum. Pour le test de viabilité cellulaire, nous choisissons d'ensemencer les plaques à 20 000 cellules par puit.

b) *Temps d'incubation*

La vitesse de conversion du WST-1 en formazan dépend du type de cellules et de leur nombre. Il est donc nécessaire d'optimiser le temps d'incubation des A549 pour les conditions de culture choisies ci-dessus.

Les cellules sont ensemencées en plaque 96 puits à 20 000 cellules par puit. Elles sont incubées 24 h dans du milieu complet puis 24 h dans du milieu sans sérum et enfin 0 à 120 min dans du WST-1. L'absorbance est alors mesurée. L'expérience est répétée deux fois et les résultats sont présentés en *Figure 7*.

L'absorbance mesurée se situe entre 0 et 2. Cette grandeur, sans unité, n'est fiable qu'en deçà de la valeur 1. Le premier test réalisé indique que le temps d'incubation doit être inférieur à 20 min. A ce temps, l'absorbance mesurée dans le second test est de 0.6. Ces résultats montrent que pour une même expérience sur les cellules, la variabilité entre réplica est conséquente. Finalement, le temps d'incubation est fixé à 30 min afin

de maximiser les valeurs d'absorbance mesurées sans dépasser significativement la valeur limite 1.

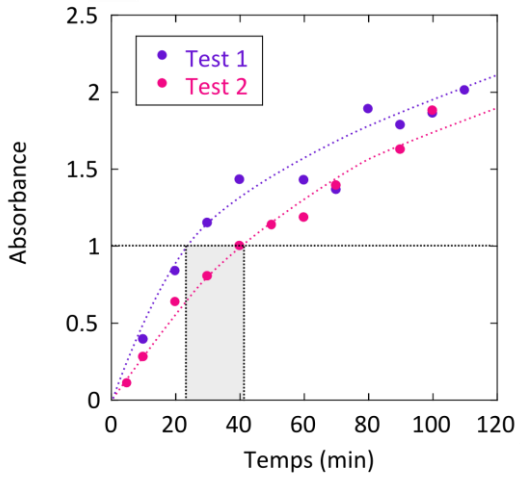


Figure 7 : Absorbance des cellules en fonction du temps d'incubation avec le WST-1. L'expérience est réalisée en duplicata. Les lignes pointillées sont des guides pour les yeux.

3) Protocole du test WST-1

Le protocole optimisé du test de viabilité cellulaire WST-1 est détaillé ci-dessous (cf *Figure 8* pour une représentation de la plaque) :

- Les cellules sont dispersées dans du DMEM complet puis ensemencées à 20 000 cellules par puit (200 µL à 100 000 cellules mL^{-1}). La première colonne est laissée vide. La plaque est incubée 24 h.
- Les cellules sont rincées deux fois avec du PBS. De l'eau oxygénée H_2O_2 est ajoutée en colonne 12 afin de mesurer l'absorbance dans le cas où toutes les cellules sont mortes. Les autres cellules sont couvertes par du DMEM. Les particules sont dispersées typiquement à 3 000 µg mL^{-1} dans du milieu. 100 µL de cette solution sont ajoutés en colonne 10 et une dilution en cascade est effectuée jusqu'à la colonne 2. Il y a donc un facteur 3 en concentration de particules entre deux colonnes voisines. La plaque est incubée 24 h.
- Les lignes 5 à 8 sont traitées durant 15 min avec 100 µL de Triton à 2% dans du DMEM. Le Triton perméabilise les membranes et entraine la mort cellulaire. La mesure ultérieure d'un signal dans ces puits signifie que les particules interagissent avec le WST-1 et modifient son absorbance. Dans nos expériences, aucune interaction entre particules et WST-1 n'a été identifiée.
- La plaque est rincée 2 fois avec du PBS puis les cellules sont incubées 30 min avec 100 µL de WST-1 dilué au 20ème dans du milieu de culture. La colonne 1 est également remplie de 100 µL de WST-1 dilué dans du DMEM.

- Le surnageant est transféré dans une autre plaque 96 puits et l'absorbance est lue à 450 et 630 nm, au Laboratoire BFA, avec un lecteur de plaque ELx808 (Biotek Instruments, Winooski, USA).
- Les données brutes sont traitées suivant le protocole recommandé par le fournisseur du kit WST-1 puis les résultats sont analysés avec un test ANOVA, suivi d'un test statistique de Dunnet (logiciel GraphPad Prism 7).

Dans nos expériences, les données des lignes 1 et 8 ne sont pas considérées afin d'éliminer les effets de bord. Un résultat correspond donc à la moyenne de trois puits. Les résultats de viabilité cellulaires seront discutés au Chapitre 6.

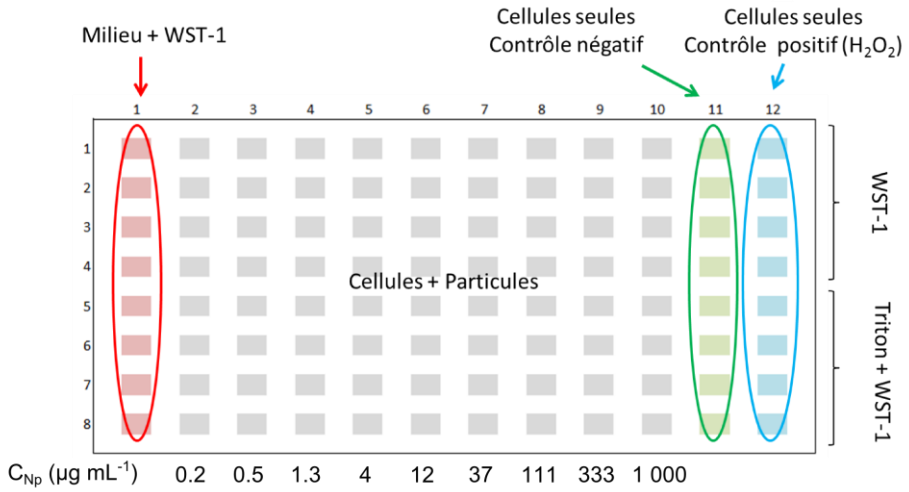


Figure 8 : Représentation d'une plaque 96 puits utilisée pour un test de viabilité cellulaire

VII. Internalisation des particules Silica (+) : quantification

1) Principe

Dans cette partie, nous souhaitons estimer la quantité de particules internalisées par les A549 ou adsorbées sur leur membrane externe. Les particules utilisées sont les Silica (+) fluorescentes, et les résultats sont obtenus par fluorimétrie. Les cellules sont ensemencées dans une plaque 96 puits. Elles sont cultivées 48 h dans du milieu complet puis elles sont incubées à temps court avec des nanoparticules dispersées dans du DMEM. Pour diminuer le bruit de fond, toutes les expériences en plaque sont réalisées dans du DMEM « blanc ».

2) Nombre de cellules à ensemencer

Comme précédemment, il est recommandé de réaliser les tests à forte confluence. Le nombre de cellules à ensemencer pour l'expérience d'internalisation doit donc être optimisé. Les A549 sont ensemencées en plaque 96 puits à 5 000, 10 000, 20 000 et

40 000 cellules par puit. Elles sont incubées 48 h dans du milieu complet. La confluence est calculée à t = 0 et estimée à t = 24 h et t = 48 h (*Tableau 3*). Le nombre de cellules double toutes les 24 h environ. Aux vues des résultats, nous choisissons d'ensemencer les plaques à 10 000 cellules par puit pour atteindre une confluence élevée après 48 h de culture.

	Confluence		
Nombre de cellules (t = 0)	t = 0 h	t = 24 h	t = 48 h
5 000	15%	20-25%	20-30%
10 000	25%	40%	70-80%
20 000	50%	90-95%	100%
40 000	75%	100%	100%

Tableau 3 : Estimation visuelle de la confluence des A549 en fonction du nombre de cellules ensemencées, après 24 h et 48 h de culture dans du milieu complet. La confluence à t = 0 est calculée à partir des tailles de cellules mesurées précédemment.

3) Détection des particules fluorescentes

La fluorescence des Silica (+) est caractérisée avec le lecteur de plaque « Flexstation 3 » (Molecular Devices) du Laboratoire BFA. Les Nps sont diluées dans de l'eau MilliQ à 5, 25, 50, 75 et 100 µg mL^{-1}. Les paramètres du lecteur de plaque sont ajustés pour que la fluorescence varie linéairement avec la concentration en particules tout en maximisant le signal. Pour rappel, les Silica (+) sont excitées à $\lambda_{ex1} =$ 533 nm et $\lambda_{ex2} =$ 595 nm et émettent en fluorescence à $\lambda_{em} =$ 590 nm. La *Figure 9* montre les résultats obtenus pour les paramètres du lecteur de plaque suivants : $\lambda_{ex} =$ 533 nm et $\lambda_{em} =$ 590 nm. Le filtre de coupure en émission est à 570 nm. La lecture est réalisée par le bas de la plaque et le couvercle n'est pas retiré. La fluorescence I varie linéairement avec la concentration en particules C_{Np}, suivant l'équation $I = 1.06 C_{Np}$.

Les Silica (+) sont diluées par du DMEM « blanc » ou sont mélangées avec du Curosurf à X = 0.3. Rappelons que le système Np/Curosurf à X = 0.3 correspond au maximum de diffusion observé en DLS. Dans ces deux cas, les particules sont agrégées alors que dans l'eau elles sont dispersées. Ainsi, la fluorescence des Nps n'est pas significativement modifiée lorsqu'elles agrègent ou lorsque leur milieu dispersant varie (*Figure 9*). Nous supposons alors que l'internalisation des Nps par les cellules n'affecte pas leur fluorescence de façon significative. Ces hypothèses nous permettront de quantifier le nombre de particules en interaction avec les cellules.

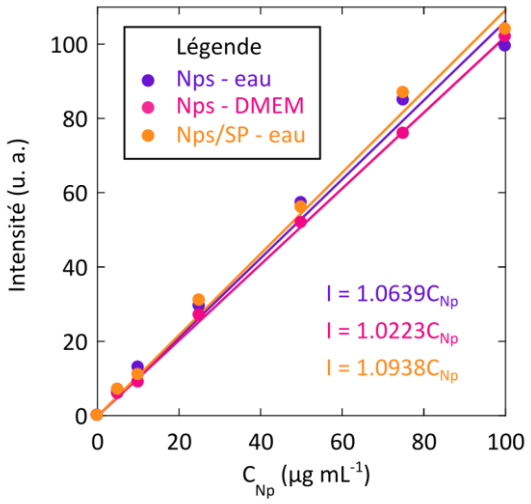


Figure 9 : Fluorescence des particules Silica (+) en fonction de la concentration. Les Nps sont diluées dans de l'eau ou du DMEM, ou mélangées à du Curosurf ($X = X_{max} = 0.3$) puis diluées dans de l'eau MilliQ.

4) Protocole

Le protocole optimisé est détaillé ci-dessous (cf *Figure 10* pour une représentation de la plaque 96 puits) :

- Les cellules sont dispersées dans du DMEM complet puis ensemencées à 10 000 cellules par puit (200 µL à 50 000 cellules mL^{-1}) dans les colonnes 1 à 9. La plaque est incubée 48 h.
- Les cellules sont rincées deux fois avec du PBS puis incubées 1 h dans du milieu sans sérum. Elles sont ensuite rincées à nouveau avec du PBS. Les particules sont dispersées à 5, 10, 25, 50, 75 et 100 µg mL^{-1} dans du DMEM puis 200 µL sont déposés sur les cellules, dans les colonnes 3 à 8. 200 µL de particules de chaque concentration sont également versés en colonne 11. Ces puits servent d'étalon interne. La plaque est incubée 1 h ou 4 h.
- La plaque est rincée 2 fois avec du PBS puis les cellules sont couvertes de 100 µL de DMEM.
- La fluorescence est lue au Laboratoire BFA avec un lecteur de plaque thermostaté à 37 °C. Le surnageant est remplacé par 100 µL de Black Brilliant (Sigma Aldrich) à 2.5 g L^{-1} dans du DMEM et la fluorescence est à nouveau lue. Par ces deux lectures, nous mesurons la fluorescence des particules ayant interagi avec les cellules et celle des Nps internalisées. Nous pouvons alors calculer la fluorescence provenant des Nps adsorbées sur la membrane cellulaire.
- Les données des lignes 1 et 8 ne sont pas considérées lors de l'analyse des résultats pour éliminer les effets de bord. Les données des 3 puits réalisées en conditions identiques sont moyennées. La fluorescence est normalisée avec la

mesure des particules seules. Cette méthode permet de comparer l'internalisation d'objets effectuée sur des plaques distinctes.

Les données relatives à ce protocole seront présentées au Chapitre 6.

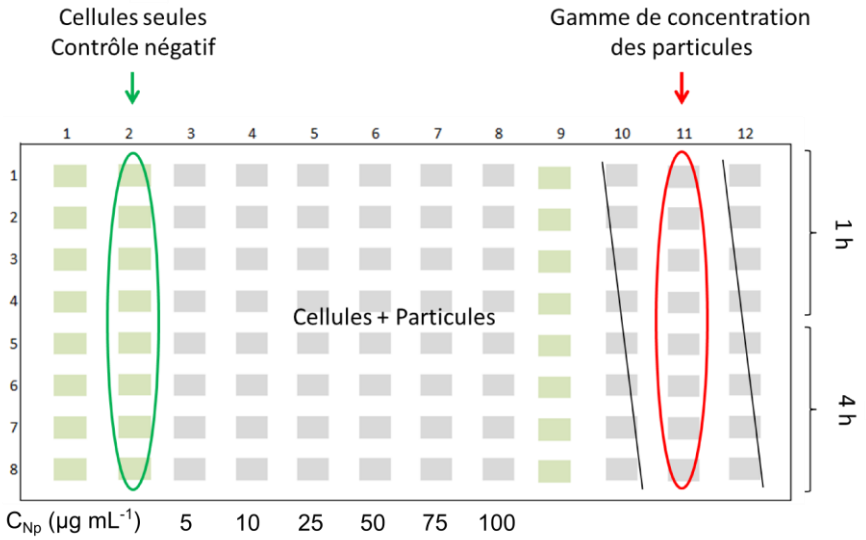


Figure 10 : Représentation d'une plaque 96 puits utilisée pour la quantification de l'internalisation des particules Silica (+).

Annexe A : Matériels

1) Curosurf

Le Curosurf® (Chiesi Parmaceuticals, Parma, Italy) est un surfactant naturel extrait des poumons de porc. Il contient des phospholipides et des protéines. Il est dispersé dans du chlorure de sodium à 0.9%, et a l'apparence d'une suspension crémeuse. D'après le fournisseur, son pH est ajusté avec du bicarbonate de sodium à 6.2, le pH étant en réalité compris entre 5.5 et 6.5[10]. Les premiers échantillons sont donnés par Ignacio Garcia-Verdugo (INSERM, Paris, France). Par la suite, le Curosurf est fourni par Mostafa Mokhtari (Hôpital du Kremlin-Bicêtre, Val-de-Marne, France).

2) Phospholipides

La 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) est achetée chez Sigma-Aldrich, alors que le 2-oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycéro-3-phospho-rac-(1-glycérol) (POPG) et le sel de sodium du L-α-phosphatidyl-DL-glycérol (PG) sont données par Ignacio Garcia-Verdugo.

3) Nanoparticules

Les nanoparticules de silice négative, notées Silica (-), sont achetées chez Sigma Aldrich. Les particules de silice positive, notées Silica (+), sont synthétisées par Stéphane Mornet (Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux, France) à partir de la méthode de Stöber[11]. En bref, des grains de silice fluorescente sont préparés à partir de rhodamine et de précurseurs de silice. Ensuite, une couronne de silice non marquée est créée autour de ces grains. La surface des particules est alors fonctionnalisée par des groupes amine qui confèrent une charge positive aux particules[12,13]. Les oxydes d'aluminium (Disperal, SASOL), notés Alumina (+) sont donnés par Florent Carn (Laboratoire Matière et Systèmes Complexes, France). Ceux de titane (Nanostructured & Amorphous Material Inc.), notés Titania (+), nous ont été fournies par Serge Stoll (Université de Genève, Suisse). Les particules de latex fonctionnalisées par des groupes carboxyles, sulfates et amidines sont achetées chez Life Technologies. Elles sont respectivement notées Latex 1 (-), Latex 2 (-) et Latex (+).
L'ensemble de ces particules est caractérisé de manière extensive au paragraphe I et les résultats sont présentés en **Annexe C**.

4) Polymères

Les polymères chlorure de polydiallyldimethylammonium (PDADMAC), de poids moléculaire 13.4 et 26.8 kDa, sont achetés chez Polysciences Europe et Sigma Aldrich respectivement. Les polymères poly(sodium 4-styrenesulfonate) (PSS) de poids moléculaire 8.0 et 59.7 kDa sont obtenus respectivement auprès de SRA Instruments et Sigma Aldrich. L'acide polyacrylique (PAA) est acheté chez Sigma Aldrich. Les caractéristiques de ces polymères sont résumées dans le *Tableau 4*.

Polymère	Fournisseur	M_n (kDa)	M_w (kDa)	DP	D	Charge	Type de polyélectrolyte
PDADMAC	Sigma Aldrich	7.6	26.8	50	3.5	+	Fort
	Polysciences Europe	4.9	13.4	31	2.7	+	Fort
PSS	Sigma Aldrich	28.2	59.7	137	2.1	-	Fort
	SRA Instruments	6.7	8.0	32	1.2	-	Fort
PAA	Sigma Aldrich	3.0	5.4	32	1.8	-	Faible

Tableau 4 : Caractéristiques des polymères utilisés dans notre travail : poids moléculaire moyen en nombre (M_n), poids moléculaire (M_w), degré de polymérisation (DP), dispersité (D) et nature du polyélectrolyte.

5) Autre composés chimiques

Le méthanol, l'acétate de sodium, le phosphate de sodium dibasique (Na_2HPO_4), le phosphate de sodium monobasique dihydrate ($NaH_2PO_4.2H_2O$), l'acide acétique, et l'acide nitrique (70%) sont achetés chez Sigma Aldrich. L'hydroxyde de sodium et l'acide chlorhydrique (37%) viennent de Riedel-deHaën et VWR Chemicals respectivement. L'eau est dé-ionisée avec un système « Millipore Milli-Q Water System".

Le PBS, le DMEM Glutamax, le DMEM sans rouge de phénol, le sérum et la Pénicilline-Streptomycine sont achetés chez Gibco, Life Technologies. Le DMEM (avec ou sans rouge de phenol) peut être complété avec 10% volumiques de sérum and 1% en volume de Pénicilline-Streptomycine.

Annexe B : Equipements

1) Diffusion de la lumière (DLS)

Les mesures de diffusion de la lumière sont réalisées avec un NanoZS Zetasizer (Malvern Instruments). Dans les expériences de diffusion de la lumière (à 173°), le diamètre hydrodynamique D_H et l'intensité diffusée I_S sont mesurés. Le rapport de Rayleigh R est déduit de l'intensité diffusée par la relation :

$$\mathrm{R} = \frac{(I_S - I_w) n_0^2 R_T}{I_T n_T^2}$$

où I_w et I_T sont les intensités diffusées par l'eau et le toluène, $n_0 =$ 1.333 et $n_T =$ 1.497 sont les indices de réfraction respectifs de la solution étudiée et du toluène et R_T est le rapport de Rayleigh du toluène à λ = 633 nm (R_T = 1.352.10^{-5} cm^{-1}). La fonction d'autocorrélation au second ordre est analysée en utilisant les cumulants et l'algorithme CONTIN afin de déterminer le coefficient de diffusion D des objets étudiés. Le diamètre hydrodynamique est ensuite calculé via l'équation de Stokes-Einstein :

$$\mathrm{D_H} = \frac{k_B T}{3\pi\eta D}$$

où k_B est la constante de Boltzmann, T la température et η la viscosité du solvant. Les mesures sont réalisées en triplicata, à 25 ou 37 °C, après 120 s de thermalisation. Pour les mesures à 37 °C, les cuves et les solutions d'intérêts sont thermalisées à 37 °C durant au moins 30 min.

2) Potentiel zéta

Le Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, UK) est utilisé pour mesurer la mobilité électrophorétique et le potentiel zéta des nanomatériaux. Pour ce faire, la vélocimétrie doppler utilisant l'analyse de la phase de la lumière diffusée est utilisée. La détection se fait à un angle de 16°. Les mesures sont réalisées en triplicata, après 2 min de thermalisation à 25 °C.

3) Analyse du suivi individuel de particules (NTA)

Les mesures de suivi individuel de particules sont réalisées avec un NanoSight LM14 (Malvern Instruments, UK) équipé d'une chambre illuminée par un laser (532 nm). Le logiciel Nanosight NTA 3.0 est utilisé pour filmer et analyser les données. Les paramètres de la caméra sont réglés manuellement pour chaque échantillon. Les mesures durent 1 min. Elles sont effectuées à température ambiante et au moins en triplicata.

4) Sédimentation Différentielle par Centrifugation (DCS)

La distribution de taille des particules est mesurée en utilisant un disque en rotation (DC24000 UHR, CPS Instruments Inc.) Des solutions de sucrose à 8 et 24% massiques

sont préparées dans de l'eau MilliQ juste avant utilisation. Elles sont mélangées afin d'obtenir des solutions à 22, 20, 18, 16, 14, 12 et 10% massiques en sucrose. Le disque, en rotation à 21 000 rpm, est rempli par injections successives de 1.6 mL de ces solutions, en allant des concentrations 24% à 8%. Avant chaque mesure, l'appareil est calibré avec des particules de chlorure de polyvinyle (0.239 µm, Analytik Ltd.). Les volumes injectés sont de 100 µL et les solutions sont à 1.5 g L^{-1} en particules. Les échantillons sont analysés trois fois pour vérifier la reproductibilité de la mesure. La moyenne des triplicatas est ensuite tracée.

5) Calorimétrie Différentielle à Balayage (DSC)

Les thermogrammes sont mesurés en utilisant un calorimètre N-DSCIII (CSC). La cellule de référence est remplie d'eau MilliQ et l'autre cellule contient 0.3 mL de Curosurf dilué à 10 g L^{-1} dans l'eau MilliQ. Les capillaires des cellules ne sont pas fermés et une pression constante de 5.10^5 Pa est appliquée. Les solutions sont soumises à 4 cycles de chauffage et refroidissement, entre 5 et 70 °C, à une vitesse de 0.5 °C min^{-1}. Les données relevées pendant le premier cycle ne sont pas prises en compte pour l'analyse des résultats. Celles des trois autres sont moyennées.

6) Extrusion

L'extrudeur et les membranes (de pores compris entre 50 et 800 nm de diamètre) sont achetés chez Avanti Polar Lipids. Les solutions de phospholipides sont préparées entre 0.1 et 10 g L^{-1} dans le dispersant désiré. Après 25 min d'équilibre thermique, elles sont extrudées 51 fois. Les solutions de concentration inférieure ou égale à 1 g L^{-1} sont extrudées à température ambiante alors que les solutions dont la concentration excède 1 g L^{-1} sont extrudées entre 37 et 40 °C.

7) Microscopie optique

Les images de contraste de phase, de champ clair et de fluorescence sont acquises sur un microscope inversé IX71 (Olympus), équipé d'objectifs x20, x40 et x60. Une caméra EXi Blue (QImaging) et le logiciel Metaview (Universal Imaging Inc.) sont utilisés comme système d'acquisition. Pour la fluorescence, le système « Illuminateur XCite Microscope » produit une lumière blanche, filtrée pour obtenir une illumination dans le rouge (filtre d'excitation : 545 nm - bande passante : 40 nm, filtre d'émission : 620 nm – bande passante : 60 nm) et dans le vert (filtre d'excitation : 470 nm - bande passante : 40 nm, filtre d'émission : 525 nm – bande passante : 50 nm). L'intensité de la lumière peut être ajustée à 100, 50, 25 et 12% de la puissance initiale de la lampe (120 W).

<u>Préparation des échantillons</u> : 30 µL de la dispersion d'intérêt sont disposés sur une lame de verre. L'ensemble est scellé par un Gene Frame (Abgene / Advanced Biotech). Dans certains cas, les lames sont couvertes d'un polymère cationique. Ainsi, le PDADMAC est dilué à 0.1 g L^{-1} dans de l'eau MilliQ. Les lames sont plongées 1 h dans

cette solution puis rincées avec de l'eau MilliQ. L'échantillon est déposé sur la lame modifiée en surface et un Gene Frame scelle l'ensemble. Pour les observations à 37 °C, la lame scellée est placée dans une chambre thermostatée (Heating Insert P Lab-Tek™, Pecon) contrôlée en température par le module Tempcontrol 37-2 digital (Pecon).

8) Microscopie électronique à transmission (MET)

Les images de microscopie électronique à transmission sont réalisées sur un microscope Tecnai 12, opérant à 80 kV et équipé d'une caméra 1Kx1K Keen View.

a) Etude des nanoparticules, des surfactants pulmonaires et des systèmes Nps/SP

Les grilles utilisées sont en cuivre et sont recouvertes d'une fine couche de carbone (Holey-carbon coated 300 mesh copper, Neyco). Lorsque les échantillons sont contrastés avec de l'acétate d'uranyle, 3 µL d'échantillon sont déposés sur la grille. Après 10 min, le surplus de liquide est éliminé grâce à un papier filtre et 3 µL d'acétate d'uranyle sont déposés sur la grille pendant 30 s. Ce composé assombrit les têtes des phospholipides grâce à la forte affinité des électrons denses de l'acétate d'uranyle pour les groupes carboxyles. Finalement, la grille est laissée sécher à température ambiante, dans le noir, pendant 20 min. Lorsque les échantillons ne sont pas marqués, 20 µL sont déposés sur la grille. L'ensemble est laissé à température ambiante pendant 10 h.

b) Etudes sur les cellules pulmonaires

Les cellules sont ensemencées dans des flasques T25 et cultivées 48 h. Elles ont alors une confluence de 80-90%. Les T25 sont rincées avec du PBS et les cellules sont incubées 4 h avec 5 mL de DMEM contenant des Silica (+), des agrégats Silica (+)/Curosurf ou des nanoBLSs. Pour chaque échantillon, les solutions sont à 100 µg mL^{-1} en particules. Les cellules sont rincées par du PBS, incubées 1 h à température ambiante avec un mélange de 1% de glutaraldéhyde et de 2.5% de PFA dans du PBS. Les cellules sont rincées 2 fois avec du PBS, décollées par grattage et centrifugées. Le culot est fixé durant 1 h avec du tétroxyde d'osmium à 1% réduit par du ferrocyanure de potassium à 1.5%. Après rinçage, les échantillons sont déshydratés par des mélanges éthanol / oxyde de propylène puis enrobés dans une résine époxy. Des coupes de 70 nm sont obtenues à l'aide d'un Ultracut UC6 (Leica) puis déposées sur des grilles de MET en cuivre couvertes d'une couche formvar-carbone. Finalement, les sections sont marquées en surface par une solution aqueuse à 4% d'acétate d'uranyle et de sel d'acide citrique (Lead(II) citrate tribasic trihydrate, Sigma Aldrich). La fixation des échantillons et les images sont réalisées par Rémi Leborgne de la plateforme ImagoSeine (Institut Jacques Monod, France).

9) Microscopie cryo-électronique à transmission (cryoMET)

Quelques microlitres d'échantillons sont déposés sur une grille couverte d'une fine couche de carbone perforée (Lacey carbon coated 200 mesh, Ted Pella). Le surplus est

aspiré par un papier filtre grâce à un Vitrobot™ (FEI) puis la grille est plongée rapidement dans de l'éthane liquide, refroidi par de l'azote liquide. Ce processus permet d'éviter la cristallisation de la phase aqueuse lors de sa solidification. La grille est ensuite transférée dans un microscope à transmission électronique (JEOL 1400 opérant à 120 kV). L'échantillon est maintenu à la température de l'azote liquide grâce à un cryo-portoir (Gatan). Le grossissement est choisi entre x3 000 et x40 000, et les images sont enregistrées avec une caméra 2K×2K Ultrascan (Gatan). La préparation des échantillons ainsi que les images sont réalisées par Annie Vacher, de l'entreprise Solvay (Aubervilliers).

Annexe C : Cartes d'identité des nanoparticules

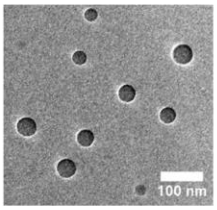
Latex (+)

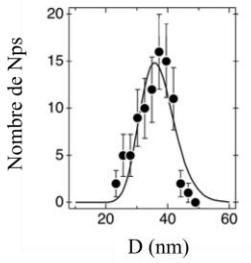
Informations générales

Composition chimique : ..... Polystyrène
Fournisseur : ..... Life Technologies
Nom : ..... Amidine Latex
Type : ..... Particules de polystyrène greffées par des groupements amidine
Densité des Nps : 1.05
Concentration : ..... 40 g L^{-1}
Préparation avant utilisation : ..... Aucune

Taille

Diamètre :
MET : 34 nm (s = 0.15)
DLS : 56 nm

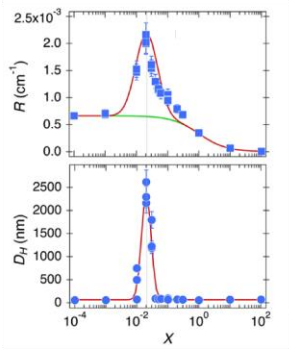




Courbe de calibration pour la concentration

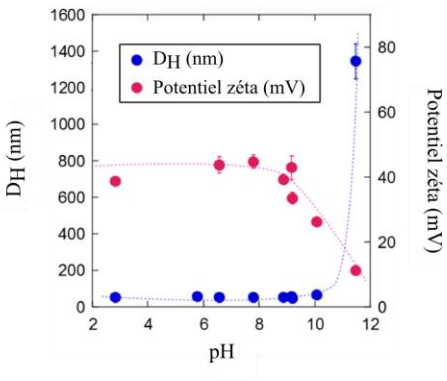
Aucune

Densité surfacique de charge



σ = +0.33 ± 0.06 e nm^{-2}

Stabilité



Temps \ pH	3.0	4.5	5.6	6.2	8.1	9.5	10.2
0 j	-	-	-	-	-	-	-
1 j	-	-	-	-	-	-	-
4 j	-	-	-	-	-	-	-
7 j	-	-	-	-	-	-	-

Temps \ FI (mM)	0	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1 000
0 j	-	-	-	T	T	T	T	T	T	T	T
1 j	-	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
4 j	-	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
7 j	-	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T

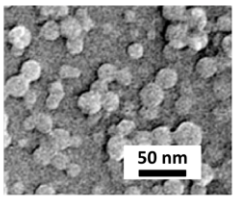
Latex 1 (-)

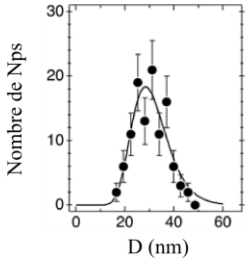
Informations générales

Composition chimique : ..... Polystyrène
Fournisseur : ..... Life Technologies
Nom : ..... Carboxyl Latex
Type : ..... Particules de polystyrène greffées par des groupements carboxyles
Densité des Nps : 1.05
Concentration : ..... 40 g L^{-1}
Préparation avant utilisation : .... Aucune

Taille

Diamètre :
MET : 30 nm (s = 0.15)
DLS : 39 nm

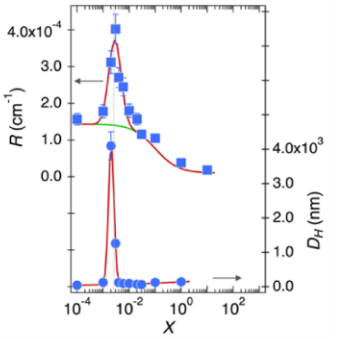




Courbe de calibration pour la concentration

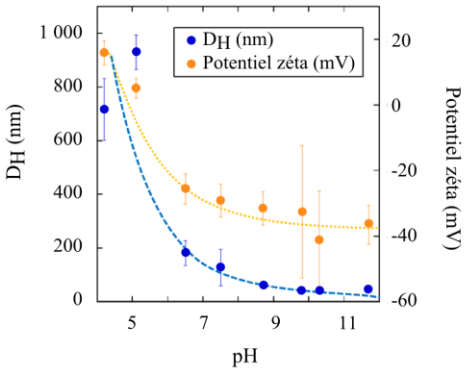
Aucune

Densité surfacique de charge



σ = - 0.048 ± 0.006 e nm^{-2}

Stabilité



Temps \ pH	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.3
0 j	T	T	T	T	T	-	-	-
3 j	T	T	T	T	T	T	-	-
5 j	T	T	T	T	T	T	T	-
10 j	T	T	T	T	T	T	T	-
29 j	T	T	T	T	T	T	T	-

Temps \ FI (mM)	0	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1 000
0 j	-	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
3 j	-	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
5 j	-	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
10 j	-	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
29 j	-	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T

Latex 2 (-)

Informations générales

Composition chimique : .....Polystyrène
Fournisseur : .....Life Technologies
Type : ..... Particules de polystyrène greffées par des groupements sulfates
Densité des Nps : 1.05
Concentration : .....80 g L^{-1}
Préparation avant utilisation : .....Aucune

Taille

MET : 41 nm
Déviation standard : 6 nm
(Donnée du fournisseur)

DLS : 51 nm

Charge

σ = - 0.035 e nm^{-2}
(Donnée du fournisseur)

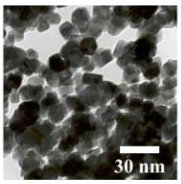
Titania (+)

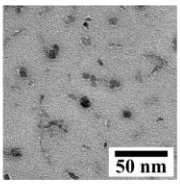
Informations générales

Composition chimique : ..... TiO_2
Fournisseur : ..... Nanostructured & Amorphous Material Inc.
Type : ..... Nanoparticules d'oxyde de titane (anastase)
Densité des Nps : 3.9
Concentration : ..... 170 g L^{-1}
Préparation avant utilisation : ..... Aucune

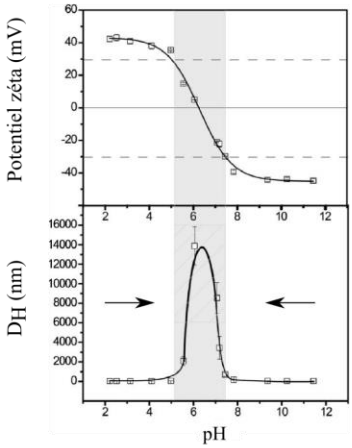
Taille

Diamètre :
MET: 15 nm
DLS : 52 nm





Stabilité



(Donnée du fournisseur et de "Loosli *et al.*, Water Research (47), 2013")

Alumina (+)

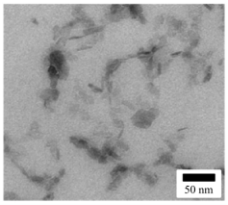
Informations générales

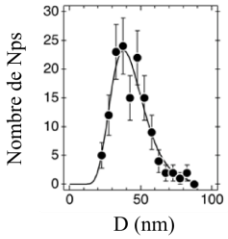
Composition chimique : ..... Al_2O_3
Fournisseur : ..... Sasol Germany
Nom : ..... Dispersal
Type : ..... Nanoparticules d'oxyde d'aluminium (boehmite)
Densité des Nps : 3.01
Préparation : ..... Les Nps, sous forme de poudre, sont dissoutes à 10 g L^{-1} dans de l'acide nitrique (0.4% massiques). La solution est agitée pendant 60 min puis soniquée 90 min

Taille

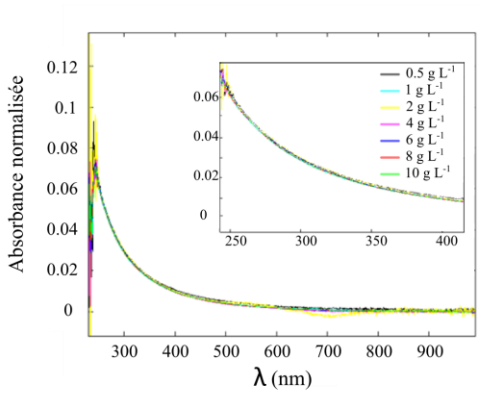
Diamètre :
MET : 40 nm (s = 0.3)
DLS : 64 nm

NB : Les Nps sont sous forme de platelets de 40 nm de long et 10 nm d'épaisseur

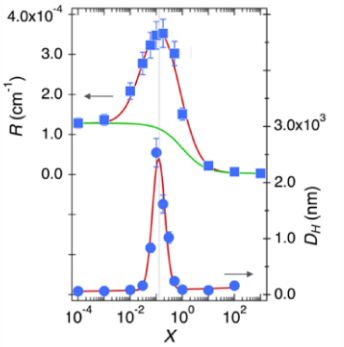




Courbe de calibration pour la concentration

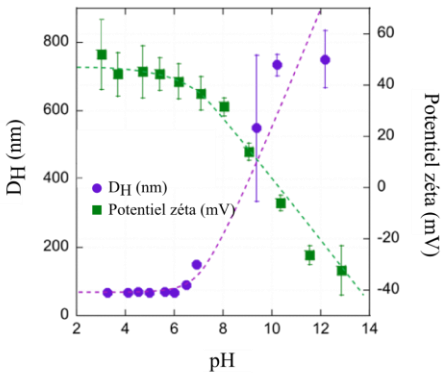


Densité surfacique de charge



σ = +7.3 ± 0.7 e nm^{-2}

Stabilité



Temps \ pH	3.4	4.1	5.1	6.2	7.3	8.1	9.2	10.0
0 j	-	-	-	-	-	-	-	-
4 j	-	-	-	-	-	T	T	T
5 j	-	-	-	-	T	T	T	T
7 j	-	-	-	-	T	T	T	T
11 j	-	-	-	-	T	T	T	T

Temps \ FI (mM)	0	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1 000
0 j	-	-	-	T	T	T	T	T	T	T	T
4 j	-	-	T	T	T	T	T	T	T	T	T
5 j	-	-	T	T	T	T	T	T	T	T	T
7 j	-	-	T	T	T	T	T	T	T	T	T
11 j	-	-	T	T	T	T	T	T	T	T	T

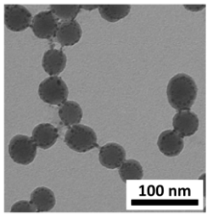
Silica (+)

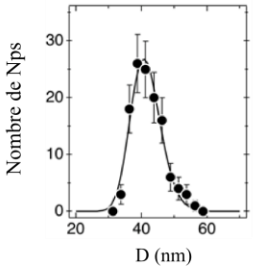
Informations générales

Composition chimique : ..... SiO_2
Fournisseur : ..... Synthétisées par Stéphane Mornet (Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux)
Type : ..... Nanoparticules de silice - coeur fluorescent (rhodamine) et surface greffée (groupements amine)
Densité des Nps : 1.9
Concentration : ..... 40 g L^{-1}
Préparation avant utilisation : ..... Aucune

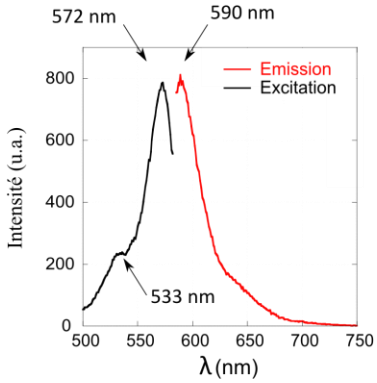
Taille

Diamètre :
MET : 42 nm (s = 0.11)
DLS : 60 nm

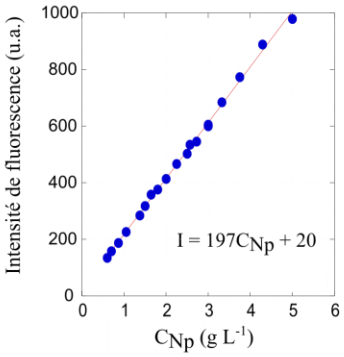




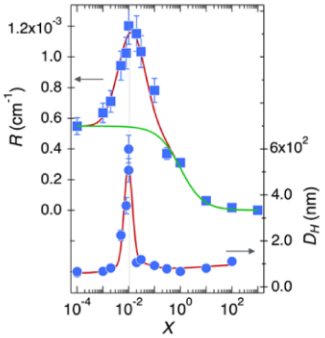
Spectres de fluorescence



Courbe de calibration pour la concentration

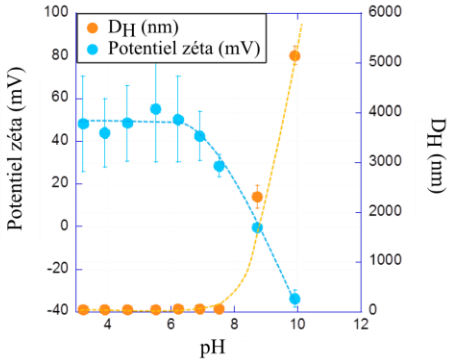


Densité surfacique de charge



σ = +0.62 ± 0.16 e nm^{-2}

Stabilité



Temps \ pH	1.5	2.3	3.2	4.6	5.1	6.5	8.7	9.4	10.1
0 j	-	-	-	-	-	-	T	T	T
1 j	-	-	-	-	-	T	T	T	T
4 j	-	-	-	-	-	T	T	T	T
7 j	-	-	-	-	T	T	T	T	T

Temps \ FI (mM)	0	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
0 j	-	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
1 j	-	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
4 j	-	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
7 j	-	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T

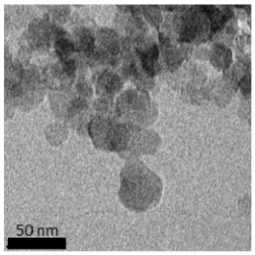
Silica (-)

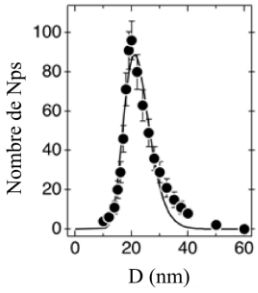
Informations générales

Composition chimique : ..... SiO_2
Fournisseur : ..... Sigma Aldrich
Nom : ..... Ludox CL-X
Type : ..... Nanoparticules de silice stabilisées par des contre-ions sodium
Impureté : ..... 7% d'éthylène glycol
Concentration : ..... 45% massiques dans l'eau
pH : 9.1
Surface développée : ..... 130 $m^2\ g^{-1}$
Densité à 25°C de la solution: ..... 1.36 g mL^{-1}
Densité des Nps : ..... 2.3 (calculée)
Préparation : ..... dilution par de l'eau à pH 9 puis dialyse dans un bain à pH 9

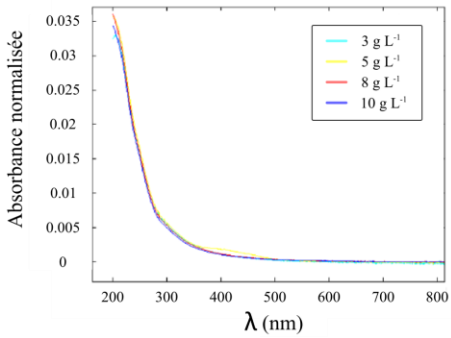
Taille

Diamètre :
MET : 20 nm (s = 0.2)
DLS : 34 nm

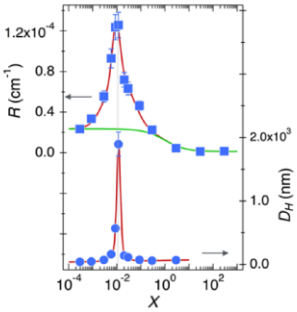




Courbe de calibration pour la concentration

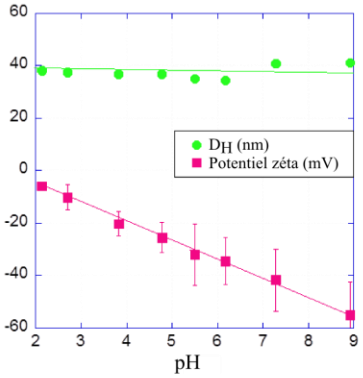


Densité surfacique de charge



σ = - 0.31 ± 0.07 e nm^{-2}

Stabilité



Temps \ pH	2.2	3.2	4.0	6.4	7.8	8.8	9.9	11.0	12.2
1 j	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 j	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 j	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Temps \ FI (mM)	0	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
0 j	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T
5 j	-	-	-	-	-	-	-	-	T	T	T
7 j	-	-	-	-	-	-	T	T	T	T	T
11 j	-	-	-	-	-	T	T	T	T	T	T

Bibliographie

1. OCDE. Guidance manual for the testing of manufactured nanomaterials: OCDE's sponsorship programme; First revision. (2010).
2. Hobi, N. *et al.* Physiological variables affecting surface film formation by native lamellar body-like pulmonary surfactant particles. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1838,** 1842–1850 (2014).
3. Hervé, P. *et al.* Novel core-shell structure for colloids made of neutral/polyelectrolyte diblock copolymers and oppositely charged surfactants. *EPL Europhys. Lett.* **58,** 912–918 (2002).
4. Berret, J.-F. Stoichiometry of electrostatic complexes determined by Light Scattering. *Macromolecules* **40,** 4260–4266 (2007).
5. Berret, J.-F. *et al.* Stable oxide nanoparticle clusters obtained by complexation. *J. Colloid Interface Sci.* **303,** 315–318 (2006).
6. Geddes, C. D., Lakowicz, J. R., Geddes, C. D. & Lakowicz, J. R. *Membranes and fluorescence microscopy.* **2007,** (Springer New York, 2009).
7. Bajaj, P., Harris, J. F., Huang, J.-H., Nath, P. & Iyer, R. Advances and challenges in recapitulating human pulmonary systems: At the cusp of biology and materials. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2,** 473–488 (2016).
8. Kemp, S. J. *et al.* Immortalization of human alveolar epithelial cells to investigate nanoparticle uptake. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **39,** 591–597 (2008).
9. Safi, M., Sarrouj, H., Sandre, O., Mignet, N. & Berret, J.-F. Interactions between sub-10-nm iron and cerium oxide nanoparticles and 3T3 fibroblasts: The role of the coating and aggregation state. *Nanotechnology* **21,** 145103–145112 (2010).
10. Minkov, I., Mircheva, K., Grozev, N., Ivanova, T. & Panaiotov, I. Properties of mixed monolayers of clinical lung surfactant, serum albumin and hydrophilic polymers. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **101,** 135–142 (2013).
11. Stöber, W., Fink, A. & Bohn, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J. Colloid Interface Sci.* **26,** 62–69 (1968).
12. Reinhardt, N., Adumeau, L., Lambert, O., Ravaine, S. & Mornet, S. Quaternary ammonium groups exposed at the surface of silica nanoparticles suitable for DNA complexation in the presence of cationic lipids. *J. Phys. Chem. B* **119,** 6401–6411 (2015).
13. George, I. *et al.* Metallic oxide nanoparticle translocation across the human bronchial epithelial barrier. *Nanoscale* **7,** 4529–4544 (2015).

Chapitre 3
Surfactants pulmonaires modèles

Table des matières

I. Substituts du surfactant pulmonaire 95
1) Généralités 95
2) Le Curosurf comme surfactant pulmonaire modèle 96
3) Caractérisation du Curosurf 97
a) Structure du Curosurf – Distribution de taille des vésicules 97
b) Stabilité du Curosurf vis-à-vis de la dilution 101
c) Température de fusion du Curosurf 103
II. Extrusion du Curosurf 104
1) Généralités 104
2) Caractérisation du Curosurf extrudé 105
a) Nombre d'extrusion et concentration du Curosurf 105
b) Extrusion à travers des pores de différentes tailles 106
3) Modèle géométrique de l'extrusion 107
4) Observation de la structure fine du Curosurf extrudé 109
III. Surfactant pulmonaire synthétique 111
1) Choix des phospholipides 111
2) Préparation et caractérisation du surfactant synthétique 111
IV. Modifications des surfactants pulmonaires modèles 112
1) Marquage fluorescent du Curosurf 112
2) Propriétés physico-chimiques en fonction du pH 113
3) Vieillissement des surfactants modèles 115
a) Congélation du Curosurf 115
b) Evolution temporelle des trois surfactants 116
V. Conclusion 117
Bibliographie 119

I. Substituts du surfactant pulmonaire

1) Généralités

Le surfactant pulmonaire endogène est obtenu par lavage broncho-alvéolaire[1]. Lorsque le lavage est effectué sur des mammifères vivants, il est réalisé par bronchoscopie. Il est alors invasif. Les lavages broncho-alvéolaires peuvent également être effectués sur des animaux qui ont été sacrifiés. Au-delà des questions d'éthique, les quantités de surfactant endogène obtenues par lavage sont faibles et dans le cas où les poumons ont été endommagés, le surfactant peut être contaminé par du matériel cellulaire. Il est donc complexe d'obtenir du surfactant endogène pour les études en laboratoire. Il est également possible d'extraire le surfactant à partir de tissus pulmonaires émincés. Ce surfactant est alors appelé « extrait de surfactant pulmonaire ».

Des surfactants pulmonaires d'origine animale sont ainsi commercialisés à des fins médicales. Ils sont utilisés pour soigner le syndrome de détresse respiratoire (SDR) généralement observé chez les prématurés de moins de 32 semaines. Par exemple, le Survanta (Abbvie Inc, North Chicago, USA)[2], l'Infasurf (Ony Inc, Amherst, USA)[3] et le Curosurf (Chiesi, Parma, Italie)[4] sont répandus en Europe et aux Etats Unis. Ces substituts présentent des distributions de tailles et des types de vésicules différents[5] (cf *Figure 1* pour l'illustration des variétés de vésicules[6]). Ils sont négativement chargés, à l'instar du surfactant endogène. Le Curosurf semble être le plus performant parmi ces trois substituts thérapeutiques[4,7].

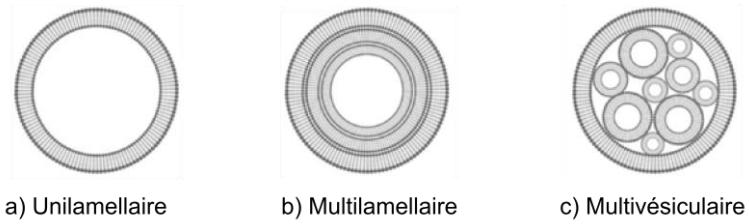


Figure 1 : Types de vésicules de phospholipides. Adapté de la référence [6].

Le *Tableau 1* détaille la composition du surfactant pulmonaire endogène humain ainsi que celle des substituts cités[1,4,5,8]. De manière globale, ces surfactants ont des compositions similaires. Parmi les surfactants de substitution, le Curosurf présente la plus haute concentration en phospholipides. Ceci permet d'instiller des volumes plus faibles dans les poumons des nourrissons. Les surfactants thérapeutiques sont cependant appauvris en protéines pour limiter les réactions immunogéniques. Ils ne contiennent pas de protéines hydrophiles, comme les protéines SP-A et D. Les protéines SP-B et C sont à l'inverse présentes car elles sont essentielles à l'activité du surfactant[7].

	Surfactant pulmonnaire	Survanta	Infasurf	Curosurf
Animal	\	Boeuf	Veau	Porc
Extraction	Lavage	Poumon émincé	Lavage	Poumon émincé
PC	70-85	79-87	70-74	67-74
DPPC (%PC)	36-59	45-75	41-61	50-56
SM	2	4.8	2	8.1
Chol	5	0	5	0
PI	4-7	0.5	2	3.3
PS	5		2	
PE	3	2.2	3	4.5
PG	7-10	3.2	6	1.2
PA		6-14		
SP-A	4	0	0	0
SP-B	1	0.04-0.13	0.4-0.9	0.3
SP-C	1	0.9-1.65	0.6	0.7
SP-D	4	0	0	0
[PL] (g L^{-1})	35	25	35	76
Doses (mL kg^{-1})	\	8	6	3.75

Tableau 1 : Composition du surfactant pulmonaire endogène d'origine humaine et des substituts thérapeutiques (données en pourcentages). Adapté des références [1], [4], [5] et [8]. Abréviations : PC – phosphatidylcholine, DPPC – dipalmitoylphosphatidylcholine, SM – sphingomyéline, chol – cholestérol, PI - phosphatidylinositol, PS - phosphatidylsérine, PE – phosphatidyléthanolamine, PG - phosphatidyleglycérol, PA - acide phosphatidique.

2) Le Curosurf comme surfactant pulmonaire modèle

Le Curosurf est le substitut le plus utilisé en France. C'est pour cette raison que nous l'avons choisi comme modèle dans cette thèse (*Figure 2*). Ignacio Verdugo-Garcia (Institut Pasteur, Paris, France) nous a fourni les premiers échantillons puis un partenariat a été mis en place avec le service de réanimation néonatale de l'Hôpital du Kremlin-Bicêtre grâce au Dr Mostafa Mokhtari.

Figure 2 : Flacon de Curosurf

La dose de Curosurf à instiller aux prématurés dépend de leur poids. Ainsi, les flacons qui ne sont plus stériles après utilisation sont jetés alors qu'ils ne sont généralement pas vides. Je suis donc allée à l'hôpital tous les 15 jours afin de récupérer les flacons entamés. Seuls ont été conservés les échantillons dont le contenu était visuellement identique à celui des flacons neufs. Le surfactant modèle collecté a été congelé en aliquots à -20 °C dans des contenants stériles.

3) Caractérisation du Curosurf

De nombreux groupes ont étudié la structure du Curosurf[5,9,10], sa capacité à s'adsorber à l'interface air/liquide dans différentes conditions physico-chimiques[11] et ses propriétés de surface[10,12–19]. Peu de données sont cependant disponibles sur sa stabilité à la dilution, sur la distribution de taille des vésicules le composant et sur son vieillissement. De plus, les possibilités de modification du Curosurf, comme l'extrusion ou le marquage par des molécules fluorescentes, n'ont pas été étudiées. Une caractérisation complète de ce surfactant pulmonaire est donc indispensable avant de commencer notre étude.

a) Structure du Curosurf – Distribution de taille des vésicules

Analyse par microscopie optique et diffusion de la lumière

La *Figure 3a* montre une image du Curosurf non dilué observé par microscopie optique à contraste de phase. Les objets présents en solution sont sphériques, peu contrastés et de taille comprise entre 1 et 15 µm. Ils sont animés d'un mouvement Brownien détectable au microscope. Comme nous le verrons par la suite, ces objets sont des vésicules uni- ou multilamellaires[5,9,20]. Dans les échantillons que nous avons observés, nous n'avons pas trouvé de structure de type myéline tubulaire[9]. Ce résultat s'explique probablement par le fait que le Curosurf est dépourvu de protéine SP-A.

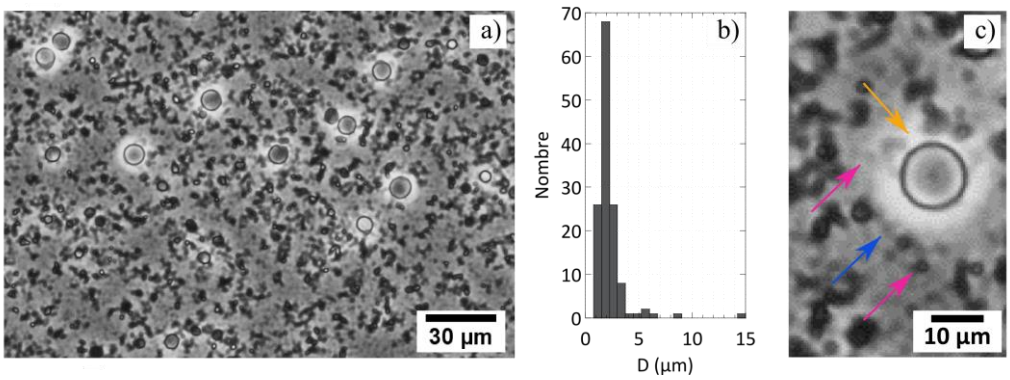


Figure 3 : a) Images de microscopie optique du Curosurf « natif » (objectif x20, T = 25 °C). b) Distribution de taille des vésicules, obtenue à partir des images de microscopie. L'analyse de 130 vésicules permet de mesurer le diamètre D des vésicules : D = 2.2 ± 1.5 µm. c) Agrandissement de l'image a). Les flèches de couleur orange, bleue et fuchsia montrent respectivement des vésicules de 10, 2 et 1 µm environ.

La *Figure 3b* représente la distribution de taille des vésicules. L'analyse de 130 objets donne une distribution de diamètre moyen 2.2 µm, avec une déviation standard de 1.5 µm. La *Figure 3c* est un agrandissement de la *Figure 3a*. Les flèches montrent des vésicules de tailles comprises entre 1 et 10 µm. Les vésicules de diamètre inférieur à

1 µm sont difficiles à distinguer du fait de leur faible contraste, ce qui induit un décalage artificiel de la distribution vers des diamètres plus élevés.

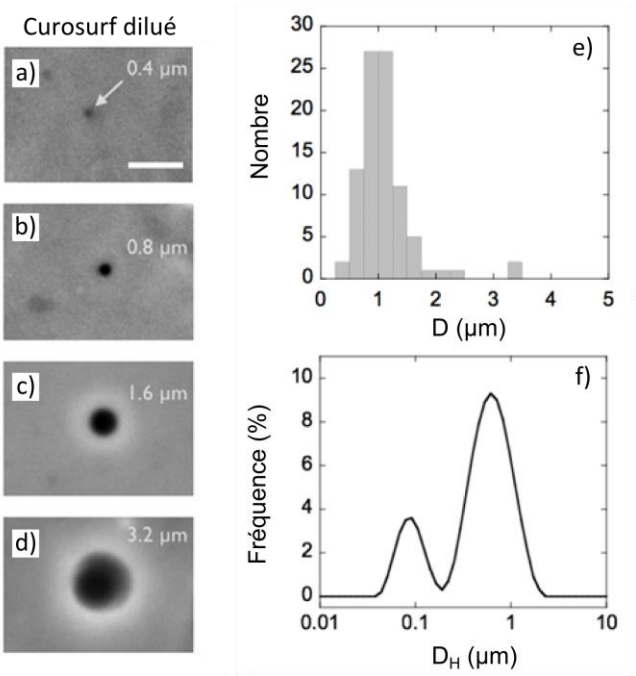


Figure 4 : a-d) Images représentatives du Curosurf dilué à 0.1 g L^{-1} obtenues par microscopie optique à contraste de phase à 25 °C (objectif x60). La taille des vésicules est indiquée dans la partie droite du panel d'images. Barre d'échelle : 3 µm. e) Distribution en taille construite à partir des images de microscopie optique. L'analyse de 100 vésicules donne un diamètre moyen D tel que D = 1.0 ± 0.5 µm. f) Distribution du diamètre hydrodynamique des vésicules de Curosurf, mesurée par DLS.

Pour observer individuellement les vésicules, le Curosurf a été dilué à 0.1 g L^{-1} par du tampon phosphate de force ionique 5 mM et de pH 6.4. Les *Figure 4a-d* montrent une sélection de particules Browniennes, de taille 0.4, 0.8, 1.6 et 3.2 µm respectivement. La distribution de taille des vésicules, construite à partir des images de microscopie, est centrée sur 1.0 µm de diamètre, avec une déviation standard de 0.5 µm (*Figure 4e*). Le décalage attendu entre les distributions du Curosurf natif (D = 2.2 µm) et dilué (D = 1.0 µm) est bien observé. La diminution de taille pourrait être due au choc osmotique causé par la dilution. Nous vérifierons plus tard que ce n'est pas le cas. Pour compléter cette étude, nous avons fait de la diffusion dynamique de la lumière sur les échantillons dilués. Les résultats montrent que le Curosurf présente une distribution bimodale dont les pics sont à 80 et 800 nm (*Figure 4f*). Ces données sont en accord avec les histogrammes de taille obtenus précédemment.

Analyse par la méthode du suivi individuel de particules

Afin d'avoir simplement et rapidement une idée de la proportion entre vésicules à 80 nm et vésicules à 800 nm, la technique d'analyse du suivi individuel de particules (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA) est utilisée sur le Curosurf.

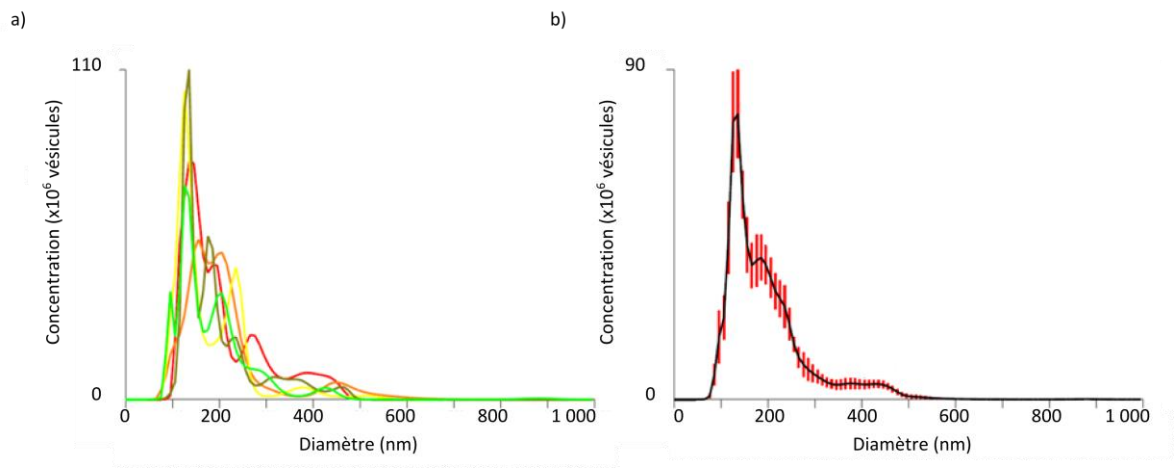


Figure 5 : a) Distributions de taille en nombre, mesurée par NTA, du Curosurf dilué à 10^{-3} g L^{-1} dans du PBS. b) Moyenne des distributions présentées en a). Les barres d'erreurs (en rouge sur le graphique) sont des déviations standards des différentes mesures.

La *Figure 5a* montre 5 mesures de tailles (distribution en nombre) pour du Curosurf dilué à 10^{-3} g L^{-1} dans du PBS. La *Figure 5b* en montre la moyenne. Les vésicules de Curosurf natif sont détectées entre 80 et 500 nm, la taille modale étant de 136 nm et le diamètre moyen de 189 ± 89 nm. Là encore, la distribution exhibe deux pics : une population est autour de 180 nm et une autre se situe vers 450 nm. En revanche, les petites vésicules sont bien plus nombreuses en NTA qu'en diffusion de la lumière. Ce résultat est attendu puisque le signal diffusé en DLS est proportionnel au diamètre des vésicules à la puissance 6. La DLS surestime donc le nombre de vésicules de grande taille. Ces données confirment le caractère disperse des vésicules du Curosurf, avec ici de légères différences dans la position des pics par rapport à la DLS. Lors des mesures de NTA, nous avons aussi mesuré la concentration en nombre de vésicules. Une solution de Curosurf natif à 1 g L^{-1} contient des vésicules à la densité de 7.4 10^{14} L^{-1}.

