



**HAL**  
open science

# Modulation des propriétés mécaniques des nanoparticules, et leurs impacts sur les mécanismes biologiques

Lise-Anne Lefol

► **To cite this version:**

Lise-Anne Lefol. Modulation des propriétés mécaniques des nanoparticules, et leurs impacts sur les mécanismes biologiques. Sciences pharmaceutiques. 2021. dumas-03467743

**HAL Id: dumas-03467743**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03467743>**

Submitted on 6 Dec 2021

**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.



# THESE

Pour l'obtention du Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

*Modulation des propriétés mécaniques des nanoparticules,  
et leurs impacts sur les mécanismes biologiques*

Présentée par  
Lise-Anne LEFOL

Soutenue publiquement le 9 juillet 2021  
devant le jury composé de

Mme Aurélie MALZERT-FRÉON	Professeur des universités, Caen	Président du jury et directrice de thèse
M. Gilles PONCHEL	Professeur des universités, Docteur en Pharmacie, Paris-Saclay	Membre du jury
Mme Anne-Claire GROO	Maître de conférences des universités, Docteur en Pharmacie, Caen	Co-directrice de thèse

Thèse dirigée par Aurélie Malzert-Fréon (directrice) et Anne-Claire Groo (co-directrice)



## LISTE DES ENSEIGNANTS-CHERCHEURS

**Directeur de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques**  
Professeur Michel BOULOUARD

### **Assesseurs**

Professeur Pascale SCHUMANN-BARD  
Professeur Anne-Sophie VOISIN-CHIRET

**Directrice administrative**  
Madame Sarah CHEMTOB

**Directrice administrative adjointe**  
Madame Emmanuelle BOURDON

### PROFESSEURS DES UNIVERSITES

<b>BOULOUARD Michel</b> .....	Physiologie, Pharmacologie
<b>BUREAU Ronan</b> .....	Biophysique, Chémoinformatique
<b>COLLOT Valérie</b> .....	Pharmacognosie
<b>DALLEMAGNE Patrick</b> .....	Chimie médicinale
<b>DAUPHIN François</b> .....	Physiologie, Pharmacologie
<b>DELEPEE Raphaël</b> .....	Chimie analytique
<b>FABIS Frédéric</b> .....	Chimie organique
<b>FRERET Thomas</b> .....	Physiologie, Pharmacologie
<b>GARON David</b> .....	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
<b>GIARD Jean-Christophe</b> .....	Bactériologie, Virologie
<b>MALZERT-FREON Aurélie</b> .....	Pharmacie galénique
<b>ROCHAIIS Christophe</b> .....	Chimie organique
<b>SCHUMANN-BARD Pascale</b> .....	Physiologie, Pharmacologie
<b>SICHEL François</b> .....	Toxicologie
<b>SOPKOVA Jana</b> .....	Biophysique, Drug design
<b>VOISIN-CHIRET Anne-Sophie</b> .....	Chimie médicinale

### MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

<b>ANDRE Véronique – HDR</b> .....	Biochimie, Toxicologie
<b>BOUET Valentine – HDR</b> .....	Physiologie, Pharmacologie
<b>CAILLY Thomas – HDR</b> .....	Chimie bio-inorganique, Chimie organique
<b>DENOYELLE Christophe – HDR</b> .....	Biologie cellulaire et moléculaire, Biochimie, Cancérologie
<b>DHALLUIN Anne</b> .....	Bactériologie, Virologie, Immunologie
<b>ELDIN de PECOULAS Philippe – HDR</b> .....	Parasitologie, Mycologie médicale
<b>GROO Anne-Claire</b> .....	Pharmacie galénique
<b>KIEFFER Charline</b> .....	Chimie médicinale

<b>KRIEGER Sophie</b> (Praticien hospitalier) – HDR .....	Biologie clinique
<b>LAPORTE-WOJCIK Catherine</b> .....	Chimie bio-inorganique
<b>LEBAILLY Pierre</b> – HDR .....	Santé publique
<b>LECHEVREL Mathilde</b> – HDR .....	Toxicologie
<b>LEGER Marianne</b> .....	Physiologie, Pharmacologie
<b>LEPAILLEUR Alban</b> – HDR .....	Modélisation moléculaire
<b>N'DIAYE Monique</b> .....	Parasitologie, Mycologie médicale, Biochimie clinique
<b>PAIZANIS Eleni</b> .....	Physiologie, Pharmacologie
<b>PEREIRA-ROSENFELD Maria de Fatima</b> .....	Chimie organique et thérapeutique
<b>POTTIER Ivannah</b> .....	Chimie et toxicologie analytiques
<b>PREVOST Virginie</b> – HDR .....	Chimie analytique, Nutrition, Education thérapeutique du patient
<b>QUINTIN Jérôme</b> .....	Pharmacognosie
<b>RIOULT Jean-Philippe</b> .....	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
<b>SINCE Marc</b> .....	Chimie analytique
<b>VILLEDIEU Marie</b> – HDR .....	Biologie et thérapies innovantes des cancers