Analyse par microscopie cryo-électronique à transmission

Le Curosurf est dilué à 5 g L^{-1} dans l'eau puis observé par microscopie cryo-électronique à transmission (cryoMET). Sur la *Figure 6*, la cryo-microscopie montre que le Curosurf est composé de vésicules unilamellaires, multilamellaires et multivésiculaires. Les vésicules observées sont disperses en taille, et les diamètres s'étendent entre la centaine de nanomètres et quelques micromètres. La structure spécifique des grilles de cryoMET implique l'exclusion des objets de grande taille lors de la préparation de l'échantillon.

Cela explique que nous n'observons pas de structures supérieures à 3 µm, contrairement aux résultats de microscopie optique (*Figure 3*). Les deux techniques sont donc complémentaires. De façon générale, les vésicules que nous imageons sont similaires à celles observées par d'autres sur des dispersions de Curosurf non dilué[9], ou dilué dans du sérum physiologique[21].

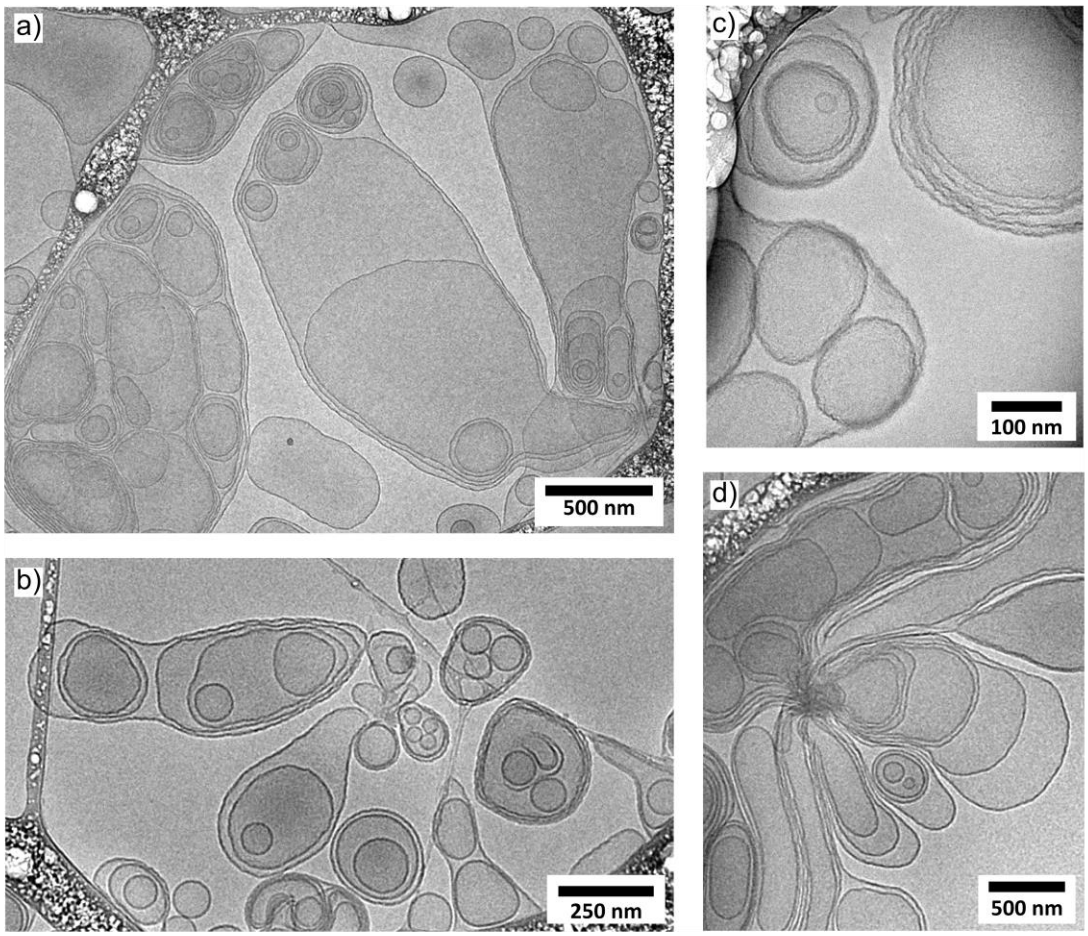


Figure 6 : Images de cryoMET du Curosurf à 5 g L^{-1} dans l'eau.

Deux particularités sont néanmoins à souligner. Premièrement, une observation à fort grossissement montre que les membranes sont comme « ridées », et que leur courbure est irrégulière, ce qui caractérise des membranes peu tendues et relativement fluides (*Figure 6c*). Deuxièmement, à plusieurs reprises, des singularités ont été détectées (*Figure 6d*). La présence de ces agglomérats, où la densité de surfaces membranaires semble très importante en un point donné, est surprenante. En effet, du point de vue de la thermodynamique, les vésicules de phospholipides devraient être dispersées afin de maximiser l'entropie de la suspension. Ces singularités pourraient être dues à la présence de la protéine SP-B. Cette dernière est en effet connue pour assembler entre

elles les membranes de phospholipides[21]. Pour finir, seules des vésicules sont vues en cryoMET. Les myélines tubulaires semblent bien être absentes du Curosurf.

b) Stabilité du Curosurf vis-à-vis de la dilution

Le Curosurf est vendu en suspension dans du chlorure de sodium (NaCl) à 150 mM. Une forte dilution dans des milieux d'osmolarité plus faible, comme l'eau par exemple, qui a une force ionique proche de zéro, pourrait entrainer un gonflement ou un éclatement des vésicules suite à un choc osmotique. A l'inverse, l'utilisation pour la dilution de milieux complexes comme le milieu de culture complet (DMEM complet), qui contient entre autre du glucose, des sels et des protéines, peut induire un dégonflement des vésicules[22–24]. La diffusion de la lumière est utilisée pour vérifier que la dilution n'affecte pas drastiquement la structure du Curosurf. Ce surfactant modèle est préparé à 5 g L^{-1} dans différents solvants (facteur de dilution : 16). Un tampon de phosphate salin (PBS), de l'eau et un milieu de culture cellulaire complet sont choisis ici car ils seront utilisés régulièrement dans la suite de notre travail. Le PBS contient principalement du NaCl (137 mM) et des ions phosphates qui tamponnent la solution au pH physiologique. Sa composition est très proche de celle du solvant initial du surfactant. Nous supposons donc que diluer le Curosurf par du PBS n'affecte pas sa structure.

La *Figure 7a* représente l'intensité diffusée par du PBS, de l'eau MilliQ et du DMEM complet, ainsi que celle diffusée par du Curosurf à 5 g L^{-1} dans ces solvants. L'eau, le PBS et le DMEM complet diffusent respectivement à 0.01, 0.04 et $0.17.10^4$ kcps. La diffusion du DMEM complet provient des protéines du sérum. Quel que soit le solvant, les suspensions de Curosurf diffusent bien plus que le dispersant seul. Après soustraction du signal venant du solvant (*Figure 7b*), le Curosurf dilué dans le PBS, l'eau et le DMEM complet diffuse respectivement à 0.6, 0.5 et 1.10^4 kcps. Ces données, du même ordre de grandeur, semblent indiquer que la dilution affecte peu la structure du Curosurf.

La *Figure 7c* montre le diamètre hydrodynamique du Curosurf dilué dans les 3 solvants cités précédemment. Le surfactant pulmonaire dispersé dans du PBS, de l'eau et du DMEM complet a une taille d'environ 1 100, 800 et 700 nm respectivement. Sachant que le Curosurf est très disperse en taille et qu'il contient des objets de taille micrométrique, le diamètre moyen donné par DLS est à considérer avec prudence. Ainsi, là encore, la dilution ne semble pas modifier de façon importante la structure du Curosurf.

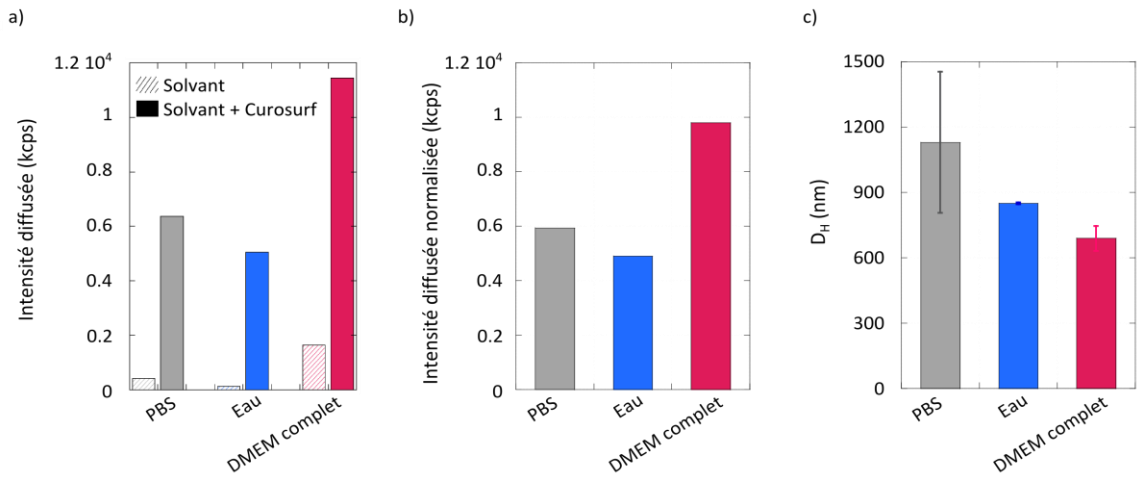


Figure 7 : a) Mesure par DLS de l'intensité diffusée par du PBS, de l'eau MilliQ, du DMEM complet et par du Curosurf dilué à 5 g L^{-1} dans ces dispersants. b) Intensité diffusée par le Curosurf à 5 g L^{-1} après soustraction du signal venant du solvant. c) Diamètre hydrodynamique des dispersions de Curosurf à 5 g L^{-1}. Les mesures sont répétées 3 fois. Les barres d'erreur représentent la déviation standard entre ces réplicas.

Nous mesurons le spectre UV-visible de solutions à différentes concentrations en surfactant pulmonaire. L'objectif est alors de déterminer plus précisément si la dilution impacte la structure du Curosurf, notamment pour des facteurs de dilution importants (typiquement de 100 à 10 000). La *Figure 8a* montre l'absorbance du Curosurf dilué à 1, 0.5, 0.1 et 0.01 g L^{-1} par de l'eau MilliQ. Les suspensions absorbent peu entre 1000 et 400 nm puis l'absorbance augmente fortement vers 250 nm.

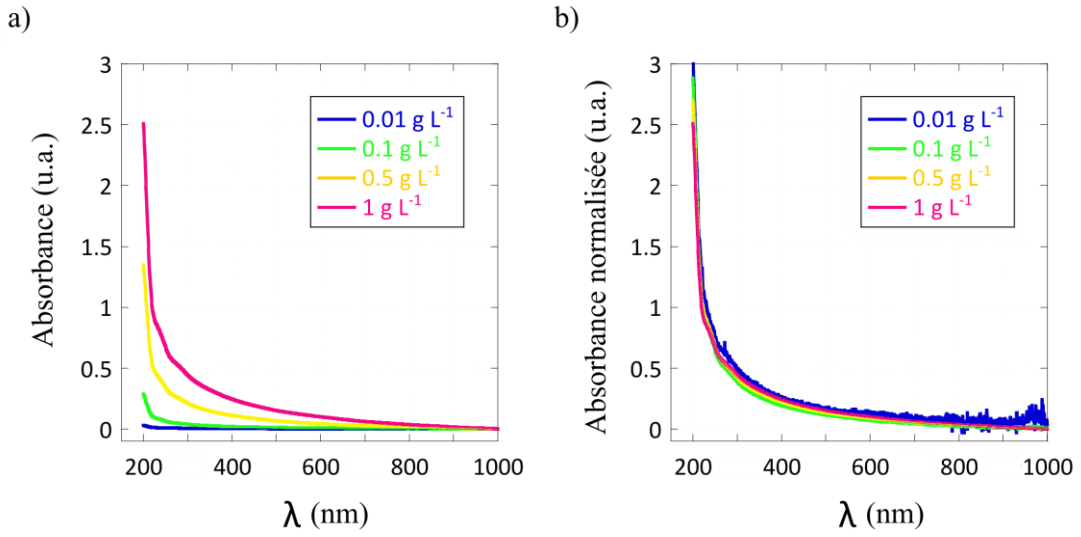


Figure 8 : a) Absorbance du Curosurf à 0.01, 0.1, 0.5 et 1 g L^{-1}. b) Absorbances normalisées par la concentration en Curosurf.

Sur la *Figure 8b*, les données UV-vis sont normalisées par la concentration des suspensions. Les absorbances normalisées du Curosurf à 0.1, 0.5 et 1 g L^{-1} sont superposées en une seule courbe maitresse. Ce résultat suggère que la distribution de taille des vésicules est proche pour ces trois suspensions. Ces données nous permettent de conclure que la dilution n'affecte pas ou peu la distribution de tailles des vésicules du Curosurf.

c) Température de fusion du Curosurf

La température de fusion (Tm pour « Melting Temperature ») du surfactant modèle est mesurée par calorimétrie différentielle à balayage (DSC pour « Differential Scanning Calorimetry »). Le but est de connaitre l'état des membranes du Curosurf dans les conditions où seront réalisées les expériences ultérieures de notre étude.

Le Curosurf est dilué à 10 g L^{-1} dans de l'eau MilliQ puis il est soumis à trois des cycles successifs de chauffage et de refroidissement. La *Figure 9* montre les thermogrammes moyennés. Aucune hystérésis n'a été observée au cours des différents cycles. La température de fusion, déterminée au maximum des pics, est de 29.5 °C. En deçà, les membranes sont dans un état dit « gel » alors qu'elles sont considérées comme « fluides » au-delà. Le pic est relativement étalé, entre 15 et 35 °C environ. Ainsi, sur cette gamme de température, on peut supposer qu'il y a une coexistence entre les phases « fluides » et « gel ».

Casals *et al.* décrivent dans une revue le même phénomène[25] et confirment que pour du surfactant d'origine porcine il existe une séparation de phase à l'échelle du micron entre des domaines « fluides » et « gels » pour des températures entre 22 et 40 °C. Concernant l'état de la membrane, nous pouvons conclure que les membranes du Curosurf sont principalement liquides à 37 °C et majoritairement en phase gel à 25 °C.

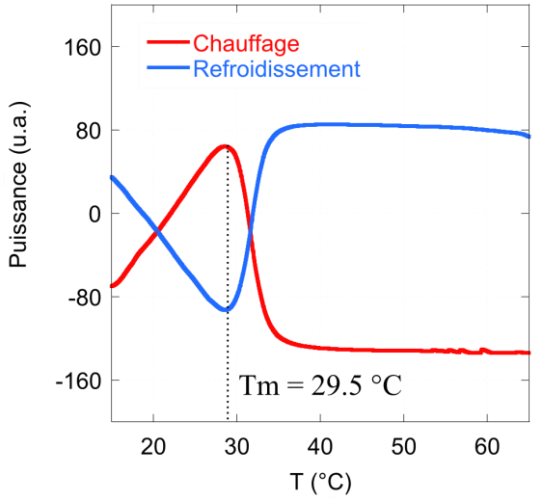


Figure 9 : Thermogrammes du Curosurf dilué à 10 g L^{-1} dans de l'eau MilliQ. L'expérience est réalisée par Gaëlle Pemboung, de l'Institut Parisien de Chimie Moléculaire.

II. Extrusion du Curosurf

1) Généralités

Le Curosurf, composé de vésicules allant de 100 nm à 15 µm de diamètre, est très disperse en taille. Dans un certain nombre de cas, il est important de pouvoir adapter la taille des vésicules au type de technique expérimentale utilisée ou de travailler avec des vésicules de faible dispersité. Deux méthodes sont généralement employées pour cela : la sonication et l'extrusion. Il a été montré que la taille des vésicules est mieux contrôlée lorsqu'elles sont obtenues par extrusion plutôt que par sonication[26]. Nous utilisons donc cette dernière méthode.

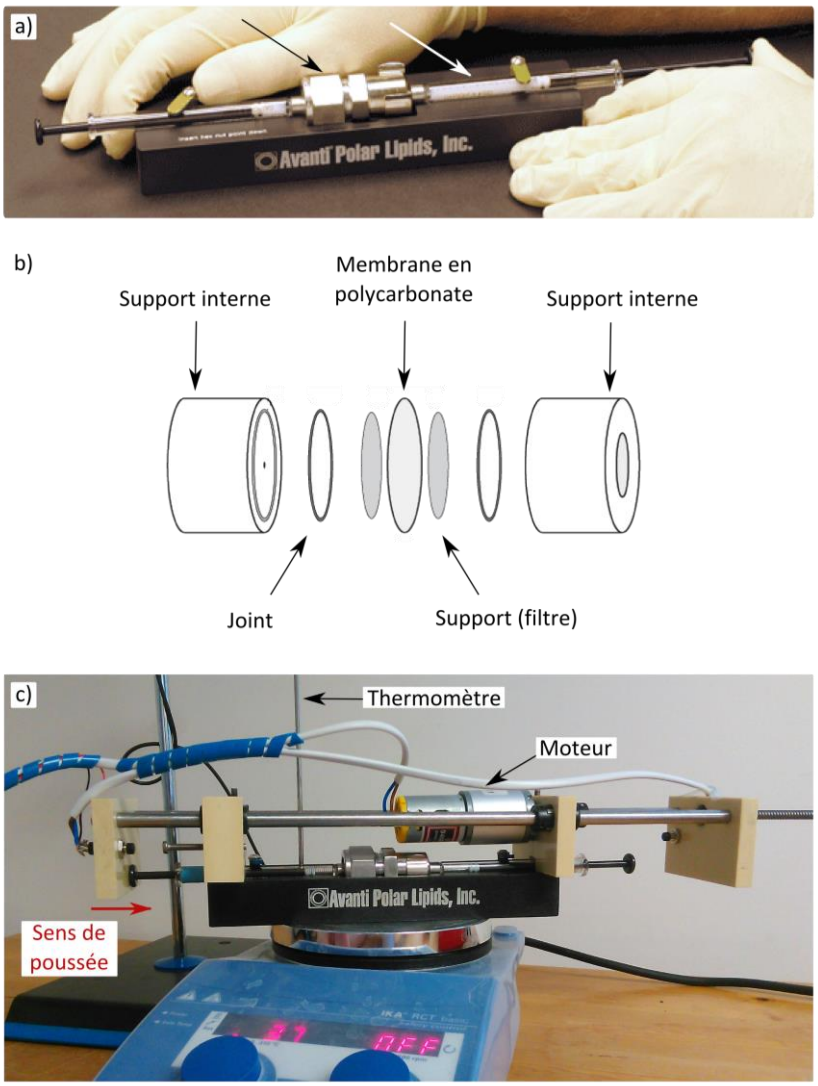


Figure 10 : a) Système d'extrusion de l'entreprise « Avanti Polar Lipids ». La flèche blanche indique la solution en cours d'extrusion et la flèche noire pointe la partie métallique contenant entre autres la membrane en polycarbonate. b) Représentation schématique du contenu de la partie métallique centrale indiquée par une flèche noire sur a). Adaptés de la référence [27]. c) Système d'extrusion automatisé et régulé en température utilisé au laboratoire.

La *Figure 10a* représente le système d'extrusion, vendu par l'entreprise « Avanti Polar Lipids »[27]. La suspension d'intérêt, contenue dans la seringue de droite et indiquée par une flèche blanche, passe à travers une membrane poreuse en polycarbonate suite à l'application manuelle d'une pression. La membrane est maintenue par un ensemble de constituants (*Figure 10b*) qui se trouvent encastrés dans la partie métallique indiquée par la flèche noire sur la *Figure 10a*. Finalement, la suspension est transférée dans la seringue de gauche lors de cette opération. Les allers-retours sont répétés jusqu'à ce que les vésicules aient la taille désirée. La *Figure 10c* représente notre système d'extrusion. Le montage initial est posé sur une plaque chauffante qui permet de réguler la température du bloc métallique noir, et par conséquent, des solutions à extruder. Un système motorisé, construit par l'Atelier de Fabrication Mécanique de notre laboratoire, peut être ajusté sur l'extrudeur commercial et permet une extrusion automatisée des solutions.

2) Caractérisation du Curosurf extrudé

a) Nombre d'extrusion et concentration du Curosurf

Dans un premier temps, la taille du Curosurf est suivie au cours de l'extrusion. Le Curosurf est dilué à 0.1 et 1 g L^{-1} dans de l'eau MilliQ. La membrane en polycarbonate a des pores de 50 nm de diamètre. La *Figure 11a* montre le diamètre hydrodynamique D_H du Curosurf, en fonction du nombre de passages à travers la membrane.

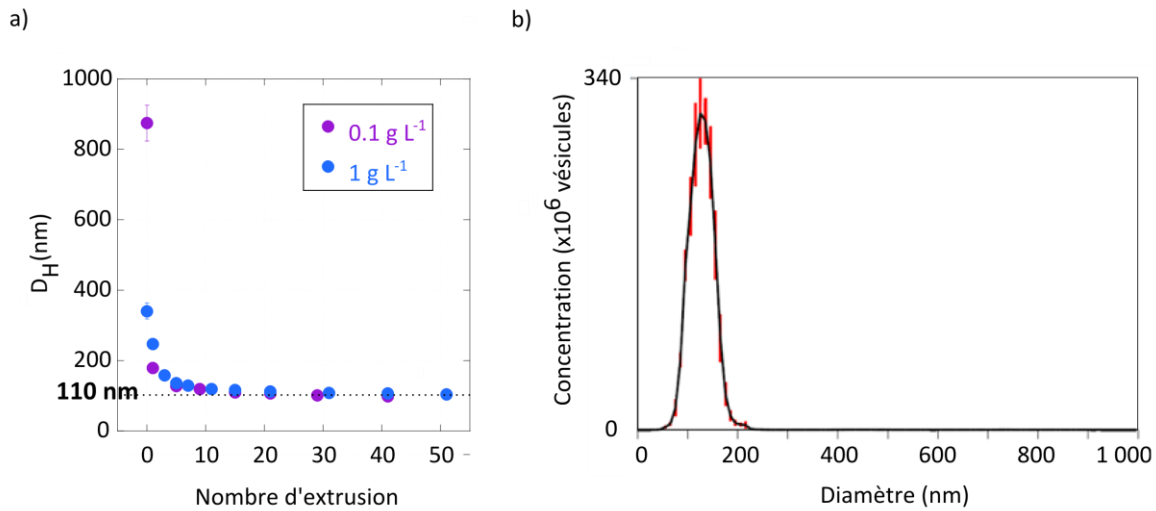


Figure 11 : a) Diamètre hydrodynamique du Curosurf, dilué à 0.1 et 1 g L^{-1} dans l'eau, en fonction du nombre de passages à travers la membrane en polycarbonate (pores 50 nm). Les mesures sont répétées 3 fois. Les barres d'erreur représentent la déviation standard entre ces réplicas. b) Distribution de taille en nombre, moyennée, mesurée par NTA. Le Curosurf est extrudé à 5 g L^{-1} puis dilué dans du PBS à 10^{-4} g L^{-1}. Les barres d'erreurs (en rouge sur le graphique) sont les déviations standards des différentes mesures.

Entre les passages 1 à 5, la taille des vésicules diminue considérablement pour atteindre 120 nm environ, et cela quelle que soit la concentration. Au-delà de 5 passages, les courbes sont parfaitement superposées. La taille des vésicules décroit progressivement jusqu'à 110 nm environ, puis se stabilise au-delà d'une quarantaine de passages. L'état final du Curosurf après extrusion semble indépendant de sa concentration initiale.
Le Curosurf extrudé est caractérisé par NTA. La *Figure 11b* montre la distribution de taille pour du Curosurf extrudé puis dilué à 10^{-4} g L^{-1}. Les vésicules ont une taille moyenne de 123 ± 27 nm, ce qui est en accord avec les données trouvées par DLS en *Figure 11a*. De plus, les mesures sont faiblement dispersées, ce qui démontre l'efficacité du système d'extrusion. La concentration en nombre de vésicules est estimée à 1.94 10^{16} L^{-1} pour une solution à 1 g L^{-1}. Elle est donc 26 fois plus élevée que celle du Curosurf natif à la même concentration. Ce résultat est logique puisque la taille des vésicules est plus faible lorsque le Curosurf est extrudé.

b) Extrusion à travers des pores de différentes tailles

Dans le but d'obtenir des vésicules de diamètre contrôlé sur une large gamme de taille, le Curosurf est dilué dans l'eau à 0.1 ou 1 g L^{-1} puis extrudé à travers des membranes de pores 50, 100, 200, 400 et 800 nm de diamètre. La *Figure 12a* montre le diamètre hydrodynamique des vésicules en fonction du nombre d'extrusion pour les différentes membranes. Quelle que soit la membrane, les mêmes observations que précédemment peuvent être faites.

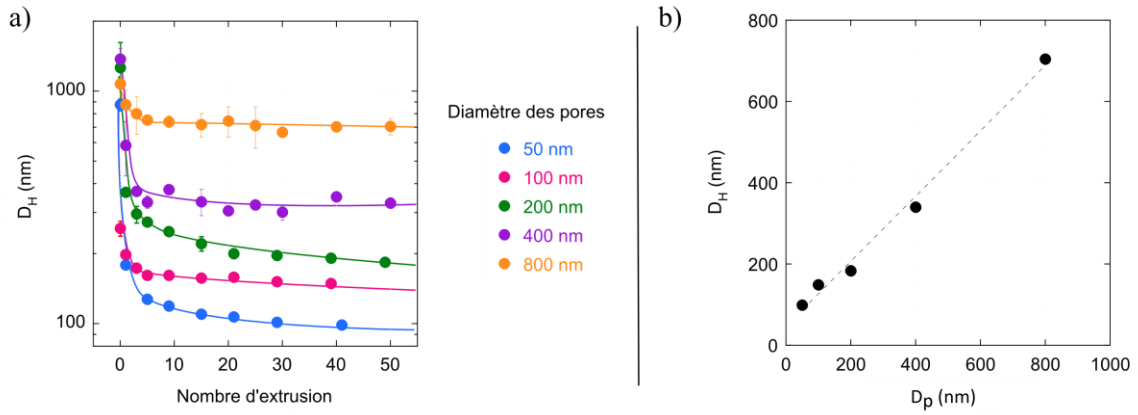


Figure 12 : a) Diamètre hydrodynamique du Curosurf, dilué à 0.1 ou 1 g L^{-1}, en fonction du nombre de passages à travers des membranes dont les pores ont différentes tailles. Les mesures sont répétées 3 fois. Les barres d'erreur représentent la déviation standard entre ces réplicas. b) Diamètre final du Curosurf après extrusion en fonction du diamètre des pores de la membrane : $D_H = 0.8\ D_p + 46.1$.

Durant les premiers passages, le diamètre des vésicules diminue rapidement jusqu'à un diamètre proche de leur taille finale. Ensuite les vésicules évoluent lentement avec l'avancement de l'extrusion et leur diamètre se stabilise après une quarantaine de

passages. Par la suite, les suspensions seront toujours extrudées 50 fois environ dans le but d'avoir des tailles finales de vésicule constantes pour une même membrane.
La taille des vésicules après extrusion est tracée en fonction du diamètre des pores des membranes, noté D_p (*Figure 12b*). Cette courbe souligne que l'extrusion permet d'obtenir des vésicules de diamètre maitrisé et varié (100 à 700 nm). Son évolution est linéaire et peut être décrite par une loi du type $D_H = 0.8\ D_p + 46.1$. Ainsi, en fin d'extrusion, les vésicules sont plus grosses que les pores pour les pores de petite taille alors qu'elles sont légèrement plus petites que ces derniers dans le cas de pores larges. Afin de comprendre cette évolution, un modèle géométrique simple a été imaginé.

3) Modèle géométrique de l'extrusion

Pour décrire l'extrusion du Curosurf, nous avons développé un modèle en deux temps, illustré en *Figure 13*. Ce modèle suppose que lors des premiers passages à travers la membrane (étape 1), les vésicules de taille très supérieure au diamètre des pores sont bloquées à leur entrée. Elles sont alors fortement déformées et les membranes se rompent, donnant ainsi naissance à des vésicules de plus petite taille, de diamètre D_i. Lors des passages ultérieurs, les vésicules sont étirées et cisaillées dans les pores (étape 2). Cela donne lieu à une instabilité de type Rayleigh (étape 3). En conséquence, les vésicules se fragmentent en N objets de diamètre D_f tel que $D_f < D_i$ (étape 4).

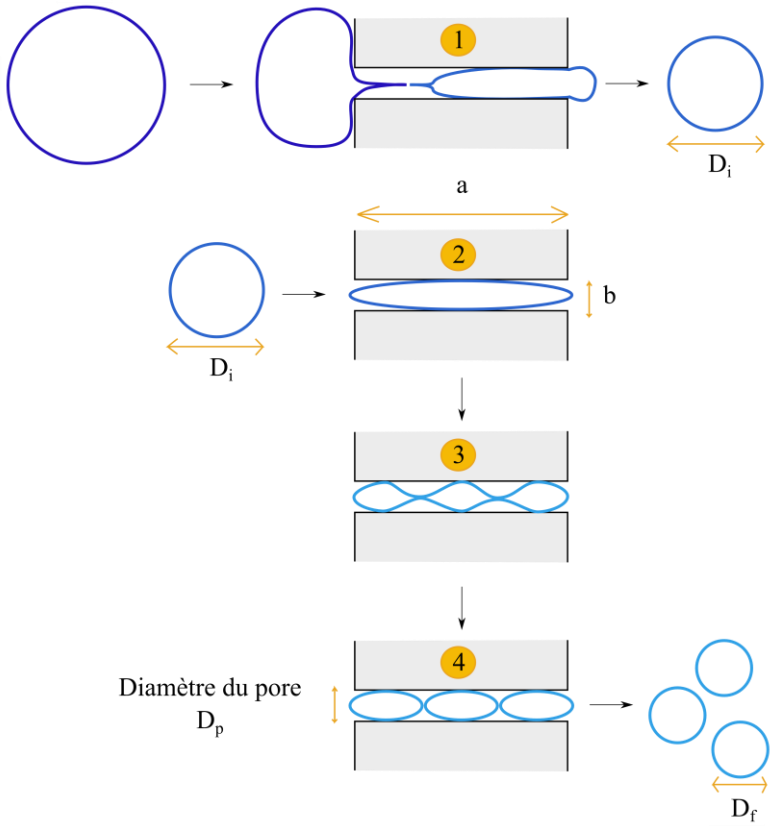


Figure 13 : Explication schématique de l'extrusion de vésicules

Le modèle présenté ci-dessus permet d'estimer D_f, N et le rapport d'aspect des vésicules étirées dans les pores. L'hypothèse principale faite ici est que l'aire des membranes est conservée durant les étapes 2 à 4 de l'extrusion. De plus, il est supposé que lors du passage à travers le pore, les vésicules allongées peuvent être décrites par un ellipsoïde de petit axe b, égal au diamètre du pore D_p. Ceci nous permet de calculer la longueur du grand axe a et d'en déduire le rapport d'aspect des vésicules étirées. Un processus d'itération estime le diamètre final des vésicules en fonction du nombre de vésicules produites.
Les résultats sont résumés dans le
Tableau 2. Pour des diamètres de pores D_p entre 50 et 400 nm, les diamètres finaux D_f calculés et obtenus expérimentalement sont en adéquation. Ainsi, on peut estimer que les vésicules étirées se fragmentent en 3 ou 4 lors du passage dans le pore (étape 2). En revanche, dans le cas d'une extrusion avec des pores de 800 nm, le modèle ne permet pas d'estimer précisément le diamètre final du surfactant pulmonaire. Dans ce cas, nous pensons que les vésicules de petites tailles passent à travers les pores de 800 nm sans se rompre ni se déformer. Seules les vésicules de diamètre supérieur au micron sont réellement extrudées, d'où l'inadéquation de notre modèle lors de l'utilisation des pores de 800 nm.

Diamètre du pore (nm)	D_i (nm) expérimental	D_f (nm) expérimental	N calculé	D_f (nm) calculé	Rapport d'aspect (a/b)
50	179	99	4	90	16
100	257	149	3	149	8
200	368	184	4	182	4
400	585	331	3	338	3
800	874	705	1 à 2	618 à 874	1

Tableau 2 : Comparaison des tailles expérimentales et théoriques de vésicules après extrusion (D_f), estimation du nombre N de vésicules extrudées obtenues à partir d'une vésicule de Curosurf natif et rapport d'aspect des vésicules dans les pores. Les calculs sont établis à partir du modèle exposé en *Figure 13* en supposant que l'aire par tête polaire des phospholipides reste inchangée durant le processus d'extrusion.

Pour finir, le rapport d'aspect des vésicules étirées dans les pores est estimé. Pour un pore de 800 nm, il est évalué proche de 1, ce qui signifie que les vésicules sont en grande majorité sphériques. Ce résultat corrobore nos hypothèses sur le passage des vésicules dans les pores de diamètre 800 nm. De manière générale, quand le diamètre des pores diminue, le rapport d'aspect des vésicules étirées augmente : les vésicules sont donc de plus en plus allongées dans les pores à mesure que leur diamètre D_p décroit.

Finalement, ce simple modèle géométrique démontre que l'extrusion est robuste, reproductible et permet de formuler des vésicules de taille prévisible.

4) Observation de la structure fine du Curosurf extrudé

Le Curosurf extrudé est analysé par microscopie électronique à transmission (MET) afin de connaitre la taille exacte des vésicules et leur structure. Le Curosurf est dilué à 0.1 g L^{-1} et extrudé avec des membranes dont les pores mesurent 50 nm de diamètre. Il est ensuite contrasté avec de l'acétate d'uranyle. L'uranyle apparait très sombre en MET. Il a une forte affinité pour les groupes carboxyles des têtes hydrophiles des phospholipides[28]. Les queues hydrophobes apparaissent alors claires sur les images. La *Figure 14a* montre que certaines vésicules ont la forme de doughnut, comme cela a été décrit par Bordi *et al*[9], alors que d'autres ressemblent à des nuages circulaires. La *Figure 14b* donne l'histogramme de taille construit à partir de l'étude de 130 vésicules : le diamètre est de 102 ± 24.7 nm. Cependant, malgré la bonne résolution du MET, il n'est pas possible de voir la structure des vésicules à l'échelle nanométrique car elles sont probablement détruites en partie par le séchage.

La *Figure 14c* montre du Curosurf extrudé observé par cryoMET. Les vésicules en suspension sont sphériques, unilamellaires et faiblement disperses en taille. Une analyse de presque 100 vésicules donne un diamètre de 81 ± 17.4 nm (*Figure 14d*). Ces résultats sont en accord avec les données de DLS discutées précédemment. De plus, les vésicules sont plus petites qu'en MET classique car non étalées par le séchage.

Similairement, le Curosurf extrudé avec des membranes de pores 100 nm est observé par cryoMET (*Figure 14e*). La *Figure 14f* montre l'histogramme de taille et révèle que le diamètre moyen est de 132 ± 70 nm, là encore en accord avec la DLS. Les vésicules ne sont pas parfaitement sphériques et sont multilamellaires ou multivésiculaires dans 21% des cas (*Figure 14e*). On peut supposer que le Curosurf extrudé avec des pores de 200 à 800 nm contiendra les mêmes types de vésicules, mais dans des proportions différentes.

Dans cette partie, nous n'avons pas abordé la question du devenir des protéines lors de l'extrusion. Parmar *et al.* ont montré que l'extrusion de liposomes composés des phospholipides PC et PE (cf *Tableau 1*) n'affecte ni la concentration, ni l'orientation, ni l'activité de la protéine transmembranaire « gonococcale I »[30]. On peut donc supposer que la protéine SP-C ne sera pas affectée par l'extrusion. La protéine SP-B n'est pas transmembranaire mais possède tout de même une forte affinité pour les chaines aliphatiques des phospholipides. On peut penser qu'elle sera également peu ou pas altérée par l'extrusion.

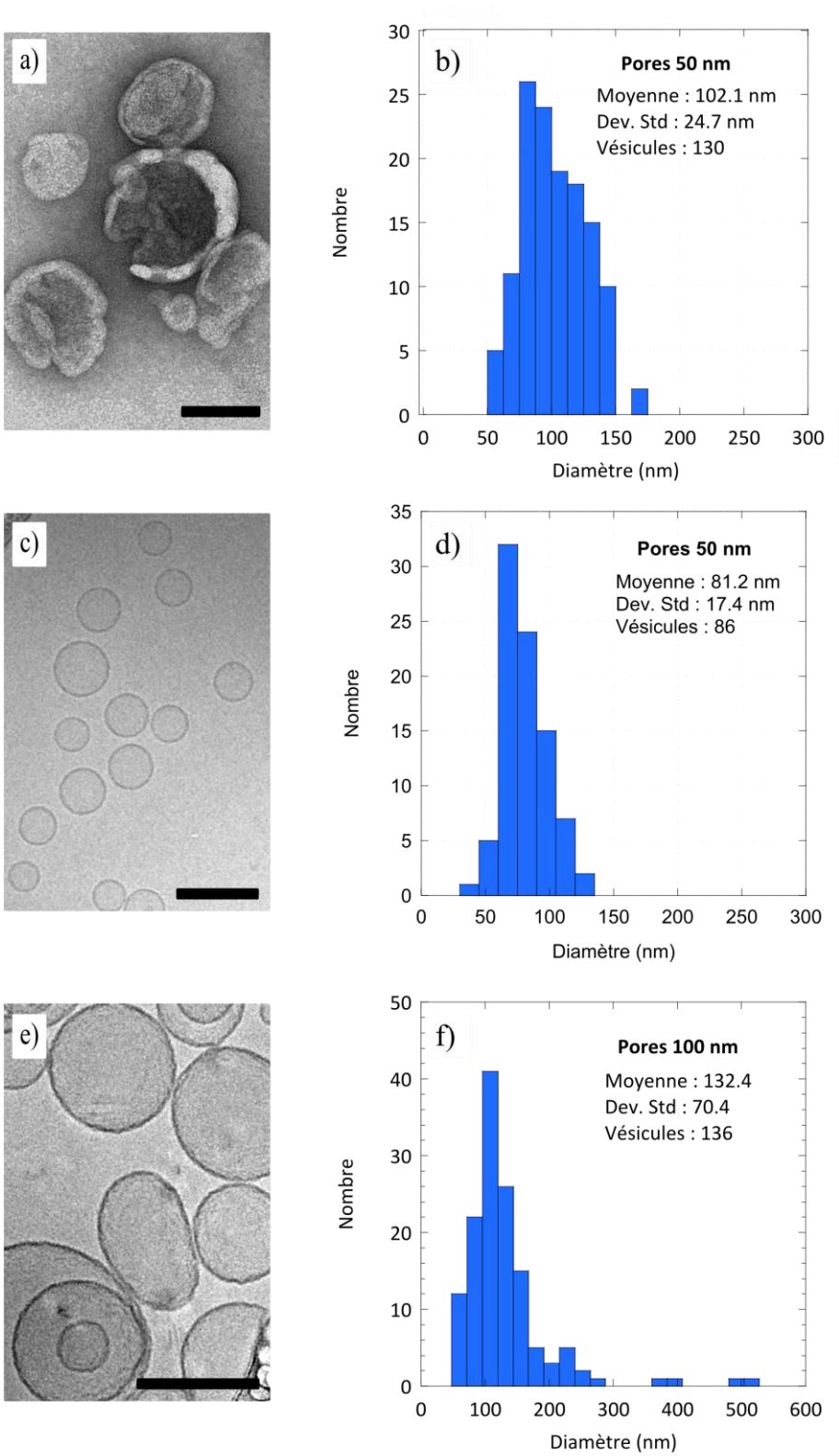


Figure 14 : Image de MET (a) du Curosurf extrudé avec des pores de 50 nm (échelle 100 nm) et histogramme de taille (b) issu de l'analyse d'images. Images de cryo-MET (c, e) de Curosurf extrudé avec des pores de 50 et 100 nm respectivement (barres échelle : 150 nm), faites par A. Vacher (Solvay). d,f) Histogrammes de taille issus de l'analyse d'image.
Abréviation : « Dev. Std » - déviation standard.

III. Surfactant pulmonaire synthétique

1) Choix des phospholipides

Afin de tester l'impact potentiel des protéines du fluide pulmonaire dans l'interaction Nps/SP, un surfactant pulmonaire contenant seulement des phospholipides a été formulé. Dans la suite de notre travail, il est appelé « surfactant synthétique ». Les systèmes modèles rapportés dans la littérature utilisent généralement le DPPC (1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine) car il est très présent dans le surfactant pulmonaire natif[31–33]. D'autres auteurs ajoutent des phospholipides de la classe des phosphatidylcholines insaturées ou des phosphatidyleglycérol[34,35]. Afin d'apporter de la complexité au « surfactant synthétique » et donc de nous rapprocher du fluide naturel, nous avons introduit dans la formulation du 2-oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phospho-rac-(1-glycerol) (POPG) et du L-α-phosphatidyl-LD-glycérol (abrégé αPG). Le αPG est composé des phospholipides suivants : 16:0 (32.9%), 18:1 (30.2%), 18:2 (18.7%), 18:0 (12.2%) et 20:4 (3.5%). Il apporte donc une certaine variabilité au surfactant synthétique.

2) Préparation et caractérisation du surfactant synthétique

Les phospholipides DPPC, αPG et POPG, initialement dans le méthanol, sont mélangés pour donner une concentration finale massique de 80/10/10. Après évaporation du solvant, les lipides sont hydratés par de l'eau MilliQ, afin d'obtenir une solution à 1 g L^{-1}. Cette suspension est extrudée à travers des pores de 50 nm de diamètre. Le diamètre hydrodynamique est mesuré en fonction du nombre d'extrusion (*Figure 15a*).

Il présente des variations de tailles similaires à celles du Curosurf extrudé. La taille finale est de 110 nm, comme pour le Curosurf. L'extrusion de systèmes comparables donne donc des vésicules de taille semblable.

Le surfactant synthétique est dilué à 10^{-5} g L^{-1} par de l'eau milliQ et étudié par NTA (*Figure 15b*). La distribution de taille indique que les vésicules ont un diamètre de 114 ± 56 nm. Là encore, les données obtenues par cette technique sont similaires à celles mesurées par DLS. La concentration du surfactant synthétique en nombre de vésicules est estimée à 8.5 10^{16} L^{-1} pour une solution à 1 g L^{-1}. Cette donnée est du même ordre de grandeur que celle du Curosurf extrudé avec la même taille de pores.

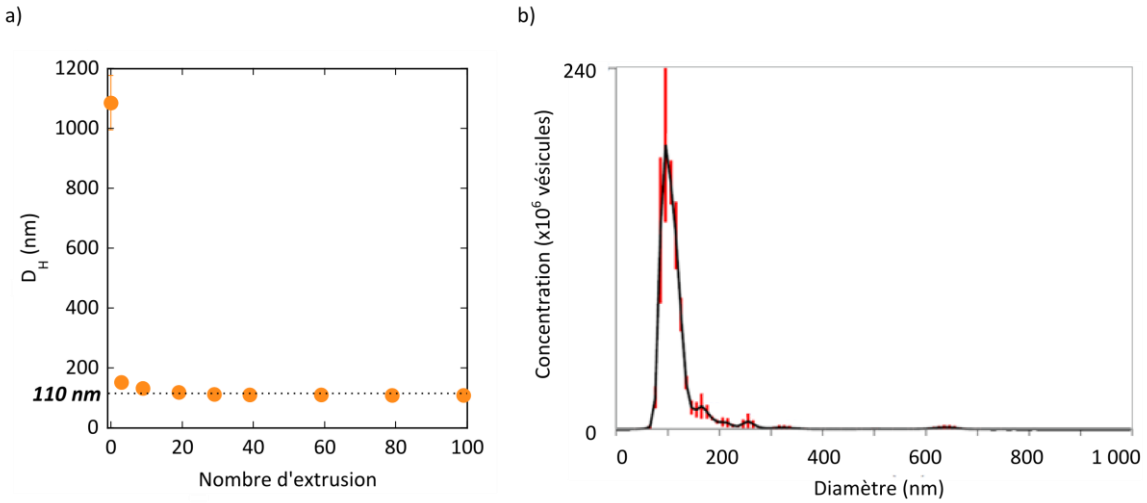


Figure 15 : a) Diamètre hydrodynamique du surfactant synthétique à 1 g L^{-1} dans l'eau en fonction du nombre d'extrusion. Les mesures sont répétées 3 fois. b) Distribution de taille en nombre, moyennée, mesurée par NTA. Le surfactant synthétique à 10^{-5} g L^{-1} dans de l'eau MilliQ. Les barres d'erreurs (en rouge sur le graphique) sont les déviations standards des différentes mesures.

IV. Modifications des surfactants pulmonaires modèles

1) Marquage fluorescent du Curosurf

Pour détecter le Curosurf potentiellement agrégé avec les nanoparticules lors des différentes expériences menées au Chapitre 5, il est nécessaire qu'il soit rendu fluorescent. Le PKH 67 est choisi comme fluorophore. Cette molécule, composée d'une tête fluoresçant dans le vert et d'une longue chaine aliphatique, est généralement utilisée pour marquer les cellules en s'insérant dans leur membrane. La *Figure 16a* représente un mélange de vésicules et de molécules de PKH 67 en solution. Nous faisons l'hypothèse que le fluorophore s'insère dans les membranes de Curosurf de la même façon que dans les membranes cellulaires. Dans ce cas, la couche lipidique externe des vésicules contient des molécules fluorescentes (*Figure 16b*). Si le PKH 67 subit comme les phospholipides un mouvement de « flip-flop » entre les deux monocouches des membranes, ces dernières seront fluorescentes dans leur globalité, comme illustré en *Figure 16c*.

Pour marquer le Curosurf, ce surfactant est simplement mélangé au fluorophore. Les concentrations en PKH 67 ont été optimisées pour permettre une bonne détection en fluorescence par divers équipements (microscope optique, NTA, lecteur de plaque, microscope confocal,…) tout en évitant des étapes de rinçage. Il a également été vérifié que les propriétés physico-chimiques des vésicules ne sont pas modifiées par le marquage. L'optimisation est détaillée dans le Chapitre 2 et les *Figure 16d-g* illustrent le résultat. Les mêmes vésicules sont observées par microscopie optique en contraste de

phase (*Figure 16d et f*) et en fluorescence (*Figure 16e et g*). La corrélation entre les images est forte, indiquant un bon marquage du Curosurf.

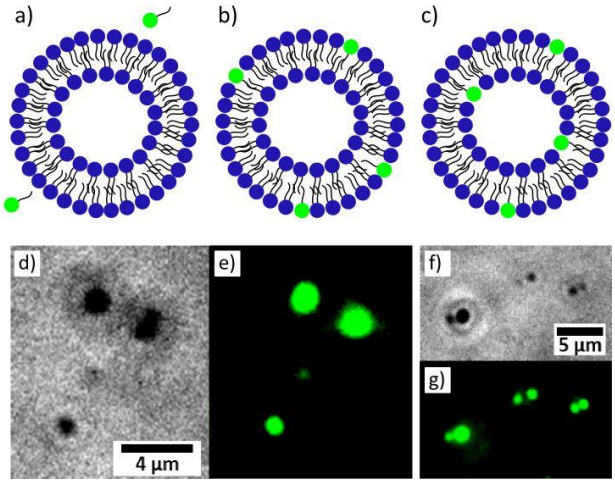


Figure 16 : a-c) Représentation schématique de vésicules mises en contact avec des molécules de PKH 67, avant (a) et après (b,c) incorporation dans la membrane des vésicules. d-g) Vésicules de Curosurf observées en microscopie optique à contraste de phase (d,f) et à fluorescence (e,g).

2) Propriétés physico-chimiques en fonction du pH

En anticipation du travail avec les Nps, il est essentiel de connaitre le comportement du surfactant pulmonaire vis-à-vis du pH. Le diamètre hydrodynamique et le potentiel zéta du Curosurf natif et extrudé à 50 nm sont mesurés sur une large gamme de pH. Les données sont montrées en *Figure 17*, la zone bleue représentant la gamme de pH dans laquelle nous travaillerons ultérieurement.

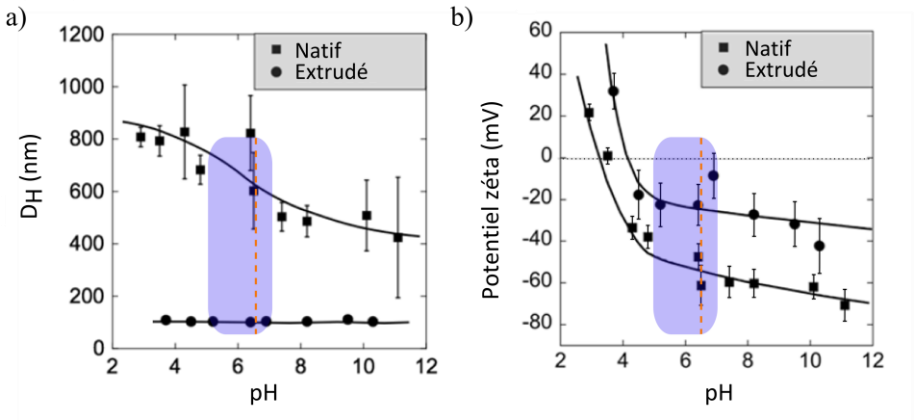


Figure 17 : Diamètre hydrodynamique (a) et potentiel zéta (b) en fonction du pH, pour le Curosurf natif (carrés) et extrudé (ronds) à 0.1 g L^{-1}. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard des expériences réalisées en triplicatas. Les lignes continues sont des guides pour les yeux. La zone bleue représente la zone de pH dans laquelle nous travaillerons ultérieurement avec le Curosurf natif ou extrudé. La ligne orange représente le pH du Curosurf natif.

En augmentant le pH, le diamètre des vésicules de Curosurf natif diminue de 800 à 400 nm, c'est-à-dire de 50%. A l'inverse, celui des vésicules extrudées reste constant, aux alentours de 100 nm. Le potentiel zéta diminue similairement pour les deux suspensions, à partir de valeurs positives à pH acide ($\zeta = +20$ mV et $\zeta = +30$ mV pour le surfactant natif et extrudé resp.). Il atteint des valeurs fortement négatives à pH alcalin ($\zeta =$ -30 mV et $\zeta =$ -60 mV). Nous confirmons par ces résultats que les membranes biologiques sont chargées négativement dans les conditions physiologiques[36]. Finalement, ni le diamètre, ni le potentiel zéta ne varient significativement sur la gamme de pH 5 - 7, qui sera la zone dans laquelle nous nous placerons lors de notre travail avec les Nps.

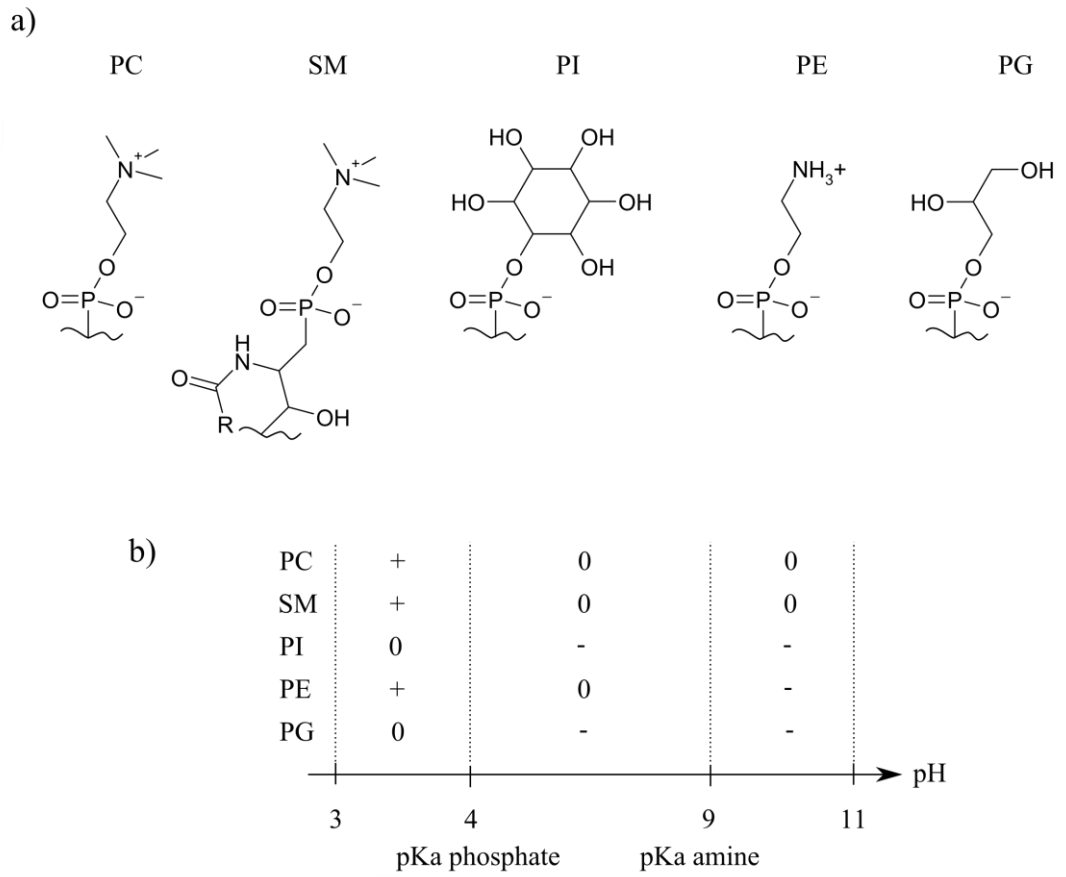


Figure 18 : a) Structure des composés majoritaires du Curosurf à pH physiologique. b) Charge des phospholipides en fonction du pH

Le comportement général illustré par la *Figure 17b* peut être compris en se référant aux propriétés acido-basiques des phospholipides. Sur la *Figure 18*, seules les têtes polaires de ces molécules sont représentées, les chaines lipidiques ne possèdant pas de groupes ionisés aux pH étudiés. A pH inférieur au pKa du groupe phosphate (de l'ordre de 4)[37], tous les phospholipides du Curosurf sont positifs ou neutres, en accord avec les mesures

de potentiel zéta effectuées. Vers pH 4, on observe une diminution rapide du potentiel zéta. Elle s'explique par le fait que tous les lipides perdent une charge suite à la déprotonation du phosphate.
Au-delà de pH 4, les phospholipides du Curosurf sont tous neutres ou négativement chargés. Ces données expliquent que le potentiel zéta est négatif dans cette zone. Vers pH 9, les groupements ammonium portés par les phospholipides minoritaires PE se déprotonent. Ce constat est à nouveau en accord avec les données.
Le potentiel zéta est mesuré à pH 6.4 pour du surfactant synthétique ainsi que pour du Curosurf extrudé avec des pores de diamètres 100 et 800 nm. Dans le *Tableau 3*, les résultats sont comparés à ceux discutés précédemment. Les valeurs de potentiel zéta sont comprises entre -25 et -60 mV. Compte tenu des barres d'erreurs sur ce type de mesure (5 à 15 mV), nous pouvons seulement conclure que le potentiel zéta du surfactant synthétique et du Curosurf extrudé à la même taille (50 nm) sont significativement différents.

Type de surfactant	Diamètre des pores (nm)	Diamètre des vésicules par DLS (nm)	Potentiel zéta (mV)
Curosurf	50	110	-23
Surfactant synthétique	50	110	-60
Curosurf	100	150	-46
Curosurf	800	700	-53
Curosurf	/	800	-55

Tableau 3 : Potentiel zéta du surfactant synthétique et du Curosurf natif ou extrudé avec différents pores.

3) Vieillissement des surfactants modèles

Dans cette partie, nous étudions les propriétés de vieillissement du Curosurf natif, du Curosurf après extrusion et du surfactant synthétique. Cet aspect est important pour définir des protocoles de conservation des formulations obtenues.

a) Congélation du Curosurf

La quantité de Curosurf récupéré à l'hôpital est assez aléatoire puisqu'elle dépend du nombre de prématurés nés, de leur stade de développement et de leur poids. Il est donc nécessaire d'être en mesure de conserver le Curosurf sur des durées de plusieurs mois. Pour cela, nous avons choisi la congélation. Il a cependant été trouvé que l'application de cycles répétés de congélation/décongélation sur des vésicules conduit à une diminution de leur taille et à une modification des structures multilamellaires[38,39]. Pour vérifier la résistance du Curosurf à la congélation, le surfactant a été porté à -20 °C entre 0 et 4 fois puis dilué à 0.1 g L^{-1} dans de l'eau MilliQ.

La *Figure 19* montre l'évolution du diamètre hydrodynamique et du potentiel zéta de ces solutions sur 25 jours. Quel que soit l'échantillon, la taille augmente de quelques centaines de nanomètres dans les 3 premiers jours puis diminue progressivement. Aucune modification significative de taille n'est observée au fur et à mesure des cycles de congélations. Aux vues de la dispersité du Curosurf, il est difficile de conclure sur une éventuelle évolution temporelle.

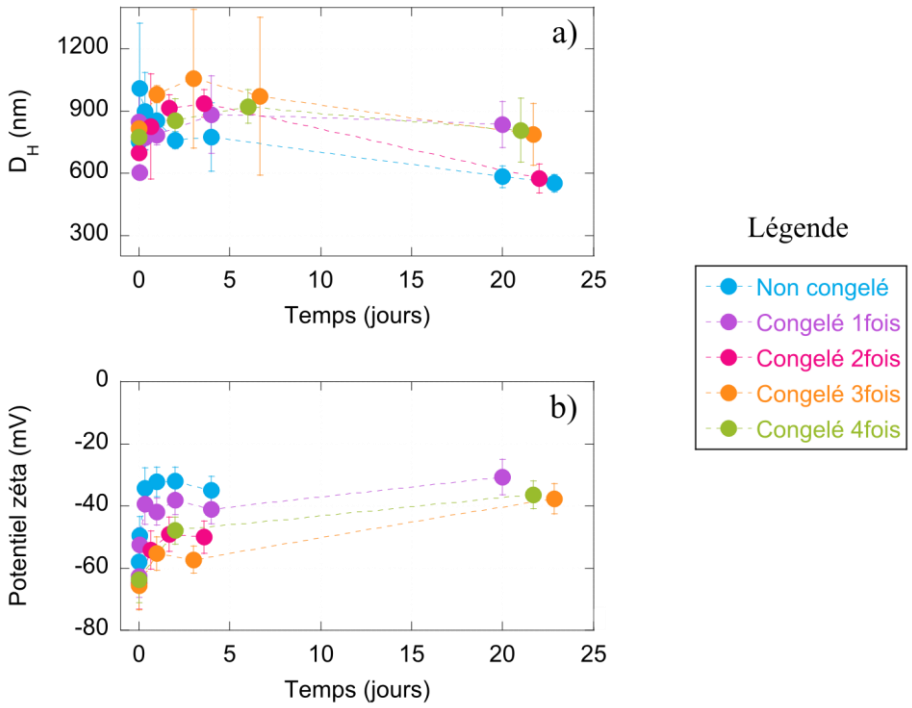


Figure 19 : Effet des cycles de congélation sur le Curosurf. Diamètre hydrodynamique (a) et potentiel zéta (b) du Curosurf natif au cours du temps, sans congélation ou après 1 à 4 cycles de congélation/décongélation à -20 °C. Les mesures sont réalisées en triplicatas et les barres d'erreurs représentent leur déviation standard.

La *Figure 19b* indique que pour un échantillon donné, le potentiel zéta augmente rapidement de 15 mV environ en deux jours, puis progressivement durant les 22 jours suivants. De plus, le potentiel zéta semble diminuer après chaque cycle de congélation. Il est donc recommandé de ne congeler le Curosurf qu'une fois pour limiter sa déstructuration.

b) Evolution temporelle des trois surfactants

Les propriétés de vieillissement du surfactant synthétique ainsi que du Curosurf natif et extrudé sont suivies durant 7 jours. Les surfactants sont dilués à 0.1 et 1 g L^{-1}. L'évolution du diamètre hydrodynamique et du potentiel zéta des surfactants est illustrée en *Figure 20*. La taille du Curosurf natif évolue la 1ère journée puis atteint un état d'équilibre. Comme les vésicules du Curosurf sont larges et distribuées en taille, il

est difficile de conclure sur une réelle évolution du Curosurf. A l'inverse, le Curosurf extrudé et le surfactant synthétique ont une taille de vésicules invariante sur la durée du suivi. Le diamètre mesuré étant relativement faible (100 nm environs), on peut conclure que ces deux surfactants sont stables en taille sur une semaine.
Pour tous les échantillons à l'exception du Curosurf natif à 1 g L^{-1}, le potentiel zéta montre une augmentation systématique de -60 mV à -30 mV, puis une stabilisation. L'origine de l'évolution du potentiel zéta pourrait être attribuée à l'hydrolyse des phospholipides.

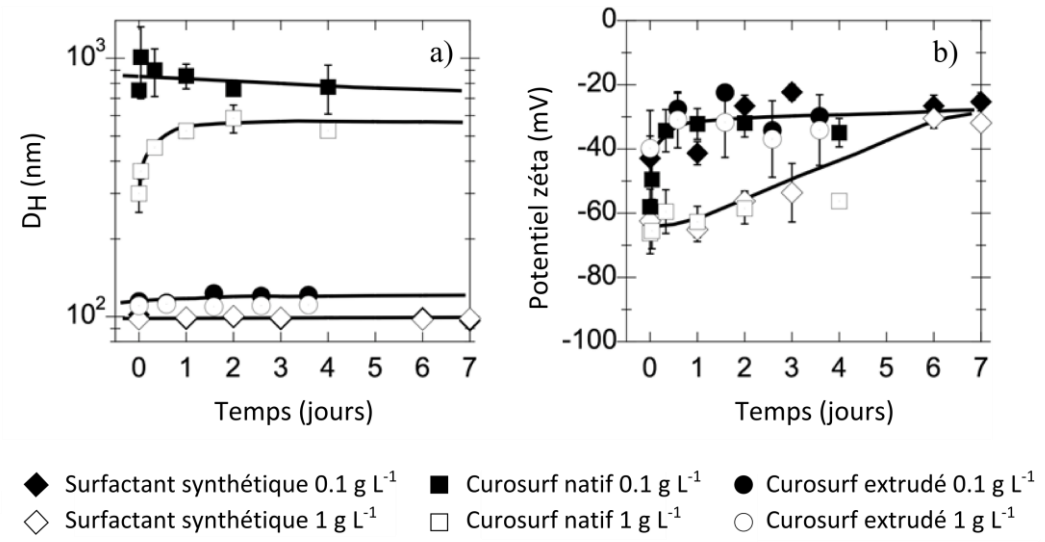


Figure 20 : Diamètre hydrodynamique (a) et potentiel zéta (b) en fonction du temps pour les trois surfactants : surfactant synthétique (diamants), Curosurf extrudé (cercles) et natif (carrés), à 0.1 et 1 g L^{-1}. Les mesures sont réalisées en triplicata et les barres d'erreurs représentent leur déviation standard. Les lignes continues sont des guides pour les yeux.

Finalement, nous recommandons les précautions d'utilisation suivantes :

- Congeler le Curosurf natif en aliquots
- Diluer le Curosurf natif après décongélation
- Utiliser le Curosurf natif fraichement dilué ou l'extruder
- Utiliser le Curosurf extrudé ou le surfactant synthétique le plus rapidement. Possibilité de conserver ces échantillons pour des expériences sur une durée de 7 jours

V. Conclusion

Le surfactant pulmonaire est un biofluide très complexe. Dans le but de réaliser des expériences pertinentes d'un point de vue physiologique, il est nécessaire de travailler avec un surfactant pulmonaire aussi réaliste que possible. Il est difficile et délicat de se

procurer du surfactant pulmonaire humain. Une méthode pour utiliser un bon modèle est de travailler avec des surfactants d'origine animale utilisés en médecine. C'est pourquoi nous avons choisi de travailler avec le Curosurf, médicament employé dans les services de néonatalité en Europe.
Dans ce chapitre, nous avons caractérisé en profondeur le Curosurf dit « natif » et le Curosurf que nous avons extrudé. Un surfactant modèle ne contenant pas de protéines a également été formulé et étudié. Les résultats de notre travail sont résumés dans le *Tableau 4*. Cette étude nous a permis de comprendre comment utiliser les surfactants modèles sans les dénaturer, ce qui sera un atout dans la suite de notre travail.

	Curosurf natif	Curosurf extrudé	Surfactant synthétique
Origine	Naturelle	Naturelle	Synthétique
Composition en Phospholipides	Complexe	Complexe	Simple
Protéines	Oui	Oui	Non
Structure	Vésicules majoritairement multilamellaires et multivésiculaires	Augmentation du nombre de vésicules unilamellaires lorsque Dp diminue	/
Taille	80 nm à 15 µm	Entre 110 et 700 nm, suivant Dp	110 nm
Dispersité en taille	Grande	Faible	Faible
Potentiel zéta	-55 mV	-20 à -53 mV	-60 mV
Tm	29.5 °C	/	/
Stabilité : dilution	Oui	/	/
Stabilité : pH	Oui entre pH 5 et 7	Oui entre pH 5 et 7	/
Stabilité : congélation	?	/	/
Stabilité : temps	1 jour	1 semaine	1 semaine
Congélation?	1 fois	Non	Non
Marquage fluorescent	Oui	/	/

Tableau 4 : Récapitulatif des propriétés du Curosurf natif, du Curosurf extrudé et du surfactant synthétique.

Bibliographie

1. Notter, Robert H. in *Lung surfactants - Basic science and clinical applications* **149,** 97–106 (Marcel Dekker, Inc., 2000).
2. www.survanta.com, consulté le 02.10.2016.
3. www.infasurf.com, consulté le 02.10.2016.
4. www.curosurf.com, consulté le 02.10.16.
5. Braun, A. *et al.* A freeze-fracture transmission electron microscopy and small angle X-ray diffraction study of the effects of albumin, serum, and polymers on clinical lung surfactant microstructure. *Biophys. J.* **93,** 123–139 (2007).
6. Van Swaay, D. & DeMello, A. Microfluidic methods for forming liposomes. *Lab. Chip* **13,** 752–767 (2013).
7. Fox, G. F. & Sothinathan, U. The choice of surfactant for treatment of respiratory distress syndrome in preterm infants: A review of the evidence. *Infant J.* **1,** 8–12 (2005).
8. MacIntyre, N. R. Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. in *Seminars in respiratory and critical care medicine* **16,** 47–52 (1995).
9. Waisman, D., Danino, D., Weintraub, Z., Schmidt, J. & Talmon, Y. Nanostructure of the aqueous form of lung surfactant of different species visualized by cryo-transmission electron microscopy. *Clin. Physiol. Funct. Imaging* **27,** 375–380 (2007).
10. Bernhard, W. *et al.* Commercial versus native surfactants: Surface activity, molecular components, and the effect of calcium. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **162,** 1524–1533 (2000).
11. Hobi, N. *et al.* Physiological variables affecting surface film formation by native lamellar body-like pulmonary surfactant particles. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1838,** 1842–1850 (2014).
12. Sun, B. *et al.* Biophysical and physiological properties of a modified porcine surfactant enriched with surfactant protein A. *Eur. Respir. J.* **10,** 1967–1974 (1997).
13. Ivanova, T., Minkov, I., Panaiotov, I., Saulnier, P. & Proust, J. E. Dilatational properties and morphology of surface films spread from clinically used lung surfactants. *Colloid Polym. Sci.* **282,** 1258–1267 (2004).
14. Wüstneck, R. *et al.* Interfacial properties of pulmonary surfactant layers. *Adv. Colloid Interface Sci.* **117,** 33–58 (2005).
15. Rudiger, M. Naturally derived commercial surfactants differ in composition of surfactant lipids and in surface viscosity. *AJP Lung Cell. Mol. Physiol.* **288,** 379–383 (2004).
16. Todorov, R., Exerowa, D., Platikanov, D., Bianco, F. & Razzetti, R. Evaluation of therapeutic pulmonary surfactants by thin liquid film methods. *Adv. Colloid Interface Sci.* **222,** 709–715 (2015).

17. Zhang, H., Fan, Q., Wang, Y. E., Neal, C. R. & Zuo, Y. Y. Comparative study of clinical pulmonary surfactants using atomic force microscopy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1808,** 1832–1842 (2011).
18. Minkov, I., Mircheva, K., Grozev, N., Ivanova, T. & Panaiotov, I. Properties of mixed monolayers of clinical lung surfactant, serum albumin and hydrophilic polymers. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **101,** 135–142 (2013).
19. Hermans, E., Saad Bhamla, M., Kao, P., Fuller, G. G. & Vermant, J. Lung surfactants and different contributions to thin film stability. *Soft Matter* **11,** 8048–8057 (2015).
20. Gross, T., Zmora, E., Levi-Kalisman, Y., Regev, O. & Berman, A. Lung surfactant-meconium interaction: *In vitro* study in bulk and at the air—solution interface. *Langmuir* **22,** 3243–3250 (2006).
21. Bernardino de la Serna, J. *et al.* Segregated ordered lipid phases and protein-promoted membrane cohesivity are required for pulmonary surfactant films to stabilize and protect the respiratory surface. *Faraday Discuss* **161,** 535–548 (2013).
22. Reeves, J. P. & Dowben, R. M. Water permeability of phospholipid vesicles. *J. Membr. Biol.* **3,** 123–141 (1970).
23. Haran, N. & Shporer, M. Study of water permeability through phospholipid vesicle membranes by ^{17}O NMR. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr.* **426,** 638–646 (1976).
24. Lawaczeck, R. On the permeability of water molecules across vesicular lipid bilayers. *J. Membr. Biol.* **51,** 229–261 (1979).
25. Casals, C. & Cañadas, O. Role of lipid ordered/disordered phase coexistence in pulmonary surfactant function. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1818,** 2550–2562 (2012).
26. Gregoriadis, G. in *Liposome technology - Entrapment of drugs and other materials (Chapter 8)* 123–140 (CRC Press, 1993).
27. https://avantilipids.com, consulté le 12.11.13.
28. Hayat, M. A. in *Principles and techniques of electron microscopy: Biological applications* **4th ed,** 545 (2000).
29. Bordi, F., Cametti, C., Sennato, S. & Diociaiuti, M. Direct evidence of multicompartment aggregates in polyelectrolyte-charged liposome complexes. *Biophys. J.* **91,** 1513–1520 (2006).
30. Parmar, M. M., Blake, M. S. & Madden, T. D. Biophysical and antigenic characterization of gonococcal protein I incorporated into liposomes. *Vaccine* **15,** 1641–1651 (1997).
31. Hermans, E. & Vermant, J. Interfacial shear rheology of DPPC under physiologically relevant conditions. *Soft Matter* **10,** 175–186 (2014).

32. Guzmán, E., Liggieri, L., Santini, E., Ferrari, M. & Ravera, F. Effect of hydrophilic and hydrophobic nanoparticles on the surface pressure response of DPPC monolayers. *J. Phys. Chem. C* **115,** 21715–21722 (2011).
33. MacCuspie, R. I., Allen, A. J. & Hackley, V. A. Dispersion stabilization of silver nanoparticles in synthetic lung fluid studied under *in situ* conditions. *Nanotoxicology* **5,** 140–156 (2011).
34. Guzmán, E., Liggieri, L., Santini, E., Ferrari, M. & Ravera, F. DPPC–DOPC Langmuir monolayers modified by hydrophilic silica nanoparticles: Phase behaviour, structure and rheology. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **413,** 174–183 (2012).
35. Jiménez-Rojo, N. *et al.* Lipidic nanovesicles stabilize suspensions of metal oxide nanoparticles. *Chem. Phys. Lipids* **191,** 84–90 (2015).
36. Alberts, B. *et al.* in *Molecular biology of the cell, 5ty Edition* (Garlan Science : New York, 2006).
37. Cevc, G. in *Phospholipids handbook: Medical applications of phospholipids* (Marcel Dekker, Inc.: New york, 1993).
38. Kaasgaard, T., Mouritsen, O. G. & Jørgensen, K. Freeze/thaw effects on lipid-bilayer vesicles investigated by differential scanning calorimetry. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1615,** 77–83 (2003).
39. Traïkia, M., Warschawski, D. E., Recouvreur, M., Cartaud, J. & Devaux, P. F. Formation of unilamellar vesicles by repetitive freeze-thaw cycles: Characterization by electron microscopy and ^{31}P-nuclear magnetic resonance. *Eur. Biophys. J.* **29,** 184–195 (2000).

Chapitre 4
Interaction entre particules et hypophase
-
Cas de particules enrobées de surfactant pulmonaire

Table des matières

I. Introduction 127
II. Formulation des nanoBLSs – preuve de concept 128
1) Généralités 128
2) Premier test 128
3) Deuxième test 129
III. Optimisation de la formulation des nanoBLSs 131
1) Généralités 131
2) Caractérisation des nanoBLSs en fonction de X_S 131
a) Résultats 131
b) Décalage contre-intuitif des courbes de DCS 133
c) Conclusion 133
3) Calcul de l'épaisseur de l'enrobage des nanoBLSs 134
4) Autre détermination expérimentale de l'épaisseur de la BLS 136
a) Observation des nanoBLSs par cryoMET 136
b) Détermination de l'épaisseur de la BLS 137
c) Présence de vésicules après formulation des nanoBLSs 138
IV. Stabilité des nanoBLSs 138
V. Interaction entre nanoBLSs et surfactant pulmonaire 139
VI. Conclusion 140
Annexe A : Calcul de l'épaisseur de l'enrobage des nanoBLSs 141
Annexe B : Nombre de vésicules restantes après formulation des nanoBLSs 144
Bibliographie 145

I. Introduction

Les nanoparticules (Nps) qui atteignent les alvéoles rencontrent en premier lieu le surfactant pulmonaire (SP). Généralement, elles pénètrent dans la phase aqueuse du surfactant, appelée hypophase, et interagissent avec ses constituants[1]. Récemment, il a été montré que l'incubation de nanomatériaux avec des composants du fluide pulmonaire peut modifier leur toxicité cellulaire ou leur internalisation[2–12]. Cependant, le lien entre propriétés physico-chimiques des particules et interaction Nps/SP/cellules n'est pas encore compris. Il apparait donc primordial de caractériser l'interaction entre nanoparticules et surfactant pulmonaire afin de comprendre le devenir des Nps inhalées.

Lorsque les particules traversent l'interface air-liquide pour atteindre l'hypophase, deux cas de figure peuvent se présenter[13–21] :

- Les particules se couvrent d'une ou de plusieurs bicouches de phospholipides accompagnées de leurs protéines (*Figure 1*, cas a)
- Les particules traversent l'interface sans que leur surface ne soit fondamentalement modifiée (*Figure 1*, cas b).

Les particules, couvertes ou non de biomolécules, se retrouvent ensuite dans l'hypophase où elles sont susceptibles d'interagir avec les vésicules du surfactant.

Il est fort probable que des scénarios intermédiaires existent mais pour des raisons pratiques, nous traiterons les deux cas hypothétiques cités ci-dessus.

Dans ce chapitre, nous nous intéressons au cas où les particules sont couvertes d'une bicouche de phospholipides (*Figure 1*, cas a). Nous montrerons comment formuler ces particules hybrides et nous étudierons leurs interactions avec les vésicules de l'hypophase.

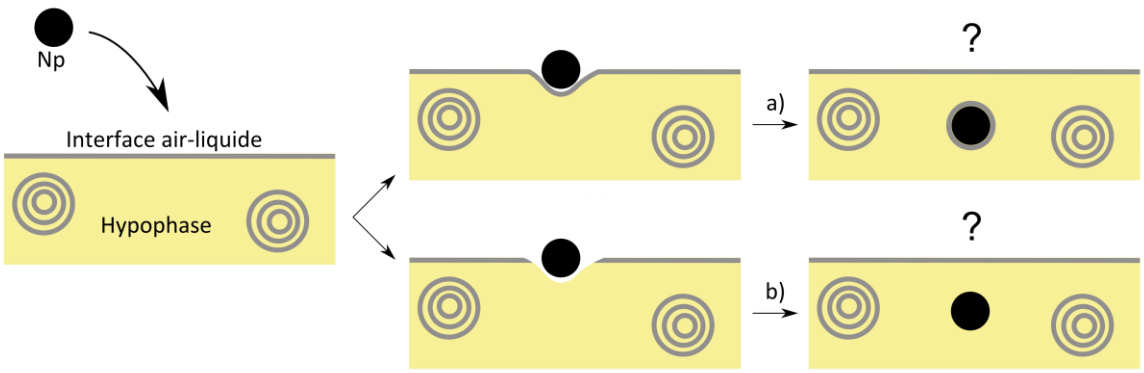


Figure 1 : Représentation schématique de l'entrée des particules dans l'hypophase du surfactant pulmonaire, avec (a) et sans (b) adsorption de biomolécules sur la particule.

II. Formulation des nanoBLSs – preuve de concept

Dans ce chapitre, nous nous intéressons aux nanoparticules Silica (+). Elles sont constituées de silice portant des charges positives en surface.

1) Généralités

Les Silica (+) étant hydrophiles, leur surface a plus d'affinité pour les têtes polaires des phospholipides que pour leurs chaines aliphatiques. On peut donc supposer que lors de la pénétration dans l'hypophase, les Silica (+) se couvrent d'une bicouche de phospholipides, dite « bicouche lipidique supportée » (BLS)[22]. Notre but est de formuler ces objets, que nous appellerons des « nanoBLSs » par la suite (*Figure 2*).

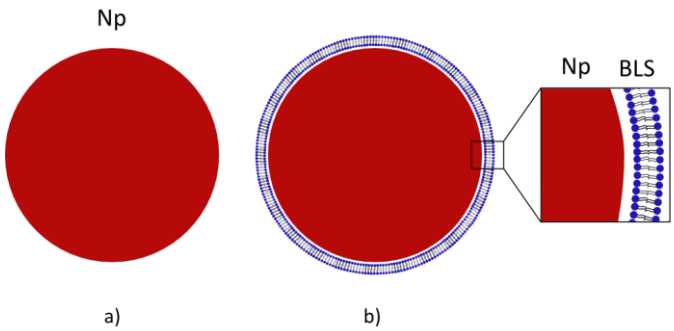


Figure 2 : Représentation schématique à l'échelle d'une nanoparticule de 40 nm « nue » (a) ou couverte d'une bicouche lipidique supportée (BLS) (b).

Les bicouches lipidiques supportées sont principalement préparées via deux méthodes : par transfert d'une monocouche à l'interface air-eau grâce à une cuve de Langmuir[23] ou par auto-assemblage des lipides suite à la fusion ou l'étalement de vésicules[23,24]. Seule la seconde méthode, initiée par Mc Connell *et al*[25] permet de couvrir des surfaces sphériques, comme par exemple des nanoparticules. Grâce à sa polyvalence, elle permet entre autres de créer des BLSs de composition mixte[24] ou de déposer des BLSs ayant des protéines transmembranaires[26], et ce, sur une grande variété de substrats solides[27].

2) Premier test

Pour obtenir des nanoBLSs par la méthode de fusion de vésicules[28], les Silica (+) sont mélangées avec du surfactant pulmonaire. La solution est caractérisée par le rapport surfacique X_S, défini par :

$$X_S = \frac{S_{bicouches}}{S_{Nps}}$$

où $S_{bicouches}$ et S_{Nps} désignent les surfaces développées par les bicouches des vésicules et par les nanoparticules respectivement. Les solutions de nanoparticules et le Curosurf, initialement à 0.1 g L^{-1} dans de l'eau MilliQ, sont mélangées de sorte que X_S vaille

environ 3. La surface développée par les bicouches de surfactant est ainsi en excès par rapport à celle des Nps.
La suspension est suivie par DLS durant 24 h et les résultats indiquent la formation d'agrégats stables dans le temps. Ces agrégats sont étudiés en détail au Chapitre 5. De taille micrométrique, ils sont constitués de particules et de vésicules. Ainsi, dans notre cas, le simple mélange de Silica (+) et de surfactant pulmonaire ne permet pas d'obtenir des nanoBLSs.
La rupture de vésicules sur surface solide dépend de la composition de ces dernières[29] mais également de paramètres physico-chimiques comme la force ionique[30], le pH[31], la température[32] et la composition chimique du substrat[27,33]. Tout comme nos expériences, ces données indiquent que la formation de bicouche lipidique supportée n'est pas toujours spontanée.

3) Deuxième test

Les Silica (+) et le Curosurf sont mélangés dans les mêmes proportions que précédemment puis la dispersion est soniquée 1h. Le suivi de la taille est effectué par diffusion de la lumière (DLS). La *Figure 3a* montre le diamètre hydrodynamique D_H de la suspension à $X_S \approx 3$ en fonction du temps de sonication. A t = 0, la solution est turbide et des objets visibles à l'œil nu sédimentent. La taille moyenne mesurée dans le surnageant est d'environ 330 nm, et la distribution de taille est étendue. Ces résultats démontrent la formation d'agrégats. Avec la sonication, le diamètre hydrodynamique diminue, atteint 100 nm après 10 min et se stabilise vers 90 nm au bout de 20 min. La solution est alors limpide. La taille finale peut correspondre à la fois au diamètre du Curosurf soniqué et au D_H des nanoparticules de silice couvertes de bicouches lipidiques.
Afin de vérifier que des nanoBLSs sont bien obtenues, de la microscopie MET est réalisée sur des échantillons contrastés à l'acétate d'uranyle[34]. Ce composé assombrit les têtes polaires des phospholipides. Ainsi, les chaines aliphatiques apparaissent blanches. Les images montrées en *Figure 3c-e* représentent des Nps, non agrégées, entourées d'une couche nanométrique plus claire, que l'on associe ici à une bicouche supportée[28]. Quelques particules nues sont observées (*Figure 3d*). Elles sont plus contrastées et leur contour est plus net. Leur présence renforce l'idée que les autres Nps sont effectivement enrobées de phospholipides.
Une analyse de taille est effectuée sur plus de 200 objets à partir des images de MET. La *Figure 3b* montre la distribution des diamètres des particules nues et de celles associées au Curosurf. La distribution de taille des particules nues est centrée sur 39.5 ± 1.6 nm et celle des particules « enrobées » est piquée sur 54.5 ± 0.8 nm. L'épaisseur de l'enrobage est donc de 7.5 ± 1.2 nm. Ce résultat est légèrement plus élevé que les épaisseurs obtenues en diffusion de neutrons ou des rayons-X sur des

bicouches de DPPC[35,36]. La différence entre notre estimation et celles de la littérature pourrait être la conséquence des effets de séchage.

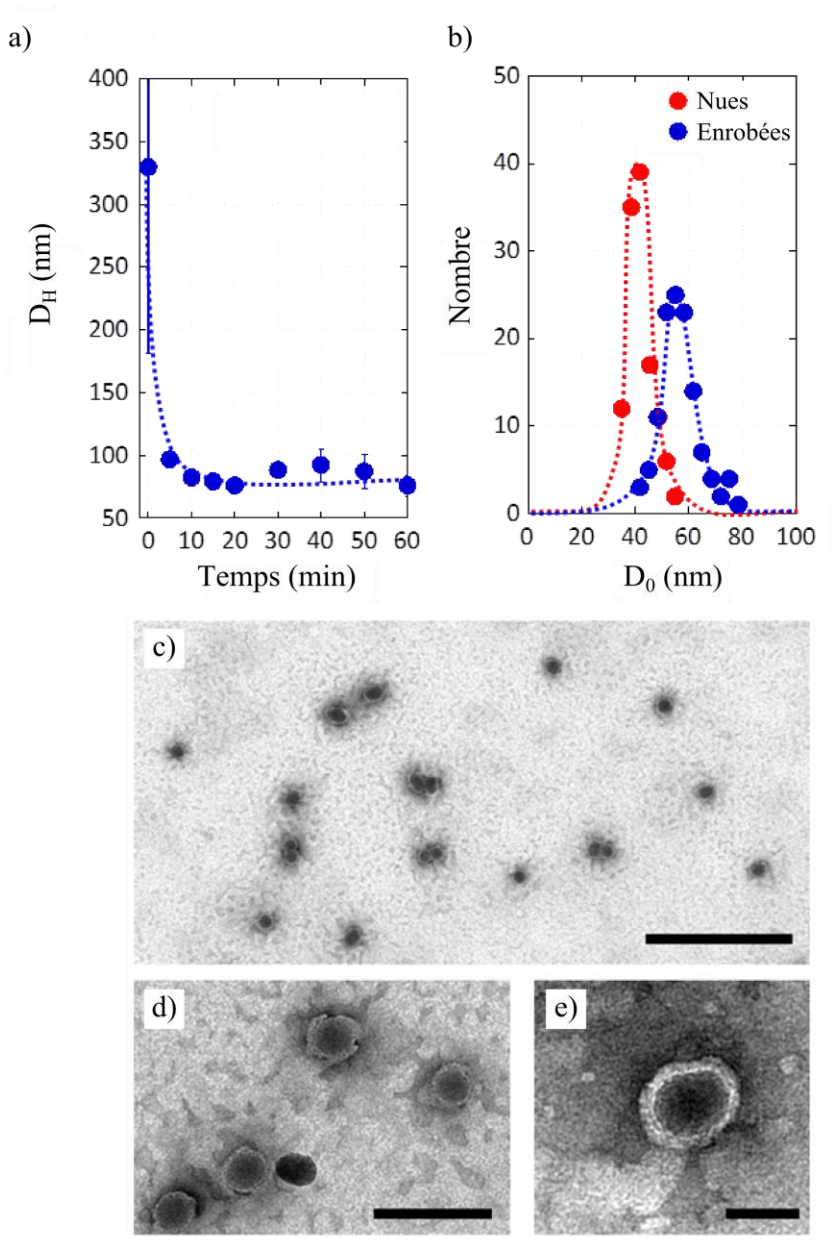


Figure 3 : a) Diamètre hydrodynamique de la suspension Silica (+)/Curosurf à $X_S = 3$ en fonction du temps de sonication. b) Distribution de taille des nanoparticules nues (ronds rouge) et soniquées avec le Curosurf à $X_S = 3$ (ronds bleus). Le diamètre moyen des particules nues (resp. enrobées) est de 42 nm (resp. 56.7 nm) et la déviation standard est de 4.6 nm (resp. 7.2 nm). Les données sont obtenues à partir de l'analyse de plus de 200 particules imagées en MET. c-e) Images de MET de la suspension Silica (+)/Curosurf ($X_S = 3$) contrastée à l'acétate d'uranyle. Le fond des images est relativement inhomogène. On peut supposer que les vésicules de Curosurf en excès se sont déposées sur la grille durant la préparation puis qu'elles ont été détruites lors du séchage de l'échantillon. Barres d'échelles : 500, 100 et 50 nm respectivement.

III. Optimisation de la formulation des nanoBLSs

1) Généralités

En vue des expériences avec les cellules pulmonaires, il est important de pouvoir isoler les nanoBLSs des vésicules de surfactant en excès. La taille et la densité des nanoBLSs et du Curosurf sont similaires. Il n'est donc pas facile de purifier les nanoBLSs par la centrigufation, qui est habituellement la méthode de choix[37–39]. En outre, les Silica (+) ne sont pas magnétiques. Les méthodes classiques utilisant des aimants ne sont pas applicables[21]. La technique de « fractionnement par couplage flux-force » (FFF) est adaptée mais nécessite un équipement coûteux et disponible dans peu de laboratoires.
Afin d'éviter l'étape de purification, nous avons décidé d'ajuster la surface développée des bicouches de phospholipides à la surface totale disponible sur les particules. Pour cela, la formation des nanoBLSs est étudiée en fonction du rapport surfacique X_S.

2) Caractérisation des nanoBLSs en fonction de X_S

a) Résultats

Les solutions Silica (+)/Curosurf sont préparées aux rapports surfaciques X_S = 0, 0.5, 1.1, 1.3, 1.5, 1.7, 2, 5 et 15. Elles sont ensuite soniquées durant 90 min. Les solutions à $X_S = 0$ et $X_S = 15$ correspondent respectivement aux particules nues et aux vésicules de Curosurf de 100 nm. La *Figure 4a* montre le potentiel zéta de ces dispersions en fonction de X_S. Lorsque le rapport surfacique varie entre 0 et 15, le potentiel zéta diminue de +50 mV à -30 mV. Il passe par 0 mV vers $X_S = 1$, puis se stabilise vers -30 mV pour $X_S \geq 2$.
La diffusion de lumière est également utilisée pour étudier la taille des complexes formulés. La *Figure 4b* montre le diamètre hydrodynamique des mêmes suspensions diluées dans de l'eau MilliQ, du PBS et du DMEM complet. Quel que soit le dispersant, la taille mesurée est d'environ 100 nm pour un X_S compris entre 5 et 2. Ensuite, le D_H augmente quand X_S décroit, indiquant un phénomène d'agrégation. Les variations du potentiel zéta et du diamètre hydrodynamique en fonction de X_S nous amènent à formuler l'hypothèse suivante : le Curosurf négativement chargé s'adsorbe progressivement sur les Nps de silice positive pour X_S allant de 0.5 à 2, puis la surface des particules est saturée en phospholipides pour $X_S \geq 2$.

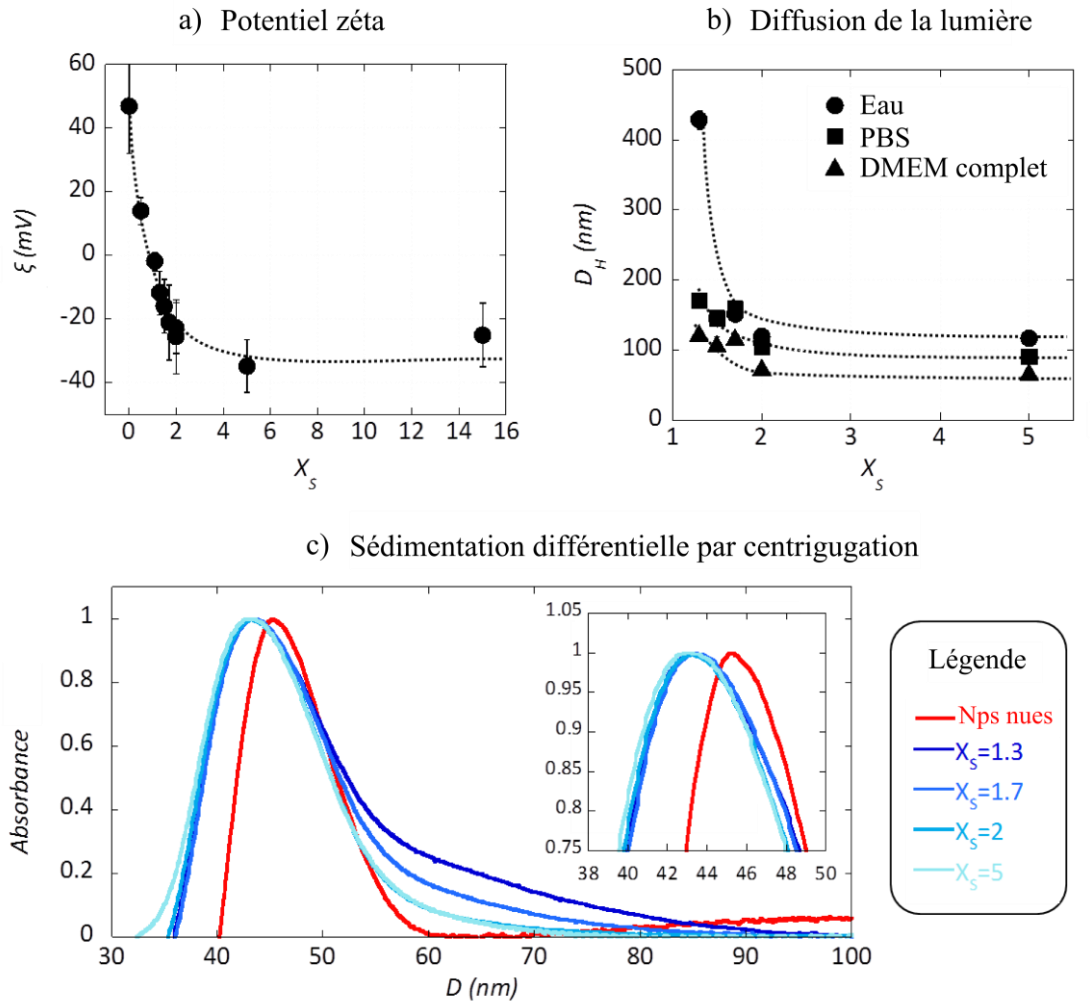


Figure 4 : a) Potentiel zéta des suspensions Silica (+)/Curosurf en fonction de X_S. La concentration en particules est de 0.5 g L^{-1}. b) Diamètre hydrodynamique, en fonction de X_S, des suspensions Silica (+)/Curosurf diluées dans de l'eau, du PBS et du DMEM complet. Les solutions sont à 0.1 g L^{-1} en particules. Les échantillons à X_S = 0.5 et 1.1 ne sont pas mesurés à cause de leur turbidité. c) Distributions de taille, obtenues par DCS, des Nps nues (courbe rouge) et des nanoBLSs préparées à différents X_S (courbes bleues). Les particules sont à 0.5 g L^{-1} dans chaque échantillon.

Pour vérifier cette hypothèse, nous utilisons la Sédimentation Différentielle par Centrifugation (DCS en anglais). Cette méthode permet de déterminer avec précision les distributions de taille des nanoBLSs. La *Figure 4c* montre les données brutes des distributions de taille des Silica (+) et des suspensions soniquées préparées à des X_S compris entre 1.3 et 5. L'encart est un grossissement du maximum des pics. Les Silica (+) présentent une distribution de taille étroite, centrée sur D_{max} = 45.4 nm, avec une largeur à mi-hauteur σ de 9.4 nm. Ces résultats sont en accord avec les analyses d'images de MET (*Figure 3b*). Le pic secondaire, observé au-delà de 85 nm, témoigne de la présence de quelques doublets. De façon surprenante, les nanoBLSs ont des

distributions de taille dont les diamètres moyens sont plus petits que celui des Nps nues. En effet, les distributions sont centrées sur D_{max} = 43.3 nm, et les largeurs à mi-hauteur σ sont mesurées entre 12.5 et 13.7 nm (*Tableau 1*). Nous reviendrons plus tard sur ce phénomène.
Quel que soit X_S, les courbes sont parfaitement superposables pour des diamètres compris entre 30 et 50 nm. Pour des diamètres supérieurs à 50 nm, les graphiques sont identiques pour les échantillons formulés à $X_S = 5$ et $X_S = 2$ alors qu'un épaulement apparait pour ceux préparés à $X_S = 1.7$ et 1.3. Cet épaulement, qui traduit un début d'agrégation, augmente à mesure que X_S diminue.

b) *Décalage contre-intuitif des courbes de DCS*

En DCS, les objets à étudier sont injectés dans un disque en rotation contenant un gradient de sucrose. Ils sédimentent à travers le gradient, plus ou moins vite selon leur taille et leur densité puis sont détectés en fin de course par un laser. L'absorbance est tracée en fonction du temps de parcours, et ce temps est transformé, grâce aux équations de Stokes-Einstein, en diamètre de particule. Ce calcul sous-entend que tous les objets injectés ont la même densité et que celle-ci est connue.
Dans notre cas, des phospholipides (et potentiellement des protéines) sont adsorbés sur les particules. La taille de cet enrobage n'étant pas déterminée précisément, la densité des nanoBLSs n'est pas connue. La distribution de taille en DCS est alors calculée à partir des données brutes en considérant que la densité des nanoBLSs est égale à celle des particules nues. La densité des particules enrobées de phospholipides est donc surestimée. En conséquence, le diamètre calculé est sous-estimé, d'où le décalage des courbes vers les petites tailles.

c) *Conclusion*

L'ensemble des données nous amène aux conclusions suivantes. Quand X_S augmente de 1.3 à 2, le surfactant pulmonaire s'adsorbe sur les particules et le taux de recouvrement augmente avec X_S. En deçà de $X_S = 2$, une partie des Nps agrègent car leur couverture partielle leur confère une charge proche de zéro. Les données à $X_S = 2$ et $X_S = 5$ sont identiques. Ce résultat suggère que le recouvrement des particules est total pour $X_S \geq 2$.
La *Figure 5* représente les distributions de taille en nombre des particules nues et des nanoBLSs. Les courbes sont plus étroites et centrées sur des diamètres plus faibles que précédemment (*Tableau 1*). De plus, les épaulements et le pic secondaire ne sont plus visibles. Ceci indique que les multiplets formés sont très peu nombreux.

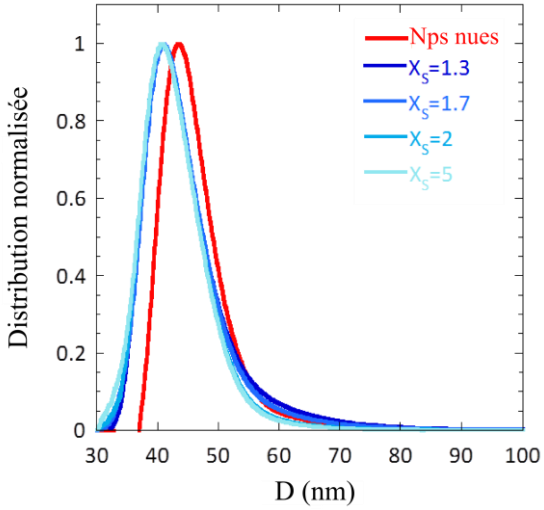


Figure 5 : Distributions de taille, en nombre, des Nps nues (courbe rouge) et des nanoBLSs préparées à différents X_S (courbes bleues). Ces distributions sont obtenues par DCS.

Au final, nous souhaitions obtenir dans ce chapitre des Nps isolées, enrobées de Curosurf, avec un excès limité de ce dernier. Nos résultats indiquent que les conditions optimales de préparation de ces objets sont autour de $X_S = 2$.

	Absorbance		Nombre	
X_S	D_{max} (nm)	σ (nm)	D_{max} (nm)	σ (nm)
0	45.4	9.4	43.6	9.4
1.3	43.3	13.7	40.9	10.7
1.7	43.3	12.9	40.9	10.5
2	43.3	12.5	40.9	10.5
5	43.3	12.8	40.9	10.5

Tableau 1 : Diamètre au maximum du pic (D_{max}) et largeur à mi-hauteur (σ) des distributions en absorbance et en nombre des particules nues et couvertes de Curosurf à différents X_S. Ces distributions sont obtenues par DCS.

3) Calcul de l'épaisseur de l'enrobage des nanoBLSs

Nous nous référons dans la suite de ce travail aux diamètres mesurés au maximum des pics (D_{max}) et non aux distributions dans leur globalité.

La mesure en DCS des distributions de taille des particules nues et des nanoBLSs permet de calculer l'épaisseur de l'enrobage de phospholipides[40] en résolvant l'équation du 3è ordre ci-dessous (**Annexe A**) :

$$(\rho_0 - \rho_{BLS})D_{nanoBLS}^3 + (\rho_{DCS} - \rho_0)D_{DCS\max}^2 D_{nanoBLS} + (\rho_{BLS} - \rho_{Np})D_{Np}^3 = 0 \quad \text{(Équation 1)}$$

Avec :

ρ_0	:	masse volumique moyenne du gradient de sucrose (1.064 g cm^{-3})
ρ_{BLS}	:	masse volumique de l'enrobage (?)
ρ_{DCS}	:	masse volumique entrée dans le logiciel (1.9 g cm^{-3})
ρ_{Np}	:	masse volumique des particules nues (1.9 g cm^{-3})
$D_{DCS\max}$	:	diamètre de la distribution de taille au maximum du pic (43.3 nm)
D_{Np}	:	diamètre des particules nues, au maximum du pic (45.4 nm)
$D_{nanoBLS}$	:	diamètre des nanoSLBs (à calculer)

Toutes les variables de l'équation sont connues, à l'exception de $D_{nanoBLS}$, que nous désirons calculer, et de ρ_{BLS}. Nous supposons que la masse volumique de bicouches de Curosurf est de 0.9 g cm^{-3}. Cette hypothèse permet de résoudre l'*Equation 1* et d'établir que le diamètre des nanoBLSs vaut 48.6 nm. Puisque la particule a un diamètre de 45.4 nm, l'épaisseur de l'enrobage est de 1.6 nm.
Une bicouche de DPPC, composant principal du Curosurf, mesure environ 4 nm[35,36]. Trois explications sont possibles pour expliquer l'écart observé:

- Les particules Silica (+) seraient couvertes seulement d'une monocouche de phospholipides et/ou protéines, bien que cela ne soit pas décrit à notre connaissance pour des particules hydrophiles. L'épaisseur mesurée aurait alors le bon ordre de grandeur.
- Des patches pourraient être adsorbés sur les Nps, produisant un recouvrement inhomogène. L'épaisseur moyenne de l'enrobage serait dans ce cas inférieure à celle d'une bicouche.
- La masse volumique des particules, de l'enrobage et du gradient de sucrose ne seraient pas connues avec assez de précision pour permettre une détermination exacte de l'épaisseur de la bicouche.

Des expériences complémentaires sont donc nécessaires afin de déterminer l'épaisseur de l'enrobage.

4) Autre détermination expérimentale de l'épaisseur de la BLS

a) Observation des nanoBLSs par cryoMET

Afin de visualiser la structure des nanoBLSs, de la microscopie MET est réalisée sur des échantillons trempés par cryogénie (cryoMET). Cette technique permet d'éviter tout changement chimique ou structural du spécimen observé. La *Figure 6* présente des images de cryoMET de la suspension Silica (+)/Curosurf préparée dans de l'eau MilliQ à $X_S = 2$, soniquée et diluée au dixième à 0.5 g L^{-1} dans du milieu de culture cellulaire. La *Figure 6a* montre une vue large de l'échantillon. La flèche verte indique des cristaux de glace, de quelques nanomètres, apparus lors de la cryogénisation. La flèche jaune montre la grille de MET, qui supporte l'échantillon. La flèche rouge pointe sur une particule alors que la bleue révèle la présence de vésicules (de 50 à 100 nm de diamètre environ).

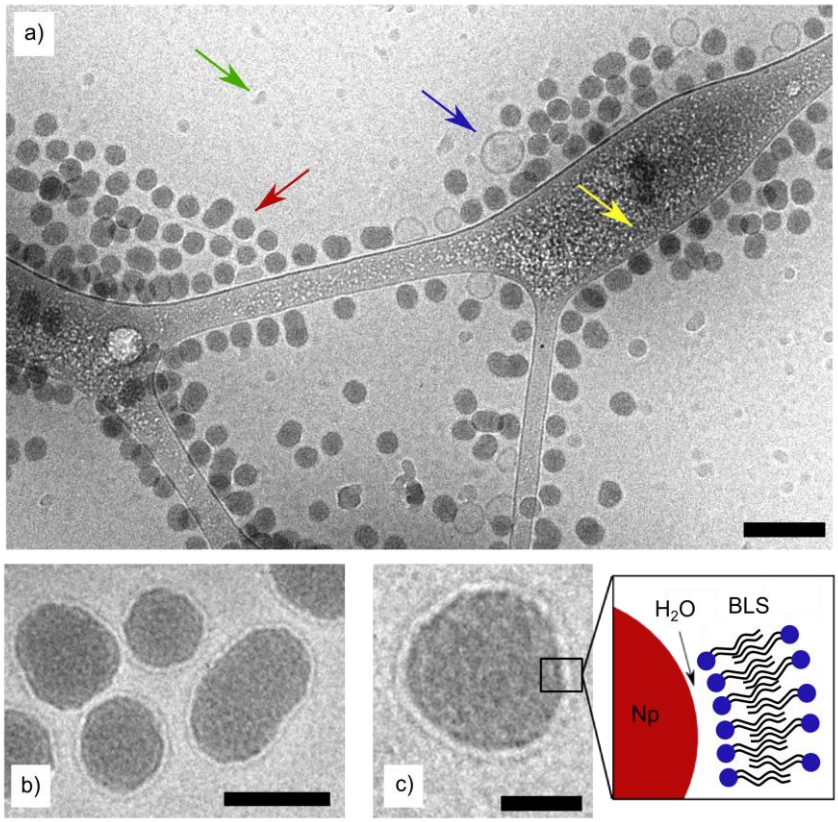


Figure 6 : Images de cryoMET de la suspension Silica (+)/Curosurf soniquée à $X_S = 2$. a) Les flèches verte, jaune, rouge et bleue pointent respectivement sur des cristaux de glace, la grille de MET, des particules et des vésicules. Barre d'échelle : 150 nm. b) Vue à grossissement moyen de nanoBLSs. Barre d'échelle : 50 nm. c) Vue à fort grossissement (barre d'échelle : 20 nm) et représentation schématique d'une nanoBLS.

La *Figure 6b* propose une vue plus rapprochée des particules. Les Nps apparaissent entourées d'un anneau continu de matériel électroniquement dense qui suit exactement les irrégularités de la surface des particules. Cet anneau est la signature en cryoMET d'une bicouche phospholipidique supportée[28]. Il est à noter qu'aucune particule nue n'a été observée sur l'ensemble des photos prises à cette valeur de X_S.

La structure et l'apparence de la bicouche lipidique, représentée schématiquement en *Figure 6c*, ont été rapportées dans la littérature[22,28,41]. Les têtes hydrophiles apparaissent noires sur les images de cryoMET alors que les chaines aliphatiques ont un contraste faible, et sont donc claires sur les photos. Généralement, la BLS n'est pas décrite comme adsorbée directement sur la particule, mais séparée de cette dernière par une fine couche de molécules d'eau organisées, d'épaisseur comprise entre 0.5 et 1 nm. Sur les images de cryoMET, le feuillet externe de la bicouche ainsi que les chaines hydrophobes interpénétrées sont bien visibles (cf *Figure 6b et c*, anneaux noirs et blancs respectivement autour des Nps). En revanche, le feuillet interne de la bicouche ainsi que l'eau piégée entre la BLS et la particule ne sont généralement pas observées. Le pourtour des particules semble cependant légèrement plus sombre que le reste. Ceci pourrait correspondre aux têtes polaires du feuillet interne de la bicouche de phospholipides. Dans ce cas, le tracé d'un profil d'intensité permettrait de mesurer l'épaisseur de la BLS.

b) Détermination de l'épaisseur de la BLS

La *Figure 7a* représente une partie de nanoBLS observée en cryoMET à fort grandissement. Le profil d'intensité est mesuré le long de la flèche noire, de la particule vers l'arrière-plan. La *Figure 7b* illustre le profil d'intensité obtenu.

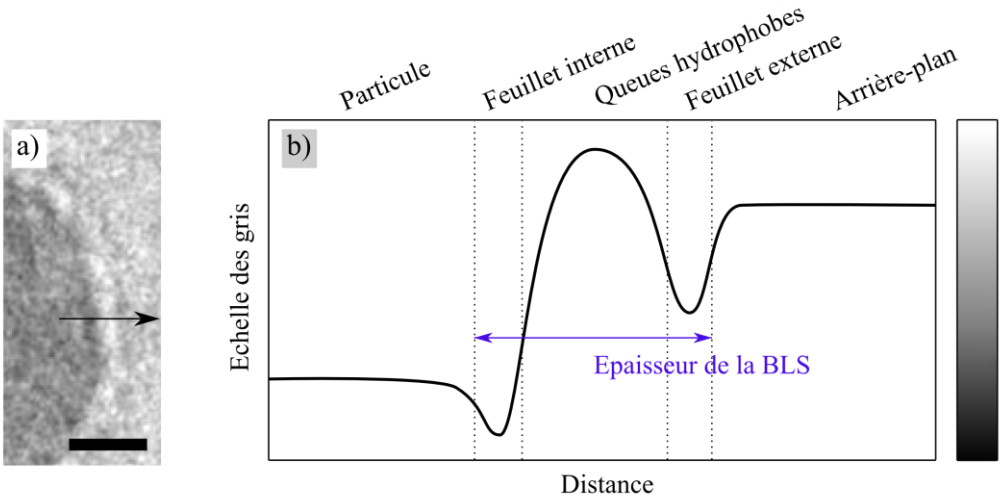


Figure 7 : a) Agrandissement d'une nanoBLS observée en cryoMET. Barre d'échelle : 10 nm. La flèche représente la ligne suivant laquelle le profil d'intensité est mesuré. b) Représentation schématique des profils d'intensités obtenus. Echelle des gris arbitraire, servant d'illustration.

De gauche à droite, il commence par un plateau dans les gris foncés, correspondant à la particule. Ensuite, le gris s'assombrit, marquant le passage des têtes polaires du feuillet interne. Puis les couleurs deviennent claires, voir blanches, avant de s'assombrir à nouveau. Ces deux variations traduisent la présence des chaines hydrophobes puis des têtes polaires du feuillet externe. Pour finir, le profil d'intensité se stabilise vers un gris clair, caractéristique de l'arrière-plan de l'image. La distance entre la Np et le feuillet externe donne alors l'épaisseur de la BLS. L'analyse de profils d'intensités, effectuée sur plus de 20 nanoBLSs, révèle que 5.2 ± 0.6 nm séparent le substrat du feuillet externe. Cette valeur est en adéquation avec les épaisseurs de BLSs décrites dans la littérature[28].

c) Présence de vésicules après formulation des nanoBLSs

Les nanoBLSs sont formulées avec un excès surfacique de membrane. Ces bicouches en excès donnent spontanément naissance à des vésicules de 75 nm lorsqu'elles sont soniquées (*Figure 6a*). Puisque la suspension n'est pas purifiée, il est important de vérifier que le nombre de vésicules restantes est négligeable devant la quantité de nanoBLSs formulées. Les nanoBLSs, préparées à $X_S = 2$, sont observées à faible grossissement en cryoMET (**Annexe B**). Sur 800 objets dénombrés, seuls 5% sont des vésicules. Ce résultat est en accord avec nos prédictions (Chapitre 2).

En conclusion, nous avons réussi à recouvrir les particules Silica (+) par une bicouche phospholipidique de Curosurf, tout en maintenant négligeable le nombre de vésicules rémanentes. La présence des protéines SP-B et SP-C dans la BLS est probable[26], mais des expériences supplémentaires sont nécessaires pour valider ou infirmer cette supposition.

IV. Stabilité des nanoBLSs

Il est important d'étudier la stabilité des nanoBLSs et d'estimer si elles peuvent être conservées dans le temps. Le potentiel zéta et la taille des nanoBLSs préparées à $X_S = 2$ sont suivis sur 20 jours, après dilution à 0.1 g L^{-1} dans de l'eau MilliQ.

La *Figure 8* montre que ces deux grandeurs restent respectivement autour de 80 nm et –30 mV environ. Ces données suggèrent que les nanoBLSs restent stables au moins 3 semaines après leur préparation. Les nanoBLSs sont diluées par du DMEM et conservées à 37 °C pendant 7 jours. La *Figure 8* montre que la taille, qui est de 90 nm, reste stable. Les nanoBLSs n'agrègent donc pas dans le milieu de culture. Ces résultats sont importants pour les expériences de biologie cellulaire car il a été montré que la réponse des cellules aux nanomatériaux dépend de leur état d'agrégation[42,43].

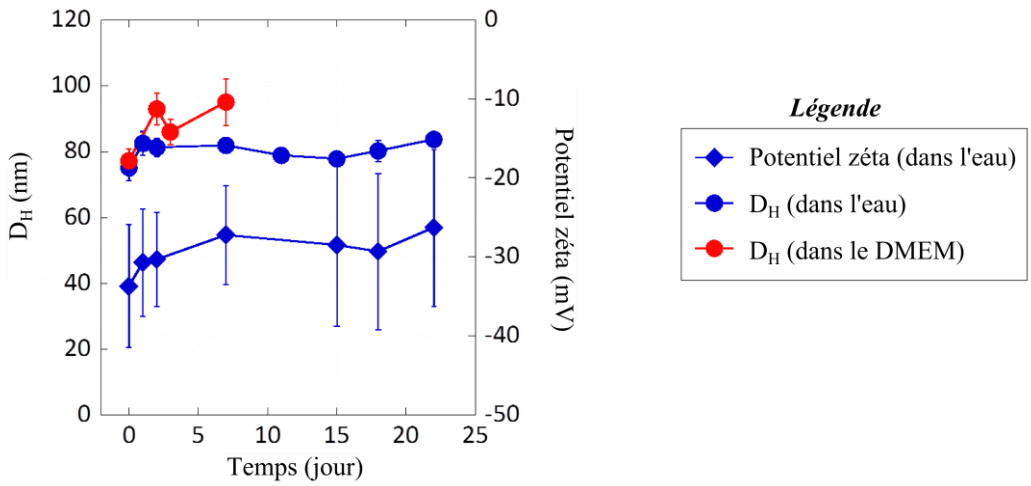


Figure 8 : Diamètre hydrodynamique et potentiel zéta, en fonction du temps, des nanoBLSs préparées à $X_S = 2$, et diluées à 0.1 g L^{-1} dans de l'eau MilliQ ou dans du DMEM.

V. Interaction entre nanoBLSs et surfactant pulmonaire

Nous faisons l'hypothèse que les nanoBLSs que nous avons formulées sont similaires aux structures formées lorsque les particules s'enrobent de phospholipides en traversant l'interface air-liquide au niveau des alvéoles. Les nanoBLSs constituent donc un modèle permettant d'étudier le devenir de ces particules quand elles atteignent l'hypothase du surfactant. Il est important de caractériser l'interaction entre nanoBLSs et SP car elle détermine le comportement des cellules pulmonaires vis-à-vis des particules enrobées.

Lorsque les humains sont exposés à des particules inhalées, le surfactant est en large excès[44]. Nous définissons le rapport massique X par :

$$X = \frac{Masse_{Curosurf}}{Masse_{Nps}}$$

Au quotidien, chez l'homme, X est généralement compris entre 10^3 et 10^4. Ainsi, la dispersion nanoBLSs/SP est très proche du surfactant seul. Les interactions entre particules et vésicules sont alors difficiles à mesurer[21]. Pour contourner ce problème, le diagramme de phases du système mixte nanoBLSs/Curosurf est étudié pour des valeurs de X comprises entre 10^{-3} et 10^3. Pour $X = 10^{-3}$, seules les nanoBLSs sont présentes alors que pour $X = 10^3$, il n'y a que des vésicules de Curosurf. Pour X compris entre ces deux valeurs, les nanoBLSs et les vésicules sont mélangées en proportions variables. Cette méthode, détaillée au Chapitre 2, a été testée avec succès lors de criblages de diagrammes de phases[45,46].

La *Figure 9* montre le nombre de Rayleigh des systèmes mixtes nanoBLSs/Curosurf en fonction du rapport X. L'expérience est menée à 37 °C pour se rapprocher des conditions physiologiques. La ligne continue rouge représente le cas d'un système sans interaction. Les données montrent que les points expérimentaux se superposent à la

courbe calculée, preuve que les nanoBLSs n'interagissent pas de manière notable avec le Curosurf.

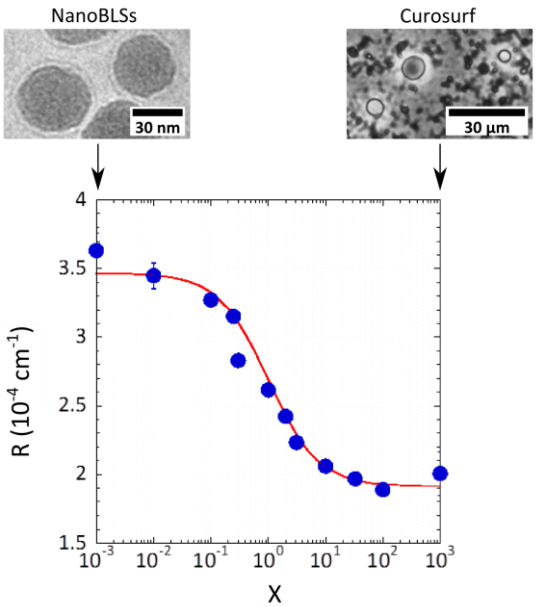


Figure 9 : Nombre de Rayleigh en fonction du rapport X pour des suspensions nanoBLSs/Curosurf à 37 °C. La courbe rouge représente le cas d'un système sans interaction.

VI. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons déposé une bicouche de Curosurf sur des nanoparticules de silice positive. La formulation de ces objets, appelés nanoBLSs, a été optimisée afin de minimiser la quantité de membranes de surfactant pulmonaire en suspension après sonication. *In vivo*, lorsque les particules traversent l'interface air-liquide des alvéoles, elles peuvent être enrobées de phospholipides et/ou de protéines. Les nanoBLSs sont supposées reproduire l'état de surface de ces particules.

Une fois dans l'hypophase, les particules enrobées sont susceptibles d'interagir avec les vésicules présentes. Pour reproduire ce phénomène, les nanoBLSs ont été mélangées avec du Curosrf et aucune interaction significative n'a été mesurée. Les nanoBLSs seraient donc dispersées dans l'hypophase du surfactant pulmonaire.

Annexe A : Calcul de l'épaisseur de l'enrobage des nanoBLSs

En DCS, les particules sont injectées dans un disque en rotation contenant un gradient de sucrose. Elles sédimentent à travers le gradient, plus ou moins vite selon leur taille, leur densité et leur forme. En fin de course, elles sont détectées par un laser, et l'absorbance est tracée en fonction du temps de parcours t.
L'équation de Stokes-Einstein permet de relier t au diamètre des particules :

$$t = \frac{C}{(\rho_{Np} - \rho_0) D_{Np}^2} \quad (1)$$

Avec :

C	:	constante dépendant du gradient
ρ_{Np}	:	masse volumique des particules nues
ρ_0	:	masse volumique moyenne du gradient de sucrose
D_{Np}	:	diamètre des particules

Ce calcul sous-entend que tous les objets injectés ont la même densité et que les particules sont sphériques.
Pour une nanoBLS, l'équation de Stokes-Einstein s'écrit sous la forme :

$$t = \frac{C}{(\rho_{nanoBLS} - \rho_0) D_{nanoBLS}^2} \quad (2)$$

Avec :

$\rho_{nanoBLS}$	:	masse volumique des nanoBLSs
$D_{nanoBLS}$	:	diamètre des nanoSLBs

Dans le logiciel fourni avec la DCS, nous entrons manuellement la masse volumique des nanoBLSs. Le diamètre mesuré est alors donné par l'équation :

$$t = \frac{C}{(\rho_{DCS} - \rho_0) D_{DCS}^2} \quad (3)$$

Avec :

ρ_{DCS}	:	masse volumique des nanomatériaux entrée dans le logiciel
D_{DCS}	:	diamètre mesuré en DCS

Puisque les nanoBLSs sont injectées dans la DCS, les équations (2) et (3) peuvent êtres égalisées.
D'où :

$$\frac{C}{(\rho_{nanoBLS} - \rho_0) D_{nanoBLS}^2} = \frac{C}{(\rho_{DCS} - \rho_0) D_{DCS}^2} \quad (4)$$

Soit

$$(\rho_{nanoBLS} - \rho_0)D_{nanoBLS}^2 = (\rho_{DCS} - \rho_0)D_{DCS}^2 \quad (5)$$

Calculons $\rho_{nanoBLS}$:

$$\rho_{nanoBLS} = \frac{m_{Np} + m_{BLS}}{V_{nanoBLS}} \quad (6)$$

Avec :

m_{Np}	:	masse d'une particule
m_{BLS}	:	masse de l'enrobage
$V_{nanoBLS}$	:	volume d'une nanoBLS

Donc :

$$\rho_{nanoBLS} = \frac{\rho_{Np}V_{Np} + \rho_{BLS}V_{BLS}}{V_{nanoBLS}} \quad (7)$$

Avec

V_{Np}	:	volume d'une particule
ρ_{BLS}	:	masse volumique de l'enrobage
V_{BLS}	:	volume de l'enrobage

Ainsi :

$$\rho_{nanoBLS} = \frac{\rho_{Np}\,\tfrac{4}{3}\pi(\tfrac{D_{Np}}{2})^3 + \rho_{BLS}(\tfrac{4}{3}\pi(\tfrac{D_{nanoBLS}}{2})^3 - \tfrac{4}{3}\pi(\tfrac{D_{Np}}{2})^3)}{\tfrac{4}{3}\pi(\tfrac{D_{nanoBLS}}{2})^3} \quad (8)$$

Donc :

$$\rho_{nanoBLS} = \frac{\rho_{Np}D_{Np}^3 + \rho_{BLS}(D_{nanoBLS}^3 - D_{Np}^3)}{D_{nanoBLS}^3} \quad (9)$$

Soit :

$$\rho_{nanoBLS} = \frac{D_{nanoBLS}^3\rho_{BLS} + D_{Np}^3(\rho_{Np} - \rho_{BLS})}{D_{nanoBLS}^3} \quad (10)$$

En injectant l'équation (10) dans l'équation (5), on obtient :

$$(\rho_{DCS} - \rho_0)D_{DCS}^2 = (\frac{D_{nanoBLS}^3\rho_{BLS} + D_{Np}^3(\rho_{Np} - \rho_{BLS})}{D_{nanoBLS}^3} - \rho_0)D_{nanoBLS}^2 \quad (11)$$

Donc :

$$(\rho_{DCS} - \rho_0)D_{DCS}^2 D_{nanoBLS}^3 = (D_{nanoBLS}^3\rho_{BLS} + D_{Np}^3(\rho_{Np} - \rho_{BLS}) - \rho_0 D_{nanoBLS}^3)D_{nanoBLS}^2 \quad (12)$$

Et :

$$(\rho_{DCS} - \rho_0)D_{DCS}^2 D_{nanoBLS} = (D_{nanoBLS}^3\rho_{BLS} + D_{Np}^3(\rho_{Np} - \rho_{BLS}) - \rho_0 D_{nanoBLS}^3) \quad (13)$$

Et :

$$(\rho_0 - \rho_{BLS})D_{nanoBLS}^3 + (\rho_{DCS} - \rho_0)D_{DCS}^2 D_{nanoBLS} + (\rho_{BLS} - \rho_{Np})D_{Np}^3 = 0 \quad (14)$$

On obtient alors l'équation du 3è degré suivante :

$$AD_{nanoBLS}^3 + CD_{nanoBLS} + D = 0 \, (15)$$

Avec :

$$A = (\rho_0 - \rho_{BLS})$$
$$C = (\rho_{DCS} - \rho_0)D_{DCS\max}^2$$
$$D = (\rho_{BLS} - \rho_{Np})D_{Np}^3$$

Si on suppose la valeur de ρ_{BLS}, il suffit de résoudre l'équation (15) avec la méthode de Cardan pour calculer $D_{nanoBLS}$ et obtenir l'épaisseur de la bicouche lipidique supportée.

Annexe B : Nombre de vésicules restantes après formulation des nanoBLSs

La *Figure 10* montre la suspension Silica (+)/Curosurf préparée à $X_S = 2$, soniquée et observée en cryoMET à faible grossissement. Les nanoBLSs et les vésicules présentes sur cette image sont comptées. Une statistique sur 800 objets montre que la suspension contient 5% de vésicules.

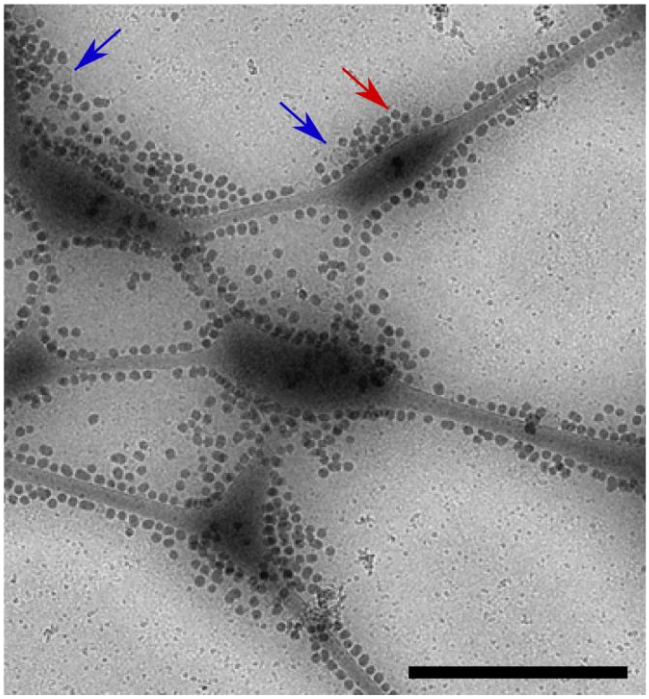


Figure 10 : Image de cryoMET, à faible grossissement, de la suspension Silica (+)/Curosurf préparée à $X_S = 2$, puis soniquée. Les flèches bleues indiquent des vésicules unilamellaires de 50 à 100 nm de diamètre. La flèche rouge pointe sur une nanoBLS. Barre d'échelle : 1 µm.

Bibliographie

1. Tsuda A. & Gehr, P. in *Nanoparticles in the lung - Environmental exposure and drug delivery (Chapter 3)* 21–46 (Taylor & Francis Group, 2015).
2. Ruge, C. A. *et al.* Uptake of nanoparticles by alveolar macrophages is triggered by surfactant protein A. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **7,** 690–693 (2011).
3. Gasser, M. *et al.* Pulmonary surfactant coating of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) influences their oxidative and pro-inflammatory potential *in vitro*. *Part Fibre Toxicol* **9,** 17–29 (2012).
4. Cho, W.-S. *et al.* Zeta potential and solubility to toxic ions as mechanisms of lung inflammation caused by metal/metal oxide nanoparticles. *Toxicol. Sci.* **126,** 469–477 (2012).
5. Ruge, C. A. *et al.* The interplay of lung surfactant proteins and lipids assimilates the macrophage clearance of nanoparticles. *PLoS ONE* **7,** 40775–40784 (2012).
6. Schleh, C. *et al.* Surfactant protein D modulates allergen particle uptake and inflammatory response in a human epithelial airway model. *Respir Res* **13,** 18–27 (2012).
7. Vranic, S. *et al.* Internalization of SiO_2 nanoparticles by alveolar macrophages and lung epithelial cells and its modulation by the lung surfactant substitute Curosurf®. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **20,** 2761–2770 (2013).
8. Ratoi, M., Hoet, P. H. M., Crossley, A. & Dobson, P. Impact of lung surfactant on wettability and cytotoxicity of nanoparticles. *RSC Adv.* **4,** 20573–20581 (2014).
9. Thorley, A. J., Ruenraroengsak, P., Potter, T. E. & Tetley, T. D. Critical determinants of uptake and translocation of nanoparticles by the human pulmonary alveolar epithelium. *ACS Nano* **8,** 11778–11789 (2014).
10. Sweeney, S. *et al.* Silver nanowire interactions with primary human alveolar type-II epithelial cell secretions: Contrasting bioreactivity with human alveolar type-I and type-II epithelial cells. *Nanoscale* **7,** 10398–10409 (2015).
11. Murphy, A., Sheehy, K., Casey, A. & Chambers, G. The surfactant dipalmitoylphophatidylcholine modifies acute responses in alveolar carcinoma cells in response to low-dose silver nanoparticle exposure: DPPC modifies acute response of low dose AgNP exposure. *J. Appl. Toxicol.* **35,** 1141–1149 (2015).
12. Kasper, J. Y. *et al.* Pulmonary surfactant augments cytotoxicity of silica nanoparticles: Studies on an *in vitro* air–blood barrier model. *Beilstein J. Nanotechnol.* **6,** 517–528 (2015).
13. Kapralov, A. A. *et al.* Adsorption of surfactant lipids by single-walled carbon nanotubes in mouse lung upon pharyngeal aspiration. *ACS Nano* **6,** 4147–4156 (2012).
14. Choe, S., Chang, R., Jeon, J. & Violi, A. Molecular dynamics simulation study of a pulmonary surfactant film interacting with a carbonaceous nanoparticle. *Biophys. J.* **95,** 4102–4114 (2008).

15. Svensson, C. R. *et al.* Direct deposition of gas phase generated aerosol gold nanoparticles into biological fluids - Corona formation and particle size shifts. *PLoS ONE* **8,** 74702–74712 (2013).
16. Hu, G. *et al.* Physicochemical properties of nanoparticles regulate translocation across pulmonary surfactant monolayer and formation of lipoprotein corona. *ACS Nano* **7,** 10525–10533 (2013).
17. Lin, X., Bai, T., Zuo, Y. Y. & Gu, N. Promote potential applications of nanoparticles as respiratory drug carrier: Insights from molecular dynamics simulations. *Nanoscale* **6,** 2759–2767 (2014).
18. Hu, Q. *et al.* Effects of graphene oxide nanosheets on the ultrastructure and biophysical properties of the pulmonary surfactant film. *Nanoscale* **7,** 18025–18029 (2015).
19. Lin, X., Zuo, Y. Y. & Gu, N. Shape affects the interactions of nanoparticles with pulmonary surfactant. *Sci. China Mater.* **58,** 28–37 (2015).
20. Yue, T., Wang, X., Zhang, X. & Huang, F. Molecular modeling of interaction between lipid monolayer and graphene nanosheets: Implications for pulmonary nanotoxicity and pulmonary drug delivery. *RSC Adv* **5,** 30092–30106 (2015).
21. Raesch, S. S. *et al.* Proteomic and lipidomic analysis of nanoparticle corona upon contact with lung surfactant reveals differences in protein, but not lipid composition. *ACS Nano* **9,** 11872–11885 (2015).
22. Le Bihan, O. *et al.* Cryo-electron tomography of nanoparticle transmigration into liposome. *J. Struct. Biol.* **168,** 419–425 (2009).
23. Tamm, L. K. & McConnell, H. M. Supported phospholipid bilayers. *Biophys. J.* **47,** 105–113 (1985).
24. Richter, R. P., Bérat, R. & Brisson, A. R. Formation of solid-supported lipid bilayers: An integrated view. *Langmuir* **22,** 3497–3505 (2006).
25. Brian, A. A. & McConnell, H. M. Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81,** 6159–6163 (1984).
26. Granéli, A., Rydström, J., Kasemo, B. & Höök, F. Formation of supported lipid bilayer membranes on SiO_2 from proteoliposomes containing transmembrane proteins. *Langmuir* **19,** 842–850 (2003).
27. Wang, F. *et al.* Profiling metal oxides with lipids: Magnetic liposomal nanoparticles displaying DNA and proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55,** 12063–12067 (2016).
28. Mornet, S., Lambert, O., Duguet, E. & Brisson, A. The formation of supported lipid bilayers on silica nanoparticles revealed by cryoelectron microscopy. *Nano Lett.* **5,** 281–285 (2005).
29. Tabaei, S. R. *et al.* Formation of cholesterol-rich supported membranes using solvent-assisted lipid self-assembly. *Langmuir* **30,** 13345–13352 (2014).
30. Boudard, S., Seantier, B., Breffa, C., Decher, G. & Felix, O. in *Thin Solid Films* **495,** 246–251 (2006).

31. Cho, N.-J., Jackman, J. A., Liu, M. & Frank, C. W. pH-driven assembly of various supported lipid platforms: A comparative study on silicon oxide and titanium oxide. *Langmuir* **27,** 3739–3748 (2011).
32. Reimhult, E., Höök, F. & Kasemo, B. Temperature dependence of formation of a supported phospholipid bilayer from vesicles on SiO_2. *Phys. Rev. E* **66,** 51905 (2002).
33. Liu, J. Interfacing zwitterionic liposomes with inorganic nanomaterials: Surface forces, membrane integrity, and applications. *Langmuir* **32,** 4393–4404 (2016).
34. Hayat, M. A. in *Principles and techniques of electron microscopy: Biological applications* **4th ed,** 545 (2000).
35. Lind, T. K., Cárdenas, M. & Wacklin, H. P. Formation of supported lipid bilayers by vesicle fusion: Effect of deposition temperature. *Langmuir* **30,** 7259–7263 (2014).
36. Kučerka, N., Nieh, M.-P. & Katsaras, J. Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1808,** 2761–2771 (2011).
37. Monopoli, M. P., Pitek, A. S., Lynch, I. & Dawson, K. A. in *Nanomaterial interfaces in Biology* **1025,** 137–155 (Humana Press, 2013).
38. Docter, D. *et al.* Quantitative profiling of the protein coronas that form around nanoparticles. *Nat. Protoc.* **9,** 2030–2044 (2014).
39. Monopoli, M. P., Wan, S., Bombelli, F. B., Mahon, E. & Dawson, K. A. Comparisons of nanoparticle protein corona complexes isolated with different methods. *Nano LIFE* **3,** 1343004 (2013).
40. Krpetić, Ž. *et al.* High-resolution sizing of monolayer-protected gold clusters by Differential Centrifugal Sedimentation. *ACS Nano* **7,** 8881–8890 (2013).
41. Kumar, A. *et al.* Enrichment of immunoregulatory proteins in the biomolecular corona of nanoparticles within human respiratory tract lining fluid. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **12,** 1033–1043 (2016).
42. Porter, D. *et al.* A biocompatible medium for nanoparticle dispersion. *Nanotoxicology* **2,** 144–154 (2008).
43. Braakhuis, H. M., Park, M. V., Gosens, I., De Jong, W. H. & Cassee, F. R. Physicochemical characteristics of nanomaterials that affect pulmonary inflammation. *Part. Fibre Toxicol.* **11,** 18 (2014).
44. Schleh, C. *et al.* The effect of titanium dioxide nanoparticles on pulmonary surfactant function and ultrastructure. *Respir. Res.* **10,** 90–100 (2009).
45. Berret, J.-F. Stoichiometry of electrostatic complexes determined by Light Scattering. *Macromolecules* **40,** 4260–4266 (2007).
46. Berret, J.-F., Yokota, K., Morvan, M. & Schweins, R. Polymer—nanoparticle complexes: From dilute solution to solid state. *J. Phys. Chem. B* **110,** 19140–19146 (2006).

Chapitre 5
Interaction entre particules et hypophase
-
Cas des particules nues

Table des matières

I. Introduction 153
II. Interaction entre particules nues et surfactants pulmonaires 153
1) Surfactants pulmonaires, particules et températures de travail 154
2) Interaction entre surfactant pulmonaire et particules Alumina (+) 154
3) Généralisation de l'interaction entre particules nues et surfactants 155
a) Résultats 156
b) Cas des particules positives 156
c) Cas des particules négatives 157
d) Conclusion 158
III. Structures issues de l'interaction entre nanoparticules et Curosurf 158
1) Méthodes expérimentales 158
2) Microscopie optique 159
a) Curosurf natif et Silica (-) 159
b) Curosurf extrudé et Alumina (+) 160
c) Curosurf natif et Silica (+) 160
3) Microscopie électronique à transmission 162
a) Curosurf extrudé et Alumina (+) 162
b) Curosurf extrudé et Silica (+) 163
4) Microscopie cryo-électronique à transmission 164
a) Curosurf natif et Silica (+) 164
b) Curosurf extrudé et Silica (+) 165
c) Curosurf natif et Silica (-) 165
IV. Conclusion 167
Annexe A : Interaction entre Curosurf natif et Latex 1 (-) 169
Annexe B : Résumé des données 170
Bibliographie 171

I. Introduction

Lors de leur arrivée dans les alvéoles, les nanoparticules (Nps) entrent en contact avec le surfactant pulmonaire (SP). En traversant le film phospholipidique présent à l'interface, elle peuvent ou non être couvertes par les biomolécules du surfactant[1–9]. Dans le chapitre précédent nous avons examiné la possibilité de formation d'une membrane supportée et les conditions de son obtention. Ici, nous envisageons le scénario où les Nps arrivent nues dans l'hypophase. Dans la majorité des travaux étudiant l'interaction entre particules et vésicules de phospholipides, les Nps et le surfactant sont directement mélangés[10–13]. Ces études se placent implicitement dans le cas de figure investigué dans ce chapitre (*Figure 1*).

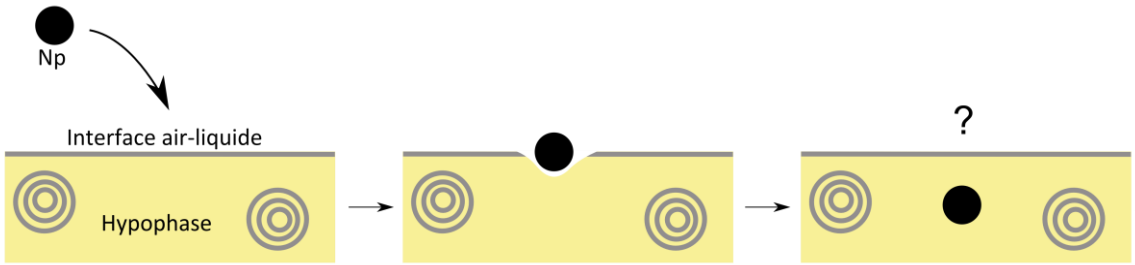


Figure 1 : Représentation schématique de l'entrée des nanoparticules dans l'hypophase du surfactant pulmonaire, sans adsorption de biomolécules sur la particule.

Pour certains, le surfactant pulmonaire modifie l'état d'agrégation des Nps[14,15] et donne lieu à la formation d'agrégats mixtes. Pour d'autres, une ou plusieurs bicouches de phospholipides et/ou protéines se forment autour des nanomatériaux. Bien que l'interaction entre particules et surfactant ait été effectivement démontrée[10–14,16,17], les données actuelles restent insuffisantes pour en avoir une compréhension complète. Dans ce chapitre, nous étudions des mélanges entre particules nues et fluide pulmonaire, pour deux types de Nps (oxyde d'aluminium et de silicium). *In fine*, nous déterminons les forces d'interaction entre les différents systèmes et nous caractérisons par microscopie les structures hybrides obtenues.

Il est à noter que les résultats obtenus dans ce chapitre sur les particules Alumina (+) sont résumés dans notre publication « Mousseau *et al.*, Langmuir, 31, 2015 » (cf p 217).

II. Interaction entre particules nues et surfactants pulmonaires

Lors d'une exposition par inhalation à des nanoparticules manufacturées, le surfactant pulmonaire est supposé être en large excès[10]. Ainsi, le rapport massique entre surfactant et particules, défini par X dans le chapitre précédent, est compris entre 10^3 et 10^4. La

dispersion Nps/SP est très proche du surfactant seul et les interactions sont difficiles à mesurer[7]. Pour résoudre ce problème, nous avons déterminé les diagrammes de phase entre nanoparticules et surfactant pulmonaire en faisant varier le rapport X sur une large gamme, typiquement de 10^{-3} et 10^{3}.

1) Surfactants pulmonaires, particules et températures de travail

Comme nous l'avons vu au Chapitre 3, le Curosurf est composé de vésicules phospholipidiques de taille comprise entre quelques dizaines de nanomètres et plusieurs microns. Afin de nous affranchir de cette dispersité pour les expériences de diffusion de la lumière, le Curosurf natif est extrudé avec des membranes de pores 50 nm. De plus, un fluide pulmonaire synthétique est considéré. Ce surfactant synthétique est utilisé dans le but de comprendre le rôle des protéines dans l'interaction Nps/SP. Il est formulé à partir de phospholipides majoritairement présents dans le surfactant naturel et ne contient par conséquent aucune des protéines du Curosurf.

Parmi les sept Nps utilisées dans la thèse, nous avons sélectionné les Alumina (+) et les Silica (-) pour leur nocivité importante reconnue chez l'humain[18–21]. Par comparaison, les Silica (+) sont aussi considérées dans cette étude. Les expériences sont enfin menées à 25 °C et 37 °C, de part et d'autre de la transition liquide – gel des membranes de Curosurf (Chapitre 3).

2) Interaction entre surfactant pulmonaire et particules Alumina (+)

Les diagrammes de phase entre les Alumina (+) et les trois types de surfactants modèles sont déterminés à 25 °C pour des solutions à 0.1 g L^{-1}. L'intensité diffusée et le diamètre hydrodynamique D_H sont représentés en fonction du rapport massique X aux *Figure 2a-c* et *Figure 2d-f* respectivement. Les courbes continues noires sont calculées en supposant que les vésicules et les particules n'interagissent pas entre elles. L'intensité diffusée dans ce cas est la somme des intensités de chaque composé, pondérées par leur concentration.

Les *Figure 2a-c* montrent que l'intensité diffusée par les dispersions Nps/SP est systématiquement plus élevée que la prédiction faite pour des systèmes sans interaction. Les pics observés sont le signe d'une interaction entre les particules et les surfactants pulmonaires modèles. Les diamètres hydrodynamiques $D_H(X)$ montrés en *Figure 2d-f* présentent également des maxima. Leurs positions en X coïncident avec celles obtenues en intensité. Le D_H atteint respectivement 2 µm, 200 nm et 1.5 µm pour les systèmes Nps/surfactant synthétique, Nps/Curosurf extrudé et Nps/Curosurf natif. Cette augmentation de taille résulte probablement de la formation d'agrégats. Pour le système Alumina (+)/Curosurf natif, le pic est plus large et les barres d'erreurs sont plus grandes que dans les deux autres cas. Ce résultat est lié à la forte dispersité en taille des vésicules de Curosurf.

La *Figure 2g* montre l'histogramme des forces d'interaction entre Alumina (+) et surfactants. Cette force est calculée à partir de l'aire comprise entre les courbes d'intensité diffusée et celles des systèmes sans interaction, après normalisation de ces dernières (aires colorées sur les *Figure 2a-c*). Cette approche montre que l'interaction Alumina (+)/SP est plus forte avec le surfactant synthétique qu'avec le Curosurf extrudé. Elle est la moins forte avec le Curosurf natif. Ces résultats sont en accord avec les données de tailles illustrées en *Figure 2d-f*, qui montrent une augmentation de 1 500%, 80% et 50% par rapport aux vésicules de surfactant synthétique, de Curosurf extrudé et de Curosurf natif.

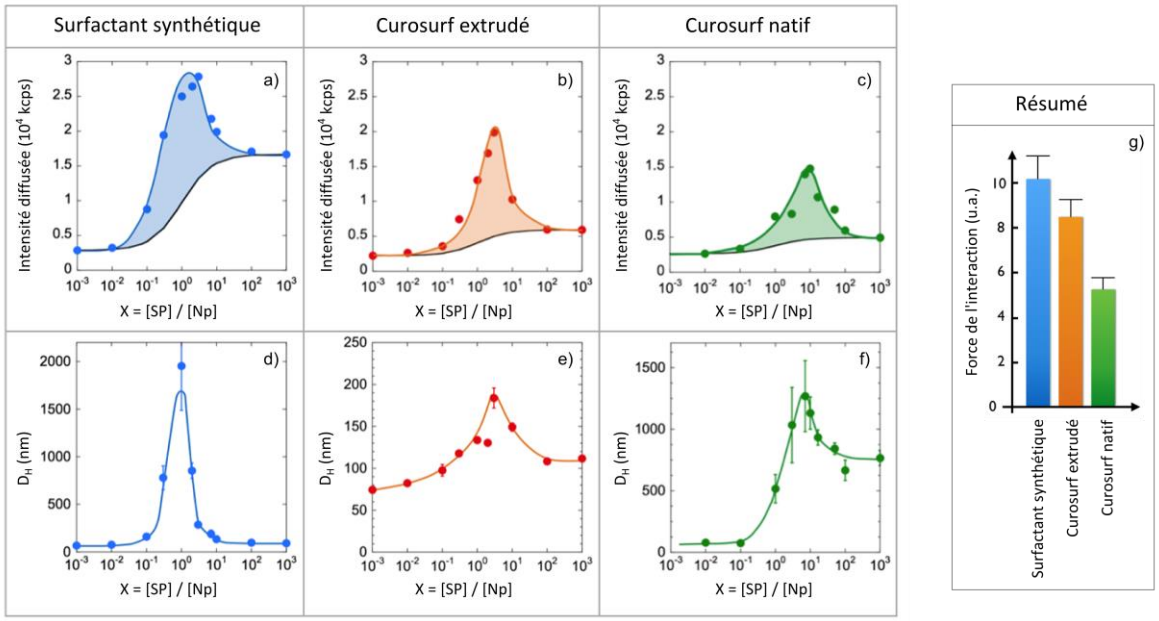


Figure 2 : Intensité diffusée (a, b, c) et diamètre hydrodynamique (d, e, f) des suspensions mixtes entre Alumina (+) et surfactant synthétique (a, d), Curosurf extrudé (b, e) et Curosurf natif (c, f) en fonction de X (T = 25 °C). X représente le rapport des concentrations massiques du surfactant et des particules. Les mesures sont effectuées en triplicata. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard moyenne. Les lignes pleines bleues, rouges et vertes sont des guides pour des yeux. Les lignes noires représentent l'intensité diffusée calculée en cas de non-interaction entre particules et vésicules. g) Intégrales, par rapport à X, de l'aire entre les courbes d'intensité expérimentales normalisées, correspondants aux aires colorées sur les figures a-c.

3) Généralisation de l'interaction entre particules nues et surfactants

Les diagrammes de phase incluant les particules Alumina (+), Silica (+), Silica (-), le Curosurf natif, le Curosurf extrudé et le surfactant synthétique sont déterminés à 25 °C et 37 °C.

a) Résultats

Des expériences de diffusion de lumière similaires à celles de la *Figure 2* permettent de mettre en évidence une interaction forte entre les particules positives et les trois types de surfactant étudiés. En revanche, il y a peu ou pas d'interaction avec les particules négativement chargées. Le *Tableau 1* résume les caractéristiques des particules, des surfactants pulmonaires et des couples Nps/SP. Les valeurs de X correspondant au maxima de diffusion et notées X_{max} y sont rapportées. La *Figure 3* représente les forces d'interaction obtenues par la méthode d'intégration décrite précédemment. Elles sont comprises entre 0 et 12 L g^{-1}.

					Surfactant synthétique	Curosurf extrudé	Curosurf natif	
Nps	D_H (nm)	Charge (e nm^{-2})	Concentration (10^{16} vésicules L^{-1})		8.5	1.9	0.07	
Alumina (+)	64	+7.3	X_{max}	25°C	1.4	3.6	8.5	Interaction
				37°C	1.7	14.6	14.0	
Silica (+)	60	+0.6		25°C	0.3	0.3	0.9	
				37°C	0.35	0.9	2.6	
Silica (-)	34	-0.3		25°C	-	-	0.5	
				37°C	-	-	1.5	

Tableau 1 : Récapitulatif des diamètres hydrodynamiques et des charges structurales des particules d'alumine et de silice, de la concentration en nombre de vésicules des trois surfactants modèles de l'étude et des X_{max} obtenus pour les différents systèmes Nps/SP.

b) Cas des particules positives

Comme le montre la *Figure 3*, l'interaction Nps/SP mesurée à 25 °C est plus faible avec les Silica (+) qu'avec les Alumina (+), particules dont les densités surfaciques de charges sont respectivement de +0.6 et +7.3 *e* nm^{-2}. Par ailleurs, la force d'interaction diminue lorsqu'on passe du surfactant synthétique au Curosurf extrudé et au Curosurf natif pour une même Np (*Figure 3a,d,g* et *Figure 3b,e,h*). Si on se réfère aux valeurs de potentiels zéta mesurées au Chapitre 3, nous observons donc que l'interaction Nps/SP diminue globalement avec la charge du surfactant. Les deux résultats précédents suggèrent que l'association entre nanoparticules et surfactant pulmonaire est contrôlée par des interactions d'origine électrostatique.

De plus, la force d'interaction entre particules et surfactant synthétique croît et X_{max} est invariant quand la température augmente (*Tableau 1*). Les données varient de façon inverse lors de l'utilisation du Curosurf natif ou extrudé. Ces résultats montrent que la composition du SP modèle modifie fortement l'interaction entre particules et

surfactant. Utiliser un fluide pulmonaire modèle aussi proche que possible des surfactants endogènes est donc primordial.
Pour finir, il est à noter que la taille des vésicules semble avoir peu d'impact sur l'interaction avec les particules, notamment à température physiologique (*Figure 3d,g* et *Figure 3e,h*). Ainsi, extruder le Curosurf ne modifie pas à priori son interaction avec les nanoparticules.

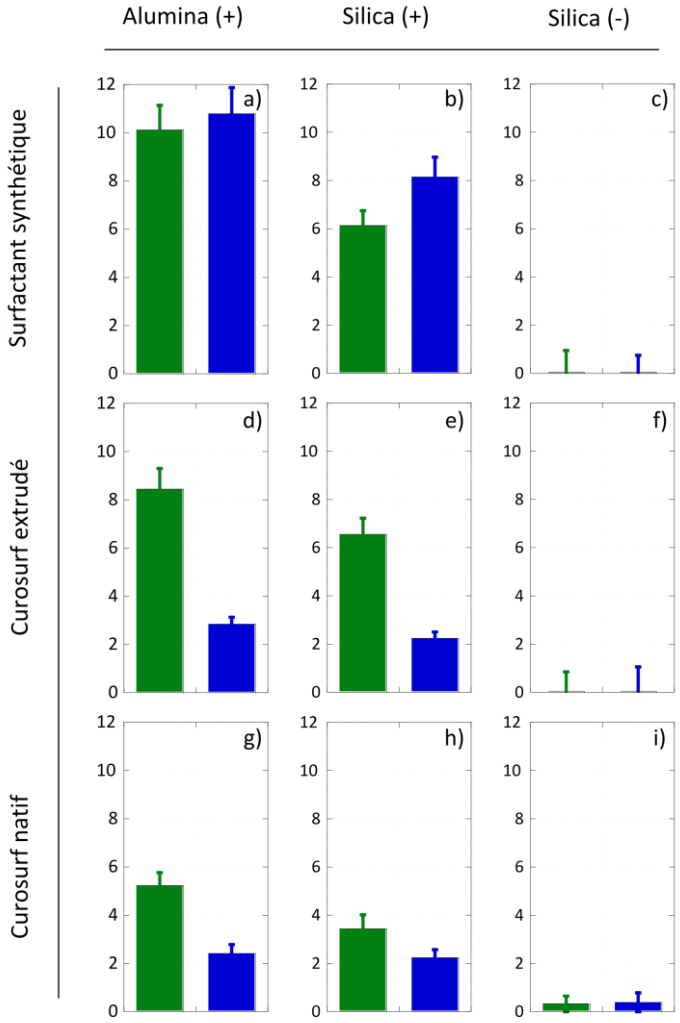


Figure 3 : Force d'interaction (L g^{-1}) mesurée pour les couples Nps/SP à 25 °C (vert) et 37 °C (bleu).

c) Cas des particules négatives

Les Silica (-) n'interagissent pas de manière significative avec le surfactant synthétique chargé négativement (*Figure 3c*). Ce résultat est en bon accord avec les données de la littérature[22]. En revanche, une interaction faible est mesurée entre les particules et le Curosurf natif, lui-même négatif (*Figure 3i*). Cette interaction pourrait venir des protéines transmembranaires positives SP-B et SP-C[23]. Les expériences d'interaction utilisant la diffusion de lumière ont été répétées avec les particules Latex 1 (-). Dans ce

cas précis, aucune interaction n'a été mesurée (**Annexe A**). Les Silica (-) et les Latex 1 (-) ont des charges de surface de -0.31 et -0.048 e nm^{-2} respectivement. L'interaction Nps (-)/Curosurf natif diminue donc avec la charge des particules. Ces données supportent l'hypothèse d'une interaction électrostatique médiée par les protéines SP-B et SP-C du Curosurf.
De façon surprenante, le Curosurf extrudé ne semble pas interagir avec les Silica (-) alors qu'il possède également des protéines SP-B et SP-C (*Figure 3f*). Le principe même de l'extrusion pourrait expliquer ce résultat. Lorsque le Curosurf est extrudé par des pores de 50 nm, les vésicules multilamellaires deviennent unilamellaires. La surface de bicouches « externes » accessibles aux particules augmente. Dans l'hypothèse où les protéines sont majoritairement réparties sur ces bicouches externes du Curosurf natif, la densité de protéines par surface de membrane diminuerait lors de l'extrusion. Ainsi, l'interaction électrostatique due aux protéines membranaires positives serait plus faible lorsque le Curosurf est extrudé.

d) Conclusion

Nous avons montré précédemment que les particules de silice entourées d'une bicouche supportée n'interagissent pas avec les vésicules de Curosurf (Chapitre 4). Nous observons le contraire lorsque ces mêmes particules nues sont dispersées dans le surfactant. Ces résultats soulignent l'importance d'étudier systématiquement l'état des Nps après leur passage à travers l'interface air-liquide des alvéoles.
L'interaction entre nanoparticules et surfactant pulmonaire est principalement d'origine électrostatique[15]. Nous trouvons que l'état de surface des nanoparticules, et en particulier leur charge, influence significativement leur interaction avec les vésicules. En revanche, la taille des vésicules ne semble pas avoir de rôle important à température physiologique. Les protéines SP-B et SP-C pourraient interagir, notamment avec les particules négatives. Les mécanismes exacts de ces interactions restent cependant à déterminer. Pour finir, il apparait indispensable d'utiliser des fluides modèles aussi proches que possible du surfactant naturel pour comprendre l'interaction Nps/SP/cellule.

III. Structures issues de l'interaction entre nanoparticules et Curosurf

1) Méthodes expérimentales

Nous avons montré par diffusion de la lumière que les particules positives interagissent avec le surfactant pulmonaire, contrairement aux particules négatives, et que cette interaction se caractérise par une augmentation significative de taille. Nous cherchons maintenant à caractériser les structures formées. Plusieurs techniques complémentaires sont utilisées afin de couvrir une large gamme d'échelles comprises entre le nanomètre

et la dizaine de microns (*Figure 4*). Dans la suite, nous présentons les résultats obtenus par microscopie optique, microscopie électronique à transmission (MET) et microscopie cryo-électronique à transmission (cryoMET).

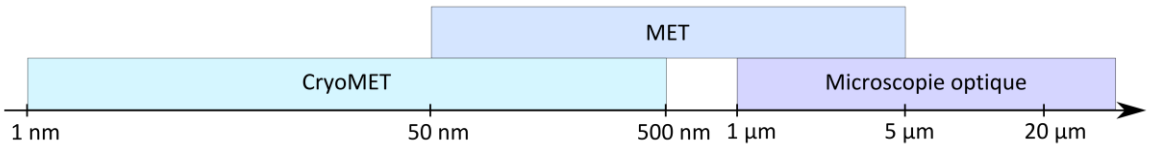


Figure 4 : Echelles spatiales auxquelles nos systèmes Nps/Sp sont observés par différentes techniques de microscopie.

2) Microscopie optique

Les particules Silica (-), Silica (+) et Alumina (+) sont mélangées avec du Curosurf à $X \approx X_{max}$ et à 25 ou 37 °C. Nous nous plaçons ainsi aux maxima de diffusion. Les solutions sont alors observées par microscopie optique à contraste de phase ou à fluorescence.

a) Curosurf natif et Silica (-)

La *Figure 5a* montre le Curosurf natif étudié en microscopie à contraste de phase. Des vésicules de taille supérieure au micromètre sont observées. La *Figure 5b* montre la même solution de Curosurf après interaction avec des Silica (-). Aucune différence entre les deux suspensions n'est décelée, si ce n'est l'effet de la dilution liée à l'ajout des particules. En accord avec les données de diffusion de la lumière, nous observons que l'interaction entre Curosurf et particules de silice négative ne modifie pas l'état de la dispersion du surfactant[22].

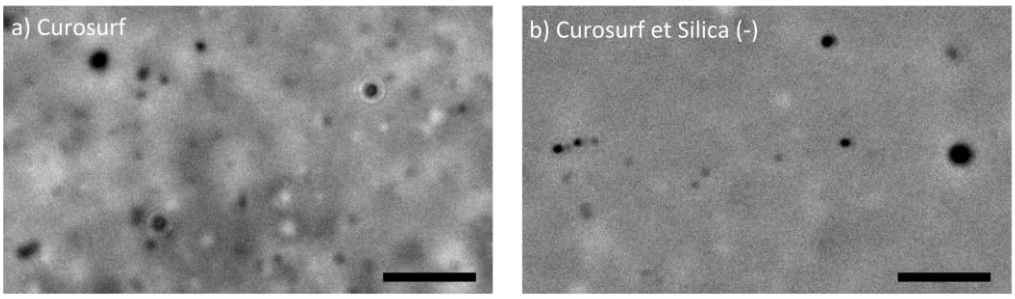


Figure 5 : Images par microscopie optique à contraste de phase (x60). a) Curosurf à 0.1 g L^{-1} dans de l'eau MilliQ. b) Curosurf (0.3 g L^{-1}) et nanoparticules de silice (0.7 g L^{-1}) à X = 0.5 dans de l'eau MilliQ à 25 °C. Barres d'échelle : 10 µm.

b) Curosurf extrudé et Alumina (+)

La Figure 6a montre des vésicules du Curosurf extrudé avec des pores de 800 nm, après complexation avec les particules Alumina (+) puis sédimentation sur la lame de microscopie. Des objets de taille comprise entre 500 nm et 40 µm sont observés. Dans l'encart, nous montrons pour rappel que le Curosurf se présente sous forme de vésicules ponctuelles dispersées. La comparaison de ces deux images permet de conclure que l'interaction entre Alumina (+) et Curosurf se traduit par la formation d'agrégats de taille micrométrique. Ces données sont en accord avec les résultats de diffusion de la lumière, où une augmentation de taille avait été mesurée.

La distribution en taille de ces agrégats est caractérisée par un diamètre moyen de 8.1 ± 6.8 µm (Figure 6b). La taille des agrégats en microscopie optique est supérieure à celle mesurée en diffusion de lumière. Nous attribuons cet effet au phénomène de sédimentation des plus gros amas. Enfin, l'agrandissement d'un agrégat, montré en Figure 6c, permet de discerner la structure « granulaire » de cet objet, et laisse supposer la présence d'une multitude de vésicules.

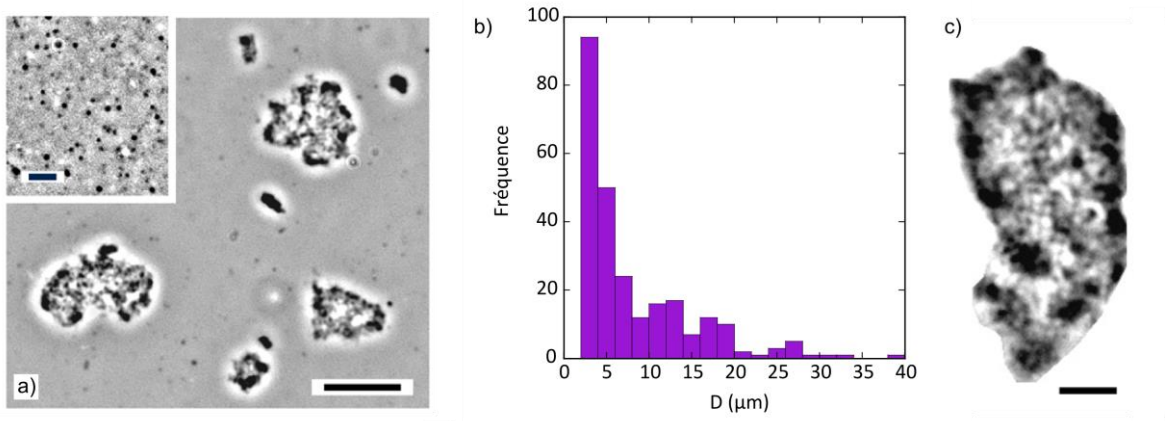


Figure 6 : a) Microscopie optique à contraste de phase (x60) d'une dispersion à X = 7 de vésicules de Curosurf extrudé à 800 nm et de particules Alumina (+). L'échantillon est préparé à 0.1 g L^{-1} et à 25 °C. La lame de verre est recouverte de poly(chlorure de diallyldiméthyl ammonium) pour permettre une meilleure adhésion des vésicules. Barre d'échelle : 20 µm. Encart : vésicules de Curosurf extrudé à 800 nm (barre d'échelle : 5 µm). b) Distribution en taille des agrégats supérieurs à 2 µm de diamètre, faite à partir de plus de 250 mesures. Le diamètre moyen est calculé en considérant les agrégats comme sphériques. Il est de 8.1 ± 6.8 µm. c) Agrandissement d'un agrégat (barre d'échelle : 5 µm).

c) Curosurf natif et Silica (+)

La Figure 7a montre des vésicules de Curosurf natif mises en contact avec des Silica (+). Comme précédemment, la microscopie optique révèle la formation d'agrégats. Ce phénomène semble général puisqu'il est obtenu pour des particules positives d'alumine et de silice, à 25 et 37 °C. La distribution de taille des agrégats est

illustrée en *Figure 7e*. Le diamètre moyen est calculé à 4.4 ± 2.8 µm. Les agrégats à base de Silica (+) sont significativement plus petits et moins dispersés en taille que ceux formés avec des Alumina (+). Ces observations sont en accord avec les forces d'interaction déterminées par diffusion de la lumière.
Dans le but de connaitre la composition de ces agrégats, les particules Silica (+), par ailleurs fluorescentes, sont mélangées avec du Curosurf préalablement marqué. Le surfactant émet dans le vert à 504 nm alors que les particules fluorescent dans le rouge à 590 nm. La *Figure 7d* montre la superposition des images des canaux rouge et vert (*Figure 7b,c*). Tous les agrégats observés sont colorés en orange, ce qui suggère qu'ils sont constitués à la fois de Curosurf et de particules.

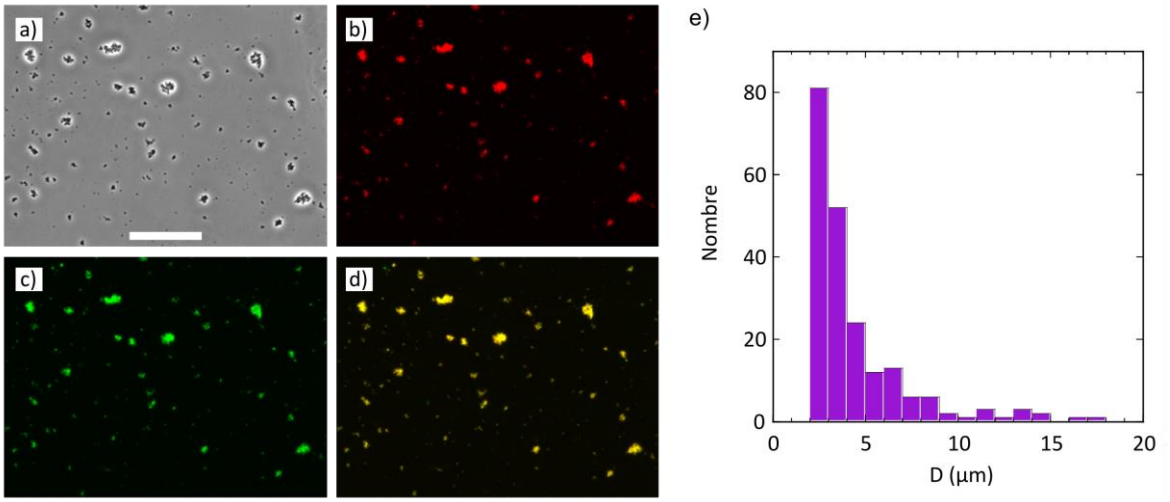


Figure 7 : a-d) Images de microscopie optique (x20) des mélanges Silica (+)/Curosurf préparés à X = 0.4 et observés en contraste de phase (a) et en fluorescence dans le rouge (b) et dans le vert (c). Les images b et c sont superposées en d. Les solutions de particules et de surfactant sont préparées dans de l'eau MilliQ à 1 g L^{-1} et chauffées à 37 °C. Le mélange est réalisé à X ≈ X_{max}, puis gardé 24 h à 37 °C. L'observation est réalisée en chambre thermostatée à 37 °C. Les lames de verre sont recouvertes de poly(chlorure de diallyldiméthyl ammonium) pour permettre une meilleure adhésion des vésicules. Barre d'échelle : 100 µm e) Distribution de taille des agrégats, obtenue à partir de l'analyse des images de microscopie (plus de 200 amas sont mesurés).

Les agrégats observés à plus fort grandissement suggèrent que différentes structures Nps/SP sont présentes en solution (*Figure 8*). Pour certains amas, la répartition entre Nps et vésicules n'est pas homogène : des régions plus riches dans l'un ou l'autre de ces composés sont observées. D'autres agrégats exhibent au contraire une superposition forte des signaux provenant des vésicules et des particules. Afin de mieux caractériser la richesse de ces structures, nous effectuons de la microscopie dont la résolution est meilleure.

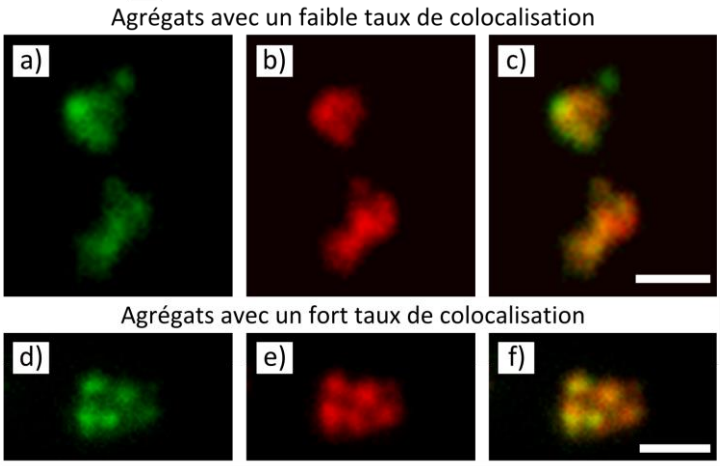


Figure 8 : Agrégats à fort grandissement (x60), fluoresçant dans le vert (a et d) et dans le rouge (b et e) et présentant un faible (c) et un fort (f) taux de colocalisation entre les fluorophores. Les images sont des agrandissements de la *Figure 7*. Barres d'échelle : 2 µm et 5 µm.

3) Microscopie électronique à transmission

De la microscopie MET est réalisée afin d'observer les agrégats mixtes Nps/SP avec une meilleure résolution. Nous avons vu précédemment que les agrégats formés peuvent atteindre 40 µm. Ces objets sont probablement trop grands pour que leur structure à l'échelle nanométrique soit déterminée par MET. Pour limiter la taille des agrégats, le Curosurf est extrudé (pores de 50 nm) et les solutions sont préparées à $X > X_{max}$.

a) Curosurf extrudé et Alumina (+)

La *Figure 9a* montre un agrégat Alumina (+)/Curosurf extrudé. Il mesure environ 5 µm et est similaire à ceux observés en microscopie optique. On peut conclure que l'extrusion ne semble pas affecter les mécanismes d'interaction entre particules et vésicules. Comme précédemment, nous pouvons discerner la structure « granulaire » de cet objet, qui laisse supposer que les agrégats sont composés des vésicules agrégées. Les détails sont cependant difficiles à discerner à cause de la forte épaisseur de l'agrégat et de l'accumulation de l'acétate d'uranyle utilisé pour contraster les images (zones noires).

La *Figure 9b* montre un agrégat de 500 nm environ. Une image de vésicule de Curosurf extrudé préparé sans particules est montrée en *Figure 9c* pour comparaison. Comme décrit par Bordi *et al*[4], les vésicules dispersées ont une forme de « doughnut » qui provient du séchage de l'échantillon. Elles apparaissent comme « vides », ce qui est en accord avec leur caractère unilammellaire (Chapitre 3). La même forme singulière est retrouvée chez les vésicules agrégées. Il semble donc que les complexes soient composés de vésicules non endommagées par l'agrégation.

Dans ce cas de figure, nous supposons que les Alumina (+) sont adsorbées à la surface extérieure des vésicules et qu'elles constituent des liens entre ces objets (*Figure 9d*). Il

est à noter que des résultats similaires ont été obtenus dans la littérature avec des vésicules de phospholipides DPPC ou DOPC et des nanoparticules d'or, de diamant, d'oxydes de titane, de fer et de zinc[14,17].

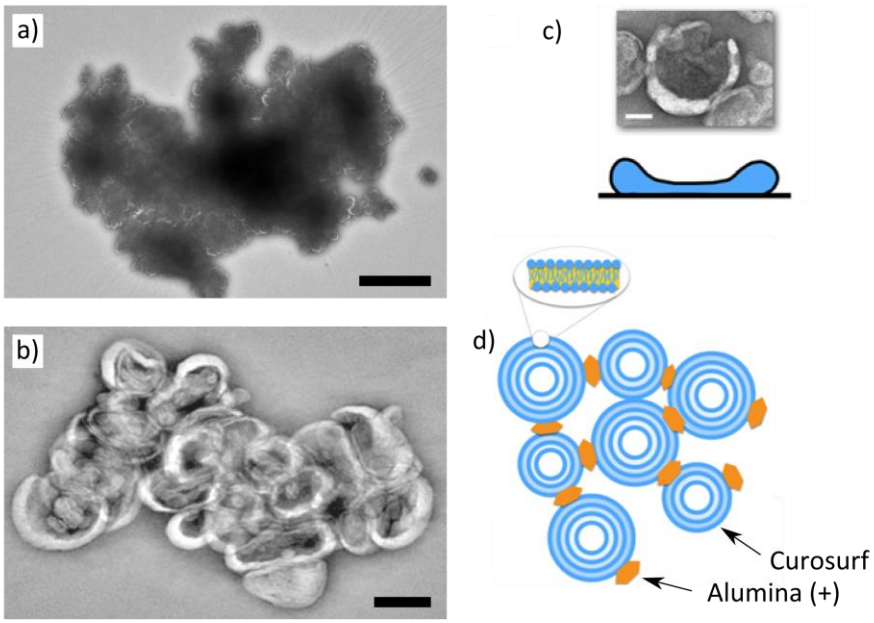


Figure 9 : a, b) Images en microscopie à transmission électronique de Curosurf extrudé avec des pores de 50 nm et de particules Alumina (+). Les solutions sont préparées à 1 g L^{-1} dans de l'eau MilliQ à pH 5, puis mélangées à X = 10. L'échantillon est dilué au 1/10 pour l'observation. Barres d'échelle : 1 µm et 100 nm respectivement. c) Vésicule unique du Curosurf extrudé, avant mélange avec les nanoparticules et schéma représentant une vésicule vue de profil. Barre d'échelle : 50 nm. Les échantillons en a, b et c sont marqués par de l'acétate d'uranyle, ce qui permet de visualiser les bicouches en blanc. d) Représentation de la structure des agrégats Nps/SP à l'échelle nanométrique.

b) Curosurf extrudé et Silica (+)

La même expérience est répétée avec des particules Silica (+). Les *Figure 10a,b* montrent des agrégats Nps/Curosurf extrudé. Ils mesurent 200 nm environ et sont similaires à ceux observés avec les oxydes d'aluminium. On observe ici une coexistence entre particules (flèche en bleu) et vésicules non endommagées par l'interaction (flèche en rouge). Des nanoparticules agrégées sont également observées à la *Figure 10c* où l'on discerne aussi des vésicules en contact avec ces particules. Une vue agrandie des Nps suggère que certaines sont enrobées par des membranes de phospholipides (*Figure 10d*). Il semble ainsi qu'avec les silices positives, nous observions deux types de structures bien distinctes, représentées schématiquement à la *Figure 10e*. Ces résultats confirment par ailleurs les données de fluorescence obtenues en microscopie optique (*Figure 8*). Malgré l'excellente résolution de la MET, les structures Nps/SP sont difficiles à

visualiser. Nous avons donc complété cette approche avec des expériences de microscopie cryo-électronique à transmission.

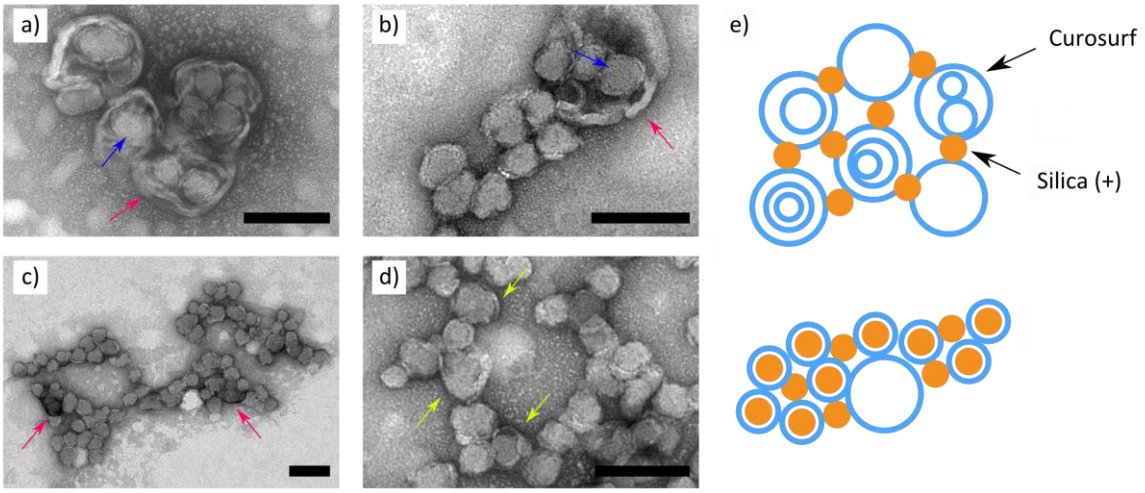


Figure 10 : a-d) Images de MET de Curosurf extrudé avec des pores de 50 nm et de particules Silica (+). Les solutions sont préparées à 1 g L^{-1} dans de l'eau MilliQ puis mélangées à X = 0.5. L'échantillon est dilué au 10ème pour l'observation. Barres d'échelle : 100 nm. e) Représentation des différentes structures des agrégats Nps/SP à l'échelle nanométrique.

4) Microscopie cryo-électronique à transmission

a) *Curosurf natif et Silica (+)*

Afin de se rapprocher des conditions physiologiques, les Silica (+) sont étudiées avec un excès de Curosurf natif (X = 22). Pour information, nous rappelons en *Figure 11a,b* le type de structures vésiculaires présentes dans le Curosurf. La première observation est qu'aucun agrégat supérieur au micromètre n'est observé ici (*Figure 11c,d*). En cryoMET, la phase aqueuse forme un ménisque de quelques centaines de nanomètres d'épaisseur. Les agrégats de taille micrométrique ont probablement été expulsés de la grille lors de sa préparation.

La *Figure 11d* montre que l'interaction entre Silica (+) et Curosurf donne naissance à quatre types de structures :

- Des particules libres en solution (flèche rose). Une observation à un plus fort grossissement montre qu'elles sont toujours nues (*Figure 11e*).
- De petits agrégats où les particules connectent les vésicules entre elles (flèche orange)
- Des liposomes en interaction avec des particules (flèche bleue). Il est difficile de dire de façon certaine si ces dernières sont sur la membrane externe du liposome[25] ou à l'intérieur de celui-ci[26]. Le fait que ces Nps possèdent une bicouche supportée[27] laisse penser qu'elles sont internalisées (*Figure 11e*).

- Des vésicules multilamellaires, de taille inférieure à 500 nm, en interaction avec des Nps (flèche marron). Les Nps semblent prises en sandwich entre la vésicule externe et les vésicules internes. Nous supposons donc qu'elles sont à l'intérieur de la vésicule.

De manière tout à fait surprenante, nous n'avons pas observé de cas où les particules franchissent une seconde membrane. Ces résultats suggèrent que les particules se couvrent de phospholipides lors de leur entrée dans les vésicules et que cet enrobage les empêche de traverser d'autres membranes[26,27]. Ce dernier point est à rapprocher de l'étude faite au Chapitre 4 où nous n'avons pas observé d'interaction entre vésicules de Curosurf et nanoBLSs.

De plus, il est étonnant que des particules soient internalisées dans des vésicules et que des bicouches supportées se forment à leur surface. En effet, l'expérience est menée à 25 °C, c'est-à-dire en deçà de la température de fusion du Curosurf. Nous faisons l'hypothèse ici qu'à température ambiante, l'interaction entre Silica (+) et Curosurf a lieu via les micro-domaines fluides coexistant avec la phase gel[28].

b) Curosurf extrudé et Silica (+)

Le Curosurf est extrudé avec des membranes de 100 nm puis mélangé aux Silica (+). La *Figure 11f* montre pour rappel des images du Curosurf extrudé et les *Figure 11g-i* illustrent les structures observées en présence de particules. Les résultats sont similaires à ceux obtenus avec du Curosurf natif. Nous observons les mêmes types de structures : i) particules libres en solution, ii) particules agrégeant des vésicules et iii) particules internalisées dans les liposomes ou iv) dans des vésicules multilamellaires. De manière surprenante, un cinquième type de structure est observé : des agrégats de particules (*Figure 11i*). Dans ce cas, certaines Nps sont nues (flèche violette) alors que d'autres possèdent une bicouche lipidique supportée (flèche rose). La formation de ces agrégats pourrait être due aux interactions électrostatiques entre espèces de charge opposée. Ces résultats confirment les expériences de MET.

c) Curosurf natif et Silica (-)

Les Silica (-) sont étudiées en présence de Curosurf natif dans les mêmes conditions que les Silica (+) (*Figure 11j-l*). De nombreuses particules sont libres en solution, certaines sont agrégées en amas de quelques unités et d'autres sont en interaction avec des vésicules. Ce dernier cas pourrait être la conséquence d'une interaction électrostatique faible établie entre Nps et protéines SP-B et C.

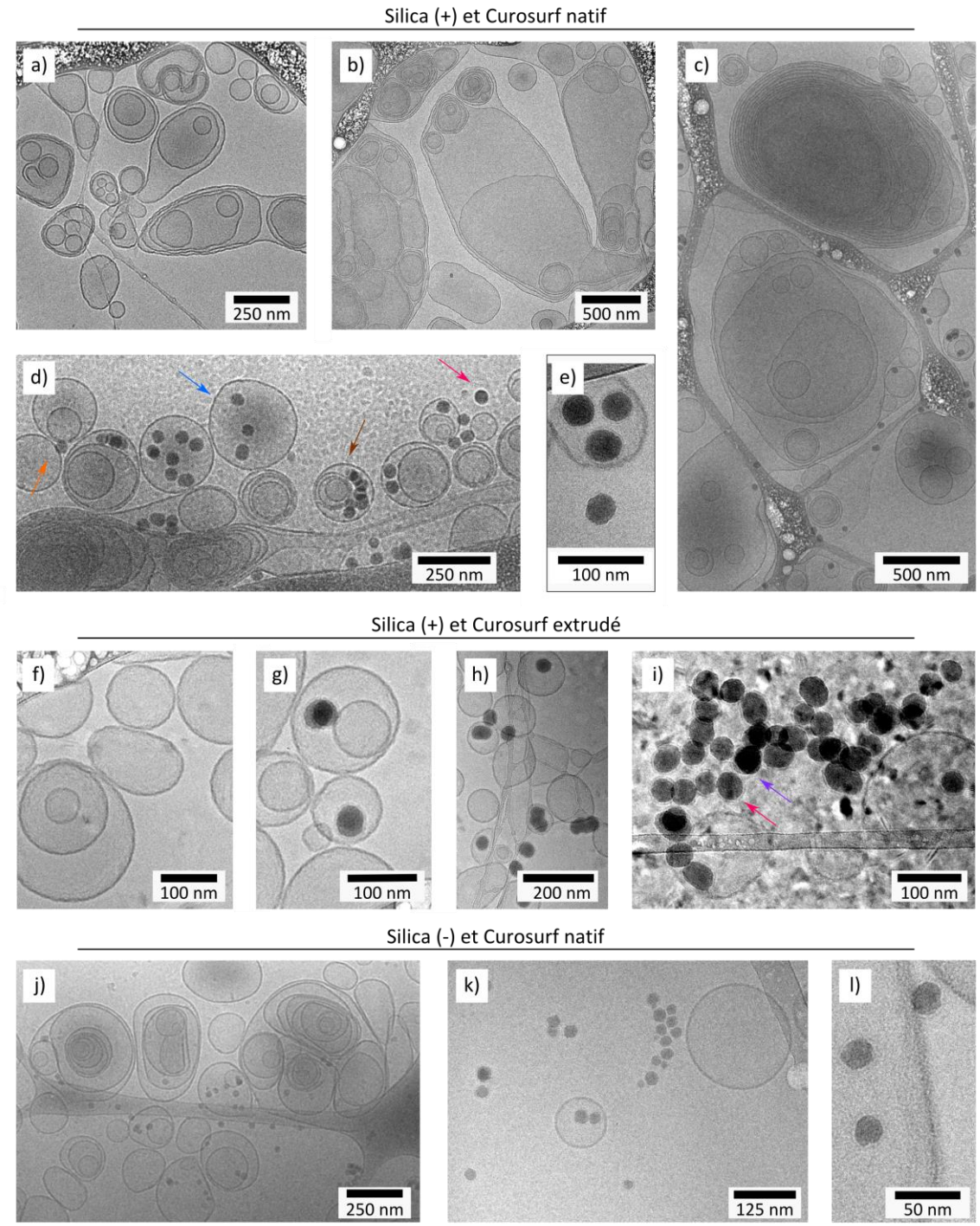


Figure 11 : Images de cryoMET. a,b) Curosurf natif à 5 g L^{-1} dans de l'eau MilliQ. c-e) Dispersions de Curosurf natif et de Silica (+), dans l'eau MilliQ à 25 °C et à X = 22.2. Les concentrations finales en Nps et en surfactant sont de 0.2 et 5 g L^{-1} respectivement. f) Curosurf dilué à 2 g L^{-1} dans de l'eau MilliQ et extrudé par des pores de 100 nm. g-i) Dispersion de Curosurf extrudé à 100 nm et de Silica (+) préparée dans l'eau MilliQ à 25 °C et à X = 10. Les concentrations finales en Nps et en surfactant sont de 0.2 et 2 g L^{-1} respectivement. j-l) Dispersion de Curosurf natif et de Silica (+) préparée à X = 22.2 et à 25 °C dans du tampon phosphate (pH 6.4, force ionique 5 mM). Les concentrations finales en Nps et en surfactant sont de 0.2 et 5 g L^{-1} respectivement. Les échantillons sont observés 24 h après leur préparation.

Lorsque les particules sont sur les vésicules ou à l'intérieur de ces dernières, elles sont en outre couvertes d'une BLS. Ce phénomène a été décrit dans la littérature et semblerait résulter de l'interaction électrostatique entre les groupements silanol des particules et la charge positive des têtes polaires des phospholipides zwitterioniques[16,26,27]. Dans les rares cas où les Silica (-) sont en interaction avec les vésicules de Curosurf, nous supposons donc que l'internalisation des Nps s'effectue via les zones où les phospholipides anioniques sont peu présents.
En conclusion, une interaction entre Curosurf et Silica (-) est observée mais elle est moins forte qu'avec les Silica (+). Ces résultats sont en accord avec les données de diffusion de la lumière et de microscopie optique.

IV. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'interaction de différents systèmes Nps nues/SP. L'ensemble des résultats est résumé dans l'**Annexe B**. Lorsque des particules nues sont mises en contact avec du fluide pulmonaire, elles interagissent plus ou moins fortement avec ce dernier. L'interaction est majoritairement électrostatique et semble avoir lieu entre particules positives et membranes négatives ou particules négatives et protéines membranaires de charge opposée.
Les structures résultant de l'interaction entre particules et vésicules ont été observées à différentes échelles par microscopie optique et électronique. Dans leur ensemble les résultats sont en accord avec ceux de la diffusion de lumière. Les structures hybrides obtenues sont complexes et de nombreux cas de figures ont été mis en évidence. La *Figure 12* illustre de manière schématique l'ensemble des structures observées expérimentalement. La diversité des objets obtenus souligne la complexité de l'interaction entre Nps et surfactant pulmonaire.

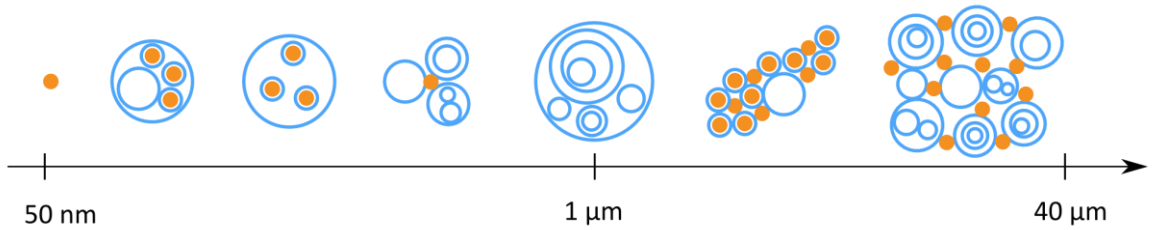


Figure 12 : Représentation schématique des structures résultant de l'interaction entre particules nues et surfactant pulmonaire. Les nanoparticules sont en orange et les vésicules de Curosurf sont en bleu.

Annexe A : Interaction entre Curosurf natif et Latex 1 (-)

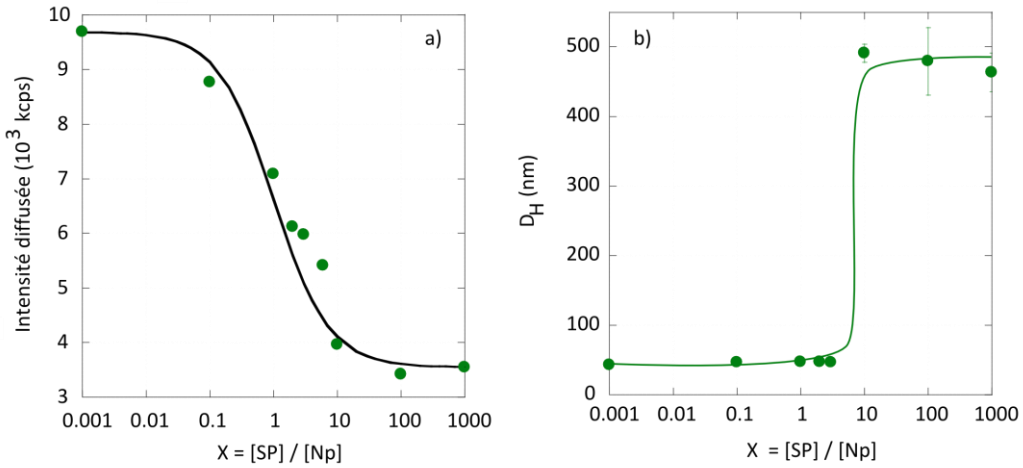


Figure 13 : Intensité diffusée (a) et diamètre hydrodynamique (b) des suspensions mixtes entre Latex 1 (-) et Curosurf natif en fonction de X (T = 25 °C). Les mesures sont effectuées en triplicata. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard moyenne. La ligne verte est un guide pour les yeux. La ligne noire représente l'intensité diffusée calculée dans le cas où les particules et les vésicules n'interagissent pas.

Annexe B : Résumé des données

Expérience	Particule	Curosurf	T (°C)	X	Interaction	Microscopie				
						Agrégats	Internalisation ou adsorption des Nps sur les vésicules	Agrégats NPs/nanoBLSs	Nps ou nanoBLSs libres en solution	Nps agrégées en solution
DLS	Alumina (+)	Natif ou extrudé (50 nm)	25 et 37	$10^{-3} – 10^{3}$	Forte	\	\	\	\	\
	Silica (+)	Natif ou extrudé (50 nm)	25 et 37	$10^{-3} – 10^{3}$	Forte	\	\	\	\	\
	Silica (-)	Natif ou extrudé (50 nm)	25 et 37	$10^{-3} – 10^{3}$	Faible-Nulle	\	\	\	\	\
Microscopie optique	Alumina (+)	Extrudé (800 nm)	25	7 (X_{max})	Forte	xxx				
	Silica (-)	Natif	25	0.5 (X_{max})	Faible					
Microscopie à fluorescence	Silica (+)	Natif	37	0.4 (X_{max})	Forte	xxx				
MET	Alumina (+)	Extrudé (50 nm)	25	10 (>X_{max})	Forte	xxx				
	Silica (+)	Extrudé (50 nm)	25	0.5 (X_{max})	Forte	xx		xx		
CryoMET	Silica (+)	Extrudé (100 nm)	25	10 (>X_{max})	Modérée		xx	xx	x	
	Silica (+)	Natif	25	22.2 (>X_{max})	Forte	x	xxx		xx	
	Silica (-)	Natif	25	22.2 (>X_{max})	Faible		x	xx	xx	x

Tableau 2 : Récapitulatif des résultats obtenus avec le Curosurf natif et extrudé. Pour les expériences de microscopie, le nombre de croix dans les cases est d'autant plus élevé que les objets concernés sont nombreux en solution.

Bibliographie

1. Choe, S., Chang, R., Jeon, J. & Violi, A. Molecular dynamics simulation study of a pulmonary surfactant film interacting with a carbonaceous nanoparticle. *Biophys. J.* **95,** 4102–4114 (2008).
2. Kapralov, A. A. *et al.* Adsorption of surfactant lipids by single-walled carbon nanotubes in mouse lung upon pharyngeal aspiration. *ACS Nano* **6,** 4147–4156 (2012).
3. Hu, G. *et al.* Physicochemical properties of nanoparticles regulate translocation across pulmonary surfactant monolayer and formation of lipoprotein corona. *ACS Nano* **7,** 10525–10533 (2013).
4. Svensson, C. R. *et al.* Direct deposition of gas phase generated aerosol gold nanoparticles into biological fluids - Corona formation and particle size shifts. *PLoS ONE* **8,** 74702–74712 (2013).
5. Lin, X., Bai, T., Zuo, Y. Y. & Gu, N. Promote potential applications of nanoparticles as respiratory drug carrier: Insights from molecular dynamics simulations. *Nanoscale* **6,** 2759–2767 (2014).
6. Yue, T., Wang, X., Zhang, X. & Huang, F. Molecular modeling of interaction between lipid monolayer and graphene nanosheets: Implications for pulmonary nanotoxicity and pulmonary drug delivery. *RSC Adv* **5,** 30092–30106 (2015).
7. Raesch, S. S. *et al.* Proteomic and lipidomic analysis of nanoparticle corona upon contact with lung surfactant reveals differences in protein, but not lipid composition. *ACS Nano* **9,** 11872–11885 (2015).
8. Lin, X., Zuo, Y. Y. & Gu, N. Shape affects the interactions of nanoparticles with pulmonary surfactant. *Sci. China Mater.* **58,** 28–37 (2015).
9. Hu, Q. *et al.* Effects of graphene oxide nanosheets on the ultrastructure and biophysical properties of the pulmonary surfactant film. *Nanoscale* **7,** 18025–18029 (2015).
10. Schleh, C. *et al.* The effect of titanium dioxide nanoparticles on pulmonary surfactant function and ultrastructure. *Respir. Res.* **10,** 90–100 (2009).
11. Fan, Q., Wang, Y. E., Zhao, X., Loo, J. S. C. & Zuo, Y. Y. Adverse biophysical effects of hydroxyapatite nanoparticles on natural pulmonary surfactant. *ACS Nano* **5,** 6410–6416 (2011).
12. Theodorou, I. G. *et al.* Static and dynamic microscopy of the chemical stability and aggregation state of silver nanowires in components of murine pulmonary surfactant. *Environ. Sci. Technol.* **49,** 8048–8056 (2015).
13. Kumar, A. *et al.* Enrichment of immunoregulatory proteins in the biomolecular corona of nanoparticles within human respiratory tract lining fluid. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **12,** 1033–1043 (2016).
14. Jiménez-Rojo, N. *et al.* Lipidic nanovesicles stabilize suspensions of metal oxide nanoparticles. *Chem. Phys. Lipids* **191,** 84–90 (2015).

15. Wohlleben, W. *et al.* Influence of agglomeration and specific lung lining lipid/protein interaction on short-term inhalation toxicity. *Nanotoxicology* **10,** 970–980 (2016).
16. Michel, R. & Gradzielski, M. Experimental aspects of colloidal interactions in mixed systems of liposome and inorganic nanoparticle and their applications. *Int. J. Mol. Sci.* **13,** 11610–11642 (2012).
17. Liu, J. Interfacing zwitterionic liposomes with inorganic nanomaterials: Surface forces, membrane integrity, and applications. *Langmuir* **32,** 4393–4404 (2016).
18. McLaughlin, A. I. G. *et al.* Pulmonary fibrosis and encephalopathy associated with the inhalation of aluminium dust. *Br. J. Ind. Med.* **19,** 253–263 (1962).
19. Abramson, M. J. & Wlodarczyk, J. H. Does aluminium smelting cause lung-disease. *Am Rev Respir Dis* **139,** 1042–1057 (1989).
20. Ziskind, M., Jones, R. N. & Weill, H. Silicosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **113,** 643–665 (1976).
21. Mossman, B. T. & Churg, A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **157,** 1666–1680 (1998).
22. Wei, X. *et al.* Effects of SiO_2 nanoparticles on phospholipid membrane integrity and fluidity. *J. Hazard. Mater.* **287,** 217–224 (2015).
23. Pérez-Gil, J. & Keough, K. M. W. Interfacial properties of surfactant proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1408,** 203–217 (1998).
24. Bordi, F., Cametti, C., Sennato, S. & Diociaiuti, M. Direct evidence of multicompartment aggregates in polyelectrolyte-charged liposome complexes. *Biophys. J.* **91,** 1513–1520 (2006).
25. Van der Wel, C. *et al.* Lipid membrane-mediated attraction between curvature inducing objects. *Sci. Rep.* **6,** 32825–32833 (2016).
26. Le Bihan, O. *et al.* Cryo-electron tomography of nanoparticle transmigration into liposome. *J. Struct. Biol.* **168,** 419–425 (2009).
27. Mornet, S., Lambert, O., Duguet, E. & Brisson, A. The formation of supported lipid bilayers on silica nanoparticles revealed by cryoelectron microscopy. *Nano Lett.* **5,** 281–285 (2005).
28. Casals, C. & Cañadas, O. Role of lipid ordered/disordered phase coexistence in pulmonary surfactant function. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1818,** 2550–2562 (2012).

Chapitre 6
Interaction des systèmes particules - surfactant pulmonaire avec les cellules alvéolaires

Table des matières

I. Introduction 177
II. Toxicité des nanoparticules 177
1) Généralités 177
2) Résultats 178
3) Interprétation des résultats 180
a) Composition chimique et état de surface 180
b) Etat d'agrégation 181
c) Conclusion 182
III. Toxicité des nanoparticules en présence de biofluides 183
1) Incubation des cellules avec des particules en présence de sérum 183
2) Incubation des cellules avec du Curosurf 183
3) Incubation des cellules avec des particules en présence de Curosurf 184
a) Résultats 184
b) Rôles des propriétés physico-chimiques des particules 186
IV. Internalisation de particules de silice fluorescente 187
1) Quantification de l'internalisation 188
a) Nanoparticules nues 188
b) Agrégats Nps/Curosurf et nanoBLSs 189
c) Comparaison des résultats 192
2) Observation des systèmes internalisés en microscopie électronique 193
a) Nanoparticules nues 193
b) Agrégats Nps/Curosurf 194
c) NanoBLSs 195
V. Conclusion 197
Annexe A : Récapitulatif de la littérature 199
Annexe B : Viabilité des A549 exposées aux Nps dispersées dans du sérum 200
Annexe C : Viabilité des A549 exposées aux Nps dispersées dans du Curosurf 202
Annexe D : Viabilité des A549 exposées aux nanoBLSs et aux agrégats 204
Bibliographie 205

I. Introduction

L'impact du surfactant pulmonaire (SP) sur l'interaction entre nanoparticules (Nps) et cellules alvéolaires est un domaine de recherche récent[1]. Une étude bibliographique montre l'existence d'un nombre relativement restreint de publications sur ce sujet. Plusieurs équipes ont étudié en particulier le rôle du surfactant ou de ses composants sur l'internalisation ou la toxicité de nanomatériaux d'origines différentes[2–21]. Que les cellules soient épithéliales ou phagocytiques, les résultats montrent que la présence de surfactant a un impact significatif sur la réponse cellulaire. Les données de toxicité sont résumées sous forme de tableau en **Annexe A**. Leur analyse montre que les résultats sont mitigés. Pour certaines particules (oxyde de titane[15], quartz[2,4,5], argent[17,21]), l'addition de surfactant pulmonaire atténue la toxicité. A l'inverse, cette dernière croît pour d'autres matériaux (silice[19], noir de carbone[12], oxyde de zinc[20]). La variabilité des résultats reste à ce stade difficile à expliquer.

Dans ce chapitre, nous essayons d'apporter notre pierre à l'édifice afin de mettre en évidence des phénomènes élémentaires régissant l'interaction Nps/SP/cellules. Dans ce but, nous avons sélectionné sept types de nanoparticules de 50 nm. Ces Nps diffèrent par leur composition chimique et leur état de surface. Dans un premier temps, nous nous intéressons à la toxicité des particules en l'absence ou en présence de surfactant pulmonaire. Nous essayons de faire apparaître des corrélations entre la viabilité cellulaire mesurée et les paramètres physico-chimiques des Nps (composition, charge de surface et propriétés d'agrégation). Dans un second temps, nous nous concentrons sur les particules de silice fluorescente chargées positivement. Leur interaction avec les cellules épithéliales A549 est étudiée en mettant en parallèle les conditions « de référence » des expérimentations *in vitro* avec celles mimant l'environnement alvéolaire. La fluorimétrie nous permet de quantifier les particules ayant interagi avec les cellules, tant au niveau de l'adsorption à la membrane plasmique que de l'internalisation. Enfin, l'effet du surfactant pulmonaire sur la localisation intracellulaire des Nps est étudié par microscopie électronique à transmission.

II. Toxicité des nanoparticules

1) Généralités

Les compartiments cellulaires pertinents pour l'étude de la toxicité sont le noyau, les mitochondries et les lysosomes[22,23]. La viabilité cellulaire est étudiée ici à travers l'activité mitochondriale des cellules. Pour cela, le test WST-1 est réalisé sur les cellules A549 après 24 h d'incubation avec des particules (ou des systèmes hybrides Nps/SP) dont la concentration est comprise entre 0.2 et 1 000 µg mL^{-1}. Cette gamme s'étend volontairement bien au-delà des concentrations physiologiques auxquelles les cellules

pulmonaires pourraient être exposées. Le but est d'observer des effets cellulaires significatifs alors que les temps d'exposition aux particules sont courts.
D'un point de vue technique, la viabilité du contrôle est normalisée à 100%. Les données sont traitées avec un test ANOVA, suivi d'un test statistique de Dunnett. Les étoiles placées au-dessus des graphiques indiquent les données présentant des différences significatives. Leur nombre est compris entre 1 et 4 et correspond à $p = 0.0332$, 0.0021, 0.0002 et 0.0001 respectivement. Sur de nombreux graphiques, les résultats des tests statistiques comparant les particules deux à deux pour une même dose ne sont pas affichés pour alléger les figures.

2) Résultats

La *Figure 1* montre les résultats de viabilité cellulaire en fonction de la dose de nanoparticules. Deux types de réponse sont observés.

- Pour les Latex 1 (-), Latex 2 (-), et Alumina (+), la viabilité reste inchangée à faible dose puis baisse lorsque la dose augmente et dépasse 100 µg mL^{-1} (*Figure 1b,c,f*). Cette diminution est le signe d'une toxicité importante souvent corrélée à la mort cellulaire.
- Pour les Latex (+), Titania (+) et les deux particules de silice, la viabilité augmente de 20 à 50% aux doses les plus faibles (dès 0.2 µg mL^{-1}), puis diminue comme dans le scénario précédent (*Figure 1d,e,g,h*). L'augmentation de la viabilité à faible dose signifie que les Nps sont nocives pour les cellules. Ces dernières sont dans une phase de défense et leur activité mitochondriale augmente.

	Latex 1 (-)	Latex 2 (-)	Latex (+)	Titania (+)	Alumina (+)	Silica (-)	Silica (+)
IC_{50} (µg mL^{-1})	1 000	850	110	/	580	40	950

Tableau 1 : IC_{50} des nanoparticules nues vis-à-vis des cellules A549.

Nous définissons la concentration inhibitrice médiane IC_{50} par la concentration en particules à partir de laquelle la viabilité cellulaire est inférieure ou égale à 50%. Les résultats sont résumés dans le *Tableau 1*. Cette donnée permet de classer les particules suivant leur toxicité :

Titania (+) < Silica (+) < Latex 1 (-) < Latex 2 (-) < Alumina (+) < Latex (+) < Silica (-)

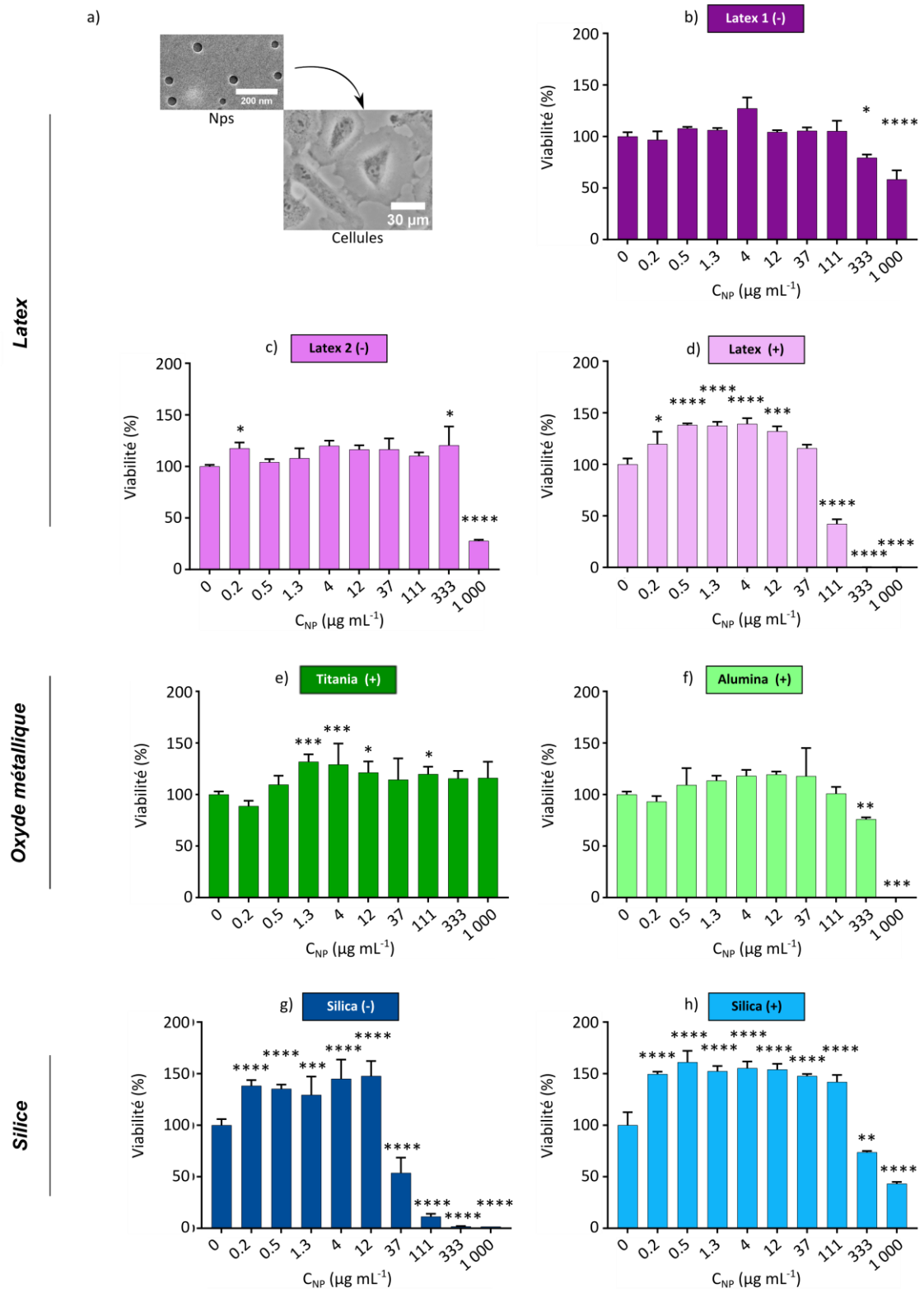


Figure 1 : a) Représentation schématique de l'incubation des cellules avec des Nps « nues ». b-h) Effet des nanoparticules sur la viabilité cellulaire. b, c, d, e, f, g et h représentent respectivement les Latex 1 (-), les Latex 2 (-), les Latex (+), les Titania (+), les Alumina (+), les Silica (-) et les Silica (+).

3) Interprétation des résultats

Les propriétés des nanoparticules telles que la composition chimique, la charge et la taille ont un rôle primordial sur la toxicité cellulaire[24]. L'état d'agrégation des Nps en milieu de culture est aussi un paramètre à prendre en compte, notamment parce qu'il détermine en partie la dose de Nps délivrées aux cellules[25]. Dans cette partie, nous cherchons des corrélations entre les résultats de toxicité observés à la *Figure 1* et ces paramètres physico-chimiques.

a) Composition chimique et état de surface

Pour mieux comprendre le lien entre composition chimique, état de surface et toxicité, les résultats du test WST-1 sont tracés en regroupant les particules par famille de matériau (*Figure 2*). Des réponses cellulaires variées sont alors observées au sein de chaque classe de particules.

Composition chimique

Considérons par exemple les Nps de Latex (+) et Silica (+). Elles sont fonctionnalisées par des groupements amine et amidine respectivement et présentent des densités surfaciques de charge similaires (Chapitre 2). En revanche, les courbes de viabilité indiquent que les Silica (+) sont nettement moins toxiques que les Latex (+) (IC_{50} de 950 µg mL^{-1} versus 110 µg mL^{-1}). La comparaison des nanoparticules d'oxydes métalliques est également révélatrice. Les Titania (+) n'ont aucun effet sur la viabilité cellulaire[26–28] alors que les Alumina (+) sont toxiques pour les A549 (IC_{50} de 580 µg mL^{-1})[28–30]. Ces deux exemples montrent qu'à charge de surface fixée, la composition chimique de la particule affecte la réponse cellulaire et doit être prise en compte dans l'analyse de la toxicité.

Etat de surface

Les Latex 1 (-) et 2 (-) ont la même composition chimique mais n'exhibent pas les mêmes fonctionnalisations de surface. Par ailleurs, la toxicité qu'elles induisent est sensiblement différente. Ce résultat illustre que la chimie des groupements de surface est un facteur déterminant de la toxicité[31].

Les données de la *Figure 2* montrent également que la charge impacte la toxicité lorsque la composition chimique des Nps est fixée. Par exemple, la toxicité envers les A549 est plus importante quand les particules de latex sont positives plutôt que négatives[32,33]. Ce résultat est retrouvé de manière récurrente dans la littérature pour différentes particules[23]. L'effet est ici renforcé pour les Latex (+) car les groupements amine interagissent fortement avec les membranes plasmiques. En effet, les particules exhibant cette fonctionnalisation sont reconnues pour perforer les membranes des cellules[23,32].

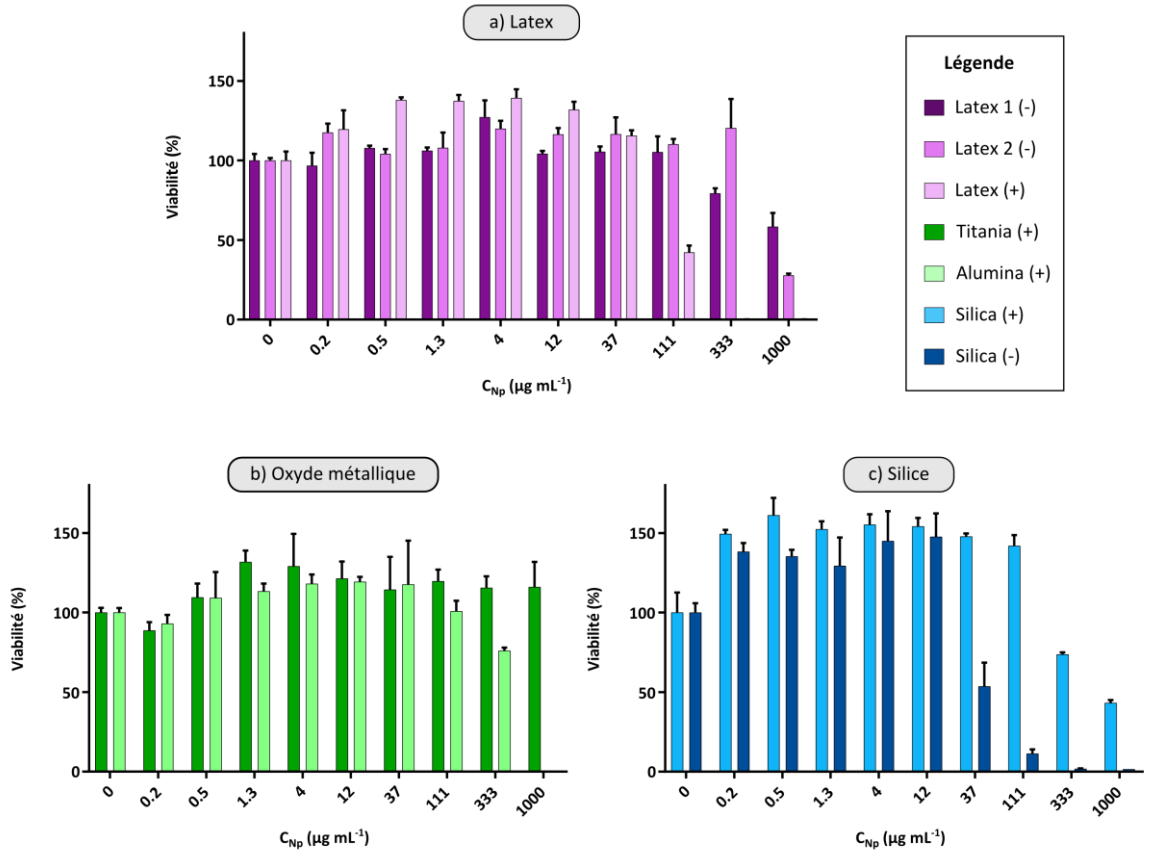


Figure 2 : Résultats des tests de WST-1 pour les particules de latex (a), pour les oxydes métalliques (b) et pour les Nps de silice (c).

Il est à noter que ces données n'impliquent pas que toutes les particules chargées positivement sont nécessairement toxiques. En effet, nous n'observons pas de toxicité de la part des Titania (+).

Pour finir, les particules de silice constituent un cas particulier intéressant. Les Silica (-) sont décrites pour être toxiques envers les A549[34–36] et les résultats de WST-1 montrent qu'elles le sont plus que les Silica (+). Ce résultat, apparemment contradictoire avec les observations précédentes, s'explique par l'interaction forte entre groupements silanol présents à la surface des silices négatives et têtes polaires des phospholipides constituant la membrane plasmique. Cette interaction peut induire la rupture de la membrane et provoquer la mort cellulaire[32,37].

b) Etat d'agrégation

De manière générale, les nanoparticules dispersées dans du milieu de culture ont tendance à agréger, soit parce qu'elles sont déstabilisées par la teneur élevée en contre-ions (force ionique 150 mM), soit parce que des macromolécules s'y adsorbent et modifient alors leur état de surface. De nombreux travaux ont montré que la taille des Nps et leur état d'agrégation impacte leur toxicité[24,32,38,39]. Les Nps étudiées dans cette

thèse étant toutes de même taille (50 nm), nous cherchons ici à déterminer si la toxicité des Nps peut être corrélée à leur état d'agrégation.
Le *Tableau 2* met en parallèle les données de toxicité et les états d'agrégation des particules dans le DMEM, déterminés en diffusion de lumière à t = 0 et à t = 24 h. Nous trouvons par exemple que les Silica (-) et les Latex (+) sont toutes les deux toxiques alors que les premières particules sont stables et que les secondes précipitent instantanément. A l'inverse, contrairement aux Titania (+), les Latex (+) sont toxiques alors que ces deux particules forment des agrégats de taille supérieure au micron. Il apparait donc que l'étude de l'état d'agrégation des Nps ne permet pas de prédire leur toxicité[40].

Np	Toxicité	Etat d'agrégation	
		t = 0 h	t = 24 h
Latex 1 (-)	++	xxx	xxx
Latex 2 (-)	+	x	x
Latex (+)	+++	xx	xxx
Titania (+)	-	xxx	xxx
Alumina (+)	++	x	xx
Silica (-)	+++	x	x
Silica (+)	++	xxx	xxx

Tableau 2 : Comparaison entre la toxicité induite par les Nps et leur état d'agrégation dans le milieu de culture, à t = 0 et à t = 24 h. Pour la toxicité, « - » signifie que la viabilité à 100 µg mL^{-1} est égale à 100%, « + », qu'elle est supérieure à 100%, « ++ », qu'elle est entre 50 et 100%, et « +++ », qu'elle est entre 0 et 50%. Similairement, « x » indique que les agrégats sont entre 0 et 250 nm, « xx », qu'ils sont entre 250 et 1 000 nm, « xxx », qu'ils sont plus grands que 1 000 nm.

c) Conclusion

Dans cette partie, nous avons déterminé la toxicité de sept types de particules différentes représentant trois classes de nanomatériaux : les oxydes métalliques, les particules de polymères (latex) et les silices. En accord avec la littérature, nous avons observé que la viabilité des cellules incubées à forte dose de particules dépend de la composition chimique et de l'état de surface de ces Nps. A l'inverse nous n'avons pas trouvé de corrélation simple entre toxicité et état d'agrégation.
Plusieurs équipes mesurent des viabilités de cellules A549 différentes des nôtres pour des nanoparticules similaires[34,35,41–43]. Cette discordance peut s'expliquer notamment par le manque d'harmonisation des protocoles[44]. Finalement, l'ensemble de ces résultats souligne la complexité d'interpréter les tests de viabilité cellulaire.

III. Toxicité des nanoparticules en présence de biofluides

1) Incubation des cellules avec des particules en présence de sérum

Afin d'évaluer l'impact d'une modification de l'environnement dans lequel sont dispersées les Nps, du sérum de veau fétal est ajouté au milieu de culture à hauteur de 10% volumiques. Le test de viabilité WST-1 est réalisé sur les sept nanoparticules déjà décrites et les résultats sont présentés en **Annexe B**. En bref, nous trouvons que quelle que soit la particule considérée, son effet sur la viabilité cellulaire est atténué par la présence de sérum. Ce résultat est associé à l'adsorption des protéines sur les particules, qui a pour conséquence de masquer les groupes de surface réactifs, de stabiliser les dispersions, d'apporter une forme de biocompatilité aux structures hybrides formées et de diminuer leur internalisation[23,45–50].

En conclusion, la mise en contact de Nps avec les biomolécules du sérum impacte significativement l'interaction Nps/cellules. Dans la suite, nous souhaitons déterminer de façon similaire l'influence du surfactant pulmonaire sur la toxicité des particules.

2) Incubation des cellules avec du Curosurf

Avant d'aborder l'effet du surfactant pulmonaire sur la toxicité des nanoparticules, nous étudions la viabilité des cellules en fonction de la dose de Curosurf seul (*Figure 3*). Les concentrations testées vont de 3 à 20 000 µg mL^{-1}. La dose la plus élevée, à savoir 20 000 µg mL^{-1}, est de l'ordre de grandeur de la concentration physiologique du surfactant pulmonaire[51,52].

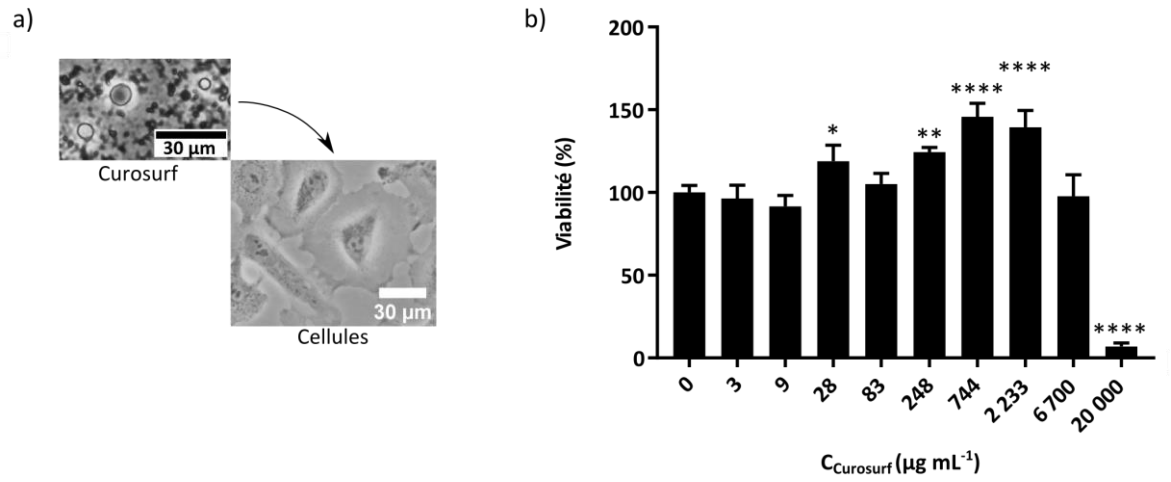


Figure 3 : a) Représentation schématique de l'expérience d'incubation des cellules avec du Curosurf. b) Viabilité cellulaire des A549 exposées à du Curosurf. La concentration maximale correspond à celle du surfactant dans les poumons.

Les résultats montrent une augmentation de la viabilité jusqu'à 140%, puis une forte diminution. A 20 000 µg mL^{-1}, la viabilité n'est plus que de 10% environ. Le Curosurf

induit donc une mort cellulaire importante à concentration physiologique. Ce résultat assez surprenant a été observé dans d'autres études, notamment sur des cellules A549, sur des cellules immortalisées de souris de type AT2 et sur des cellules primaires AT2 de rat[53].

Plusieurs phénomènes pourraient expliquer un tel comportement. Le WST-1 étant réalisé en plaque de 96 puits, l'épaisseur de fluide couvrant les cellules est de quelques millimètres. Dans les alvéoles en revanche, le surfactant a une épaisseur moyenne plus faible, de l'ordre de 100 à 500 nm[52]. Par ailleurs, la pression partielle en dioxygène *in vivo* est de 15 kPa dans les alvéoles et de 5 kPa dans le sang veineux. Ce gradient de pression est nécessaire à la diffusion de l'oxygène des alvéoles vers le système sanguin[54]. Une telle différence de pression n'est cependant pas présente *in vitro*. On peut donc supposer que la diffusion de l'oxygène vers les cellules est significativement impactée *in vitro* lorsque le milieu de culture est trop concentré en surfactant. Pour finir, les A549 sont des cellules immortalisées cancéreuses d'origine humaine. Il est donc possible qu'à dose élevée le surfactant porcin soit toxique envers ces cellules.

3) Incubation des cellules avec des particules en présence de Curosurf

a) Résultats

En cas d'inhalation de nanoparticules, ces dernières sont minoritaires par rapport aux vésicules de surfactant. Dans cette partie, le rapport massique X entre Curosurf et Nps est alors fixé à 20. Nous mesurons la viabilité cellulaire en fonction de la dose de Nps appliquée, le rapport entre particules et surfactant restant constant. Dans les expériences réalisées, la dose de particules est comprise entre 0.07 et 333 µg mL^{-1} (**Annexe C**). Les données de viabilité cellulaire des A549 exposées aux nanoparticules sont comparées dans le cas où le surfactant est présent ou non en solution (*Figure 4*).

Plusieurs cas de figures sont observés :

- Pour les Latex 1 (-), les Latex 2 (-) et les Alumina (+), les résultats de toxicité sont comparables à ceux obtenus précédemment. Le surfactant n'a donc qu'un effet modéré sur la viabilité dans ce cas (*Figure 4b,c,f*).
- Pour les Latex (+), les Silica (-) et les Silica (+), une amélioration marquée de la viabilité est observée à forte dose (*Figure 4d,g,h*). Notons à ce sujet des résultats opposés dans le travail de Kasper *et al.* pour les Silica (-)[19].
- Pour les Titania (+), la toxicité est augmentée en présence de Curosurf (*Figure 4e*)[15].

Ainsi, à l'exception des oxydes de titane, la toxicité des particules est atténuée en présence du surfactant pulmonaire. Cette tendance est à rapprocher de celle trouvée avec le sérum. Les observations faites ici sont qualitatives et traduisent l'existence de processus complexes gouvernant l'interaction entre particules, matériel biologiques et cellules.

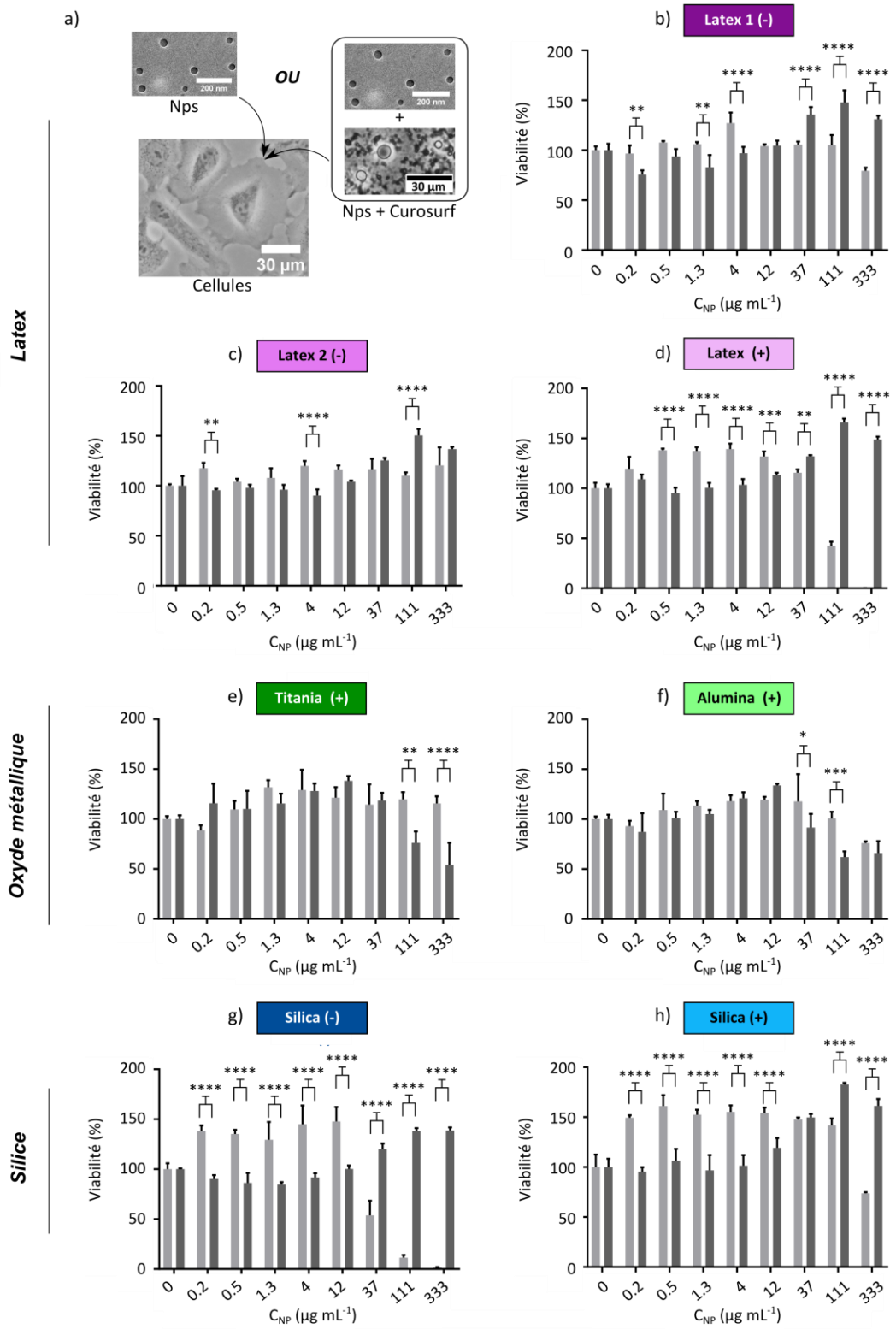


Figure 4 : a) Représentation schématique de l'incubation des cellules A549 avec des particules ou des mélanges particules/Curosurf. b-h) Comparaison des tests de viabilité cellulaire effectués pour des Nps (histogrammes gris clair) et pour des mélanges Nps/Curosurf (histogrammes gris foncés) préparés à X = 20. Les expériences en présence de Curosurf ont été réalisées en collaboration avec Chloé Puisney (Laboratoire BFA, Université Paris Diderot).

b) Rôles des propriétés physico-chimiques des particules

Pour déterminer l'influence des paramètres physico-chimiques des particules sur la toxicité des systèmes Nps/SP, les résultats sont à nouveau triés selon leur charge et leur composition chimique (**Annexe C**). Une corrélation nette entre les réponses provoquées par les particules négatives apparait. De plus, les Latex (+) induisent une figure de toxicité similaire à celle des Silica (+) alors que les oxydes de titane et d'aluminium en génèrent une autre. Lorsque les résultats sont classés par type de particules, nous remarquons que la viabilité cellulaire est la même en fonction de la dose au sein de chaque famille de particule, et cela quelle que soit la charge. Ainsi, la charge des Nps ne semble plus jouer de rôle dans la toxicité des particules en présence de surfactant.

De façon plus surprenante, les particules de silice et de latex induisent une réponse similaire à toutes les doses. Il est en de même pour les oxydes métalliques de titane et d'aluminium. Finalement, pour sept particules étudiées, seules deux figures générales de viabilité sont observées pour les systèmes Nps/SP/cellules (*Figure 5*) :

- Pour les oxydes métalliques, la viabilité est constante, augmente faiblement puis diminue jusqu'à 60% environ.
- Pour les autres particules, la viabilité reste constante jusqu'à des concentrations en particules relativement élevées (10 µg mL^{-1}) puis croît à fortes doses jusqu'à 140% environ.

Ainsi, en présence de Curosurf, la composition chimique des particules et leurs modifications de surface semblent être des critères moins déterminants de leur toxicité. Le fait que le surfactant homogénéise la réponse des cellules vis-à-vis de différentes particules a également été montré par Ruge *et al.* lors de l'étude de l'internalisation de particules hydrophiles et hydrophobes par des macrophages[9].

Dans ce qui suit, nous formulons des hypothèses permettant de corréler les structures hybrides formées entre Nps/SP et la toxicité qu'elles induisent. Il a été montré que différents oxydes métalliques agrègent fortement avec les vésicules de phospholipides[55] alors que les particules de silice sont plus ou moins internalisées par les vésicules (Chapitre 5). Notre supposition est donc la suivante :

- L'agrégation forte entre oxydes métalliques et surfactant augmenterait la toxicité de ces Nps.
- Les particules de latex et de silice seraient internalisées par les vésicules de surfactant, ce qui limiterait le contact entre cellules et particules et atténuerait la toxicité de ces dernières.

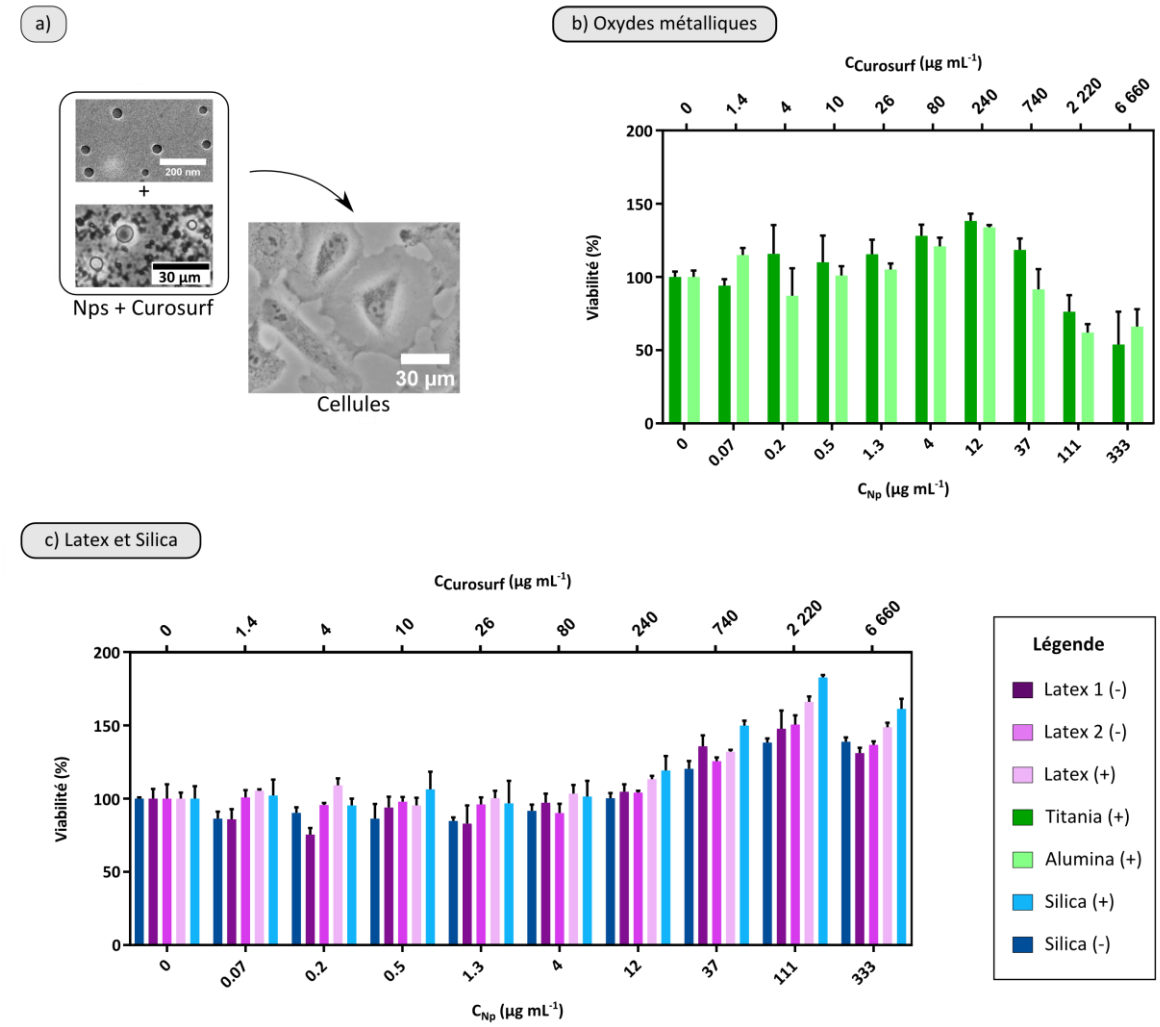


Figure 5 : a) Représentation schématique de l'incubation des cellules A549 avec les mélanges Nps/Curosurf. b-c) Viabilité cellulaire après exposition aux systèmes Nps/Curosurf pour les particules d'oxydes métalliques (b), de latex et de silice (c).

IV. Internalisation de particules de silice fluorescente

Dans la partie précédente, nous avons étudié la toxicité de différentes particules préincubées ou non avec du fluide pulmonaire, et nous avons vu la difficulté d'interpréter ces résultats. Dans cette partie, nous avons sélectionné un type de particules, en l'occurrence les particules de silice chargées positivement. Lors de leur synthèse, des fluorophores émettant dans le rouge y ont été incorporés, les rendant appropriées pour des expériences de fluorimétrie. L'objectif est de mieux comprendre les résultats de toxicité. Pour cela, les quantités de particules en interaction avec les cellules sont déterminées en fonction de la dose, en présence ou en absence du Curosurf.

Dans un second temps, ces particules sont localisées dans les cellules par microscopie électronique à transmission (MET).

1) Quantification de l'internalisation

a) Nanoparticules nues

Les *Figure 6a,b* montrent des représentations schématiques du processus d'incubation des A549 avec les particules de silice d'une part, et la localisation possible de ces particules vis-à-vis des cellules d'autre part. Les particules utilisées ici sont nues et serviront de référence pour la suite. Les cellules sont incubées 1 h et 4 h avec des Nps dont la dose est comprise entre 10 et 100 µg mL^{-1}. Comme nous l'avons montré au Chapitre 2, des mesures de fluorimétrie permettent de déterminer précisément les quantités de particules internalisées par les cellules ou adsorbées sur leur membrane.

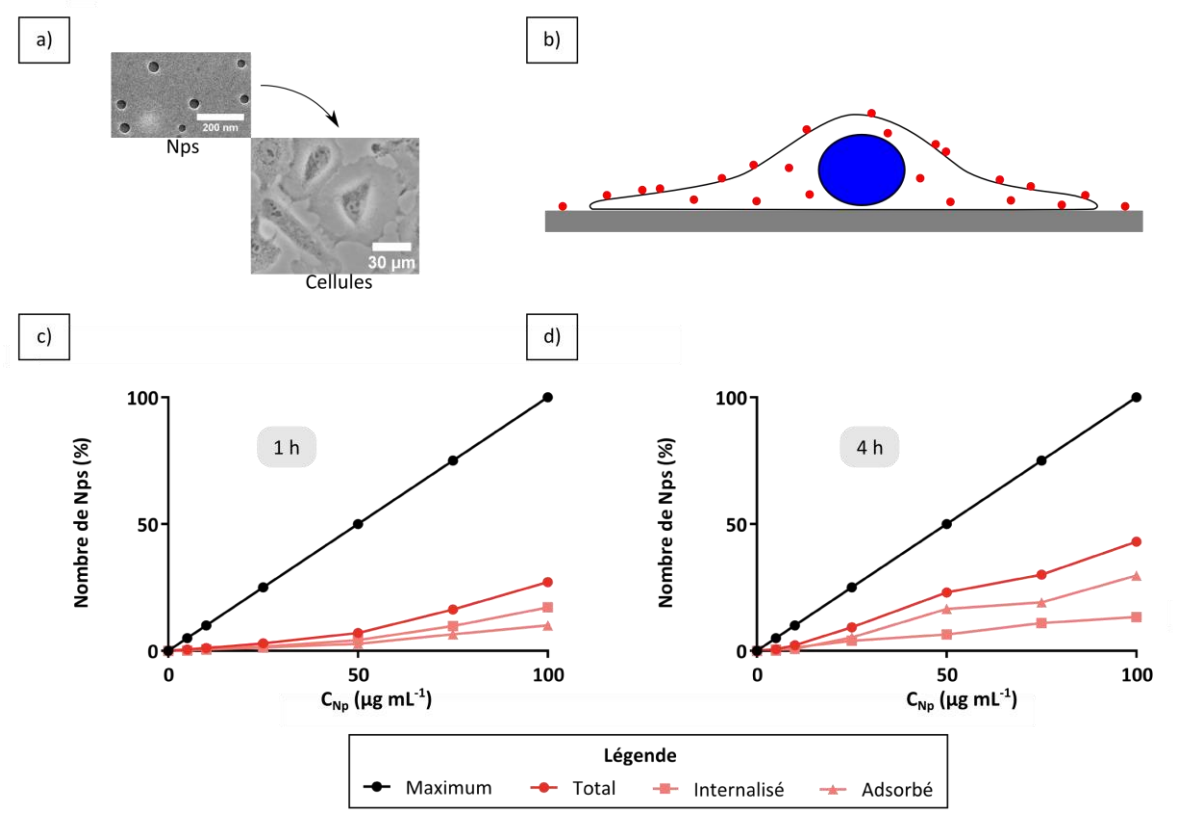


Figure 6 : a) Représentation schématique de l'incubation des cellules A549 avec les Nps. b) Illustration d'une cellule présentant des particules adsorbées sur sa membrane extérieure et d'autres internalisées. Le noyau de la cellule est dessiné en bleu et les particules sont en rouge. c-d) Internalisation des Nps, après 1 h et 4 h d'incubation respectivement. Sont tracés le nombre de particules Silica (+) adsorbées sur les cellules, le nombre de Nps internalisées par ces dernières et le nombre total de Nps en interaction avec les cellules. Les résultats sont normalisés par rapport à la courbe dite « Maximum », qui correspont à 100% d'interaction des Nps avec les cellules. Les mesures sont réalisées sur 3 puits et les déviations standards calculées sont comprises entre 0 et 3%.

Les *Figure 6c,d* montrent les quantités de particules en interaction avec les cellules après 1 h et 4 h d'incubation. La droite en noir représente le taux maximum qui serait mesuré si toutes les particules en solution étaient adsorbées ou internalisées. Dans les conditions testées, les proportions internalisées, adsorbées et totales croissent linéairement avec la dose. La quantité de particule en interaction avec les cellules varie entre 5 et 25%. Ces valeurs sont typiques pour des Nps n'ayant pas subi de traitement de surface spécifique[56–61].

Une observation plus précise des données montre que le rapport entre les quantités de particules internalisées et celles de Nps adsorbées à 1 h augmente avec la dose, alors que le phénomène est inverse à 4 h (au-delà de 25 µg mL^{-1}). Le *Tableau 3* fait une synthèse des données. Les résultats semblent indiquer qu'à temps court, les cellules tentent d'internaliser toutes les particules qui arrivent sur leurs membranes. A l'opposé, à temps long, la membrane des cellules est saturée et l'internalisation est ralentie, voire arrêtée[62].

	1h				4h			
C_{Nps} (µg mL^{-1})	Internalisé	Adsorbé	Total	Internalisé / Adsorbé	Internalisé	Adsorbé	Total	Internalisé / Adsorbé
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
5	6.7	20.2	26.9	0.3	26.9	6.7	33.7	4.0
10	9.3	7.4	16.7	1.3	20.4	11.1	31.5	1.8
25	7.4	5.7	13.1	1.3	17.6	23.3	40.9	0.8
50	8.8	5.9	14.7	1.5	13.4	34.6	48.0	0.4
75	13.0	8.7	21.7	1.5	14.5	25.4	40.0	0.6
100	17.1	10.0	27.1	1.7	13.4	29.7	43.1	0.5

Tableau 3 : Comparaison des quantités de Nps internalisées, adsorbées et en interaction avec les cellules, en fonction de la concentration en particules et du temps d'incubation. Les rapports des quantités de Nps internalisées et adsorbées sont également renseignés.

b) Agrégats Nps/Curosurf et nanoBLSs

Les études physicochimiques réalisées aux chapitres précédents sur l'interaction Nps/SP sont mises à profit pour produire trois types de structures hybrides et étudier la réponse cellulaire qu'elles induisent :

1. Des agrégats mixtes préparés par mélange direct au maximum de l'interaction entre particules et vésicules ($X = 0.3$).
2. Des agrégats mixtes préparés par mélange direct à $X = 70$. Cet échantillon présente un large excès de surfactant et simule le cas physiologique où les particules entrent dans l'hypophase du surfactant sans se couvrir de biomolécules.

3. Des nanoSLBs préparées à $X_S = 2$. Ces objets, qui désignent les particules individuelles enrobées d'une bicouche de Curosurf, sont représentatifs des nanoparticules arrivant dans l'hypophase après interaction avec l'interface air-liquide des alvéoles.

Dans cette partie, les systèmes Nps/Curosurf sont étudiés à des concentrations en deçà de 100 µg mL^{-1}, c'est-à-dire à des doses où ils ne sont pas toxiques pour les cellules A549 (**Annexe D**).

La *Figure 7a* représente à nouveau un schéma de l'incubation des cellules avec des agrégats hybrides. Les *Figure 7b,c* montrent en échelles linéaire et semi-logarithmique les proportions de Nps internalisées et adsorbées après 4 h d'incubation avec les cellules.

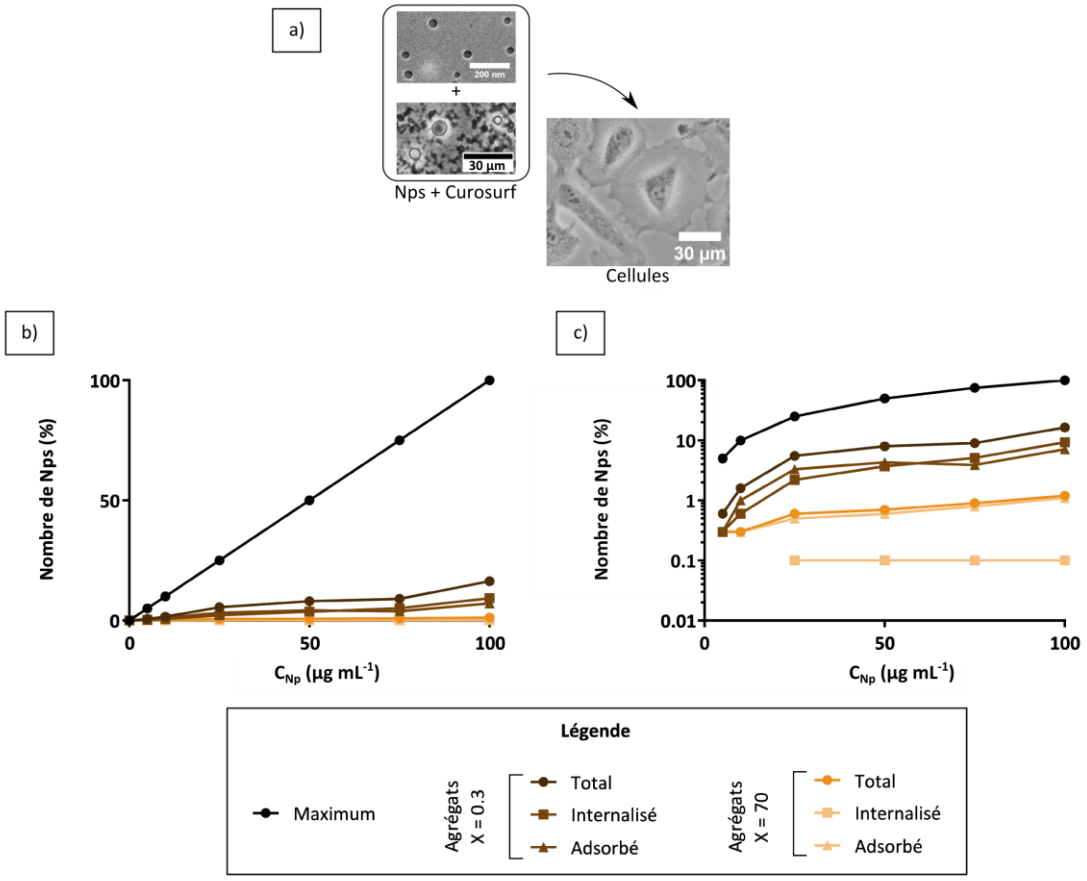


Figure 7 : a) Représentation schématique de l'incubation des cellules A549 avec les systèmes Nps/Curosurf. b-c) Internalisation des agrégats, préparés à X = X_{max} = 0.3 et à X = 70 (4 h d'incubation). Les résultats sont présentés en échelle linéaire et logarythmique respectivement. Sont tracés le nombre de particules Silica (+) adsorbées sur les cellules, le nombre internalisées par ces dernières et le total des Nps en interaction avec les cellules. Les résultats sont normalisés par rapport à la courbe dite « Maximum », qui correspont à 100% d'interaction des Nps avec les cellules. Les mesures sont réalisées sur 3 puits et les déviations standards calculées sont comprises entre 0 et 3%.

A la dose maximale, la proportion de particules en interaction avec les A549 est de 10% pour les agrégats avec excès de particules ($X = 0.3$) et de 1% pour les agrégats avec excès de vésicules ($X = 70$). Dans ce second cas, la quantité de particules internalisées est inférieure à 0.1% de la dose (*Figure 7c*). Il est à noter que pour $X = 0.3$, les nombres de particules adsorbées et internalisées sont du même ordre alors que pour $X = 70$, la quantité de particules adsorbées est significativement plus importante.
Le surfactant pulmonaire a donc comme effet direct de diminuer l'adsorption et l'internalisation des particules. Ce phénomène s'explique par le fait que les particules sont moins accessibles suite à leur interaction avec les phospholipides du Curosurf.

La *Figure 8* illustre les résultats obtenus avec les nanoBLSs. Les proportions de particules internalisées et adsorbées sont faibles, de l'ordre de 1% à la dose de 100 µg mL^{-1}. Ce résultat est plus prononcé que ceux obtenus précédemment avec les agrégats. Les particules de type nanoSLBs sont ainsi furtives vis-à-vis des cellules. Ceci est une conséquence de la présence de la bicouche lipidique supportée.

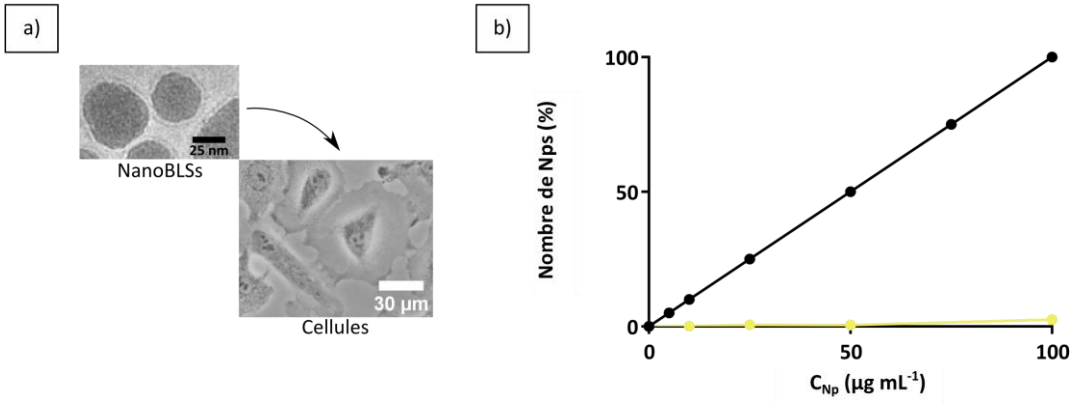


Figure 8 : a) Représentation schématique de l'incubation des cellules avec les nanoBLSs b) Internalisation des nanoBLSs, préparées à $X_S = 2$, après 4 h d'incubation. Seul le nombre total de particules en interaction avec les cellules est tracé. Les résultats sont normalisés par rapport à la courbe dite « Maximum », qui correspont à 100% d'interaction des Nps avec les cellules.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat :

- Comme nous l'avons montré au Chapitre 4, les nanoBLSs sont stables dans le milieu de culture, ce qui limite leur sédimentation, et donc leur contact avec les cellules.
- Les nanoBLSs sont chargées négativement en moyenne, tout comme les membranes des cellules. Il y a donc répulsion électrostatique entre ces deux entités. Cet effet est probablement faible compte tenu de la force ionique élevée du milieu de culture qui diminue la portée des interactions.

- Les phospholipides enrobant la particule empêchent les cellules de « reconnaître » la particule comme un agent étranger[63,64].

c) Comparaison des résultats

Nous avons rassemblé sur un même graphe l'ensemble des résultats concernant les proportions de nanoparticules internalisées (*Figure 9*). Il apparaît que plus la fraction de surfactant pulmonaire est importante, moins les particules sont internalisées, qu'elles soient sous forme agrégée ou sous forme de nanoSLB.
Pour des conditions proches des conditions physiologiques, c'est-à-dire pour X = 70 et pour les nanoBLSs, l'internalisation est inférieure à 1%. Ces résultats sont en accord avec les données de Vranic *et al.*[14]. Il est à noter que contrairement à nos travaux, la caractérisation physico-chimique des systèmes hybrides Nps/SP n'a pas été rapportée par ces auteurs.

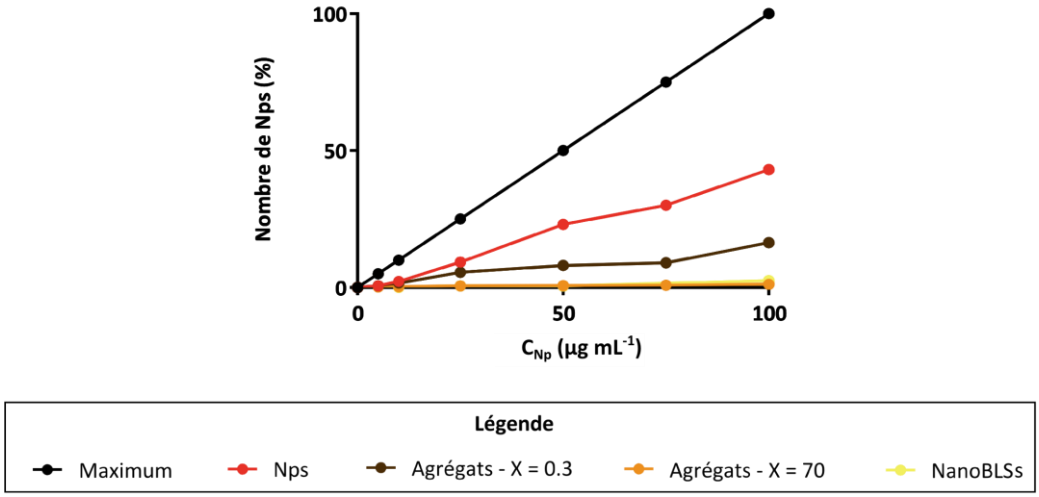


Figure 9 : Comparaison des résultats d'internalisation pour les Nps, les agrégats et les nanoBLSs, après 4 h d'incubation.

Nos résultats d'internalisation mettent en évidence l'importance de l'état physico-chimique des objets en interaction avec les cellules. Par ailleurs, ils sont cohérents avec ceux obtenus en toxicité. Notre étude montre que le surfactant pulmonaire protège les cellules des nanoparticules sur des temps courts. Il serait judicieux de répéter ces expériences avec du Curosurf marqué en fluorescence pour déterminer le devenir du surfactant lorsque les systèmes Nps/SP sont internalisés par les A549.

2) Observation des systèmes internalisés en microscopie électronique

Dans cette partie, nous cherchons à localiser les nanomatériaux dans la cellule, à estimer leur état d'agrégation et à obtenir des indications sur leur mécanisme d'entrée. Les cellules sont alors incubées 4 h avec les nanoparticules (ou avec les différents systèmes Nps/SP) à 100 µg mL^{-1} puis observées par MET.

a) Nanoparticules nues

La *Figure 10* montre une cellule entière imagée en MET après incubation avec des Silica (+).

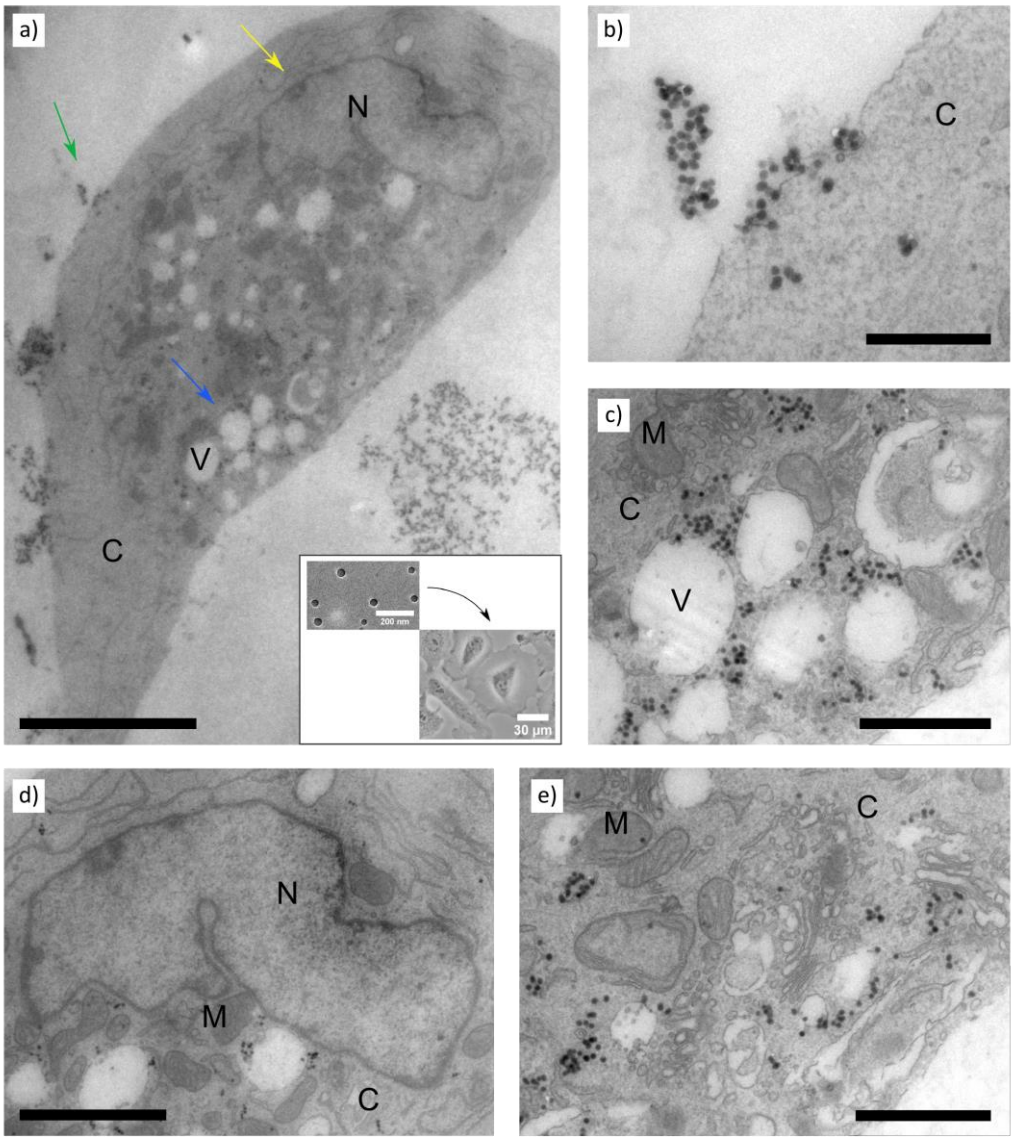


Figure 10 : Images de MET de cellules A549 incubées 4 h avec des particules « nues » de Silica (+) à C = 100 µg mL^{-1}. Légende : N – noyau ; C – cytoplasme ; M – mitochondrie ; V – vacuole. a) Cellule entière observée à faible grossissement (barre d'échelle : 5 µm). b-d) Agrandissements des zones indiquées par les flèches de couleur verte, bleu et jaune respectivement. Barres d'échelles respectives : 500 nm, 2 µm et 2 µm. e) Cytoplasme d'une seconde cellule. Barre d'échelle : 1 µm.

De nombreuses particules sont visibles à l'intérieur et à l'extérieur de cette cellule, et de manière générale elles se trouvent sous la forme d'agrégats de quelques unités à quelques dizaines d'unités. Aucune particule n'est observée dans le noyau[23] ou dans les mitochondries.
Les *Figure 10b-d* sont des agrandissements des zones indiquées par les flèches. L'image présentée en *Figure 10e* est celle d'une cellule voisine sur la coupe de MET. La première observation importante concerne la présence de vacuoles de taille comprises entre 250 nm et 2 µm de diamètre, et repérées par un « V » sur les images. Ces vacuoles sont le signe que l'intégrité du cytoplasme est endommagée[65] et que la cellule a entamé un processus de mort cellulaire de type nécrose ou paraptose[66–68]. Ces résultats sont en accord avec l'existence d'une toxicité avérée mesurée par WST-1, même si l'atteinte mitochondriale n'est observée qu'à une concentration légèrement plus élevée (> 200 µg mL^{-1}).
La seconde observation d'intérêt est que les particules de silice internalisées ne sont pas incluses dans des compartiments membranaires tels que des endosomes ou des lysosomes. Elles sont au contraire libres dans le cytosol. La membrane plasmique semble être rompue par l'arrivée de particules en amas[37] (*Figure 10b*). Nous supposons que cette porosité induit l'entrée directe des particules dans la cellule et que ce mode d'internalisation est responsable de la toxicité observée.

b) Agrégats Nps/Curosurf

La *Figure 11a* illustre les observations faites en MET sur des cellules incubées avec le système Silica (+)/Curosurf sous forme d'agrégats ($X \approx X_{max}$). A la différence du cas où les particules sont nues, la cellule observée ici ne présente pas de vacuoles.
Des particules individuelles ou en amas sont visibles à l'intérieur de la cellule ainsi que sur la membrane plasmique. Les *Figure 11b,c* montrent des agrandissements des zones indiquées par les flèches et permettent d'identifier des particules libres dans le cytosol ou incluses dans des compartiments endosomaux. Ces résultats pourraient suggérer une pluralité de mécanismes d'entrée, due à la présence de plusieurs types de structures agrégées (Chapitre 5).
Comme précédemment, aucune particule n'a été observée dans les mitochondries ou dans le noyau (*Figure 11d,e*). Dans les cellules, on distingue moins de particules internalisées que précédemment, une observation en accord avec les résultats de fluorimétrie.
Nous concluons que la pré-incubation des particules de silice positives avec du surfactant pulmonaire modifie profondément leur interaction avec les cellules.

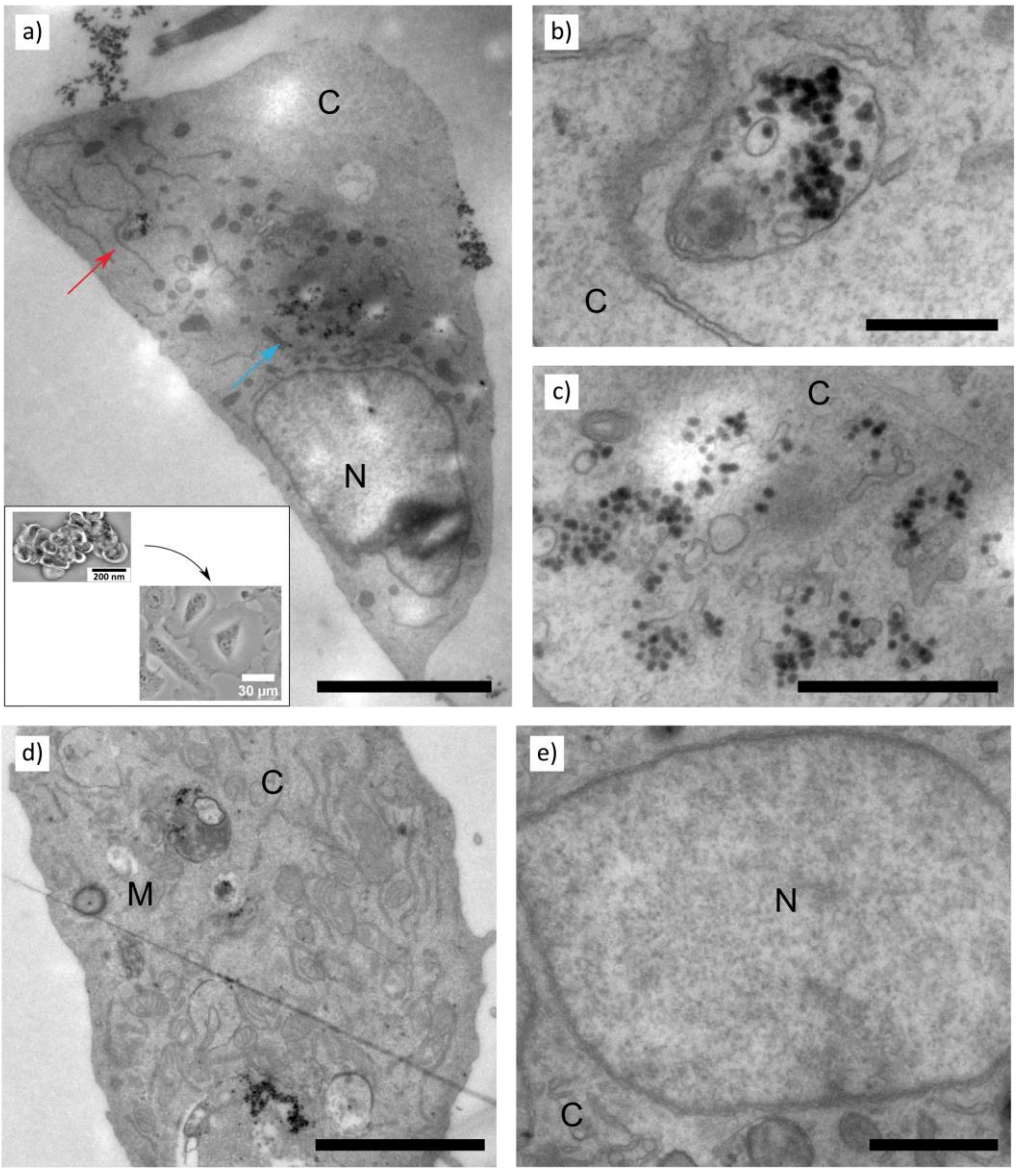


Figure 11 : Images de MET de cellules A549 incubées 4 h avec des agrégats Silica (+)/Curosurf à C = 100 µg mL^{-1} en particules et X ≈ X_{max}. Légende : N – noyau ; C – cytoplasme ; M – mitochondrie. a) Cellule entière observée à faible grossissement (barre d'échelle : 5 µm). b-c) Agrandissements des zones indiquées par une flèche rouge et bleue respectivement. Barres d'échelle : 500 nm et 1 µm respectivement. d-e) Cytoplasme et noyau d'autres cellules. Barres d'échelles : 2 µm et 1 µm respectivement.

c) NanoBLSs

Dans cette dernière partie, les cellules A549 sont incubées avec des particules couvertes d'une bicouche lipidique supportée (*Figure 12*).

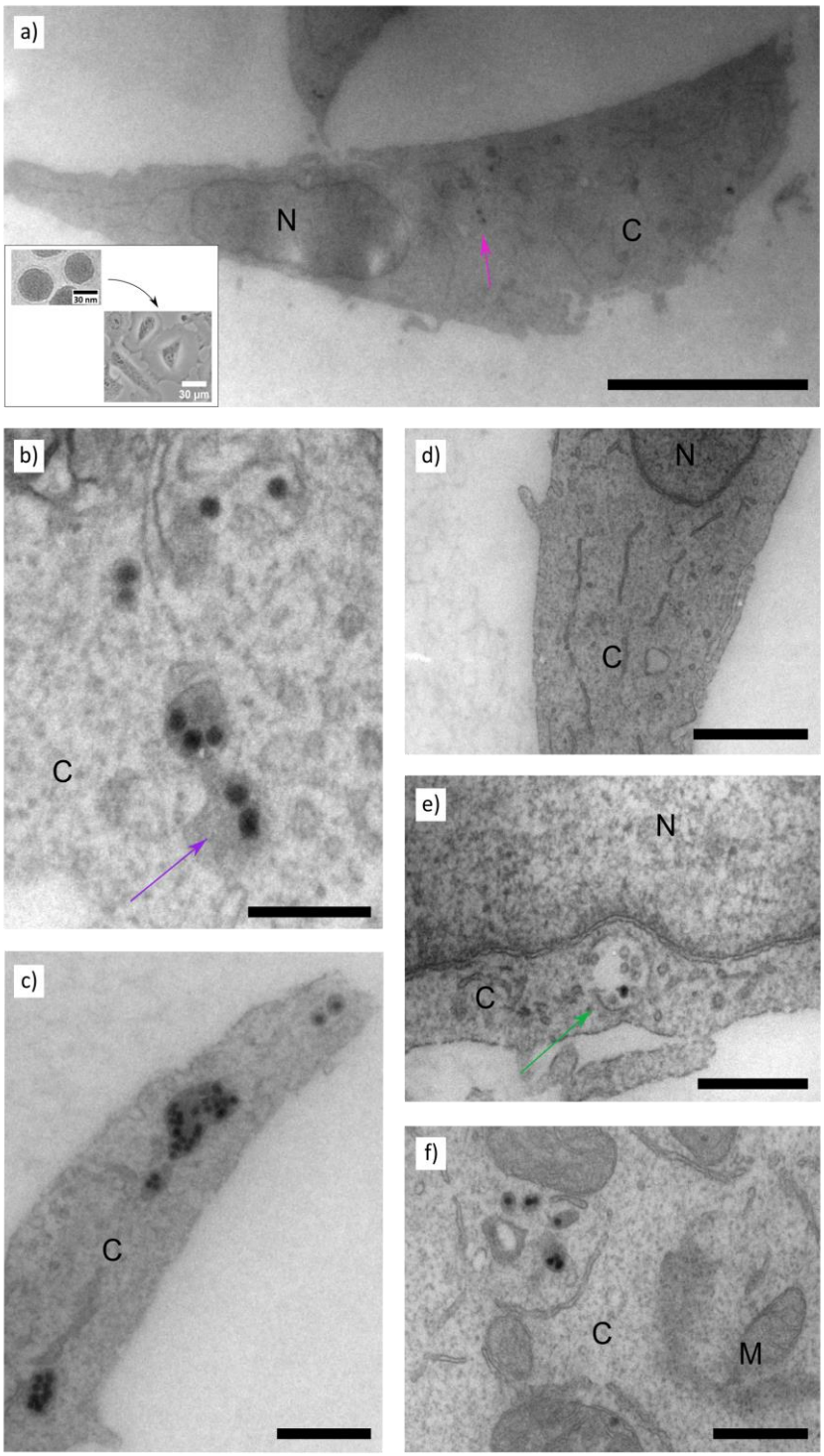


Figure 12 : Images de MET de cellules A549 incubées 4 h avec des particules de Silica (+) à C = 100 µg mL^{-1} et enrobées dans du Curosurf (X_S = 2). Légende : N – noyau ; C – cytoplasme ; M - mitochondrie. a) Cellule entière observée à faible grossissement (barre d'échelle : 5 µm). b) Agrandissement de la zone indiquée par la flèche fushia. La flèche violette indique un lysosome. Barre d'échelle : 250 nm. c-e) Images du cytoplasme, du noyau et des mitochondries d'autres cellules. La flèche verte montre un endosome. Barres d'échelle : 500 nm, 1 µm, 500 nm et 500 nm respectivement.

Les changements avec les deux cas précédents sont spectaculaires :

- Les particules dans leur ensemble sont individuelles ou regroupées dans des amas de quelques unités.
- En grande majorité, les particules identifiées sont dans des lysosomes (*Figure 12b,c,f*), quelques-unes étant localisées dans des endosomes (*Figure 12e*).
- Le nombre total de particules internalisées est faible, et aucune particule adsorbée à la membrane plasmique n'est observée.

Comme pour le cas des agrégats, nous n'observons pas de vacuoles, et aucune particule n'est détectée dans les mitochondries ou le noyau (*Figure 12e,f*). L'ensemble de ces résultats est en accord avec la faible toxicité mesurée en WST-1 et avec les expériences de fluorimétrie. Ces données sont également similaires à celles observées pour l'internalisation par des A549 de particules de silice en présence ou en absence de protéine corona[50]. Une fois de plus nos résultats montrent l'effet protecteur du Curosurf dans les processus d'interaction Nps/cellules.

V. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'impact du surfactant pulmonaire sur la toxicité et l'internalisation des particules. Dans un premiers temps, sept Nps appartenant à trois classes différentes de matériaux ont été considérées : des particules de latex, des oxydes métalliques et des particules de silice. A l'exception des oxydes de titane, l'ensemble des Nps est toxique à divers degrés vis-à-vis des cellules A549. Nous avons montré que la toxicité des particules dépend de leur composition chimique et de leur état de surface. En revanche, aucune corrélation entre agrégation des matériaux et viabilité n'a été observée.

Les expériences ont été répétées en pré-incubant les particules avec du Curosurf. Nous avons montré que la présence de surfactant pulmonaire diminue la toxicité des particules de latex et de silice. Le résultat inverse est observé pour les oxydes métalliques. Il semblerait que la toxicité des particules soit intimement liée au type de structure formée lors de l'incubation avec les vésicules de Curosurf.

Nos expériences soulignent la difficulté d'interpréter les tests de viabilité et de déterminer l'impact de chaque paramètre physico-chimique. Cet obstacle vient en partie du fait que ces paramètres sont couplés et que les protocoles de toxicité ne sont pas harmonisés.

Dans un second temps, nous avons étudié des systèmes Silica (+)/SP bien caractérisés. Les données montrent que plus les particules sont dans une configuration proche de l'*in vivo*, c'est-à-dire plus le rapport X est élevé, moins elles sont internalisées. Ces résultats sont en accord avec la diminution de toxicité observée par ailleurs. Il semblerait donc que le surfactant réduise la toxicité des Nps en limitant leur internalisation.

Pour finir, les cellules incubées avec les différents systèmes Nps/SP ont été étudiées par MET. Les différences observées entre chaque échantillon sont remarquables et concernent la quantité de particules internalisées, leur état d'agrégation, et le fait qu'elles soient libres dans le cytoplasme ou contenues dans des endosomes ou des lysosomes. Ces résultats semblent en accord avec ceux de toxicité et d'internalisation.
Pour conclure, nous avons montré dans ce chapitre qu'il est primordial de caractériser extensivement les structures résultant de l'interaction Nps/SP et de coupler différentes techniques expérimentales afin de comprendre les résultats de toxicité cellulaire.

Annexe A : Récapitulatif de la littérature

Références	Cellules	Nanomatériaux	SPs	X	Sonication	Evolution de la toxicité
Ratoi *et al.*	A549	Np d'oxyde de titane	DPPC	1.25	Oui	↘
Kasper *et al.*	A549	Np de silice	Alvéofact	0.4 à 8	Non	↗
Cho *et al.*	Globules rouges	Np d'oxyde de aluminium	SP murin	?	Non	↘
		Np d'oxyde de silice et titane				Toxicité trop faible pour voir un effet du SP
Wallace *et al.*	Globules rouges	Np de quartz	PC	0.1	Non	↘
		Np de kaolin		0.2		↘
Liu *et al.*	Macrophages pulmonaires	Np de quartz	DPPC	0.1	Non	↘
Gao *et al.*	Macrophages alvéolaires	Np de quartz	DPPC	0.1	Non	↘
		Np de kaolin		0.2		↘
Gasser *et al.*	Macrophages	NT de carbone	Curosurf	1	Oui	↗
Wang *et al.*	Cellules épithéliales du poumon	NT de carbone	Survanta	1.5	Oui	Pas de toxicité, avec ou sans SP
Sweeney *et al.*	AT1 immortalisées	NT d'argent	Sécrétions de cellules AT2	?	Non	↘
			Curosurf			Pas d'effet du SP
Murphy *et al.*	A549	Np d'argent	DPPC	5.10^{-4}	?	↗
Sweeney *et al.*	AT1 immortalisées	Np d'argent	Curosurf	?	Non	↘
Theodorou *et al.*	AT1 immortalisées	NT d'oxyde de zinc	Curosurf	?	Non	↗
Lu *et al.*	Fibroblastes de poumons	Fibres de silicates	PC	?	Oui	↘
Nguyen *et al.*	A549	Np de polymères	Alvéofact	0.002 à 0.045	Non	Pas d'effet
	Cellules épithéliales pulmonaires	Np de polymères	Alvéofact	0.002 à 0.045	Non	Pas d'effet

Tableau 4 : Récapitulatif des données de la littérature concernant l'impact du surfactant pulmonaire sur la toxicité des nanomatériaux. Abbréviations : Np - nanoparticule ; NT - nanotube ; PC - phospholipide de la famille des phosphatidylcholines. L'Alvéofact, le Curosurf et le Survanta sont des surfactants thérapeutiques d'origine animale.

Annexe B : Viabilité des A549 exposées aux Nps dispersées dans du sérum

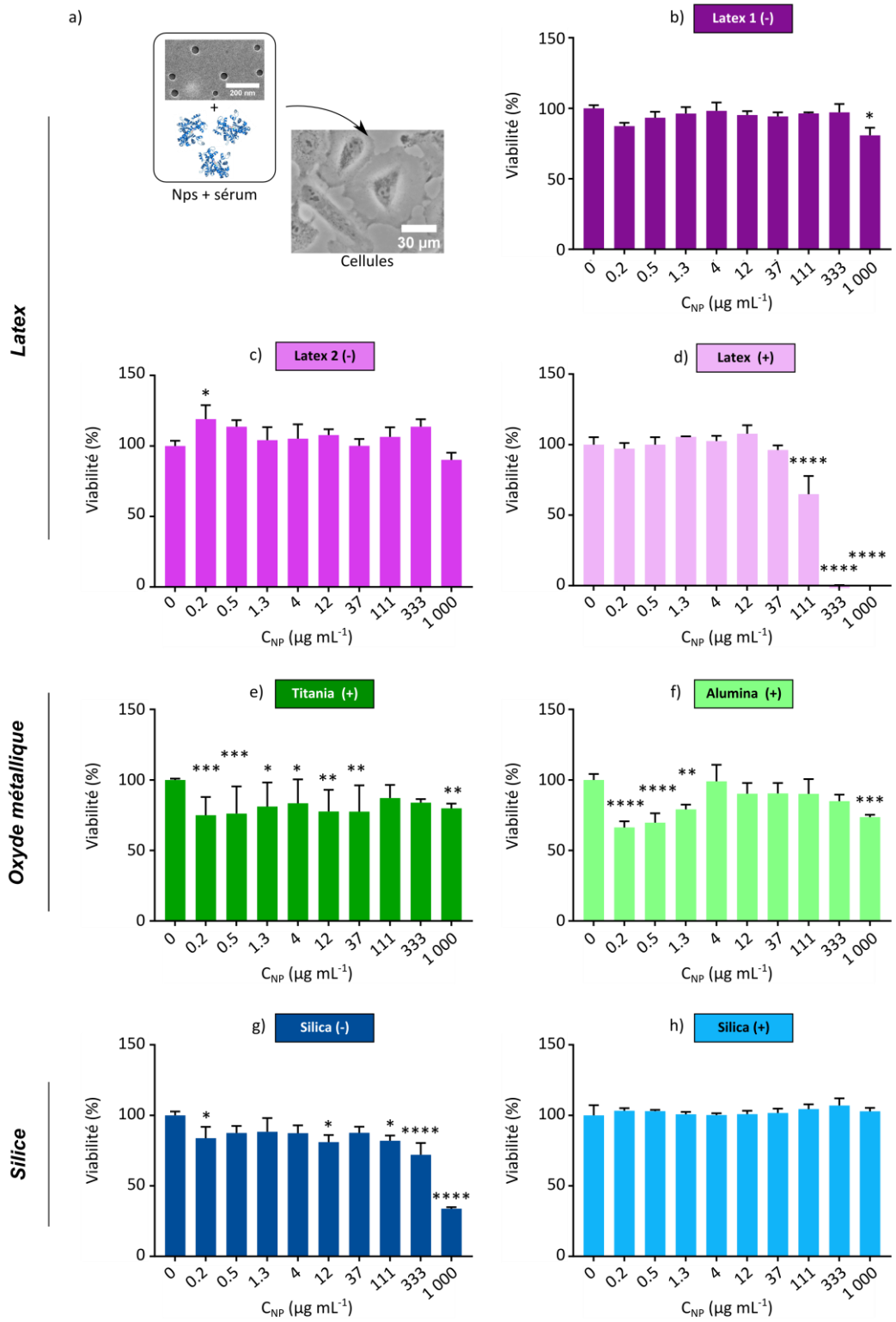


Figure 13 : a) Représentation schématique de l'incubation des cellules A549 avec des mélanges Nps/Sérum. b-h) Viabilité cellulaire après incubation avec les Latex 1 (-), les Latex 2 (-), les Latex (+), les Titania (+), les Alumina (+), les Silica (-) et les Silica (+) respectivement dans du milieu de culture complété par du sérum.

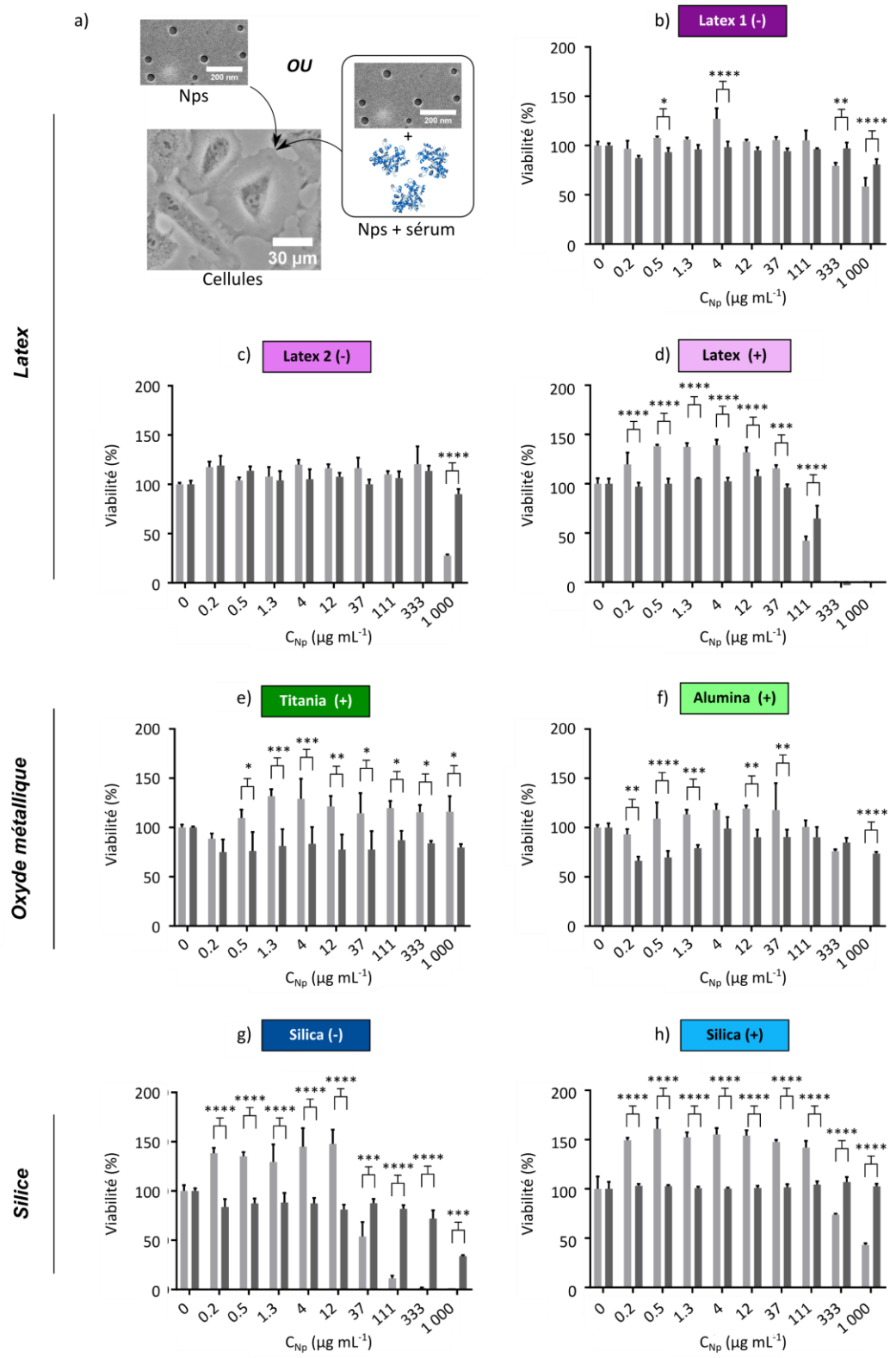


Figure 14 : a) Représentation schématique de l'incubation des cellules avec des particules ayant été dispersées dans du milieu contenant ou non du sérum. b-h) Comparaison des tests de viabilité cellulaire effectués pour des Nps diluées dans du milieu de culture (histogrammes gris clair) et dans du milieu de culture complété par du sérum (histogrammes gris foncés).

Annexe C : Viabilité des A549 exposées aux Nps dispersées dans du Curosurf

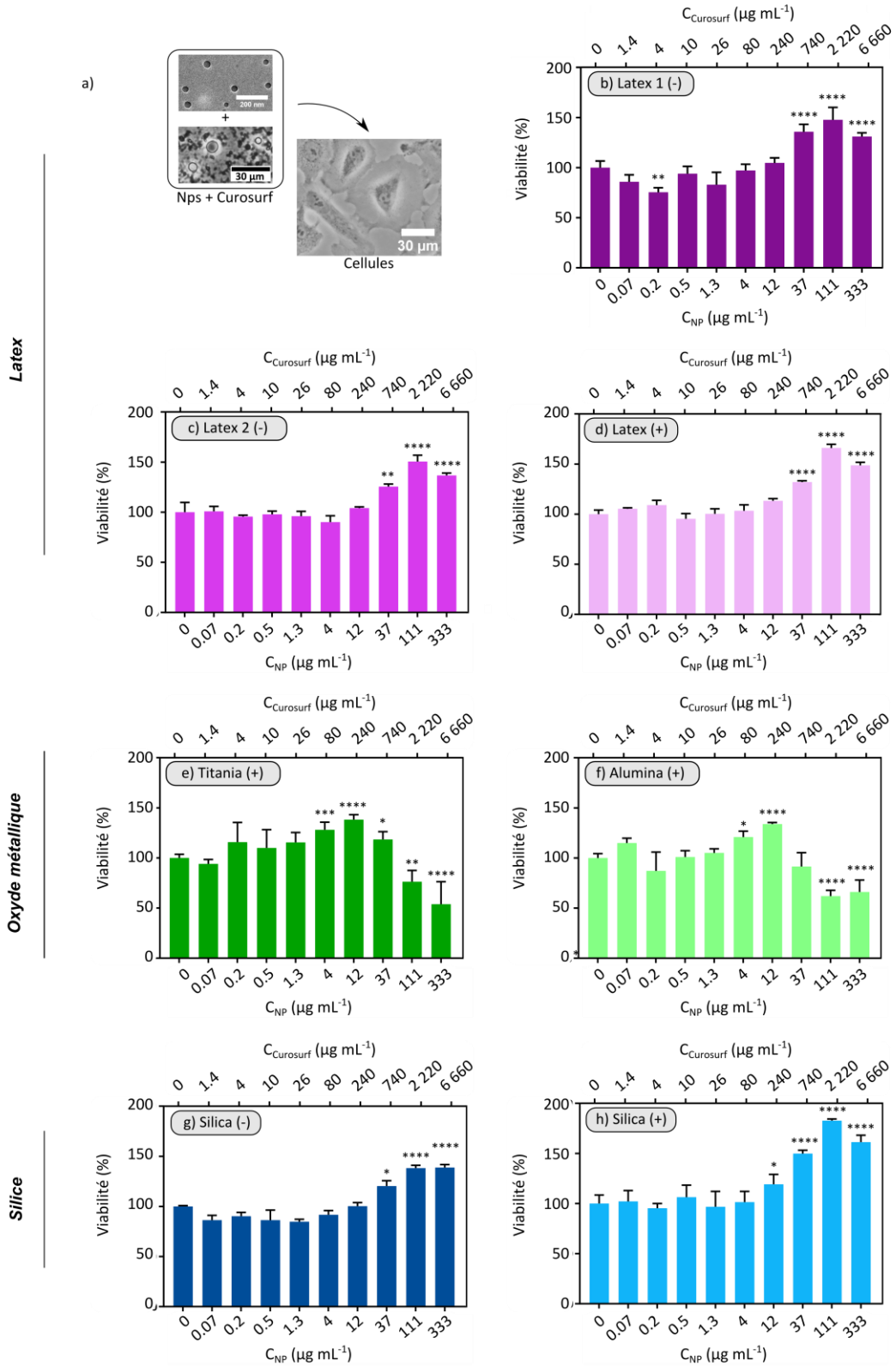


Figure 15 : a) Représentation schématique de l'incubation des cellules A549 avec les mélanges Nps/Curosurf. b-h) Viabilité cellulaire après incubation avec les Latex 1 (-), les Latex 2 (-), les Latex (+), les Titania (+), les Alumina (+), les Silica (-) et les Silica (+) en présence de Curosurf.

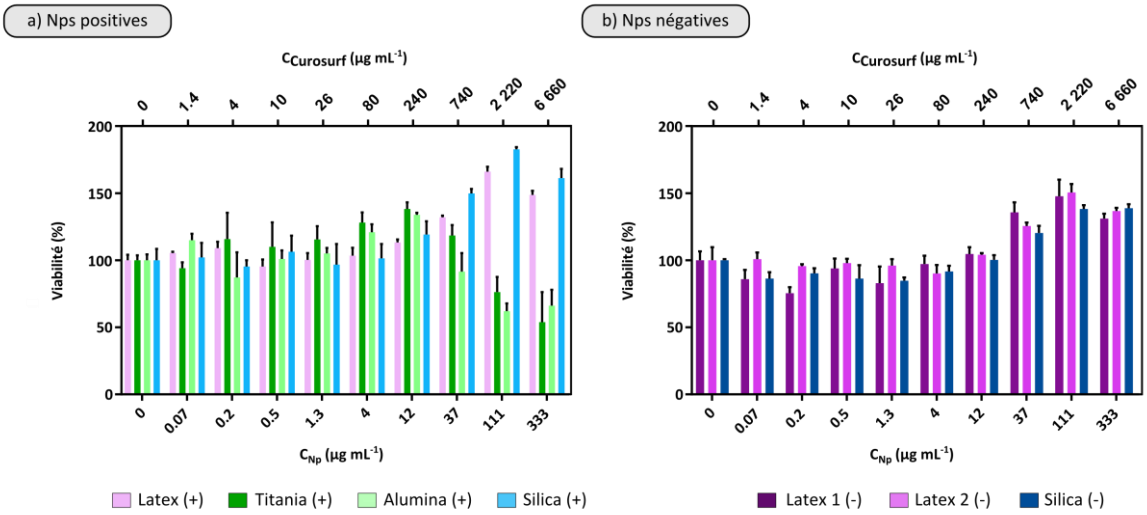


Figure 16 : Viabilité cellulaire après exposition aux systèmes Nps/Curosurf pour les particules de charge positive (a) et négative (b).

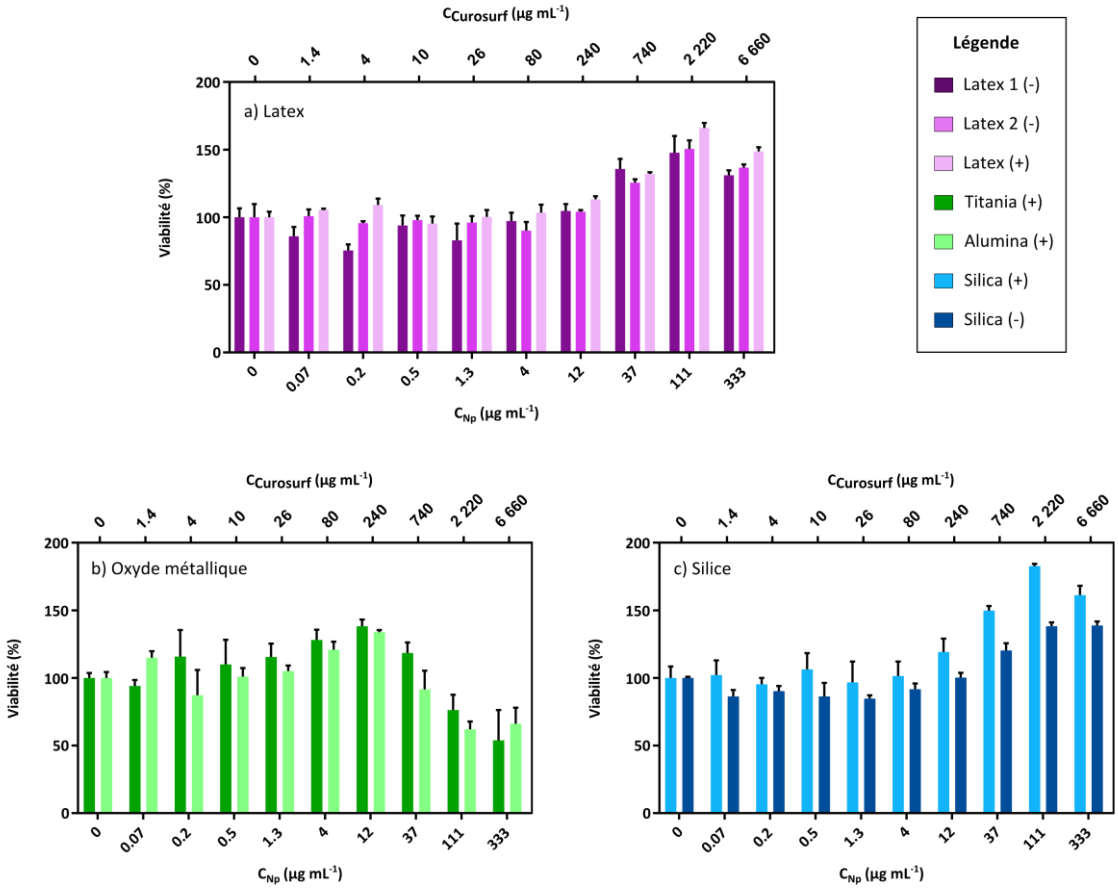


Figure 17 : Viabilité cellulaire après exposition aux systèmes Nps/Curosurf pour les particules de latex (a), pour des oxydes de titane et d'aluminium (b) et pour des particules de silice (c).

Annexe D : Viabilité des A549 exposées aux nanoBLSs et aux agrégats

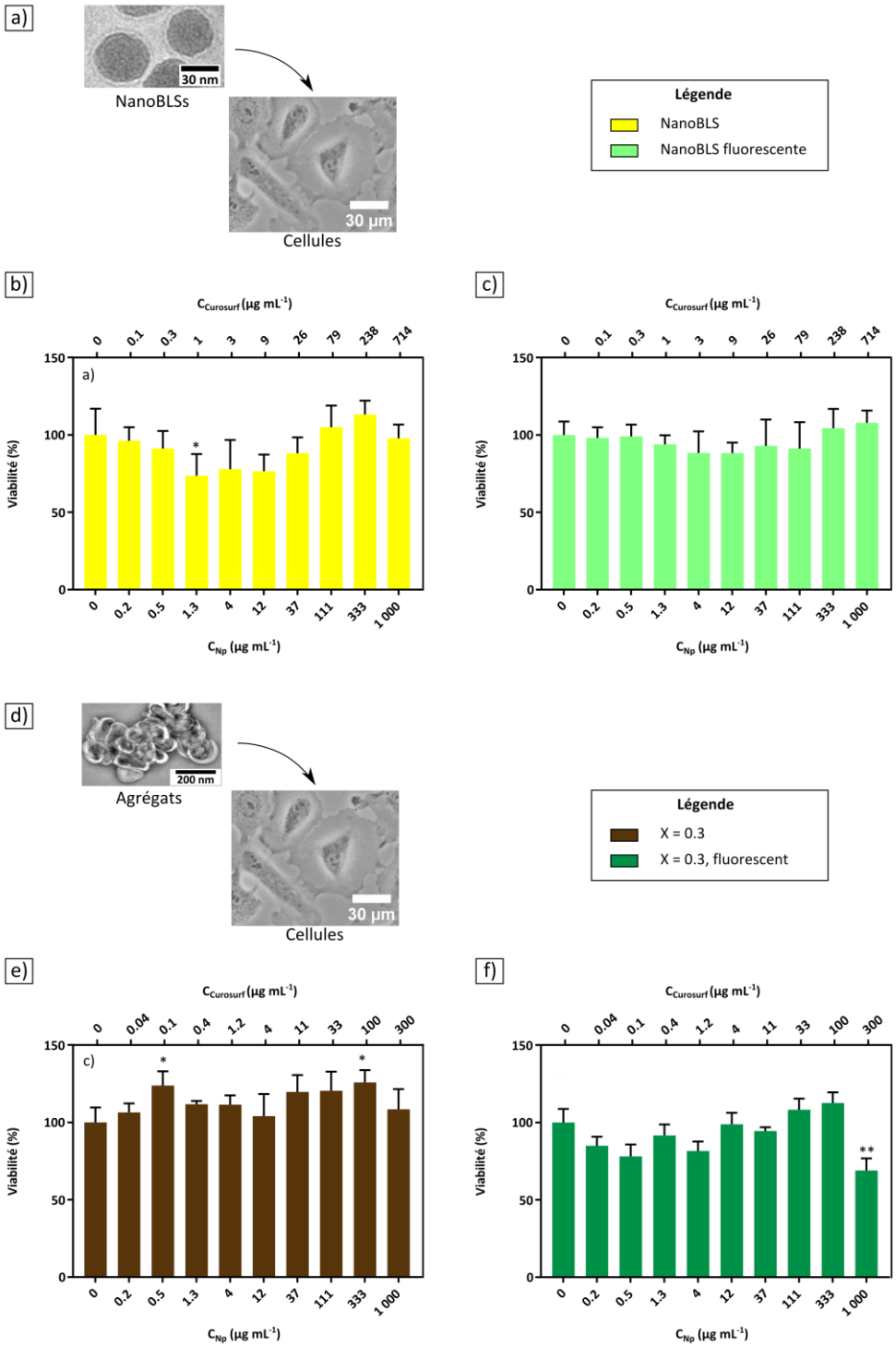


Figure 18 : a) Représentation schématique de l'incubation des cellules A549 avec des nanoBLSs. b-c) Viabilité des A549 exposées aux nanoBLSs et aux nanoBLSs dont le Curosurf est marqué au fluorophore PKH 67 d) Représentation schématique de l'incubation des cellules A549 avec des agrégats Nps/Curosurf. e-f) Viabilité des A549 incubées avec des agrégats Silica (+)/Curosurf prépares à X = 0.3 dont le Curosurf est marqué ou non au PKH 67. Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec Chloé Puisney (Laboratoire BFA, Université Paris Diderot).

Bibliographie

1. Schleh, C. & Hohlfeld, J. M. Interaction of nanoparticles with the pulmonary surfactant system. *Inhal. Toxicol.* **21,** 97–103 (2009).
2. Wallace, W. E. *et al.* Contrasting respirable quartz and kaolin retention of lecithin surfactant and expression of membranolytic activity following phospholipase A_2 digestion. *J. Toxicol. Environ. Health* **37,** 391–409 (1992).
3. Lu, J., Keane, M. J., Ong, T. & Wallace, W. E. *In vitro* genotoxicity studies of chrysotile asbestos fibers dispersed in simulated pulmonary surfactant. *Mutat. Res. Toxicol.* **320,** 253–259 (1994).
4. Liu, X. *et al.* Phospholipid surfactant adsorption by respirable quartz and *in vitro* expression of cytotoxicity and DNA damage. *Toxicol. Lett.* **96–7,** 77–84 (1998).
5. Gao, N. *et al.* Effects of phospholipid surfactant on apoptosis induction by respirable quartz and kaolin in NR8383 rat pulmonary macrophages. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **175,** 217–225 (2001).
6. Nguyen, J. *et al.* Nanocomposites of lung surfactant and biodegradable cationic nanoparticles improve transfection efficiency to lung cells. *J. Controlled Release* **140,** 47–54 (2009).
7. Wang, L. *et al.* Dispersion of single-walled carbon nanotubes by a natural lung surfactant for pulmonary *in vitro* and *in vivo* toxicity studies. *Part. Fibre Toxicol.* **7,** 31–40 (2010).
8. Ruge, C. A. *et al.* Uptake of nanoparticles by alveolar macrophages is triggered by surfactant protein A. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **7,** 690–693 (2011).
9. Ruge, C. A. *et al.* The interplay of lung surfactant proteins and lipids assimilates the macrophage clearance of nanoparticles. *PLoS ONE* **7,** 40775–40784 (2012).
10. Kapralov, A. A. *et al.* Adsorption of surfactant lipids by single-walled carbon nanotubes in mouse lung upon pharyngeal aspiration. *ACS Nano* **6,** 4147–4156 (2012).
11. Schleh, C. *et al.* Surfactant protein D modulates allergen particle uptake and inflammatory response in a human epithelial airway model. *Respir Res* **13,** 18–27 (2012).
12. Gasser, M. *et al.* Pulmonary surfactant coating of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) influences their oxidative and pro-inflammatory potential *in vitro*. *Part Fibre Toxicol* **9,** 17–29 (2012).
13. Cho, W.-S. *et al.* Zeta potential and solubility to toxic ions as mechanisms of lung inflammation caused by metal/metal oxide nanoparticles. *Toxicol. Sci.* **126,** 469–477 (2012).
14. Vranic, S. *et al.* Internalization of SiO_2 nanoparticles by alveolar macrophages and lung epithelial cells and its modulation by the lung surfactant substitute Curosurf®. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **20,** 2761–2770 (2013).

15. Ratoi, M., Hoet, P. H. M., Crossley, A. & Dobson, P. Impact of lung surfactant on wettability and cytotoxicity of nanoparticles. *RSC Adv.* **4,** 20573–20581 (2014).
16. Thorley, A. J., Ruenraroengsak, P., Potter, T. E. & Tetley, T. D. Critical determinants of uptake and translocation of nanoparticles by the human pulmonary alveolar epithelium. *ACS Nano* **8,** 11778–11789 (2014).
17. Sweeney, S. *et al.* Silver nanowire interactions with primary human alveolar type-II epithelial cell secretions: Contrasting bioreactivity with human alveolar type-I and type-II epithelial cells. *Nanoscale* **7,** 10398–10409 (2015).
18. Murphy, A., Sheehy, K., Casey, A. & Chambers, G. The surfactant dipalmitoylphophatidylcholine modifies acute responses in alveolar carcinoma cells in response to low-dose silver nanoparticle exposure: DPPC modifies acute response of low dose AgNP exposure. *J. Appl. Toxicol.* **35,** 1141–1149 (2015).
19. Kasper, J. Y. *et al.* Pulmonary surfactant augments cytotoxicity of silica nanoparticles: Studies on an *in vitro* air–blood barrier model. *Beilstein J. Nanotechnol.* **6,** 517–528 (2015).
20. Theodorou, I. G. *et al.* Effect of pulmonary surfactant on the dissolution, stability and uptake of zinc oxide nanowires by human respiratory epithelial cells. *Nanotoxicology* **10,** 1351–1362 (2016).
21. Sweeney, S. *et al.* Pulmonary surfactant mitigates silver nanoparticle toxicity in human alveolar type-I-like epithelial cells. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **145,** 167–175 (2016).
22. Unfried, K. *et al.* Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms. *Nanotoxicology* **1,** 52–71 (2007).
23. Fröhlich, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* 5577–5591 (2012).
24. Braakhuis, H. M., Park, M. V., Gosens, I., De Jong, W. H. & Cassee, F. R. Physicochemical characteristics of nanomaterials that affect pulmonary inflammation. *Part. Fibre Toxicol.* **11,** 18 (2014).
25. Tsuda A. & Gehr, P. in *Nanoparticles in the Lung - Environmental Exposure and Drug Delivery (Chapter 17)* 267–294 (Taylor & Francis Group, 2015).
26. Wadhwa, S. *et al.* Comparative *in vitro* cytotoxicity study of carbon nanotubes and titania nanostructures on human lung epithelial cells. *J. Hazard. Mater.* **191,** 56–61 (2011).
27. Moschini, E. *et al.* The modality of cell–particle interactions drives the toxicity of nanosized CuO and TiO_2 in human alveolar epithelial cells. *Toxicol. Lett.* **222,** 102–116 (2013).
28. Simon-Deckers, A. *et al.* In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. *Toxicology* **253,** 137–146 (2008).

29. Lin, W., Stayton, I., Huang, Y., Zhou, X.-D. & Ma, Y. Cytotoxicity and cell membrane depolarization induced by aluminum oxide nanoparticles in human lung epithelial cells A549. *Toxicol. Environ. Chem.* **90,** 983–996 (2008).
30. Braydich-Stolle, L. K. *et al.* Nanosized aluminum altered immune function. *ACS Nano* **4,** 3661–3670 (2010).
31. Grabowski, N. *et al.* Toxicity of surface-modified PLGA nanoparticles toward lung alveolar epithelial cells. *Int. J. Pharm.* **454,** 686–694 (2013).
32. Ruenraroengsak, P. *et al.* Respiratory epithelial cytotoxicity and membrane damage (holes) caused by amine-modified nanoparticles. *Nanotoxicology* **6,** 94–108 (2012).
33. Fröhlich, E. *et al.* Comparison of two *in vitro* systems to assess cellular effects of nanoparticles-containing aerosols. *Toxicol. In Vitro* **27,** 409–417 (2013).
34. Lin, W., Huang, Y., Zhou, X.-D. & Ma, Y. *In vitro* toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **217,** 252–259 (2006).
35. Kim, I.-Y., Joachim, E., Choi, H. & Kim, K. Toxicity of silica nanoparticles depends on size, dose, and cell type. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **11,** 1407–1416 (2015).
36. Tsuda A. & Gehr, P. in *Nanoparticles in the Lung - Environmental Exposure and Drug Delivery (Chapter 7)* 107–132 (Taylor & Francis Group, 2015).
37. Wei, X. *et al.* Effects of SiO_2 nanoparticles on phospholipid membrane integrity and fluidity. *J. Hazard. Mater.* **287,** 217–224 (2015).
38. Muhlfeld, C. *et al.* Interactions of nanoparticles with pulmonary structures and cellular responses. *AJP Lung Cell. Mol. Physiol.* **294,** 817–829 (2008).
39. Bruinink, A., Wang, J. & Wick, P. Effect of particle agglomeration in nanotoxicology. *Arch. Toxicol.* **89,** 659–675 (2015).
40. Wohlleben, W. *et al.* Influence of agglomeration and specific lung lining lipid/protein interaction on short-term inhalation toxicity. *Nanotoxicology* **10,** 970–980 (2016).
41. Soto, K., Garza, K. & Murr, L. Cytotoxic effects of aggregated nanomaterials. *Acta Biomater.* **3,** 351–358 (2007).
42. Horie, M. *et al.* Protein adsorption of ultrafine metal oxide and its influence on cytotoxicity toward cultured cells. *Chem. Res. Toxicol.* **22,** 543–553 (2009).
43. Tang, Y. *et al.* Mitochondrial injury induced by nanosized titanium dioxide in A549 cells and rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **36,** 66–72 (2013).
44. Lanone, S. *et al.* Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. *Part. Fibre Toxicol.* **6,** 14–25 (2009).
45. Davoren, M. *et al. In vitro* toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. *Toxicol. In Vitro* **21,** 438–448 (2007).
46. Vranic, S. *et al.* Impact of serum as a dispersion agent for *in vitro* and *in vivo* toxicological assessments of TiO_2 nanoparticles. *Arch. Toxicol.* (2016).

47. Murdock, R. C., Braydich-Stolle, L., Schrand, A. M., Schlager, J. J. & Hussain, S. M. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to *in vitro* exposure using Dynamic Light Scattering technique. *Toxicol. Sci.* **101,** 239–253 (2008).
48. Fede, C. *et al.* The toxicity outcome of silica nanoparticles (Ludox®) is influenced by testing techniques and treatment modalities. *Anal. Bioanal. Chem.* **404,** 1789–1802 (2012).
49. Hsiao, I.-L. & Huang, Y.-J. Effects of serum on cytotoxicity of nano- and micro-sized ZnO particles. *J. Nanoparticle Res.* **15,** 1829–1844 (2013).
50. Lesniak, A. *et al.* Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells. *ACS Nano* **6,** 5845–5857 (2012).
51. MacIntyre, N. R. Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. in *Seminars in respiratory and critical care medicine* **16,** 47–52 (1995).
52. Notter, R. H. *Lung Surfactant: Basic Science and Clinical Applications*. **149,** (CRC Press: Boca Raton, FL, 2000).
53. Wemhöner, A., Jennings, P., Haller, T., Rüdiger, M. & Simbruner, G. Effect of exogenous surfactants on viability and DNA synthesis in A549, immortalized mouse type II and isolated rat alveolar type II cells. *BMC Pulm. Med.* **11,** 1–7 (2011).
54. Silbernagl S. & Despopoulos A. *Atlas de poche de Physiologie*. (Flammarion, 1992).
55. Liu, J. Interfacing zwitterionic liposomes with inorganic nanomaterials: Surface forces, membrane integrity, and applications. *Langmuir* **32,** 4393–4404 (2016).
56. Limbach, L. K. *et al.* Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: Effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environ. Sci. Technol.* **39,** 9370–9376 (2005).
57. Wang, S. H., Lee, C. W., Chiou, A. & Wei, P. K. Size-dependant endocytosis of gold nanoparticles studied by three-dimensional mapping of plasmonic scattering images. *J. Nanobiotechnology* **8,** 33–45 (2010).
58. Cho, E. C., Au, L., Zhang, Q. & Xia, Y. The effects of size, shape, and surface functional group of gold nanostructures on their adsorption and internalization by cells. *Small* **6,** 517–522 (2010).
59. Safi, M., Courtois, J., Seigneuret, M., Conjeaud, H. & Berret, J.-F. The effects of aggregation and protein corona on the cellular internalization of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* **32,** 9353–9363 (2011).
60. Galimard, A. *et al.* Thirty-femtogram detection of iron in mammalian cells. *Small* **8,** 2036–2044 (2012).
61. Torrisi, V. *et al.* Preventing corona effects: Multiphosphonic acid poly(ethylene glycol) copolymers for stable stealth iron oxide nanoparticles. *Biomacromolecules* **15,** 3171–3179 (2014).
62. Vranic, S. *et al.* Deciphering the mechanisms of cellular uptake of engineered nanoparticles by accurate evaluation of internalization using imaging flow cytometry. *Part. Fibre Toxicol.* **10,** (2013).

63. Nir, S. & Nieva, J. L. Uptake of liposomes by cells: Experimental procedures and modeling. *Methods Enzymol.* **372,** 235–248 (2003).
64. Düzgüneş, N. & Nir, S. Mechanisms and kinetics of liposome–cell interactions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **40,** 3–18 (1999).
65. Schütz, C. A. *et al.* Differential stress reaction of human colon cells to oleic-acid-stabilized and unstabilized ultrasmall iron oxide nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **9,** 3481–3498 (2014).
66. Sperandio, S., de Belle, I. & Bredesen, D. E. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97,** 14376–14381 (2000).
67. Liu, D. *et al.* Cytogenetical and ultrastructural effects of copper on root meristem cells of Allium sativum L. *Biocell Off. J. Soc. Latinoam. Microsc. Electron. Al* **33,** 25–32 (2009).
68. Zhang, J.-S. *et al.* γ-Tocotrienol Induces Paraptosis-Like Cell Death in Human Colon Carcinoma SW620 Cells. *PLoS ONE* **8,** 57779–57791 (2013).

Conclusion

Les particules fines émises par les activités humaines représentent un problème sociétal d'importance. Il a été montré que l'augmentation du nombre de personnes atteintes de maladies respiratoires est corrélée à celle de la pollution, notamment à cause des particules de taille inférieure à 100 nm, dites « nanoparticules ». Lorsque ces nanoparticules sont inhalées, elles peuvent atteindre les alvéoles pulmonaires, qui sont le lieu des échanges gazeux dioxygène/dioxyde de carbone. Lors de leur arrivée dans les alvéoles, les nanoparticules rencontrent d'abord le surfactant pulmonaire, biofluide phospholipidique et protéique qui assure diverses fonctions physiologiques dans le poumon et qui tapisse les cellules épithéliales.
Dans un premier temps, les particules peuvent se déposer sur le film de phospholipides constituant l'interface entre l'air et le surfactant pulmonaire. Les particules peuvent ensuite traverser ce film et se retrouver ainsi dans l'hypophase de surfactant. Lors de cette étape, elles adsorbent ou non les phospholipides et protéines qui constituent le film interfacial. Qu'elles soient nues ou enrobées, elles interagissent alors potentiellement avec les vésicules multilamellaires du surfactant, donnant ainsi naissance à des structures hybrides particules - membranes. Les cellules épithéliales alvéolaires sont exposées à ces structures hybrides et leur réponse diffère de celle observée lorsqu'elles sont simplement incubées avec des particules nues. Pour finir, une partie des particules inhalées transloque à travers l'épithélium alvéolaire vers le système sanguin et s'accumule dans des organes secondaires. Les différentes étapes de ce schéma général sont encore mal connues et leur compréhension nécessite de mettre en place une approche pluridisciplinaire.
Dans cette thèse, nous avons cherché à obtenir des particules dont l'état de surface est similaire à celui des nanoparticules ayant traversé le film phospholipidique interfacial. Nous avons ensuite déterminé l'interaction entre ces particules et l'hypophase du surfactant. Les structures hybrides résultantes ont alors été caractérisées. Enfin, nous avons comparé la réponse de cellules épithéliales induite par ces structures hybrides à celle provoquée par des particules non modifiées. Dans ce but, nous avons travaillé avec des systèmes modèles de nanoparticules, de surfactant pulmonaire et de cellules. Nous avons sélectionné sept particules différentes représentant trois classes de nanomatériaux : des particules polymériques (latex), des oxydes métalliques et des silices.
Les particules considérées sont toutes préparées en phase aqueuse. Pour des questions de simplicité, nous avons préféré cette configuration de travail à l'utilisation d'aérosols. En effet, les matériaux générés par nébulisation sont moins bien contrôlés au niveau de la physico-chimie de surface et ont une taille trop élevée pour appartenir à la catégorie des nanoparticules.

Dans le **Chapitre 3**, nous avons caractérisé le Curosurf, qui est un surfactant endogène d'origine porcine utilisé comme médicament chez les nouveau-nés prématurés. Il est

composé de vésicules multilamellaires disperses en taille, chargées négativement et comportant des protéines transmembranaires de charge positive. L'étude menée à ce chapitre nous a permis d'appréhender la complexité de ce biofluide et de déterminer les conditions de conservation et d'expérimentation permettant de ne pas le dénaturer. Nous avons également extrudé le Curosurf à travers des membranes de porosité contrôlée (50 - 800 nm) afin de réduire la taille et la dispersité des vésicules qui le composent. L'extrusion s'est révélée être d'une importance capitale dans notre étude. Ce processus nous a permis d'utiliser de nombreuses techniques expérimentales explorant des échelles de taille variées. Lors des expériences alors menées, nous avons constaté que la taille à laquelle nous extrudions le surfactant n'influençait pas son interaction avec les différentes nanoparticules.

Au **Chapitre 4**, nous nous sommes intéressés au cas où les particules se couvrent de phospholipides durant la translocation à travers le film interfacial présent dans les alvéoles. Par simple sonication, nous avons déposé une bicouche de Curosurf sur des nanoparticules de silice positive, donnant ainsi naissance à des particules enrobées de phospholipides. Nous avons appelé ces objets « nanoBLSs » pour « nanoparticule possédant une bicouche lipidique supportée ». L'interaction entre ces structures et le Curosurf a été mesurée par diffusion de la lumière grâce à un protocole rapide et versatile préalablement mis au point dans notre équipe. N'ayant détecté aucune interaction significative, nous avons supposé que les nanoBLSs restent dispersées dans l'hypophase du surfactant pulmonaire.

Dans le **Chapitre 5**, nous avons étudié par la même méthode l'interaction de différents systèmes particules nues/surfactant pulmonaire. La répétition des expériences dans différentes conditions expérimentales nous a permis de montrer que l'interaction est majoritairement électrostatique et qu'elle semble avoir lieu entre particules positives et membranes négatives ou particules négatives et protéines membranaires positives.
De plus, ce travail a montré que la composition du surfactant pulmonaire modèle considéré modifie de façon importante l'interaction avec les particules. Nos résultats soulignent donc la nécessité de travailler avec un surfactant modèle aussi proche que possible du surfactant endogène. Cette observation remet en question l'utilisation du Curosurf puisque ce dernier ne contient pas les protéines hydrophiles SP-A et SP-D.
La réalisation des diagrammes de phase examinés en diffusion de lumière présente une limite : il est nécessaire que les particules soient stables en solution à l'instant précédant le mélange. Les expériences n'ont donc pas pu être menées dans les conditions physiologiques de salinité et de pH. Une façon de contourner ce problème serait de répéter les expériences d'interaction en utilisant la technique de microbalance à quartz où les particules seraient déposées sur le substrat et les vésicules injectées par la suite dans la cellule de mesure.

Dans la suite de ce chapitre, les structures résultant de l'interaction entre particules et vésicules ont été observées à différentes échelles par microscopie optique et électronique. Les résultats confirment dans leur ensemble ceux de la diffusion de lumière. Les structures hybrides obtenues sont variées, ce qui souligne la complexité sous-jacente de l'interaction entre particules et surfactant pulmonaire. En outre, la cryoMET s'est révélée être une méthode de choix dans la détermination des structures hybrides formées.

Au **Chapitre 6**, nous avons étudié l'impact du surfactant pulmonaire sur la toxicité et sur l'internalisation de nanoparticules. Si l'on se réfère à la littérature, nous pouvons dire qu'aucune règle ne prévaut actuellement quant au choix du surfactant pulmonaire modèle, des lignées cellulaires, du rapport entre surfactant et particules, du fait de soniquer ou non des échantillons. De plus, les travaux publiés ne caractérisent généralement pas les structures hybrides mises en contact avec les cellules. Pour ces multiples raisons, aucune conclusion simple concernant l'impact du surfactant sur la toxicité nanoparticulaire n'apparait lors de la comparaison des différents travaux disponibles dans la littérature.
Dans cette thèse, nous avons montré que la présence de surfactant pulmonaire modifie significativement la toxicité des sept particules testées. Malgré la difficulté reconnue d'interpréter les résultats de viabilité il semblerait que, dans notre cas, la toxicité des particules soit intimement liée au type de structure formée lors de l'incubation de ces dernières avec les vésicules de Curosurf.
Pour finir, nous avons étudié des systèmes particules/surfactant/cellules sur la base d'une caractérisation en profondeur des interactions entre nanomatériaux et fluide pulmonaire. Pour cela, nous avons optimisé un protocole sur lecteur de plaque permettant de mesurer facilement et rapidement les quantités de particules internalisées par les cellules ou adsorbées sur leur membrane. Nous avons également observé les cellules par MET après incubation avec les différents systèmes étudiés durant la thèse. Au final, les données montrent que plus les particules sont dans une configuration proche de l'*in vivo*, moins elles sont internalisées et plus leur toxicité est faible. Les résultats obtenus dans cette thèse sont résumés en *Figure 1*.
Dans cette partie, nous avons montré entre autres que les nanoBLSs sont furtives. Il serait intéressant de voir si notre protocole peut être transposé à d'autres nanomatériaux dans le cadre d'applications médicales.

Conclusion

Nous avons montré dans cette thèse qu'il est indispensable de caractériser extensivement les structures résultant de l'interaction nanoparticules/surfactant pulmonaire avant d'effectuer des tests cellulaires. Il semble donc primordial d'aborder

l'étude du rôle du surfactant sur le devenir des particules inhalées avec une approche pluridisciplinaire.

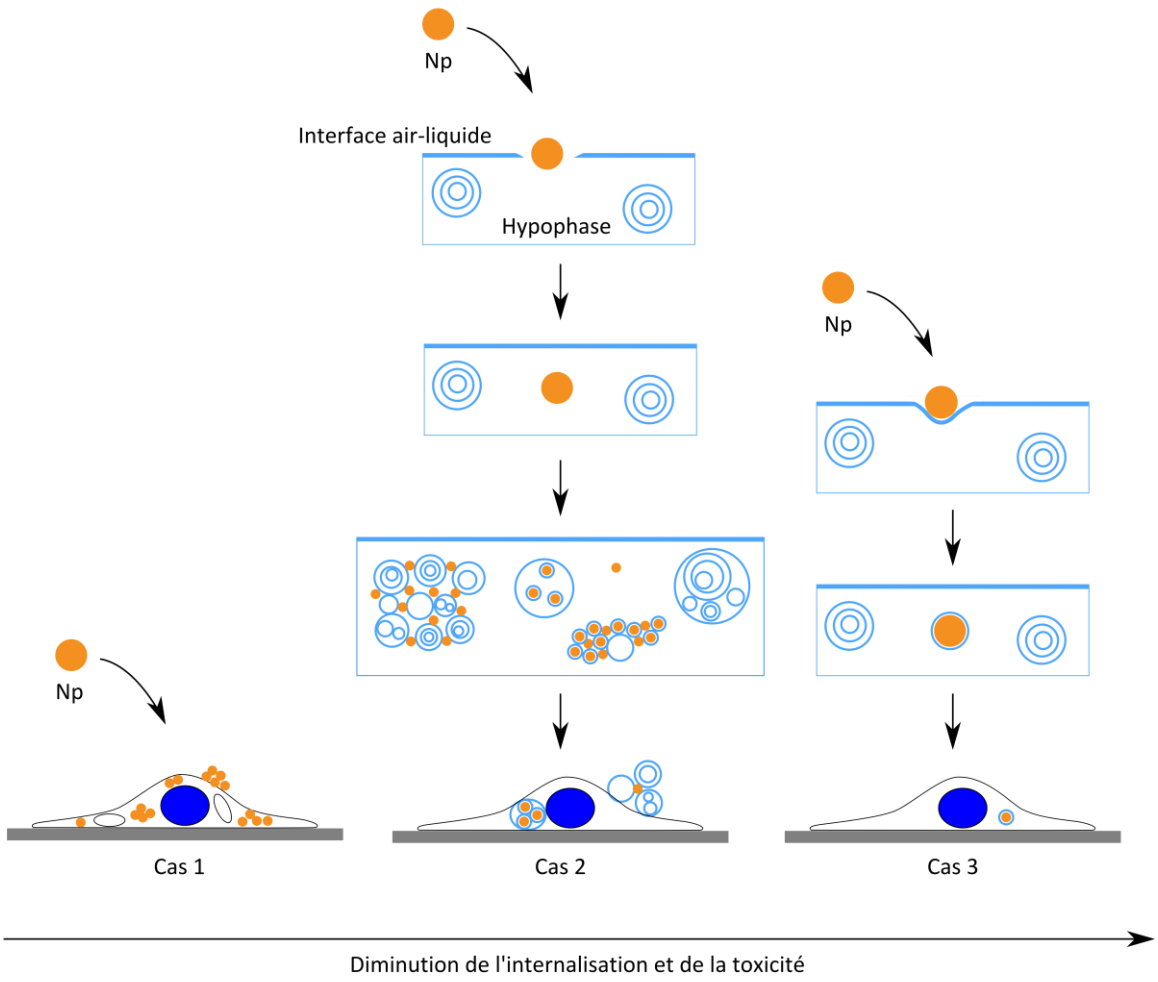


Figure 1 : Représentation schématique résumée des résultats obtenus au cours de cette thèse sur l'interaction nanoparticules/surfactant pulmonaire/cellules.

Articles

Article 1 : Biophysicochemical interaction of a clinical pulmonary surfactant with nanoalumina, Langmuir, 2015.
Reproduit avec la permission de l'ACS. Copyright © 2015, American Chemical Society.

Article 2 : Polyelectrolyte assisted charge titration spectrometry: Applications to latex and oxide nanoparticles, Journal of Colloid and Interface Science, 2016.
Reproduit avec la permission de Elsevier. Copyright © 2016 Elsevier Inc.

Langmuir

Article

pubs.acs.org/Langmuir

Biophysicochemical Interaction of a Clinical Pulmonary Surfactant with Nanoalumina

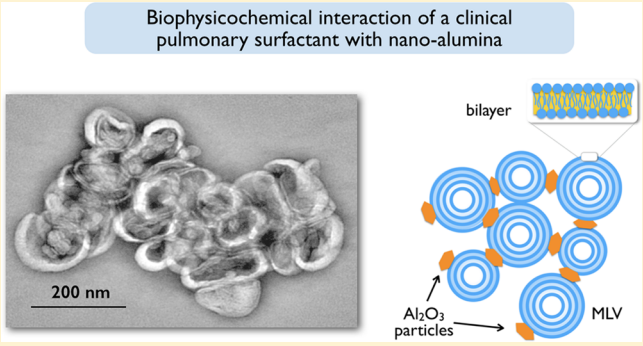
F. Mousseau,[†] R. Le Borgne,[‡] E. Seyrek,[†] and J.-F. Berret*[,†]

[†]Laboratoire Matière et Systèmes Complexes, UMR 7057 CNRS Université Denis Diderot Paris-VII, Bâtiment Condorcet, 10 rue Alice Domon et Léonie Duquet, 75205 Paris, France

[‡]ImagoSeine Electron Microscopy Facility, Institut Jacques Monod, UMR 7592, CNRS - Université Paris Diderot Paris-VII, 75013 Paris, France

Supporting Information

ABSTRACT: We report on the interaction of pulmonary surfactant composed of phospholipids and proteins with nanometric alumina (Al_2O_3) in the context of lung exposure and nanotoxicity. We study the bulk properties of phospholipid/nanoparticle dispersions and determine the nature of their interactions. The clinical surfactant Curosurf, both native and extruded, and a protein-free surfactant are investigated. The phase behavior of mixed surfactant/particle dispersions was determined by optical and electron microscopy, light scattering, and zeta potential measurements. It exhibits broad similarities with that of strongly interacting nanosystems such as polymers, proteins or particles, and supports the hypothesis of electrostatic complexation. At a critical stoichiometry, micron-sized aggregates arising from the association between oppositely charged vesicles and nanoparticles are formed. Contrary to the models of lipoprotein corona or of particle wrapping, our work shows that vesicles maintain their structural integrity and trap the particles at their surfaces. The agglomeration of particles in surfactant phase is a phenomenon of importance that could change the interactions of the particles with lung cells.



I. INTRODUCTION

Pulmonary surfactant, the fluid lining the epithelium of the lungs is a complex surface-active fluid that contains phospholipids and lipids (85% and 5%, respectively) and 10% proteins (SP-A, SP-B, SP-C, SP-D, and serum proteins).[1,2] The biophysical functions of pulmonary surfactant are to prevent the collapse of small alveoli during expiration and the overexpansion of large alveoli during inspiration. It also preserves bronchiolar patency during normal and forced respiration.[1,3,4] Furthermore, it has an important immunological role of protecting the lungs from injuries and infections caused by inhaled particles, including micro-organisms, particulate matter, or engineered particles.[5−10] More specifically, particles of sizes less than 100 nm end up significantly deposited in the alveoli, and are susceptible to interact with the lung fluid.[11,12]

To evaluate the risks of exposure to inhaled nanomaterials, recent studies have been focusing on the interaction of particles with membranes, more specifically on model systems made of 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC) or 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) unilamellar vesicles.[13−20] The review of the different interaction potentials between particles and membranes revealed the importance of the interplay between particle/vesicle attraction and bilayer bending energy.[17] For diameters lower than a critical size (order of 10 nm for silica), the particles decorate the outer surface of the membrane, and induce aggregation.[17,18] For larger particle diameters, supported phospholipid bilayers form and coat the particles.[13,16] In the latter case, it is suggested that the membrane invaginates and eventually engulfs the particle in a process that resembles endocytosis.[14,21] In some reports, this engulfment is dubbed ingestion or transmigration, because it involves the passage of the particle from the outer to the inner part of the object. Ingestion of latex particle (2 μm) was first evidenced by Dietrich et al. using time-lapse microscopy and single object manipulation.[13] Transmigration of silica-based nanoparticles (110 nm) into micron-sized liposomes combined with membrane invagination was evidenced by Le Bihan et al. using cryo-electron tomography.[16] Recent simulations studies have shown that the wrapping of biomembranes around particles are favored if the adhesive interactions are sufficiently strong to compensate bending.[22−25] Simulations were also performed on hydrophobic nanoparticles and predicted the formation of a lipoprotein corona or insertion into the membrane.[22,24] In contrast, very little is known on the interactions between particles and membranes forming multi-

Received: February 6, 2015
Revised: June 15, 2015
Published: June 15, 2015

ACS Publications © 2015 American Chemical Society

DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b01639
Langmuir 2015, 31, 7346−7354

lamellar vesicles and/or comprising different types of phospholipids and proteins. In this context, factors such as vesicle dispersity, variability of the molecular constituents, pH, or salt concentration of the solvent have to be taken into account, and may lead to specific behaviors.

In this work, we use a clinical pulmonary surfactant, Curosurf (Chiesi Pharmaceuticals, Parma, Italy) to evaluate the interactions of particles with membranes relevant to biology. Curosurf is a commercially available surfactant developed as a medication for exogenous treatment of respiratory distress syndrome for premature infants. Pulmonary surfactant substitutes are either synthetic or derived from animals, and their clinical effects have been thoroughly documented.[23] As compared to other preparations, Curosurf contains the highest amount of phospholipids and proteins, with concentrations of 76 g L^{-1} of phospholipids and 0.45 (respectively 0.59) g L^{-1} of SP-B (respectively SP-C) membrane proteins and has been shown to be an effective surfactant in the treatment of respiratory deficiency. Curosurf bulk solutions are dispersions of spherical multilamellar vesicles (MLVs) mainly composed of a mixture of phospholipids and surface-active proteins.[6,26] Bulk samples were examined using freeze-fracture and (cryo)-transmission electron microscopy to determine the size and shape distribution of MLVs, and the organization of bilayers in the presence of biological or synthetic additives.[27−29]

Previous studies focused on interfacial and rheological properties of surface layers, as it is relevant to its biophysical function in the lungs.[19,30−35] In the alveoli, however, the pulmonary surfactant forms a layer of a few hundreds of nanometers,[1,36] and after crossing the air−liquid interface, the nanoparticles will also interact with the phospholipid subphase. This secondary process could interfere with phospholipid bulk dynamics and exchanges, and perturb the surfactant equilibrium. Some studies of nanoparticles interacting with pulmonary surfactant bulk phases were reported, but their number is limited. These studies involved the formation of complexes formed at the air/liquid interface, and further analysis on the interactions of these complexes with lung epithelial cells.[26,37−41] Issues related to cytotoxicity, lung inflammation and ability to cause oxidative stress were also addressed. However, these studies do not focus primarily on the main driving forces of interaction.

Here we report on the bulk properties of a synthetic and of purified pulmonary surfactant, and highlight the nature of interactions of nanoparticles with phospholipid membranes. In the first part, the physicochemical properties of pulmonary surfactant and particles are thoroughly characterized. Emphasis is put on stability, surface charge, and aging behavior of dispersions. We also use extrusion to prepare multilamellar vesicles of well-characterized size and dispersity. As a model of nanoparticle−pulmonary surfactant system, alumina (Al_2O_3) was chosen as it is one of the most widely used material in nanotechnology-based products and its toxicological relevance, especially for lungs, is already well-recognized and studied.[42−46] The formation of complexes between Al_2O_3-nanoparticles with pulmonary surfactant substitutes is demonstrated here. The complexes are the result of electrostatic interactions between oppositely charged vesicles and particles.

II. MATERIALS AND METHODS

II.1. Materials. Curosurf (Chiesi Pharmaceuticals, Parma, Italy) is a natural surfactant extract obtained from porcine lungs, and containing polar lipids such as phosphatidylcholine (about 70% of total phospholipid content), phosphatidylglycerol (about 30% of total phospholipid content), and about 1% of hydrophobic proteins SP-B and SP-C. It is suspended in 0.9% sodium chloride solution and appears as a white to creamy suspension. According to the manufacturer, its pH is adjusted as required with sodium bicarbonate to a pH of 6.2 on average, the actual pH being indeed comprised between 5.5 and 6.5 according to the different batches received.[31] Curosurf was kindly provided by Mostafa Mokhtari (Kremlin-Bicêtre Hospital, Val-de-Marne, France) and by Ignacio Garcia-Verdugo (INSERM, Paris, France). Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) was obtained from Sigma-Aldrich, while 2-oleoyl-1-palmitoyl-*sn*-glycero-3-phospho-rac-(1-glycerol) (POPG) and L-α-phosphatidyl-DL-glycerol sodium salt from egg yolk lecithin (PG, Sigma-Aldrich, MDL number: MFCD00213550) were given by Ignacio Garcia-Verdugo from Institut Pasteur, Paris. Aluminum oxide nanoparticles (Disperal, SASOL) were kindly given by Florent Carn (Laboratoire Matière et Sytèmes Complexes, Paris). The powder was dissolved in nitric acid (0.4 wt %) and sonicated for 30 min to give suspensions at 10 g L^{-1}. Methanol, nitric acid (70%), and poly-(diallyldimethylammonium chloride) (PDADMAC, M_W < 100 000 g mol^{-1}) were purchased from Sigma-Aldrich. Water was deionized with a Millipore Milli-Q Water system. All the products were used without further purification.

II.2. Protein-Free Surfactant. Phospholipids DPPC, PG, and POPG were initially dissolved in methanol, at 10, 10, and 20 g L^{-1} respectively. These compounds were mixed in proper amounts for a final weight concentration of 80%/10%/10% of DPPC/PG/POPG. The solvent was evaporated under low pressure at 60 °C for 30 min. The lipid film formed on the bottom of the flask was then rehydrated with the addition of Milli-Q water at 60 °C and agitated at atmospheric pressure for another 30 min. Milli-Q water was added again to finally obtain a solution at 1 g L^{-1}.

II.3. Extrusion. Extrusion of Curosurf and protein-free surfactant was performed using an Avanti Mini Extruder (Avanti Polar Lipids, Inc. Alabama, USA). Solutions were prepared at 1 g L^{-1} and extruded 50 times through Whatman Nucleopor polycarbonate membranes of different pore sizes (50, 100, 200, and 800 nm in diameter). For the interaction studies with nanoalumina, the MLV dispersions were then diluted to 0.1 g L^{-1}, and the pH was adjusted to pH 5 using 0.1 M hydrochloric acid.

II.4. Dynamic Light Scattering (DLS). Hydrodynamic diameters were measured using a Zetasizer Nano ZS equipment (Malvern Instruments, Worcestershore, UK). A 4 mW He−Ne laser beam (λ = 633 nm) is used to illuminate sample dispersion, and the scattered intensity is collected at an angle of 173°. The second-order autocorrelation function is analyzed using the CONTIN algorithm to determine the average diffusion coefficient D_0 of the scatterers. Hydrodynamic diameter is then calculated according to the Stokes−Einstein relation, $D_H = k_B T/3\pi\eta D_0$, where k_B is the Boltzmann constant, T is the temperature, and η is the solvent viscosity. Measurements were performed in triplicate at 25 or 37 °C after an equilibration time of 120 s.

II.5. Zeta Potential. Laser Doppler velocimetry was used to carry out the electrokinetic measurements of electrophoretic mobility and zeta potential with the Zetasizer Nano ZS equipment (Malvern Instruments, Worcestershore, UK). Measurements were performed three times, at 25 °C, after 120 s of thermal equilibration.

II.6. Optical Microscopy. Phase-contrast and bright field images were acquired on an IX71 inverted microscope (Olympus) equipped with 20× , 40×, and 60× objectives. Thirty microliters of dispersion was deposited on a glass plate and sealed into a Gene Frame (Abgene/Advanced Biotech) dual adhesive system. An EXi Blue camera (QImaging) and Metaview software (Universal Imaging Inc.) were used as the acquisition system. Silica glass slides were coated using poly(diallyldimethylammonium chloride) to improve the surface adhesion of the MLVs.

II.7. Transmission electron microscopy (TEM). TEM imaging was performed with a Tecnai 12 operating at 80 kV equipped with a 1K × 1K Keen View camera. For negative staining, drops of suspensions were deposited on Formvar-carbon coated 400 mesh

DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b01639
Langmuir 2015, 31, 7346−7354

copper grids. Negative stains were made with 1% uranyl acetate in water.

II.8. Interaction. The interactions between lung fluid models and nanoparticles were investigated using a mixing protocol developed by us and had already been tested on a series of strongly interacting colloidal systems.[47−49] It was checked that this procedure provides reproducible results, in particular that the mixing order or concentration does not modify interactions. Batches of pulmonary phospholipid phases and nanoparticles were prepared in the same conditions of pH (pH 5) and concentration (c = 0.1 g L^{-1}) and then mixed at different ratios, noted by $X = V_{Surfactant}/V_{NP}$, where $V_{Surfactant}$ and V_{NP} denote the volumes of the phospholipid and particle solutions, respectively. Because the concentrations of the stock solutions are identical, the volumetric ratio X is equivalent to the mass ratio between constituents. This procedure was preferred to titration experiments, because it allowed exploring a broad range in mixing conditions ($X = 10^{-3} - 10^{3}$), while keeping the total concentration in the dilute regime and using a low amount of pulmonary fluid and particle.[48,50,51] The interactions between the phospholipid vesicles and Al_2O_3 nanoparticles occurred rapidly, i.e., within a few seconds after mixing.

III. RESULTS AND DISCUSSION

III.1. Characterization and Processability of Curosurf.

III.1.1. Structure of Native Curosurf. Curosurf solutions were prepared from the native dispersions at 76 g L^{-1} by dilution using 5 mM phosphate buffer (pH 6.4). Solutions at c = 0.1 and 1 g L^{-1} were studied using optical microscopy and light scattering for characterization at room and body temperatures. Microscopy observations reveal the presence of micron sized objects with spherical symmetry undergoing rapid Brownian motion. Figure 1a−d shows a selection of some of the Brownian particles, with sizes 0.4 μm, 0.8 μm, 1.6 and 3.2 μm, respectively. An analysis of 100 objects resulted in a size distribution of median diameter 1.0 μm and standard deviation 0.5 μm (Figure 1e). Referring to earlier studies, these particles are identified as uni- or multilamellar vesicles.[26−28,32] In this study, large membrane layers or tubular myelin commonly observed in the lung fluid were not observed by microscopy.[52] Dynamic light scattering performed on the same sample shows a bimodal distribution with two major peaks, at 80 and 800 nm (Figure 1f). The DLS peak at 800 nm is in agreement with that found by microscopy. Light scattering also shows a population of small vesicles that could not be detected by microscopy. Data on the surfactant microstructure obtained at T = 25 °C or T = 37 °C, i.e., at temperatures where the membranes are in the gel or in the fluid phase, respectively, were similar (see differential scanning calorimetry data in Supporting Information, S1).

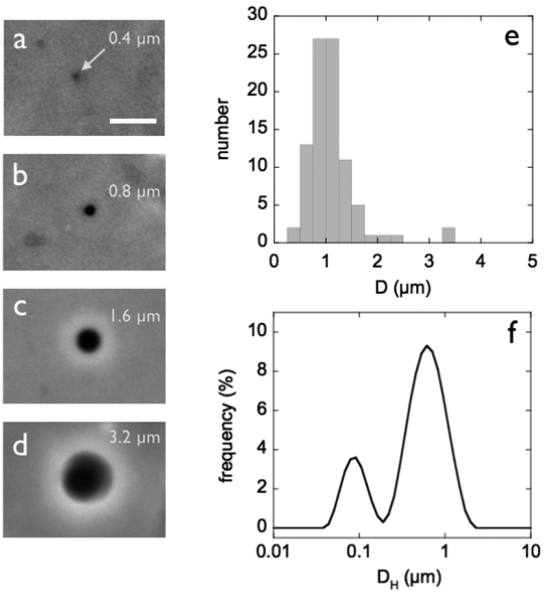


Figure 1. (a−d) Representative images of Curosurf at the concentration of 0.1 g L^{-1} obtained by phase contrast optical microscopy at T = 25 °C (the bar is 3 μm). The sizes for the vesicles are indicated in the right-hand side of the panel. (e) Size distribution deduced from optical microscopy. (f) Distribution of hydrodynamic diameters of Curosurf vesicles as determined by DLS.

III.1.2. Extrusion. As discussed previously, Curosurf dispersion in its native state is made of highly disperse MLVs. Concerning interactions with particles, dispersity is a major issue, in particular for data analysis and interpretation. To overcome this difficulty, extrusion was applied using polycarbonate membranes with different pore diameters of 50, 100, and 200 nm. For extrusion, native Curosurf was first diluted to 0.1 g L^{-1} at pH 6.4, as in the previous section. Figure 2a shows hydrodynamic diameter of vesicles as a function of the number of passages through the membrane. For the first extrusion passages (1 to 5), a sharp decrease in size was observed. With further extrusion, a plateau at hydrodynamic diameters 100, 150, and 180 nm is reached for membranes of increasing pore sizes. In parallel, the MLV size distribution was found to decrease progressively, reaching the final dispersity index of 0.1 ± 0.05 (S2). Additional extrusion using an 800 nm-pore membrane was performed for microscopic visualization purposes (see Section III.2).

Based on earlier studies of unilamellar vesicles,[53,54] a model was developed that can also describe the extrusion of pulmonary surfactant analogues. This model assumes that in the first passages, native micron size vesicles are pushed through the pores causing strong deformation, membrane tearing, and resizing of the structure. At this stage, the exiting vesicles are still large and nonuniform. As extrusion progresses, the size mismatch between pores and vesicles lessens, giving rise to a Rayleigh-like instability. In the pores, the vesicles are sheared and stretched significantly, leading to their breaking into smaller objects (Figure 2b). Because of this stretching, exit diameters are larger than the pore sizes. From purely geometrical considerations, the final diameters can be estimated and were found in agreement with experimental data (Supporting Information, S2). Extrusion turns out to be an easy and reproducible procedure to prepare Curosurf vesicles of predictable size.

III.1.3. Curosurf Stability: Effect of pH and Aging. From a practical standpoint and in anticipation of the work with particles, it is essential to know the behavior and stability of the surfactant vesicles as a function of physicochemical parameters, such as concentration, temperature and pH. Hydrodynamic diameter and zeta potential of native and extruded Curosurf were measured over a wide range of pH above and below the physiological value (pH 6.4 for newborns). Data are displayed in Figures 3a and 3b, respectively. With increasing pH, the broadly distributed vesicles of native Curosurf decrease by 50% in size (from 800 to 400 nm). In contrast, the diameter of vesicles extruded through a 50 nm-membrane remains constant at 100 nm. Likewise, the zeta potential is found to decrease from positive values at acidic pH (ζ = +25 mV) to highly negative ones at alkaline pH (ζ = −30 mV and −60 mV for the extruded and native state, respectively). At physiological conditions, we confirmed that phospholipid membranes are

DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b01639
Langmuir 2015, 31, 7346−7354

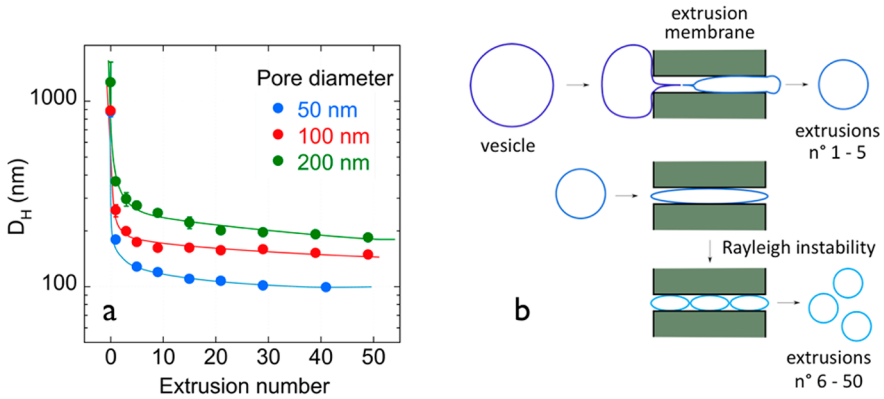


Figure 2. (a) Hydrodynamic diameter measured by light scattering as a function of the number of passages. Polycarbonate membranes of pore size 50, 100, and 200 nm were used and experiments were performed in triplicate. The error bars represent the standard deviation. For large extrusion numbers, the bars are smaller than the symbols. The solid lines are guides for the eyes. (b) Schematic representation of the two-step extrusion process.

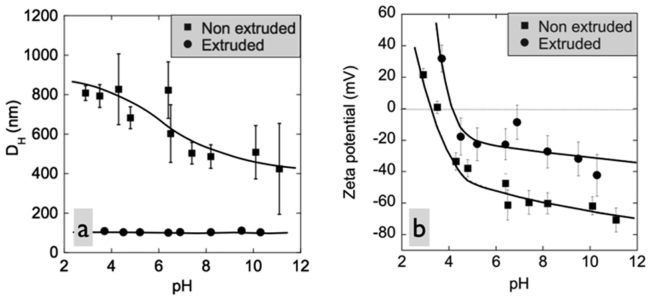


Figure 3. Hydrodynamic diameter (a) and zeta potential (b) as a function of pH for extruded and nonextruded Curosurf at 0.1 g L^{-1}. Error bars represent the standard deviation of experiments performed in triplicate. For extruded Curosurf (close circles in panel a), the errors bars are smaller than the symbols. The solid lines are guides for the eyes.

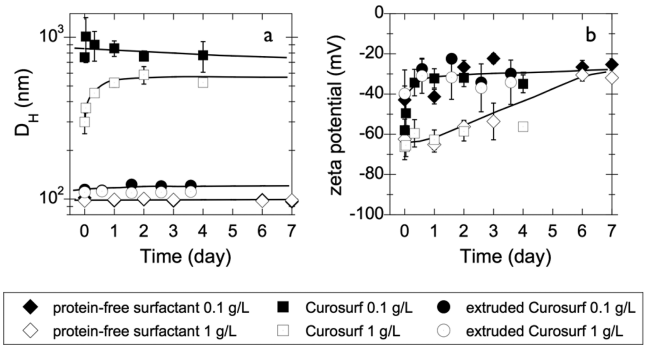


Figure 4. Hydrodynamic diameter (a) and zeta potential (b) as a function of time for three types of lung fluid substitutes: protein-free surfactant (diamond), extruded (circles), and native (squares) Curosurf at concentrations 0.1 and 1 g L^{-1}. Experiments were performed in triplicate, and the error bars represent the standard deviation. Solid lines are guides for the eyes.

negatively charged.[55] The behaviors found in Figure 3 can be understood in terms of acid−base properties of the phospholipid molecules. At pH below the pK_a of the phospholipids (pK_a of 4[56]), the phosphate moieties are not ionized, and the overall charge of the membrane is given by the quaternary ammonium groups located in the zwitterionic heads. The rapid decrease of the ζ-potential observed around pH 4 is then attributed to the deprotonation of the phosphate groups, and the charging of the membrane.

Aging properties of Curosurf preparations were investigated over a 30-day period by light scattering and zetametry. Experiments were performed every 12 h, the samples being stored at 4 °C between measures. Hydrodynamic diameter and zeta potential are displayed in Figure 4a,b for native and extruded Curosurf as well as for the protein-free surfactant for 7 days after the preparation. For size, native Curosurf (either at 0.1 and 1 g L^{-1}) exhibits an evolution on the first day, but rapidly reaches a steady state. For these samples, the size distribution is broad, and minor modifications could change the average hydrodynamic diameter. In contrast, the extruded samples remain unchanged over the entire period. The zeta potential shows a systematic increase from −60 mV to −30 mV for all samples, except for native Curosurf at 1 g L^{-1}. Data at 7 and 30 days are moreover identical, confirming the good stability of as prepared MLVs. Concerning the origin of the ζ-potential variations during the first days, further work is required to clarify this issue. Additional results were acquired using up to four freeze−thaw cycles on the native specimens. No significant changes were observed either, suggesting that freezing surfactant preparation does not alter its structural properties (Supporting Information, S3).

III.2. Interactions with Aluminum Oxide Particles. Prior to experiments with pulmonary surfactant, the alumina particles were also thoroughly characterized. DLS, TEM, and zeta potential measurements were performed at concentrations 0.1 to 1 g L^{-1} and from pH 3 to pH 12 (Figure 5a,b). In the inset, a TEM image shows that Al_2O_3 particles are anisotropic, their shape is that of irregular platelets of average dimensions 40 nm long and 10 nm thick. The particles exhibit moreover a broad size distribution (Figure 5a). Electrophoretic measurements show that the particles are positively charged at low pH, with ζ = +40 mV. As pH increases above 6, particle surface charge decreases progressively and reaches the isoelectric point around pH 10. Beyond this, the particles are negatively charged. These results are in agreement with those of Cabane and co-workers who reported an isoelectric point of 9.3 for alumina particles.[57,58] Above pH 6, particles also start to aggregate and their hydrodynamic diameter increases, suggesting that the stability observed at low pH is caused by electrostatic repulsion. Experiments involving pulmonary surfactant and particles were performed at pH 5, where both dispersions are stable.

DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b01639
Langmuir 2015, 31, 7346−7354

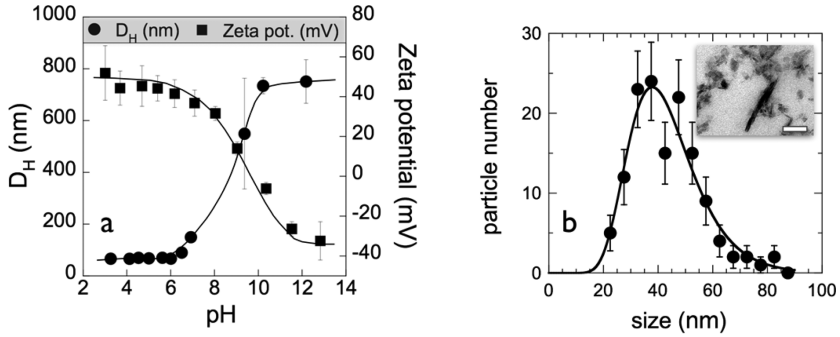


Figure 5. (a) Hydrodynamic diameter and zeta potential of alumina particles (1 g L^{-1}) as a function of pH. Error bars represent the standard deviation of experiments performed in triplicate. (b) Alumina particle size distribution obtained from transmission electron microscopy image analysis. Inset: TEM picture of Al_2O_3 particles (bar 50 nm). The solid line results from least-squares calculations using a log-normal distribution with median diameter 41 nm and dispersity (defined as the ratio between the standard deviation and the average) of 0.3.

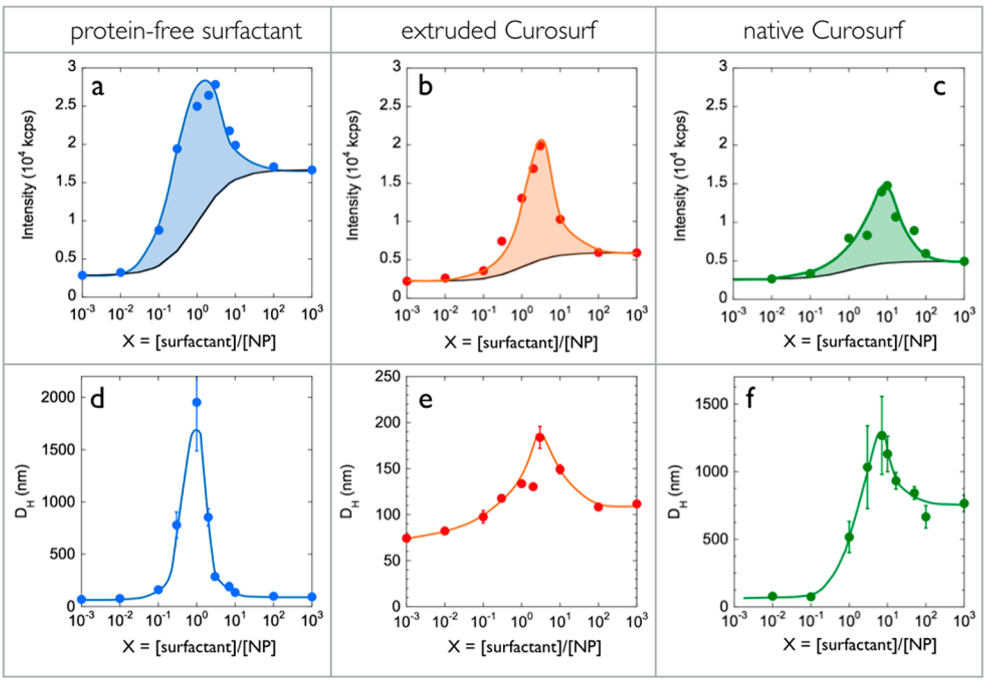


Figure 6. Scattered intensity (a, b, and c) and hydrodynamic diameter (d, e, and f) of alumina particles mixtures with protein-free surfactant (a, d), extruded Curosurf (b, e) and native Curosurf (c, f) as a function of X (T = 25 °C). X denotes the ratio between the surfactant and nanoparticles weight concentration. Light scattering experiments were performed in triplicate. The error bars represent the mean of the standard deviations. Solid lines in blue, red, and green are guides for the eyes. Solid lines in black in a, b, and c represent the scattered intensity calculated assuming that particles and vesicles do not interact.

Surfactant/nanoparticle dispersions were obtained by mixing stock solutions at different volumetric ratios X. This method was successfully tested in the screening of multicomponent phase diagrams.[48,51] In physiological conditions of lung exposure to nanoparticles, pulmonary surfactant is in excess and the ratio X lies in the range $10^3 - 10^4$.[59] Because of this large excess, the dispersion is close to that of pure Curosurf, and the interactions of the particles with the vesicles are difficult to assess. To remedy this shortcoming, the phase behavior of the mixed systems was investigated between $X = 10^{-3}$ and 10^3. In this context, it is assumed that the nature of the interactions does not depend on the X-values. Figure 6 shows the scattering intensity (panels a−c) and the hydrodynamic diameter D_H (panels d−f) as a function of X at T = 25 °C. The surfactant phases studied are a protein-free surfactant (Figure 6a,d), and dispersions of extruded (using 50 nm pores in Figure 6b,e) and native Curosurf (Figure 6c,f). The solutions were prepared at fixed concentration (0.1 g L^{-1}) for every X. In Figure 6, nanoparticles and surfactant stock solutions are set at $X = 10^{-3}$ and $X = 10^3$ for convenience. For dilute solutions as the ones investigated here, the scattering intensity is proportional to the concentration and to the molecular weight of the scatterers. The solid black lines in Figure 6a,b,c are calculated assuming that surfactant and particles do not interact with each other, and that the scattering is the sum of the intensities weighted by their actual concentrations. In Figure 6a−c, the scattering intensity is found to be systematically higher than the predictions for noninteracting species, implying that mixed aggregates are formed upon mixing. The scattering maxima ascertain moreover that the aggregates have a preferential stoichiometry, as the maximum is peaked at a definite X.

The hydrodynamic diameters $D_H(X)$ shown in Figures 6c−e confirms this interpretation. The D_H-values at maximum reaches 2 μm for the protein-free surfactant, 200 nm and 1.5

DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b01639
Langmuir 2015, 31, 7346−7354

μm for the extruded and native Curosurf, and the position of the maxima corresponds to that of the scattering peaks. Similar results were obtained at T = 37 °C, i.e., at temperature where the phospholipids are in the disordered liquid state (Supporting Information, S4). Figure 7 displays the histograms of the

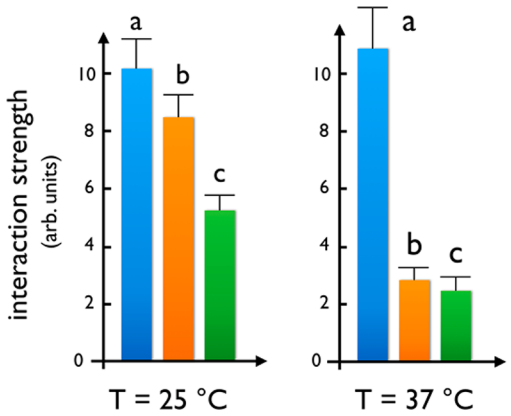


Figure 7. Integrals over the mixing ratio X between the scattering intensities as determined experimentally and the intensities calculated from noninteracting particles and vesicles (colored areas in Figure 6 and Figure S4). The integral is indicative of the strength of nanoparticle-surfactant interactions. The labels a, b, and c are related to the protein-free surfactant, the extruded Curosurf, and the native Curosurf, respectively.

interaction strength between particles and vesicles at the two temperatures, T = 25 and 37 °C. This strength is calculated from the integral of the scattering intensity (color-shaded areas in Figure 6 and Figure S4) with respect to the predictions for noninteracting species. This approach shows that surfactant−particle interactions are the strongest for protein-free surfactant, and the weakest for native Curosurf. These conclusions were confirmed from the size data (T = 25 °C), which show increases by 1500%, 80% and 50% with respect to the uncomplexed vesicles. The shift of the scattering maxima for the different formulations (from X = 1−8 in Figure 6a−c) is indicative of a predetermined stoichiometry between species. However, the number of vesicles and particles in the formed aggregate are difficult to estimate, since the relationship between the phospholipid concentration and the vesicle density is yet unknown.[60] This shift in X suggests, however, that at a fixed concentration, extruded vesicles are more numerous that native ones.

To gain further insight into the surfactant−Al_2O_3 mixed structures, dispersions were prepared at the maximum of the scattering peak using extruded Curosurf with 100 or 800 nm pore membranes. Figure 8a shows vesicles adsorbed at a silica surface before and after complexation with nanoalumina. In the inset, the uncomplexed 800 nm MLVs are isolated and randomly distributed on the substrate, whereas in the mainframe they form micron-sized aggregates. These results are in agreement with the light scattering data (Figure 6). Due to the sedimentation of the largest clusters, aggregates appear larger than those detected by light scattering. A close-up view of an aggregate shown in Figure 8b exhibits characteristic patterns of vesicles at close packing inside the formed structure. Figure 9a and 9b display aggregates observed by TEM, using here 100 nm extruded MLVs. The two examples shown are representative of the many structures observed using this technique. The cluster structure is dense, and the vesicles have a doughnut

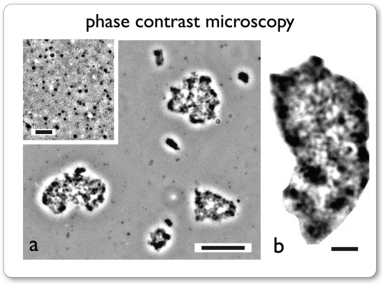


Figure 8. (a) Dispersions of 800 nm Curosurf vesicles and alumina particles at ratio X = 7 observed by phase contrast microscopy (×60). The bar is 20 μm. The sample was prepared at c = 0.1 g L^{-1} and T = 25 °C and put between glass slides. The silica surfaces were coated using poly(diallyldimethylammonium chloride) to improve surface adhesion. Inset: image of uncomplexed vesicle in the same experimental conditions (bar 5 μm). (b) Close-up view of an aggregate (bar 5 μm).

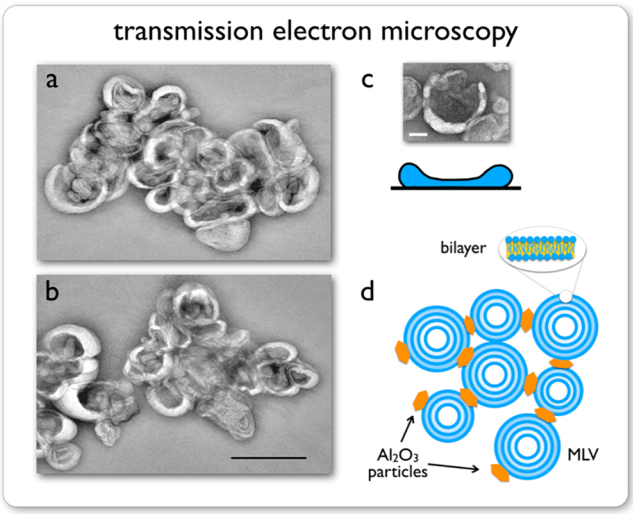


Figure 9. (a and b) Transmission electron microscopy image of mixed 100 nm extruded Curosurf vesicles and alumina particles (bar 200 nm). (c) Close-up view of a single vesicle (bar 50 nm) and cartoon illustrating its doughnut height profile on the grid.[29] (d) Schematic representation of nanoparticle−surfactant aggregates.

shape. During the sample preparation, dehydration causes the collapse of the MLVs at the center. The vesicles maintain their shape on the border, however, due to the curvature effect of the phospholipid bilayer (Figure 9c). Similar structures were observed on surfactant substitutes[28] and on polymer-liposome complexes.[29] Note that in the figure the Al_2O_3 particles are not visible, probably because of their weak contrast as compared to that of the stained vesicles. A schematic representation of an aggregate is illustrated in Figure 9d.

The results here demonstrate that the interaction of nanoalumina with surfactant gives rise to the formation of large aggregates, the size of which depends on the ratio between the two species. The phase behavior of the mixed dispersions exhibits similarities with that of strongly interacting nanosystems such as polymers, proteins or particles, and supports the hypothesis of electrostatic complexation. Electrostatic complexation designates the process by which coassembly is driven by the pairing of electric charges located at the surfaces of particles or along the backbones of macromolecules.[49] It is concluded that, in the present experimental

DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b01639
Langmuir 2015, 31, 7346−7354

context, the interactions of nanoalumina and surfactant are mainly driven by electrostatic forces. The destabilization or reorganization of the vesicles as a result of strong interaction is not observed. Encapsulation of alumina particles by vesicles is also not likely to occur. These scenarios would indeed result in a decrease in the light scattering data as a function of X, which is not observed experimentally. The interactions between nanoalumina and vesicles finally appear to be nonspecific and independent of the membrane proteins SP-B and SP-C, as similar results were observed for protein-free surfactant and Curosurf. At this point, it is difficult to attribute the differences between the protein-free surfactant and the Curosurf (such as those seen in light scattering) to the presence of the proteins.

IV. CONCLUSION

The pulmonary surfactant layer located at the air−liquid interface in the alveoli is known to be the first line of barrier for particles inhaled through the airways. Previous studies on the interaction with particles highlighted the modifications of interface properties. After deposition at the air−liquid interface, however, the particles may dissolve in the surfactant subphase and modify the phospholipid exchanges and equilibrium. To investigate these interactions further, a clinical pulmonary surfactant Curosurf and a synthetic analogue composed of phospholipids are characterized and analyzed for their interaction with 40 nm alumina nanoparticles. The size, the microstructure, the stability and the nature of the dispersion forces of the surfactant phase are the primary physicochemical indicators to be considered when examining the interactions with nanoparticles. These properties were examined thoroughly in the present work. On native Curosurf, data obtained by light scattering and microscopy corroborate those reported in the literature:[26,28,59] surfactant dispersions are made of multilamellar vesicles broadly distributed in size, typically from 100 nm to 5 μm. To circumvent the issue of the size dispersity, which can be detrimental in some cases (in particular in relation with data analysis and treatment), the Curosurf dispersions were extruded using polycarbonate membranes of pores 50 to 800 nm, resulting in the generation of highly uniform vesicles. The first result that emerges from this work is that native and extruded Curosurf behave similarly as a function of pH, temperature, stability and interactions with particles. We also demonstrate that for the bulk phase, extruded surfactant represents an excellent model to study. With alumina particles, the interactions give rise to the formation of large aggregates made of the vesicles and particles, which is in agreement with the phenomenon of electrostatic complexation. The microstructure of the aggregates was disclosed using electron and optical microscopy, and it reveals densely packed clusters made of tens to hundreds of vesicles glued together by the nanoalumina (Figure 9d). As anticipated, the behavior of particles in Curosurf bears some similarities with that of particles in biological fluids in general, such as plasma serum, lysosomal, and interstitial fluids.[7,15,41,47,61] In these complex environments, the particles are generally found to be coated with proteins or with other biomacromolecules (forming then the protein corona), and later to agglomerate into clusters of various sizes.[62,63] In this respect, the vesicles of the lung surfactant substitutes are playing the same role as that of the serum proteins in other environments. The agglomeration of particles in biological fluids is a phenomenon of critical importance since it results in the loss of the nanometer character of the probes, in changes of hydrodynamic properties, and interactions with cells. Finally, as compared to recent simulation predictions,[22−25] our results provide a different view. The formation of large vesicular clusters is a process that is different from the phenomena of protein/lipoprotein corona or of formation of supported bilayers and should be considered when the biological responses are studied concerning the effects of nanoparticles in lungs. Moreover, aggregate formation could result in the long term trapping of particles and prevent their interactions with epithelial cells.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Liquid−gel transition in the phospholipid bilayer of Curosurf: DSC experiment; extrusion of Curosurf; effect of freeze-thaw cycles on Curosurf; interaction with nano-alumina at 37 °C. The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b01639.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: jean-francois.berret@univ-paris-diderot.fr.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank M. Angelova, A. Baeza-Squiban, F. Carn, I. Garcia-Verdugo, M. Mokhtari, F. Montel, D. Nguyen, and N. Puff for fruitful discussions. We are also thankful to Lise Picaut from Laboratoire Matière et Systèmes Complexes for her help in the work on Curosurf characterization and interaction, and Gaëlle Pembouong from Institut Parisien de Chimie Moléculaire for the DSC experiments. We acknowledge the ImagoSeine facility (Jacques Monod Institute, Paris, France), and the France BioImaging infrastructure supported by the French National Research Agency (ANR-10-INSB-04, "Investments for the future"). ANR (Agence Nationale de la Recherche) and CGI (Commissariat à l'Investissement d'Avenir) are gratefully acknowledged for their financial support of this work through Labex SEAM (Science and Engineering for Advanced Materials and devices) ANR 11 LABX 086, ANR 11 IDEX 05 02.

■ REFERENCES

(1) Notter, R. H. *Lung Surfactant: Basic Science and Clinical Applications*; CRC Press: Boca Raton, FL, 2000; Vol. *149*.

(2) Glasser, J. R.; Mallampalli, R. K. Surfactant and its role in the pathobiology of pulmonary infection. *Microbes and Infection* **2012**, *14* (1), 17−25.

(3) Clements, J. A. Lung surfactant: A personal perspective. *Annu. Rev. Physiol.* **1997**, *59*, 1−21.

(4) Griese, M. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur. Respir. J.* **1999**, *13*, 1455−1476.

(5) Braakhuis, H. M.; Park, M. V. D. Z.; Gosens, I.; De Jong, W. H.; Cassee, F. R. Physicochemical characteristics of nanomaterials that affect pulmonary inflammation. *Part. Fibre Toxicol.* **2014**, *11*.

(6) Casals, C.; Canadas, O. Role of lipid ordered/disordered phase coexistence in pulmonary surfactant function. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2012**, *1818* (11), 2550−2562.

(7) Horie, M.; Kato, H.; Fujita, K.; Endoh, S.; Iwahashi, H. In Vitro Evaluation of Cellular Response Induced by Manufactured Nanoparticles. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25* (3), 605−619.

(8) Hussain, S.; Boland, S.; Baeza-Squiban, A.; Hamel, R.; Thomassen, L. C. J.; Martens, J. A.; Billon-Galland, M. A.; Fleury-

DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b01639
Langmuir 2015, 31, 7346−7354

Feith, J.; Moisan, F.; Pairon, J. C.; Marano, F. Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: Role of particle surface area and internalized amount. *Toxicology* **2009**, *260* (1−3), 142−149.
(9) Sayes, C. M.; Reed, K. L.; Warheit, D. B. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: Comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicol. Sci.* **2007**, *97* (1), 163−180.
(10) Balasubramanian, S. K.; Poh, K. W.; Ong, C. N.; Kreyling, W. G.; Ong, W. Y.; Yu, L. E. The effect of primary particle size on biodistribution of inhaled gold nano-agglomerates. *Biomaterials* **2013**, *34* (22), 5439−5452.
(11) Elder, A.; Vidyasagar, S.; DeLouise, L. Physicochemical factors that affect metal and metal oxide nanoparticle passage across epithelial barriers. *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.* **2009**, *1* (4), 434−450.
(12) Dombu, C. Y.; Betbeder, D. Airway delivery of peptides and proteins using nanoparticles. *Biomaterials* **2013**, *34* (2), 516−525.
(13) Dietrich, C.; Angelova, M.; Pouligny, B. Adhesion of latex spheres to giant phospholipid vesicles: Statics and dynamics. *J. Phys. II* **1997**, *7* (11), 1651−1682.
(14) Menger, F. M.; Angelova, M. I. Giant vesicles: Imitating the cytological processes of cell membranes. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31* (12), 789−797.
(15) Nel, A. E.; Madler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M. V.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano−bio interface. *Nat. Mater.* **2009**, *8* (7), 543−557.
(16) Le Bihan, O.; Bonnafous, P.; Marak, L.; Bickel, T.; Trepout, S.; Mornet, S.; De Haas, F.; Talbot, H.; Taveau, J. C.; Lambert, O. Cryo-electron tomography of nanoparticle transmigration into liposome. *J. Struct. Biol.* **2009**, *168* (3), 419−425.
(17) Michel, R.; Gradzielski, M. Experimental Aspects of Colloidal Interactions in Mixed Systems of Liposome and Inorganic Nanoparticle and Their Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13* (9), 11610−11642.
(18) Savarala, S.; Ahmed, S.; Ilies, M. A.; Wunder, S. L. Stabilization of Soft Lipid Colloids: Competing Effects of Nanoparticle Decoration and Supported Lipid Bilayer Formation. *ACS Nano* **2011**, *5* (4), 2619−2628.
(19) Munteanu, B.; Harb, F.; Rieu, J. P.; Berthier, Y.; Tinland, B.; Trunfio-Sfarghiu, A. M. Charged particles interacting with a mixed supported lipid bilayer as a biomimetic pulmonary surfactant. *Eur. Phys. J. E, Soft Matter* **2014**, *37* (8), 28.
(20) Pera, H.; Nolte, T. M.; Leermakers, F. A. M.; Kleijn, J. M. Coverage and Disruption of Phospholipid Membranes by Oxide Nanoparticles. *Langmuir* **2014**, *30* (48), 14581−14590.
(21) Hillaireau, H.; Couvreur, P. Nanocarriers' Entry into the Cell: Relevance to Drug Delivery. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66* (17), 2873−2896.
(22) Hu, G. Q.; Jiao, B.; Shi, X. H.; Valle, R. P.; Fan, Q. H.; Zuo, Y. Y. Physicochemical Properties of Nanoparticles Regulate Translocation across Pulmonary Surfactant Monolayer and Formation of Lipoprotein Corona. *ACS Nano* **2013**, *7* (12), 10525−10533.
(23) Ramanthan, R.; Kamholz, K.; Fujii, A. M. Is there a Difference in Surfactant Treatment of Respiratory Distress Syndrome in Premature Neonates? A Review. *J. Pulm. Resp. Med.* **2013**, *S13*.
(24) Bahrami, A. H.; Raatz, M.; Agudo-Canalejo, J.; Michel, R.; Curtis, E. M.; Hall, C. K.; Gradzielski, M.; Lipowsky, R.; Weikl, T. R. Wrapping of nanoparticles by membranes. *Adv. Colloids Interface Sci.* **2014**, *208*, 214−224.
(25) Dasgupta, S.; Auth, T.; Gov, N. S.; Satchwell, T. J.; Hanssen, E.; Zuccala, E. S.; Riglar, D. T.; Toye, A. M.; Betz, T.; Baum, J.; Gompper, G. Membrane-Wrapping Contributions to Malaria Parasite Invasion of the Human Erythrocyte. *Biophys. J.* **2014**, *107* (1), 43−54.
(26) Gross, T.; Zmora, E.; Levi-Kalisman, Y.; Regev, O.; Berman, A. Lung-surfactant-meconium interaction: In vitro study in bulk and at the air-solution interface. *Langmuir* **2006**, *22* (7), 3243−3250.
(27) Braun, A.; Stenger, P. C.; Warriner, H. E.; Zasadzinski, J. A.; Lu, K. W.; Taeusch, H. W. A freeze-fracture transmission electron microscopy and small angle X-ray diffraction study of the effects of albumin, serum, and polymers on clinical lung surfactant microstructure. *Biophys. J.* **2007**, *93* (1), 123−139.
(28) Waisman, D.; Danino, D.; Weintraub, Z.; Schmidt, J.; Talmon, Y. Nanostructure of the aqueous form of lung surfactant of different species visualized by cryo-transmission electron microscopy. *Clin. Physiol. Funct. Imaging* **2007**, *27* (6), 375−380.
(29) Bordi, F.; Cametti, C.; Sennato, S.; Diociaiuti, M. Direct evidence of multicompartment aggregates in polyelectrolyte-charged liposome complexes. *Biophys. J.* **2006**, *91* (4), 1513−1520.
(30) Alexandrova, L.; Nedyalkov, M.; Platikanov, D.; Razzetti, R.; Bianco, F. Wetting behavior of pulmonary surfactant aqueous solutions. *Colloid Polym. Sci.* **2013**, *291* (11), 2725−2731.
(31) Minkov, I.; Mircheva, K.; Grozev, N.; Ivanova, T.; Panaiotov, I. Properties of mixed monolayers of clinical lung surfactant, serum albumin and hydrophilic polymers. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **2013**, *101*, 135−142.
(32) Wustneck, R.; Perez-Gil, J.; Wustneck, N.; Cruz, A.; Fainerman, V. B.; Pison, U. Interfacial properties of pulmonary surfactant layers. *Adv. Colloids Interface Sci.* **2005**, *117* (1−3), 33−58.
(33) Zhang, H.; Fan, Q.; Wang, Y. E.; Neal, C. R.; Zuo, Y. Y. Comparative study of clinical pulmonary surfactants using atomic force microscopy. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembranes* **2011**, *1808* (7), 1832−1842.
(34) Hermans, E.; Vermant, J. Interfacial shear rheology of DPPC under physiologically relevant conditions. *Soft Matter* **2014**, *10* (1), 175−186.
(35) Alonso, C.; Alig, T.; Yoon, J.; Bringezu, F.; Warriner, H.; Zasadzinski, J. A. More than a monolayer: Relating lung surfactant structure and mechanics to composition. *Biophys. J.* **2004**, *87* (6), 4188−4202.
(36) Gil, J.; Weibel, E. R. Morphological study of pressure-volume hysteresis in rat lungs fixed by vascular perfusion. *Resp. Physiol.* **1972**, *15* (2), 190−213.
(37) Gasser, M.; Wick, P.; Clift, M. J. D.; Blank, F.; Diener, L.; Yan, B.; Gehr, P.; Krug, H. F.; Rothen-Rutishauser, B. Pulmonary surfactant coating of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) influences their oxidative and pro-inflammatory potential in vitro. *Part. Fibre Toxicol.* **2012**, *9*.
(38) Vranic, S.; Garcia-Verdugo, I.; Darnis, C.; Sallenave, J.-M.; Boggetto, N.; Marano, F.; Boland, S.; Baeza-Squiban, A. Internalization of SiO_2 nanoparticles by alveolar macrophages and lung epithelial cells and its modulation by the lung surfactant substitute Curosurf®. *Environ. Sci. Poll. Res.* **2013**, *20* (5), 2761−2770.
(39) Beck-Broichsitter, M.; Ruppert, C.; Schmehl, T.; Guenther, A.; Betz, T.; Bakowsky, U.; Seeger, W.; Kissel, T.; Gessler, T. Biophysical investigation of pulmonary surfactant surface properties upon contact with polymeric nanoparticles in vitro. *Nanomedicine* **2011**, *7* (3), 341−350.
(40) Ruge, C. A.; Kirch, J.; Canadas, O.; Schneider, M.; Perez-Gil, J.; Schaefer, U. F.; Casals, C.; Lehr, C. M. Uptake of nanoparticles by alveolar macrophages is triggered by surfactant protein A. *Nanomedicine* **2011**, *7* (6), 690−693.
(41) Braydich-Stolle, L. K.; Breitner, E. K.; Comfort, K. K.; Schlager, J. J.; Hussain, S. M. Dynamic Characteristics of Silver Nanoparticles in Physiological Fluids: Toxicological Implications. *Langmuir* **2014**, *30* (50), 15309−15316.
(42) Adamcakova-Dodd, A.; Stebounova, L. V.; O'Shaughnessy, P. T.; Kim, J. S.; Grassian, V. H.; Thorne, P. S. Murine pulmonary responses after sub-chronic exposure to aluminum oxide-based nanowhiskers. *Part. Fibre Toxicol.* **2012**, *9*.
(43) Pauluhn, J. Retrospective analysis of 4-week inhalation studies in rats with focus on fate and pulmonary toxicity of two nanosized aluminum oxyhydroxides (boehmite) and pigment-grade iron oxide (magnetite): The key metric of dose is particle mass and not particle surface area. *Toxicology* **2009**, *259* (3), 140−148.
(44) Schafer, U.; Jahreis, G. Exposure, bioavailability, distribution and excretion of aluminum and its toxicological relevance to humans. *Trace Elem. Electrolytes* **2006**, *23* (3), 162−172.

DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b01639
Langmuir 2015, 31, 7346−7354

(45) Wei, Z. C.; Chen, L. M.; Thompson, D. M.; Montoya, L. D. Effect of particle size on in vitro cytotoxicity of titania and alumina nanoparticles. *J. Exp. Nanosci.* **2014**, *9* (6), 625−638.
(46) Wang, L.; Pal, A. K.; Isaacs, J. A.; Bello, D.; Carrier, R. L. Nanomaterial induction of oxidative stress in lung epithelial cells and macrophages. *J. Nanopart. Res.* **2014**, *16* (9).
(47) Torrisi, V.; Graillot, A.; Vitorazi, L.; Crouzet, Q.; Marletta, G.; Loubat, C.; Berret, J. F. Preventing Corona Effects: Multiphosphonic Acid Poly(ethylene glycol) Copolymers for Stable Stealth Iron Oxide Nanoparticles. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (8), 3171−3179.
(48) Berret, J.-F. Stoichiometry of electrostatic complexes determined by light scattering. *Macromolecules* **2007**, *40* (12), 4260−4266.
(49) Chapel, J. P.; Berret, J.-F. Versatile electrostatic assembly of nanoparticles and polyelectrolytes: Coating, clustering and layer-by-layer processes. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2012**, *17* (2), 97−105.
(50) Berret, J.-F.; Sehgal, A.; Morvan, M.; Sandre, O.; Vacher, A.; Airiau, M. Stable oxide nanoparticle clusters obtained by complexation. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *303* (1), 315−318.
(51) Berret, J.-F.; Yokota, K.; Morvan, M.; Schweins, R. Polymer−nanoparticle complexes: From dilute solution to solid state. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (39), 19140−19146.
(52) Gil, J.; Weibel, E. R. Improvements in demonstration of lining layer of lung alveoli by electron microscopy. *Resp. Physiol.* **1969**, *8* (1), 13−36.
(53) Frisken, B. J.; Asman, C.; Patty, P. J. Studies of vesicle extrusion. *Langmuir* **2000**, *16* (3), 928−933.
(54) Clerc, S. G.; Thompson, T. E. A possible mechanism for vesicle formation by extrusion. *Biophys. J.* **1994**, *67* (1), 475−476.
(55) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed.; Garland Science: New York, 2008.
(56) Cevc, G. *Phospholipids Handbook: Medical Applications of Phospholipids*; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1993.
(57) Desset, S.; Spalla, O.; Cabane, B. Redispersion of Alumina Particles in Water. *Langmuir* **2000**, *16*, 10495−10508.
(58) Desset, S.; Spalla, O.; Lixon, P.; Cabanet, B. From powders to dispersions in water: Effect of adsorbed molecules on the redispersion of alumina particles. *Langmuir* **2001**, *17* (21), 6408−6418.
(59) Schleh, C.; Muhlfeld, C.; Pulskamp, K.; Schmiedl, A.; Nassimi, M.; Lauenstein, H. D.; Braun, A.; Krug, N.; Erpenbeck, V. J.; Hohlfeld, J. M. The effect of titanium dioxide nanoparticles on pulmonary surfactant function and ultrastructure. *Respir. Res.* **2009**, *10*, 90.
(60) Seth, M.; Ramachandran, A.; Leal, L. G. Dilution Technique to Determine the Hydrodynamic Volume Fraction of a Vesicle Suspension. *Langmuir* **2010**, *26* (19), 15169−15176.
(61) Chanteau, B.; Fresnais, J.; Berret, J.-F. Electrosteric Enhanced Stability of Functional Sub-10 nm Cerium and Iron Oxide Particles in Cell Culture Medium. *Langmuir* **2009**, *25* (16), 9064−9070.
(62) Safi, M.; Courtois, J.; Seigneuret, M.; Conjeaud, H.; Berret, J.-F. The effects of aggregation and protein corona on the cellular internalization of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* **2011**, *32* (35), 9353−9363.
(63) Tenzer, S.; Docter, D.; Kuharev, J.; Musyanovych, A.; Fetz, V.; Hecht, R.; Schlenk, F.; Fischer, D.; Kiouptsi, K.; Reinhardt, C.; Landfester, K.; Schild, H.; Maskos, M.; Knauer, S. K.; Stauber, R. H. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8* (10), 772−781.

DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b01639
Langmuir 2015, 31, 7346−7354

Journal of Colloid and Interface Science 475 (2016) 36–45

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Colloid and Interface Science

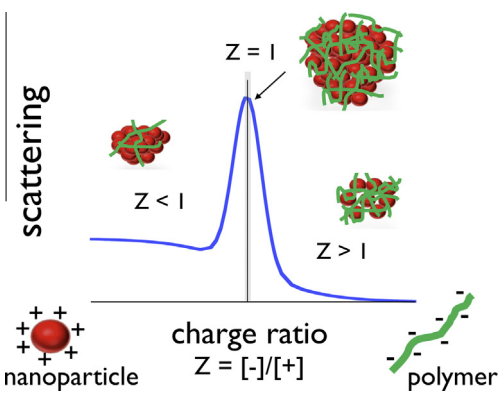
journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcis

Polyelectrolyte assisted charge titration spectrometry: Applications to latex and oxide nanoparticles

F. Mousseau [a,*], L. Vitorazi [a], L. Herrmann [a], S. Mornet [b], J.-F. Berret [a,*]

[a] Matière et Systèmes Complexes, UMR 7057 CNRS Université Denis Diderot Paris-VII, Bâtiment Condorcet, 10 rue Alice Domon et Léonie Duquet, 75205 Paris, France
[b] Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux, UPR CNRS 9048, Université Bordeaux 1, 87 Avenue du Docteur A. Schweitzer, Pessac cedex F-33608, France

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:
Received 19 February 2016
Revised 20 April 2016
Accepted 21 April 2016
Available online 26 April 2016

Keywords:
Charge density
Nanoparticles
Light scattering
Polyelectrolyte complex

ABSTRACT

The electrostatic charge density of particles is of paramount importance for the control of the dispersion stability. Conventional methods use potentiometric, conductometric or turbidity titration but require large amount of samples. Here we report a simple and cost-effective method called polyelectrolyte assisted charge titration spectrometry or PACTS. The technique takes advantage of the propensity of oppositely charged polymers and particles to assemble upon mixing, leading to aggregation or phase separation. The mixed dispersions exhibit a maximum in light scattering as a function of the volumetric ratio X, and the peak position X_{Max} is linked to the particle charge density according to $\sigma \sim D_0 X_{Max}$ where D_0 is the particle diameter. The PACTS is successfully applied to organic latex, aluminum and silicon oxide particles of positive or negative charge using poly(diallyldimethylammonium chloride) and poly(sodium 4-styrenesulfonate). The protocol is also optimized with respect to important parameters such as pH and concentration, and to the polyelectrolyte molecular weight. The advantages of the PACTS technique are that it requires minute amounts of sample and that it is suitable to a broad variety of charged nano-objects.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Electrostatic Coulomb forces are ubiquitous in soft condensed matter [1,2]. Interaction pair potentials created by elementary charges of the same sign at interfaces or along macromolecules

* Corresponding authors.
E-mail addresses: fanny.mousseau@univ-paris-diderot.fr (F. Mousseau), jean-francois.berret@univ-paris-diderot.fr (J.-F. Berret).

http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2016.04.036
0021-9797/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

are long-range and repulsive. These interactions depend on physico-chemical parameters, such as the dielectric constant of the continuous phase, the solute concentration, the pH, the ionic strength and the temperature. Electrostatic forces between like-charged systems are especially relevant to insure repulsion between colloidal objects. At low ionic strength, electrostatic repulsions are for instance sufficient to induce long-range ordering and colloidal crystal phases [3]. In aqueous dispersions, the ionizable groups at the colloid surface exert Coulombic forces toward the counterions, leading to their condensation and to the formation of the electrical double layer [1]. The counterion condensation occurs for charge density σ above a certain threshold [4]:

$$\sigma > \frac{2}{\pi D \ell_B} \tag{1}$$

where D is the diameter of the colloid and ℓ_B is the Bjerrum length (0.7 nm in water). As a result, particles in solution satisfying Eq. (1) behave as if they would have an effective charge Z_{eff} different from its structural charge Z_{str} [4,5]. The counterion condensation for colloids bears strong similarities with that derived for polymers and known as the Oosawa-Manning condensation [6]. Following Belloni [4] the effective charge can be approximated by the expression:

$$Z_{eff} = \frac{2D}{\ell_B} \tag{2}$$

For a particle of charge density $\sigma = +1e\ \mathrm{nm}^{-2}$ and a diameter of 10 nm, the effective charge $Z_{eff} = +28e$ represents around 10% of the total ionizable groups ($Z_{str} = +314e$). As the condensed counterions are firmly attached to the surface and move with the colloid during diffusion, experiments such as electrophoretic mobility measurements [7–12] or small-angle scattering experiments in the concentrated regime [13–15] enable access to the effective charge only.

Potentiometric, turbidity or colloid titration techniques, as well as conductometry are commonly used to determine the structural charges of colloids. Potentiometric or acid-base titration coupled with conductometry was successfully applied to microgels [16], polymer micelles [17] and metal oxide nanoparticles [18–21]. However the technique requires large sample quantity, which depending on the particle synthesis is not always possible. To determine the charge density of iron oxide particles for instance, Lucas et al. used potentio-conductometric titration with dispersions containing 5–10 g of iron oxide dry matter [18]. Colloid titration is another method that was introduced by Terayama some 50 years ago [22]. This technique was applied to titrate ion-containing polymers in aqueous solutions. Colloid titration is based on the reaction between oppositely charged polyelectrolytes in presence of a small amount of dye molecules that serves as an indicator of the endpoint reaction between the two polymers [23,24].

Initially developed to study protein complexes, isothermal titration calorimetry (ITC) has gained interest in the field of physical chemistry. ITC was also used to survey the condensation of DNA with multivalent counterions [25] and with oligo- and polycations [26–28] and more recently the complexation between polymers, proteins or surfactants. Despite a large number of studies [29–39] the interpretation of the thermograms remains a challenge, as the heat exchanges during titration exhibit rich and numerous features not always accounted for by existing models [33,40]. More recently, ultrafast laser spectroscopy coupled to the generation of the second harmonics or resistive pulse sensing techniques were proposed to measure the surface charge of particles in the nanometer range [41,42].

The technique examined here borrows its principle from methods developed for enzymatic activity measurements [43] and from turbidity titration [44,45]. Earlier reports suggest that the maximum of absorbance or turbidity associated with the precipitation is related to the end-point reaction, and allows an estimation of the charge density of the titrated colloids. The method applied here differs from turbidity titration in two aspects: (i) light scattering is preferred to UV-spectrometry and (ii) the mixed polymer and particle dispersions are prepared by direct mixing instead of step-wise addition. With newly developed photon counters, light scattering is a highly sensitive technique, which can detect colloidal diffusion down to extremely low concentration. During the last decade, light scattering has been applied to investigate the complexation of oppositely charged species, including surfactant, polymers, phospholipids and proteins [12,46–53]. In most studies however, emphasis was put on the structures that formed and not on the reaction stoichiometry [54]. Here we develop a simple protocol based on the use of light scattering and on the complexation property of particles with oppositely charged polymers. The technique is assessed on different types of organic and inorganic nanoparticles in the 50 nm range, either positive or negative and it is shown that the structural charge and charge density can be determined with minute amount of sample. The technique was dubbed Polyelectrolyte Assisted Charge Titration Spectrometry subsequently abbreviated as PACTS.

2. Materials and methods

2.1. Nanoparticles

Latex particles functionalized with carboxylate or amidine surface groups were acquired from Molecular Probes (concentration 40 g L^{-1}). The dispersion pH was adjusted at pH 9.7 and pH 6 by addition of sodium hydroxide and hydrochloric acid, respectively. The particles were characterized by light scattering and transmission electron microscopy, yielding D_H = 39 nm and 56 nm and D_0 = 30 and 34 nm. Negative silica particles (CLX®, Sigma Aldrich) were diluted from 450 to 50 g L^{-1} by DI-water. Particles were dialyzed for 2 days against DI-water at pH 9. Positive silica particles (D_H = 60 nm) were synthesized using the Stöber synthesis route [55–57]. Silica seeds were first prepared and grown to increase the particle size. Functionalization by amine groups was then performed, resulting in a positively charged coating [56]. Aminated silica synthesized at 40 g L^{-1} were diluted with DI-water and the pH was adjusted to pH 5 with hydrochloric acid. Aluminum oxide nanoparticle powder (Disperal®, SASOL) was dissolved in a nitric acid solution (0.4 wt% in deionized water) at the concentration of 10 g L^{-1} and sonicated for 1 h. For the PACTS experiments, the dispersions were further diluted to 0.1 g L^{-1} and the dispersion pH was adjusted to pH 4 with sodium hydroxide. In this pH condition, the nanoalumina are positively charged (D_H = 64 nm) [58].

Fig. 1 displays images of the particles obtained by transmission electron microscopy (TEM). Except for Al_2O_3 which have the form of irregular platelets of average dimensions 40 nm long and 10 nm thick, all other particles are spherical. In Table 1, the hydrodynamic diameters D_H are found slightly higher than the geometric diameters D_0 found by TEM. With light scattering, the largest particles contribute predominantly to the scattering intensity and determine the value for the measured D_H. The dispersity s defined as the ratio between the standard deviation and the average diameter are shown in Table 1 (see Supplementary Fig. 1 for size distributions).

2.2. Polymers

Poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDADMAC) of molecular weight M_w = 13.4 and 26.8 kDa was purchased from Polysciences Europe and from Sigma Aldrich respectively. The degree of polymerization was determined from the number-average molecular weight M_n by size exclusion chromatography

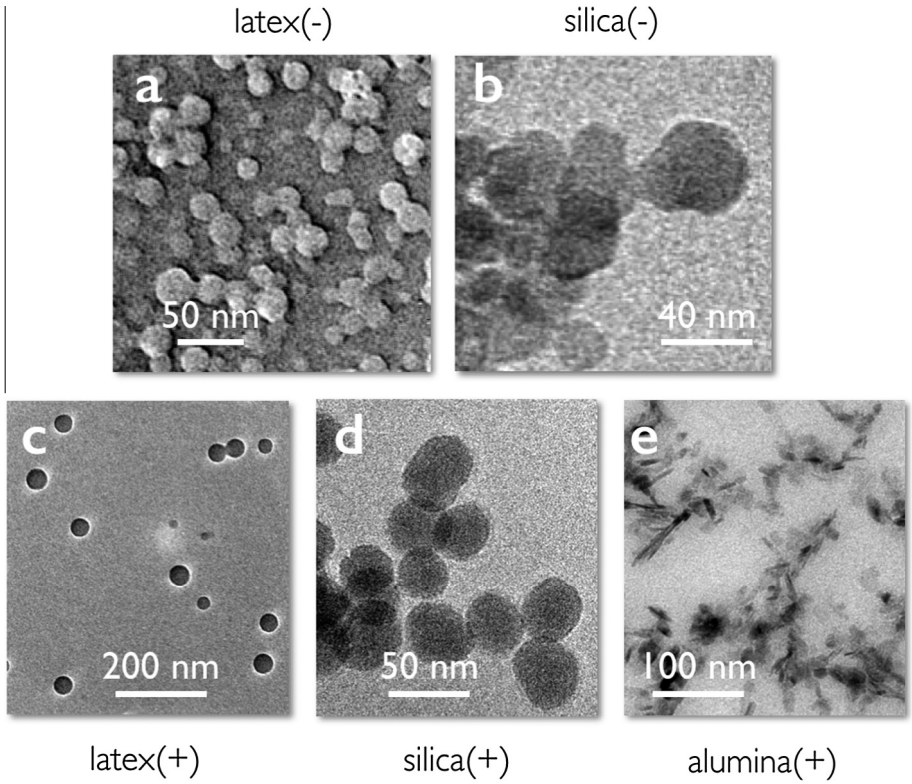


Fig. 1. Transmission electronic microscopy images of latex (a, c), silica (b, d) and alumina (e) particles used in this study.

Table 1
Nanoparticles studied in the present work. Particle characteristics are the mass density (ρ), the pH at which the experiments are done, the hydrodynamic diameter (D_H), the geometric diameter (D_0) and the dispersity s obtained from transmission electron microscopy.

Nano-particle	Chemical composition	Function-nalization	ρ (g cm^{-3})	Working pH	D_H (nm)	D_0 (nm)	s
Latex (−)	Polystyrene	Carboxylate	1.05	9.7	39	30	0.15
Latex (+)	Polystyrene	Amidine	1.05	6	56	34	0.15
Silica (−)	SiO_2	/	2.3	9	34	20	0.20
Silica (+)	SiO_2	Amine	1.9	5	60	42	0.11
Alumina (+)	Al_2O_3	/	3.0	4	64	40	0.30

(SEC) and found to be 31 and 50 with respective dispersities of Đ = 2.7 and 3.5 [59]. As shown in Supplementary Fig. 2, SEC combined light-scattering detection using Novema columns reveals a double peak distribution for PDADMAC26.8k, one associated with a molecular weight around 30 kDa and one attributed to longer chains or polymer aggregates. Poly(sodium 4-styrenesulfonate) (PSS) of molecular weight M_w = 8.0 kDa and 59.7 kDa were obtained from SRA Instruments and Sigma Aldrich. The degrees of polymerization were found at 32 and 137 by SEC, with respective dispersities Đ = 1.2 and 2.1. PDADMAC and PSS polymers were selected for titration because their ionization state does not depend on pH. Experiments were also carried out using poly (acrylic acid) (PAA, Sigma Aldrich) for comparison. Its degree of polymerization was obtained from SEC and found at 32, with a dispersity of 1.8. PAA is a weak polyelectrolyte characterized by a pKa of 5.5. The polymer characteristics are summarized in Table 2 and in Supplementary Fig. 2 [59]. The PDADMAC, PSS and PAA repetitive unit molar masses (m_n) are 161.5, 206.1 and 94.0 g mol^{-1} respectively. Sodium acetate (CH_3COO^-, Na^+; $3H_2O$), acetic acid, nitric acid, hydrochloric acid and sodium hydroxide were purchased from Sigma-Aldrich. Water was deionized with a Millipore DI-Water system. All the products were used without further purification. Stock solutions are diluted with DI-water to 1 or 0.1 g L^{-1} and pH is adjusted with hydrochloric acid or with sodium hydroxide, depending on the particles to be titrated.

2.3. Mixing protocols

For PSS, PAA and PDADMAC polymers, 500 μL batches were prepared in the same conditions of pH and concentration (0.1, 1 or 10 g L^{-1}). Solutions were mixed at different charge ratios $Z_{-/+} = [-]/[+]$ where [−] and [+] denote the molar charge concentrations. This procedure was preferred to titration experiments because it allowed exploring a broad range in mixing conditions ($Z_{-/+} = 10^{-4}$–10^{3}), while keeping the total concentration in the dilute regime [46,60,61]. Interactions between polymers occurred rapidly upon mixing, i.e. within a few seconds, and the dispersions were then studied by light scattering. The complexation of nanoparticles with oppositely charged polymers was investigated using a similar protocol. Particle concentration was adjusted so that the dispersion scattering intensity did not exceed 5×10^5 kcps, corresponding to a Rayleigh ratio $\mathcal{R} = 5 \times 10^{-3}$ cm^{-1}. Polymer and nanoparticle batches (500 μL) were prepared in the same pH and concentration conditions (between 0.1 g L^{-1} and 1 g L^{-1}). The solutions were mixed at different volumetric ratios X, where

Table 2
Polyelectrolytes investigated in this work. Polymer characteristics are the number-average molecular weight (M_n), molecular weight (M_w), the degree of polymerization (DP), the dispersity (Đ) and the nature of the polyelectrolyte [59].

Polymer	Provider	M_n (kDa)	M_w (kDa)	DP	Đ	Charge	Polyelectrolyte type
PDADMAC	Sigma Aldrich	7.6	26.8	50	3.5	+	Strong
	Polysciences Europe	4.9	13.4	31	2.7	+	Strong
PSS	Sigma Aldrich	28.2	59.7	137	2.1	–	Strong
	SRA Instruments	6.7	8.0	32	1.2	–	Strong
PAA	Sigma Aldrich	3.0	5.4	32	1.8	–	Weak

$X = V_{Pol}/V_{NP}$ and V_{Pol} and V_{NP} are the volumes of the polymer and particle solutions respectively. Because the stock solution concentrations are identical, the volumetric ratio X is equivalent to the mass ratio between constituents.

2.4. Transmission electron microscopy

TEM imaging was performed with a Tecnai 12 operating at 80 kV equipped with a 1 K × 1 K Keen View camera. Drops of suspensions (20 μL at 0.01 g L^{-1} in DI-water) were deposited on holey-carbon coated 300 mesh copper grids (Neyco). Grids were let to dry over night at room temperature.

2.5. Isothermal titration calorimetry

Isothermal titration calorimetry (ITC) was performed using a Microcal VP-ITC calorimeter (Northampton, MA) with cell of 1.464 mL, working at 25 °C and agitation speed of 307 rpm. The syringe and the measuring cell were filled with degased solutions of PDADMAC, and PSS at the same pH. Water was also degased and filled the reference cell. Typical charge concentrations were 10 mM in the syringe and 1 mM in the measuring chamber. The titration consisted in a preliminary 2 μL injection, followed by 28 injections of 10 μL at 10 min intervals. A typical ITC experiment includes the thermogram (i.e. the differential power provided by the calorimeter to keep the temperature of cell and reference identical) and binding isotherm. Control experiments were carried out to determine the enthalpies associated to dilution. These behaviors were later subtracted to obtain the neat binding heat.

2.6. Static and dynamic light scattering

Light scattering measurements were carried out using a NanoZS Zetasizer (Malvern Instruments). In the light scattering experiment (detection angle at 173°), the hydrodynamic diameter D_H and the scattered intensity I_S were measured. The Rayleigh ratio $\mathcal{R}$ was derived from the intensity according to the relationship: $\mathcal{R} = (I_S - I_w)n_0^2\mathcal{R}_T/I_T n_T^2$ where I_w and I_T are the water and toluene scattering intensities respectively, $n_0 = 1.333$ and $n_T = 1.497$ the solution and toluene refractive indexes, and $\mathcal{R}_T$ the toluene Rayleigh ratio at $\lambda = 633$ nm ($\mathcal{R}_T = 1.352 \times 10^{-5}$ cm^{-1}). The second-order autocorrelation function is analyzed using the cumulant and CONTIN algorithms to determine the average diffusion coefficient D_C of the scatterers. Hydrodynamic diameter is then calculated according to the Stokes–Einstein relation, $D_H = k_B T/3\pi\eta D_C$, where k_B is the Boltzmann constant, T the temperature and η the solvent viscosity. Measurements were performed in triplicate at 25 °C after an equilibration time of 120 s.

2.7. Electrophoretic mobility and zeta potential

Laser Doppler velocimetry using the phase analysis light scattering mode and detection at an angle of 16° was used to carry out the electrokinetic measurements of electrophoretic mobility and zeta potential with the Zetasizer Nano ZS equipment (Malvern Instruments, UK). Zeta potential was measured after a 2 min equilibration at 25 °C.

2.8. Optical microscopy

Phase-contrast images were acquired on an IX73 inverted microscope (Olympus) equipped with an 60× objectives. PSS8.0k and PDADMAC13.4k were prepared in MilliQ water at 20 g L^{-1}. Solutions were diluted to 0.1 g L^{-1} with DI-water or 100 mM NaCl solution electrolyte. The polymer dispersions were mixed at $Z = 1$ and after 10 min, the mixture was diluted by a factor 10 for observation. 30 μl of dispersion were deposited on a glass plate and sealed into a Gene Frame® (Abgene/Advanced Biotech) dual adhesive system. An EXi Blue camera (QImaging) and Metaview software (Universal Imaging Inc.) were used as the acquisition system.

3. Results

3.1. Assessment of the PACTS technique using ion-containing polymers

The PACTS technique was first assessed using oppositely charged polymers. Poly(diallyldimethylammonium chloride) and poly(sodium 4-styrenesulfonate) of molecular weight $M_w = 13.4$ and 8.0 kDa with similar degrees of polymerization ($DP = 31$ and 32 respectively) were considered. In this study, isothermal titration calorimetry was used to determine the stoichiometry of the inter-polyelectrolyte reaction, and to set up a reference for PACTS. In addition to the charge stoichiometry, ITC also provides the binding enthalpy and reaction binding constant. Fig. 2a and b displays the thermogram and the binding isotherm obtained for PSS/PDADMAC, respectively. Here, the PSS dispersion at molar charge concentration 20 mM was added stepwise to a PDADMAC solution containing 2 mM of positive charges. Throughout the process, the enthalpy exhibits a sigmoidal decrease with increasing charge ratio and is associated with an exothermic reaction. Above $Z_{-/+} = 1$, heat exchanges close to zero indicate that the titration is completed. Experiments performed with PSS and PDADMAC of different molecular weights provide similar thermograms (see Supplementary Fig. 3). The data of Fig. 2 also confirm the ITC results obtained by Bucur and coworkers on the same polymers at a slightly different ionic strength (0.3 M NaCl) [29].

The ITC data on PSS/PDADMAC were analyzed according to the Multiple Non-interacting Sites (MNIS) model [33,40,62]. The MNIS model assumes that the macromolecules to be titrated have several anchoring sites, and that the binding probability is independent on the occupation rate of other sites. This simplified model was found to work well for a broad range of colloidal systems [33,39]. The reaction between macromolecules is associated with heat exchange that is proportional to the amount of binding events and characterized by the enthalpy ΔH_b, the binding constant K_b and by a reaction stoichiometry n. Fig. 2a displays the ITC data together with the fitting curves obtained from the MNIS model. The values retrieved are the binding enthalpy $\Delta H_b = -2.6$ kJ mol^{-1}, the free energy

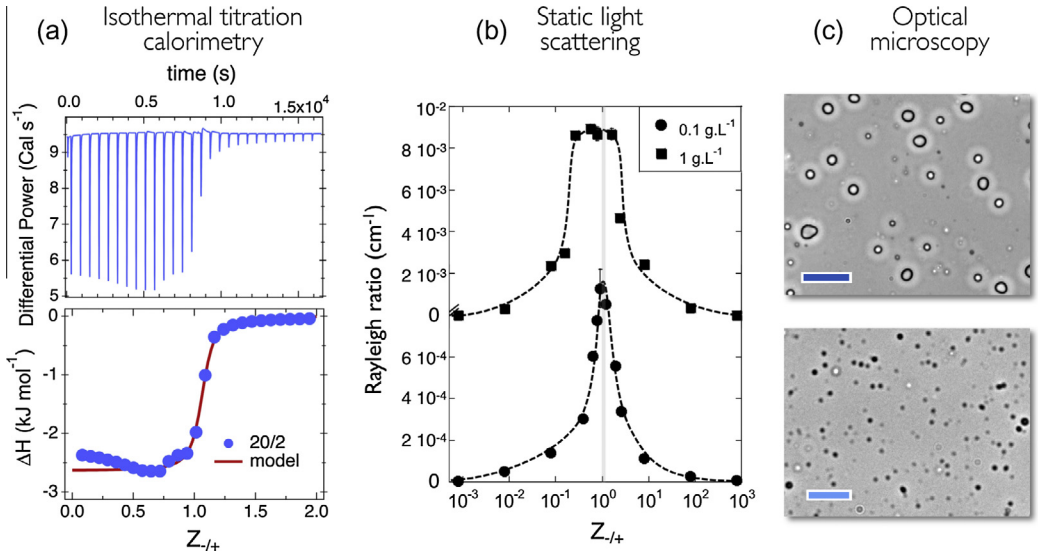


Fig. 2. (a) Thermogram (upper panel) and binding isotherm (lower panel) obtained from micro-calorimetry titration of poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDADMAC M_w = 13.4 kDa) by stepwise addition of poly(sodium 4-styrenesulfonate) (PSS, M_w = 8.0 kDa). The molar charge concentrations are 20 mM and 2 mM respectively, and the temperature is fixed at T = 25 °C. The continuous curve in red arises from best fit calculations using the Multiple Non-interacting Sites (MNIS) model. The stoichiometry coefficient derived from ITC is n = 1.1 ± 0.1. (b) Rayleigh ratios obtained from PDADMAC/PSS mixed dispersions formulated by direct mixing. The scattering intensity exhibits a maximum at the 1:1 charge stoichiometry. (c) Bright field optical microscopy images of the PDADMAC/PSS coacervate phase prepared without added salt (upper panel) and at the ionic strength of 100 mM. The dark (light) blue bars are 20 (5) μm. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

$\Delta G = -RTLnK_b = -30.4$ kJ mol^{-1} and the entropy contribution to the reaction $T\Delta S = \Delta H_b - \Delta G = +27.8$ kJ mol^{-1}. The associated binding constant is $K_b = 2.0 \times 10^5$ M^{-1} and the stoichiometry coefficient $n = 1.1 \pm 0.1$. For PDADMAC13.4k and PDADMAC26.8k titrated alternatively with PSS8.0k and PSS59.7k, stoichiometry coefficients close to unity were also obtained (Supplementary Fig. 3). The large value of the binding constant indicates a strong affinity of styrene sulfonate for diallyldimethylammonium, and a stoichiometry around 1 that the complexation occurs through charge neutralization. The entropy contribution to the reaction, $-T\Delta S$ is around 10 times larger than the binding enthalpy, demonstrating that the process is driven by the entropy and dominated by the release of the sodium and chloride counterions [25,54].

The PACTS technique was applied to PSS/PDADMAC following the direct mixing protocol described in Section 2.3. The volumes of the stock solutions used for mixing were adjusted to cover a range in charge ratio between 10^{-4} and 10^3. After mixing, the dispersions were stirred rapidly, let to equilibrate for 5 min and the scattered intensity and hydrodynamic diameter were measured in triplicate. The light scattering experiments were repeated a day after and showed the same features (data not shown). Fig. 2b displays the Rayleigh ratio obtained for 0.1 and 1 g L^{-1} PSS/PDADMAC mixtures. Both datasets exhibit a maximum around the 1:1 charge stoichiometry. At 1 g L^{-1}, the scattering peak is broad and exhibits a flat plateau between $Z_{-/+} = 0.5$ and 2. At 0.1 g L^{-1} in contrast, the sharp maximum is observed and allows an accurate determination of its location, here at $Z_{Max} = 1.2 \pm 0.1$. Such a scattering feature on mixing oppositely charge species was observed for various systems, including synthetic and biological polymers, phospholipid vesicles and surfactants [19,31,32,47,48,51,52,63]. It is interpreted in terms of complexation, charge neutralization and the formation of structures or phase much larger the initial components. In this scenario, the coacervate particles formed at equivalence ($[+] = [-]$) have a zero surface charge and grow rapidly in size. In off-stoichiometric mixtures on the other hand, the coacervate particles are charged and repel each other, preventing them from growing. The Z_{max}-value is also in good agreement with the stoichiometry found in ITC on the same compounds. We have found that stoichiometric PSS/PDADMAC mixtures without added salt form a viscous coacervate phase that sedimented rapidly [63,64]. Observed between glass slides, the coacervate appears as 5 μm droplets (Fig. 2c, top panel). At 0.1 M of added salt, the phase separation persists and gives rise to droplets in the micron range (Fig. 2c, lower panel). These polymer phases are similar to those found by Priftis et al. on branched poly(ethyleneimine) complexed with linear poly(glutamic acid) [51,65], indicating that electrostatics driven reactions between charged polymers share general features as far as the structure, the phase or the thermodynamics are concerned [32]. The main result of this study is that the PACTS technique allows an accurate determination of the charge stoichiometry.

3.2. Application of the PACTS technique to nanoparticles and polymers

Polymer/nanoparticle dispersions were formulated by mixing stock solutions at different volumetric ratios between 10^{-4} and 10^3. Fig. 3a–c shows the Rayleigh ratio $\mathcal{R}(X)$, hydrodynamic diameter $D_H(X)$ and zeta potential $\zeta(X)$ respectively for latex/poly (sodium 4-styrenesulfonate) mixtures. At 0.1 g L^{-1}, the mixed dispersions are dilute and the scattering intensity is proportional to the concentration and to the molecular weight of the scatterers. The continuous line in Fig. 3a is calculated assuming that polymers and particles do not interact, and that the Rayleigh ratio is the sum of the respective Rayleigh ratios weighted by their actual concentrations [60]:

$$\mathcal{R}_0(X) = \frac{\mathcal{R}_{NP} + \mathcal{R}_{Pol}X}{1 + X} \tag{3}$$

where $\mathcal{R}_{NP}$ and $\mathcal{R}_{Pol}$ are the Rayleigh ratios of the nanoparticle and polymer dispersions, respectively. In Fig. 3a, $\mathcal{R}(X)$ is found to be higher than the predictions for non-interacting species, and it exhibits a marked maximum at the critical value $X_{Max} = 0.020 \pm 0.003$. The observation of a maximum suggests that polymer/particle aggregates are formed, and that it occurs at a defined stoichiometry.

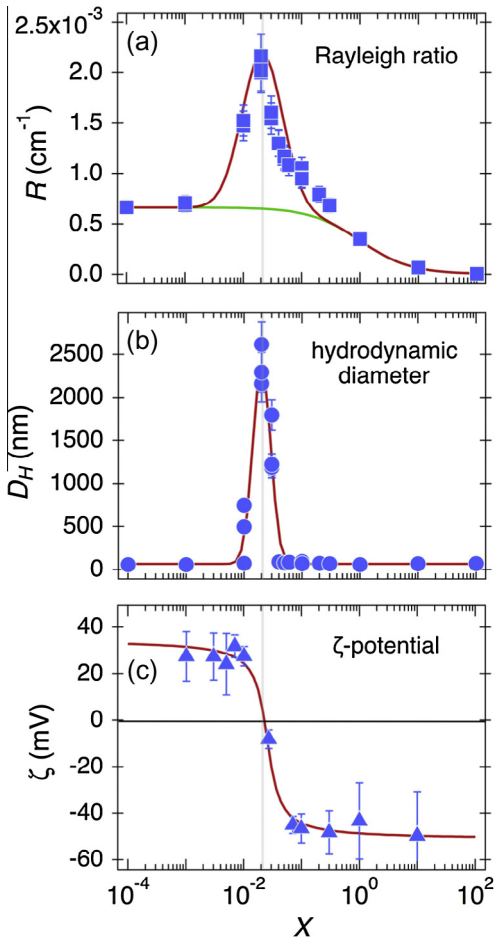


Fig. 3. Rayleigh ratio $\mathcal{R}(X)$ (a), hydrodynamic diameter $D_H(X)$ (b) and zeta potential $\zeta(X)$ (c) measured for positively charged 34 nm latex particles complexed with poly (sodium 4-styrenesulfonate) chains of molecular weight M_w = 8.0 kDa at concentration c = 0.1 g L^{-1}. The continuous line in green (a) is calculated according to Eq. (3). The position of $\mathcal{R}(X)$ and $D_H(X)$-maxima coincides with charge neutralization and a zero zeta potential. Continuous lines in red are guides for the eyes. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

The hydrodynamic diameter $D_H(X)$ in Fig. 3b confirms this result. The D_H-maximum reaches a value over a micron at the same X_{Max} as the intensity. Fig. 3c shows the zeta potential $\zeta(X)$ as a function of the mixing ratio. The point of zero charge, characterized by $\zeta(X) = 0$ is obtained for $X = X_{Max}$, indicating that the reaction stoichiometry is associated with the neutralization of the electrostatic charges [31,52,66]. Zeta measurements using higher molecular weight poly(sodium 4-styrenesulfonate) (M_w = 59.7 kDa) confirm this result (Supplementary Fig. 4). Our goal here is to show that under appropriate conditions, the approach can be exploited to determine the structural charges of particulate nanosystems.

3.3. Charge density calculation and comparison with standard methods

Fig. 4 displays the Rayleigh ratio and the hydrodynamic diameter for latex (a), silica (b, c) alumina (d). The negative latex and silica were complexed with PDADMAC13.4k, whereas the positively charged particles (silica and alumina) were associated with the 8 kDa PSS. The features disclosed in Fig. 3 were again observed: both $\mathcal{R}(X)$- and $D_H(X)$-data exhibit sharp maxima. The positions of these maxima coincide and allow an accurate determination of X_{Max}. The values for the mixing ratios at maximum are 0.0023 ± 0.0003 for carboxylate coated latex, 0.010 ± 0.002 for negative silica, 0.016 ± 0.004 for amine coated silica and 0.10 ± 0.01 for alumina. Assuming that the peak position coincides with the charge neutralization, the structural charge Z_{Str} is obtained from:

$$Z_{Str} = X_{Max}\frac{M_n^{Np}}{m_n} \tag{4}$$

where M_n^{Np} and m_n denote the number-averaged molecular weights of the particles and of the repetitive unit of the polymer used for titration, respectively. Taking into account the particle dispersity s (Table 1), the charge density reads:

$$\sigma = \frac{\mathcal{N}_A \rho D_0 exp(2.5s^2)}{6m_n} X_{Max} \tag{5}$$

In Eq. (5), ρ is the particle mass density and $\mathcal{N}_A$ the Avogadro number. For log-normal distribution of median diameter D_0 and dispersity s, the ith-moment is given by the expression $\langle D^i \rangle = D_0^i \exp(i^2 s^2/2)$. For particles of uniform size ($s \sim 0$), the exponential term in the numerator of Eq. (5) is close to 1, and the charge density is directly proportional to the particle diameter and the scattering maximum position observed by PACTS.

Results are summarized in Table 3, and the charge densities obtained from Eq. (5) are compared with those retrieved from conventional methods. The σ-values for carboxylate and amidine latex (σ = −0.05e nm^{-2} and +0.21e nm^{-2} respectively) were provided by the supplier, whereas those of negative silica and alumina were measured using potentiometry and precipitation titration coupled to conductometry experiments. The positive silica particles were produced in small quantities and their charges could not be obtained by titration. As shown in Table 3 for alumina, latex and negative silica, PACTS provides charge densities in agreement with the other techniques. In view of the dispersity exhibited by the polymers and particles examined in this work, a 20–30% difference between PACTS and other techniques is noticeable. For positive silica, the value retrieved from PACTS amounts at σ = +0.62e nm^{-2}, a value in fair agreement with earlier determination [56,57]. From the charge densities listed, it can also be verified that the inequality $\sigma > 2/\pi D \ell_B$ (Eq. (1)) holds and that the condensation and double layer description apply for all particles considered [1]. In conclusion, it can be said that the PACTS is an accurate technique for measuring the structural charges of nanoparticles.

3.4. Optimizing PACTS

In this section, we explore the effects of physico-chemical parameters such as the concentration, the molecular weight and the polymer ionization state.

3.4.1. Effect of concentrations and sensitivity

As illustrated in Fig. 2 for PSS8.0k and PDAD13.4k, the initial concentration has a significant effect on the scattering peak shape. The plateau observed at 1 g L^{-1} around the 1:1 charge stoichiometry arises from the high turbidity of the coacervate phase. As a result, the sample absorbs a noticeable part of the incoming and scattered light, and the recorded values of the Rayleigh ratios are biased. At 0.1 g L^{-1}, the hydrodynamic sizes are of the order of 200 nm, the turbidity is lowered, making measurements possible. For particles, PACTS measurements were made between 0.1 and 1 g L^{-1} and gave Rayleigh ratios around 10^{-3} cm^{-1} at the peak maximum. These values are 1000 times larger than the minimum Rayleigh ratio detectable by light scattering spectrometers [49]. The concentration in a PACTS experiment could hence be reduced and still provides reliable data. One important advantage of PACTS over the techniques mentioned in introduction is that it requires very low amount of samples.

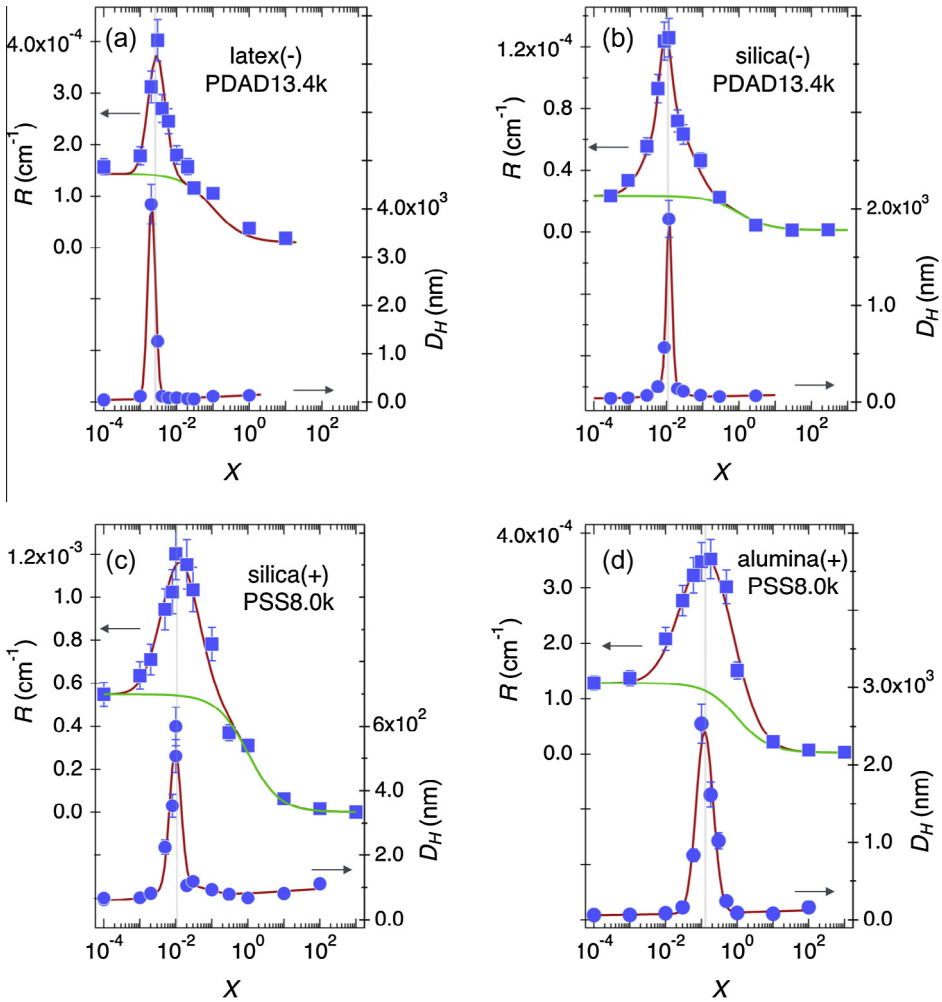


Fig. 4. Rayleigh ratio $\mathcal{R}(X)$ and hydrodynamic diameter $D_H(X)$ obtained from PACTS experiments performed with latex (a), silica (b and c) and alumina (d) nanoparticles. The legends are similar to those of Fig. 3. Continuous lines in red are guides for the eyes. PACTS was performed at concentrations $c = 1$ g L^{-1} in (a), $c = 0.1$ g L^{-1} in (b), $c = 0.5$ g L^{-1} in (c) and $c = 0.1$ g L^{-1} in (d). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 3
Charge densities σ of the particles studied in this work determined by conventional titration methods and by PACTS. X_{Max} denotes the volumetric mixing ratio at which the scattering intensity and hydrodynamic diameter are maximum. The charge density from PACTS was calculated from Eq. (5) and particle characteristics of Table 1.

Nanoparticles (sign)	Nominal charge density, σ (nm^{-2})	Mixing ratio at maximum scattering, X_{Max}	Charge density from PACTS, σ (nm^{-2})
Latex (−)	−0.05	0.0023 ± 0.003	−0.048 ± 0.006
Latex (+)	+0.21	0.020 ± 0.003	+0.33 ± 0.06
Silica (−)	−0.24	0.010 ± 0.002	−0.31 ± 0.07
Silica (+)	n.d.	0.016 ± 0.004	+0.62 ± 0.16
Alumina (+)	+5.9	0.10 ± 0.01	+7.3 ± 0.7

3.4.2. Effect of polymer molecular weight

The molecular weight of the titrating polymers plays also an important role. Fig. 5a displays the Rayleigh ratio as a function of X for negative silica complexed with poly(diallyldimethylammonium chloride) of molecular weight M_w = 13.4 kDa and 26.8 kDa. With increasing molecular weight, the scattering peak broadens and shifts toward higher mixing ratios, here from X_{Max} = 0.01 to 0.02, leading to a doubling of the apparent charge density (−0.30e nm^{-2} versus −0.61e nm^{-2}). Similarly, positive latex particles were associated with poly(sodium 4-styrenesulfonate) at M_w = 8.0 kDa and M_w = 59.7 kDa. Again, the scattering peak broadens and moves toward higher X-values (Fig. 5b). With PSS59.7k, the charge density deduced using Eq. (5) equals σ = +2.6e nm^{-2}, that is seven times that obtained with PSS8.0k. These results suggest that the particle aggregation mechanism depends on the molecular weight of the titrating polymers. For short chains, it is assumed that the polymers adsorb at the particle surface and compensate the structural charges. As a result the destabilization occurs through the surface charge neutralization and electrostatic screening. Note here that the structural charges of the polymers ($Z_{str} \sim 30$) are much smaller than that of the particles ($Z_{str} = 1000$–5000). This asymmetry appears as an important criterion in regulating the adsorption and precipitation processes. With higher molecular weight polymers, polymers adsorb at the particle surface but form loops or bridges with neighboring particles. In this latter case, there is an excess of uncomplexed charges, which artificially increases the particle charge density.

3.4.3. Effect of polyelectrolyte

Fig. 5c compares the Rayleigh ratios $\mathcal{R}(X)$ using a weak (poly (sodium acrylate) 5.4 kDa) and a strong (PSS8.0k) polyelectrolyte of same degree of dispersity, together with the positively charged silica. Experiments were performed under conditions where the particles are colloidally stable, i.e. at pH 5. Acid-base titration experiments on PAA 5.4 kDa have shown that at this pH, the chain ionization degree is 30%. Fig. 5c illustrates that switching from

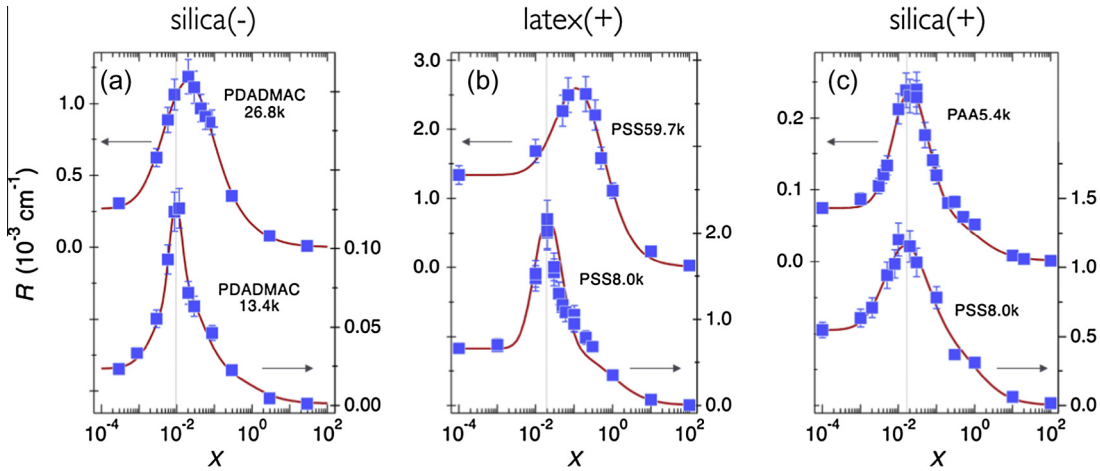


Fig. 5. Rayleigh ratio $\mathcal{R}(X)$ and hydrodynamic diameter $D_H(X)$ obtained from PACTS experiments performed with negative silica (a), positive latex (b) and silica (c) nanoparticles. Except for silica(−)/PDADMAC26.8k that was measured at c = 1 g L^{-1}, all PACTS concentrations were c = 0.1 g L^{-1}. The legends are similar to those of Fig. 3. Continuous lines in red are guides for the eyes. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

strong to weak poly(acid) shifts the scattering maximum position to higher values, here from X_{Max} = 0.013–0.022. As a result, the charge density estimated from Eq. (5) is found to be higher with PAA (σ = +1.85e nm^{-2}) as compared to that with PSS (σ = +0.63e nm^{-2}). The reason for this discrepancy is that not all the acrylic acid monomers adsorbing at the interface are charged and complex with the silica surface charges. Using PDADMAC and partially charged PAA chains, it was shown recently that the complexation process itself modifies the degree of ionization of the weak poly(acid) chains and displaces the reaction stoichiometry [39,67].

4. Conclusion

The main result of this study is that polyelectrolyte assisted charge titration spectrometry technique is a rapid and effective method to estimate nanoparticle structural charges. Here we are taking advantage of the propensity of oppositely charged polymers and particles to assemble upon mixing. The designed complexation protocole makes use of low molecular weight ion-containing polymers as complexing agents. Upon mixing, the chains adsorb at the particle surface in an entropy-driven process and compensate the charge of the nanoparticles. The particles then aggregate via van der Waals interactions, resulting in the formation of micron size objects, or in some cases micro-phase separation. Both induced states are easily detectable by light scattering. The screening of the polymer/nonoparticle phase diagram by varying the volumetric ratio leads to a marked scattering peak (Fig. 6). The peak position on the X-axis provides the value of the charge density σ, assuming its size and dispersity are known. In this approach, the complexing polymers are of low molecular weight to avoid overcharging during the adsorption process. Overcharging can be associated to the formation of loops, dangling ends or to the bridging of distant particles. The use of high molecular weight polymers leads to a wrong estimation of the structural charges, as shown in Fig. 5. The protocol was further optimized with respect to pH, concentration and to the nature of the polymers. The technique used here is similar in its principle to the one reported by one of us a few years ago [60]. In this previous work, the complexation was carried out using double hydrophilic block copolymers instead of homopolyelectrolytes. The role of the neutral block was to reduce the interfacial tension between the particle aggregates and the solvent, and to stabilize the microstructure in the 100 nm range. With homopolyelectrolytes the situation is different, as the complexation and further growth of the aggregates are not hindered by

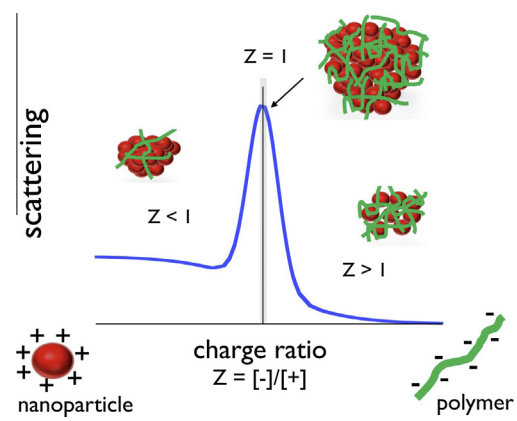


Fig. 6. Schematic representation of the light scattering response to mixing oppositely charged polymers and particles. The position of the maximum scattering peak corresponds to the 1:1 charge stoichiometry.

the presence of neutral blocks, therefore leading to the formation of micron size colloids or coacervate droplets solely at the charge stoichiometry. One decisive advantage of PACTS is that it requires minute amounts of particles, typically 10 μg of dry matter, whereas conventional titration uses 10^3–10^4 larger quantities [16–18,21]. In conclusion, PACTS represents a quick and easy protocol that can be used to determine the structural charge density of nanoparticles, which is of critical importance for the stability and interaction of bulk dispersions.

Acknowledgments

We thank Jean-Paul Chapel, Fabrice Cousin, Jacques Jestin, Evdokia Oikonomou, Olivier Sandre and Christophe Schatz for fruitful discussions. L.V. thanks CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) in Brazil for postdoctoral fellowship (Proc. No. 210694/2013-0). We also thank Mélanie Legros from Institut Charles Sadron in Strasbourg, France for the size-exclusion chromatography measurements and molecular weight determination. ANR (Agence Nationale de la Recherche) and CGI (Commissariat à l'Investissement d'Avenir) are gratefully acknowledged for their financial support of this work through Labex SEAM (Science and Engineering for Advanced Materials and devices) ANR 11 LABX 086, ANR 11 IDEX 05 02. This research

was supported in part by the Agence Nationale de la Recherche under the contract ANR-13-BS08-0015 (PANORAMA).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2016.04.036.

References

[1] J.N. Israelachvili, Intermolecular and Surfaces Forces, second ed., Academic Press, New York, 1992.
[2] D.F. Evans, K. Wennerström, The Colloidal Domain, Wiley-VCH, New York, 1999.
[3] P. Pieranski, Colloidal crystals, Contemp. Phys. 24 (1983) 25–73.
[4] L. Belloni, Ionic condensation and charge renormalization in colloid suspensions, Colloids Surf. A 140 (1998) 227–243.
[5] S. Alexander, P.M. Chaikin, P. Grant, G.J. Morales, P. Pincus, D. Hone, Charge renormalization, osmotic-pressure, and bulk modulus of colloidal crystals – theory, J. Chem. Phys. 80 (1984) 5776–5781.
[6] F. Oosawa, Polyelectrolytes, Marcel Dekker, New York, N.Y., 1971.
[7] F. Strubbe, F. Beunis, K. Neyts, Determination of the effective charge of individual colloidal particles, J. Colloid Interface Sci. 301 (2006) 302–309.
[8] T. Trimaille, C. Pichot, A. Elaissari, H. Fessi, S. Briancon, T. Delair, Poly(D, L-lactic acid) nanoparticle preparation and colloidal characterization, Colloid Polym. Sci. 281 (2003) 1184–1190.
[9] J.P. Holmberg, E. Ahlberg, J. Bergenholtz, M. Hassellov, Z. Abbas, Surface charge and interfacial potential of titanium dioxide nanoparticles: experimental and theoretical investigations, J. Colloid Interface Sci. 407 (2013) 168–176.
[10] K. Makino, H. Ohshima, Electrophoretic mobility of a colloidal particle with constant surface charge density, Langmuir 26 (2010) 18016–18019.
[11] A.V. Delgado, F. Gonzalez-Caballero, R.J. Hunter, L.K. Koopal, J. Lyklema, Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena, J. Colloid Interface Sci. 309 (2007) 194–224.
[12] R. Doi, E. Kokufuta, On the water dispersibility of a 1:1 stoichiometric complex between a cationic nanogel and linear polyanion, Langmuir 26 (2010) 13579–13589.
[13] B. D'aguanno, R. Klein, Integral-equation theory of polydisperse Yukawa systems, Phys. Rev. A 46 (1992) 7652–7656.
[14] N. Gorski, M. Gradzielski, H. Hoffmann, Mixtures of nonionic and ionic surfactants – the effect of counterion binding in mixtures of tetradecyldimethylamine oxide and tetradecyltrimethylammonium bromide, Langmuir 10 (1994) 2594–2603.
[15] M. Quesada-Perez, J. Callejas-Fernandez, R. Hidalgo-Alvarez, Interaction potentials, structural ordering and effective charges in dispersions of charged colloidal particles, Adv. Colloids Interface Sci. 95 (2002) 295–315.
[16] T. Hoare, R. Pelton, Titrametric characterization of pH-induced phase transitions in functionalized microgels, Langmuir 22 (2006) 7342–7350.
[17] J. Rodriguez-Hernandez, J. Babin, B. Zappone, S. Lecommandoux, Preparation of shell cross-linked nano-objects from hybrid-peptide block copolymers, Biomacromolecules 6 (2005) 2213–2220.
[18] I.T. Lucas, S. Durand-Vidal, E. Dubois, J. Chevalet, P. Turq, Surface charge density of maghemite nanoparticles: role of electrostatics in the proton exchange, J. Phys. Chem. C 111 (2007) 18568–18576.
[19] J. Fresnais, M. Yan, J. Courtois, T. Bostelmann, A. Bee, J.F. Berret, Poly(acrylic acid)-coated iron oxide nanoparticles: quantitative evaluation of the coating properties and applications for the removal of a pollutant dye, J. Colloid Interface Sci. 395 (2013) 24–30.
[20] J. Sonnefeld, A. Gobel, W. Vogelsberger, Surface-charge density on spherical silica particles in aqueous alkali chloride solutions.1. Experimental results, Colloid Polym. Sci. 273 (1995) 926–931.
[21] F.A. Tourinho, A.F.C. Campos, R. Aquino, M. Lara, G.J. da Silva, J. Depeyrot, Surface charge density determination in electric double layered magnetic fluids, Braz. J. Phys. 32 (2002) 501–508.
[22] H. Terayama, Method of colloid titration (a new titration between polymer ions), J. Polym. Sci. 8 (1952) 243–253.
[23] T. Masadome, Determination of cationic polyelectrolytes using a photometric titration with crystal violet as a color indicator, Talanta 59 (2003) 659–666.
[24] K. Ueno, K. Kina, Colloid titration – a rapid method for the determination of charged colloid, J. Chem. Educ. 62 (1985) 627–629.
[25] D. Matulis, I. Rouzina, V.A. Bloomfield, Thermodynamics of DNA binding and condensation: isothermal titration calorimetry and electrostatic mechanism, J. Mol. Biol. 296 (2000) 1053–1063.
[26] W. Kim, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Development of a fitting model suitable for the isothermal titration calorimetric curve of DNA with cationic ligands, J. Phys. Chem. B 110 (2006) 10919–10925.
[27] W. Kim, Y. Yamasaki, W.-D. Jang, K. Kataoka, Thermodynamics of DNA condensation induced by poly(ethylene glycol)-block-polylysine through polyion complex micelle formation, Biomacromolecules 11 (2010) 1180–1186.
[28] N. Korolev, N.V. Berezhnoy, K.D. Eom, J.P. Tam, L. Nordenskiold, A universal description for the experimental behavior of salt-(in)dependent oligocation-induced DNA condensation (vol 37, pg 7137, 2009), Nucleic Acids Res. 40 (2012) 2807–2821.
[29] C.B. Bucur, Z. Sui, J.B. Schlenoff, Ideal mixing in polyelectrolyte complexes and multilayers: entropy driven assembly, J. Am. Chem. Soc. 128 (2006) 13690–13691.
[30] T. Cedervall, I. Lynch, S. Lindman, T. Berggard, E. Thulin, H. Nilsson, K.A. Dawson, S. Linse, Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104 (2007) 2050–2055.
[31] F. Loosli, P. Le Coustumer, S. Stoll, TiO_2 nanoparticles aggregation and disaggregation in presence of alginate and Suwannee River humic acids. pH and concentration effects on nanoparticle stability, Water Res. 47 (2013) 6052–6063.
[32] J. Qin, D. Priftis, R. Farina, S.L. Perry, L. Leon, J. Whitmer, K. Hoffmann, M. Tirrell, J.J. de Pablo, Interfacial tension of polyelectrolyte complex coacervate phases, ACS Macro Lett. 3 (2014) 565–568.
[33] J. Courtois, J.-F. Berret, Probing oppositely charged surfactant and copolymer interactions by isothermal titration microcalorimetry, Langmuir 26 (2010) 11750–11758.
[34] L. Chiappisi, D. Li, N.J. Wagner, M. Gradzielski, An improved method for analyzing isothermal titration calorimetry data from oppositely charged surfactant polyelectrolyte mixtures, J. Chem. Thermodyn. 68 (2014) 48–52.
[35] I. Herrera, M.A. Winnik, Differential binding models for isothermal titration calorimetry: moving beyond the Wiseman isotherm, J. Phys. Chem. B 117 (2013) 8659–8672.
[36] S. Louguet, A.C. Kumar, N. Guidolin, G. Sigaud, E. Duguet, S. Lecommandoux, C. Schatz, Control of the PEO chain conformation on nanoparticles by adsorption of peo-block-poly(l-lysine) copolymers and its significance on colloidal stability and protein repellency, Langmuir 27 (2011) 12891–12901.
[37] D. Priftis, N. Laugel, M. Tirrell, Thermodynamic characterization of polypeptide complex coacervation, Langmuir 28 (2012) 15947–15957.
[38] N. Welsch, A.L. Becker, J. Dzubiella, M. Ballauff, Core-shell microgels as "smart" carriers for enzymes, Soft Matter 8 (2012) 1428–1436.
[39] L. Vitorazi, N. Ould-Moussa, S. Sekar, J. Fresnais, W. Loh, J.P. Chapel, J.F. Berret, Evidence of a two-step process and pathway dependency in the thermodynamics of poly(diallyldimethylammonium chloride)/poly(sodium acrylate) complexation, Soft Matter 10 (2014) 9496–9505.
[40] T. Wiseman, S. Williston, J.F. Brandts, L.N. Lin, Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter, Anal. Biochem. 179 (1989) 131–137.
[41] R.R. Kumal, T.E. Karam, L.H. Haber, Determination of the surface charge density of colloidal gold nanoparticles using second harmonic generation, J. Phys. Chem. C 119 (2015) 16200–16207.
[42] R. Vogel, W. Anderson, J. Eldridge, B. Glossop, G. Willmott, A variable pressure method for characterizing nanoparticle surface charge using pore sensors, Anal. Chem. 84 (2012) 3125–3131.
[43] P. Job, Studies on the formation of complex minerals in solution and on their stability, Annales De Chimie France 9 (1928) 113–203.
[44] H. Dautzenberg, Polyelectrolyte complex formation in highly aggregating systems. 1. Effect of salt: polyelectrolyte complex formation in the presence of NaCl, Macromolecules 30 (1997) 7810–7815.
[45] J.M. Lambert, Volumetric analysis of colloidal electrolytes by turbidity titration, J. Colloid Sci. 2 (1947) 479–493.
[46] P. Herve, M. Destarac, J.-F. Berret, J. Lal, J. Oberdisse, I. Grillo, Novel core-shell structure for colloids made of neutral/polyelectrolyte diblock copolymers and oppositely charged surfactants, Europhys. Lett. 58 (2002) 912–918.
[47] L. Leclercq, M. Boustta, M. Vert, A physico-chemical approach of polyanion-polycation interactions aimed at better understanding the in vivo behaviour of polyelectrolyte-based drug delivery and gene transfection, J. Drug Target. 11 (2003) 129–138.
[48] S. Sennato, F. Bordi, C. Cametti, Correlated adsorption of polyelectrolytes in the "charge inversion" of colloidal particles, Europhys. Lett. 68 (2004) 296–302.
[49] L. Qi, J.P. Chapel, J.C. Castaing, J. Fresnais, J.-F. Berret, Organic versus hybrid coacervate complexes: co-assembly and adsorption properties, Soft Matter 4 (2008) 577–585.
[50] L. Qi, J. Fresnais, J.-F. Berret, J.C. Castaing, F. Destremaut, J.B. Salmon, F. Cousin, J.P. Chapel, Influence of the formulation process in electrostatic assembly of nanoparticles and macromolecules in aqueous solution: the interaction pathway, J. Phys. Chem. C 114 (2010) 16373–16381.
[51] D. Priftis, K. Megley, N. Laugel, M. Tirrell, Complex coacervation of poly (ethylene-imine)/polypeptide aqueous solutions: thermodynamic and rheological characterization, J. Colloid Interface Sci. 398 (2013) 39–50.
[52] V. Mengarelli, L. Auvray, D. Pastre, M. Zeghal, Charge inversion, condensation and decondensation of DNA and polystyrene sulfonate by polyethylenimine, Eur. Phys. J. E 34 (2011) 127.
[53] M. Miyake, K. Ogawa, E. Kokufuta, Light-scattering study of polyelectrolyte complex formation between anionic and cationic nanogels in an aqueous salt-free system, Langmuir 22 (2006) 7335–7341.
[54] J.P. Chapel, J.-F. Berret, Versatile electrostatic assembly of nanoparticles and polyelectrolytes: coating, clustering and layer-by-layer processes, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 17 (2012) 97–105.
[55] A. Van Blaaderen, J. Van Geest, A. Vrij, Monodisperse colloidal silica spheres from tetraalkoxysilanes: particle formation and growth mechanism, J. Colloid Interface Sci. 154 (1992) 481–501.
[56] N. Reinhardt, L. Adumeau, O. Lambert, S. Ravaine, S. Mornet, Quaternary ammonium groups exposed at the surface of silica nanoparticles suitable for DNA complexation in the presence of cationic lipids, J. Phys. Chem. B 119 (2015) 6401–6411.

[57] I. George, G. Naudin, S. Boland, S. Mornet, V. Contremoulins, K. Beugnon, L. Martinon, O. Lambert, A. Baeza-Squiban, Metallic oxide nanoparticle translocation across the human bronchial epithelial barrier, Nanoscale 7 (2015) 4529–4544.
[58] S. Desset, O. Spalla, P. Lixon, B. Cabane, From powders to dispersions in water: effect of adsorbed molecules on the redispersion of alumina particles, Langmuir 17 (2001) 6408–6418.
[59] R.G. Gilbert, M. Hess, A.D. Jenkins, R.G. Jones, R. Kratochvil, R.F.T. Stepto, Dispersity in polymer science (IUPAC Recommendations 2009) (vol 81, pg 351), Pure Appl. Chem. 81 (2009) (2009) 779.
[60] J.-F. Berret, Stoichiometry of electrostatic complexes determined by light scattering, Macromolecules 40 (2007) 4260–4266.
[61] J.-F. Berret, A. Sehgal, M. Morvan, O. Sandre, A. Vacher, M. Airiau, Stable oxide nanoparticle clusters obtained by complexation, J. Colloid Interface Sci. 303 (2006) 315–318.
[62] I. Jelesarov, H.R. Bosshard, Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition, J. Mol. Recognit. 12 (1999) 3–18.
[63] E. Spruijt, A.H. Westphal, J.W. Borst, M.A.C. Stuart, J. van der Gucht, Binodal compositions of polyelectrolyte complexes, Macromolecules 43 (2010) 6476–6484.
[64] E. Spruijt, J. Sprakel, M. Lemmers, M.A.C. Stuart, J. van der Gucht, Relaxation dynamics at different time scales in electrostatic complexes: time-salt superposition, Phys. Rev. Lett. 105 (2010).
[65] D. Priftis, R. Farina, M. Tirrell, Interfacial energy of polypeptide complex coacervates measured via capillary adhesion, Langmuir 28 (2012) 8721–8729.
[66] F. Bordi, C. Cametti, S. Sennato, M. Diociaiuti, Direct evidence of multicompartment aggregates in polyelectrolyte-charged liposome complexes, Biophys. J. 91 (2006) 1513–1520.
[67] A.I. Petrov, A.A. Antipov, G.B. Sukhorukov, Base-acid equilibria in polyelectrolyte systems: from weak polyelectrolytes to interpolyelectrolyte complexes and multilayered polyelectrolyte shells, Macromolecules 36 (2003) 10079–10086.