#### **PROFESSEUR AGREGE (PRAG)**

<b>PRICOT Sophie</b> .....	Anglais
----------------------------	---------

#### **PERSONNEL ASSOCIE A TEMPS PARTIEL (PAST)**

<b>SAINT-LORANT Guillaume</b> .....	Pharmacie clinique
<b>SEDILLO Patrick</b> .....	Pharmacie officinale
<b>RICHARD Estelle</b> .....	Pharmacie officinale

#### **ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE**

<b>JOURDAN Jean-Pierre</b>
----------------------------

**Enseignants titulaires du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

## Remerciements

Tout d'abord, je souhaitais particulièrement remercier ma directrice de thèse Madame Aurélie Malzert-Fréon, ainsi que ma co-directrice de thèse, Madame Anne-Claire Groo, pour leur implication dans la rédaction de ce manuscrit. Vos conseils m'ont été précieux, et m'ont permis de mener à bien la rédaction de cette thèse. Merci pour toutes ces années d'enseignements, où vous m'avez transmis votre passion pour la galénique, vos qualités d'enseignement ont joué un rôle prépondérant dans mon choix de carrière. Merci également d'avoir répondu présentes à chacune de mes sollicitations pour trouver un stage ou une thèse de science, grâce à vous j'ai pu réaliser le parcours que je souhaitais, et je vous en suis extrêmement reconnaissante.

Un très grand merci à Gilles Ponchel, pour avoir gentiment accepté de faire partie de ce jury de thèse. J'ai eu la chance de vous côtoyer durant mon stage de Master 2, et je tenais à chaleureusement vous remercier pour votre bienveillance, votre écoute et vos conseils.

J'aimerais également remercier toutes les personnes que j'ai croisées, au cours de mes stages notamment, et qui ont été déterminantes, chacune à leur manière, dans mon parcours.

Merci Victor, pour avoir guidé mes premiers pas dans un laboratoire de recherche, pour le temps que tu m'as accordé et pour tous tes conseils.

Un grand merci à Mathilde Lorscheider, pour la confiance que tu m'as accordée, pour tout ce que j'ai appris à tes côtés, merci de m'avoir donné cette chance de travailler dans ton équipe durant ces 6 mois de stage. Quelle belle expérience ! Merci pour tous tes conseils qui m'ont été précieux et le sont encore aujourd'hui.

J'en profite pour remercier également Hicheme, merci pour ton soutien pendant mon stage de Master 2, pour nos longues discussions passionnantes, et surtout merci de m'avoir remotivée dans les moments de doute.

Enfin, je tenais à remercier les personnes de mon entourage qui ont tout autant été importantes durant ces années d'études.

Une dédicace spéciale à mes amis pharmaciens, en particulier à Laura, Elise, Clélia et Laure, la « team bidouille », avec qui j'ai passé des moments mémorables. Ces années n'auraient pas été les mêmes sans notre entraide, vous avez été des binômes de choc !

Merci à mes parents, pour m'avoir toujours soutenue, quels que soient mes choix, et de m'avoir permis d'étudier dans les meilleures conditions possibles. Merci papa, de m'avoir dit « tu ne bosses pas ? » quand je faisais une pause, et merci maman, de m'avoir dit « arrête de travailler, va t'aérer ! » quand j'étais fatiguée. Vous avez toujours été de bon conseil et je n'en serais pas là aujourd'hui sans vous, merci infiniment.

Je terminerai ces remerciements par la meilleure : ma p'tite poupoule, ma grande sœur Bérénice. Je me souviendrai toujours du jour des résultats PACES, où on s'est prises dans les bras en pleurant quand on a appris que je passais en pharma. Ce fut le début d'un long parcours où tu m'as soutenue, parfois aidée à réviser (la fameuse œnanthe safranée... ;)), mais surtout où tu m'as aidée à décompresser, avec tous nos moments cocooning et nos fous rires inoubliables.

## Sommaire

Liste des abréviations

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Liste des Équations

I- Introduction.....	6
II- Généralités sur les nanomédicaments .....	7
II-1 Définition .....	7
II-2 Apports de l'échelle nanométrique .....	9
II-3 Applications actuelles et futures des nanotechnologies .....	11
II-4 Atouts et limites des nanomédicaments .....	13
II-4-1 Atouts des nanomédicaments .....	13
II-4-2 Notions de nanotoxicologie .....	13
II-5 Différentes catégories de nanovecteurs .....	18
II-5-1 Types de nanovecteurs .....	18
II-5-2 Matériaux les plus utilisés .....	27
II-6 Procédés de formulation des NPs polymériques.....	30
II-6-1 L'émulsion-évaporation de solvant.....	30
II-6-2 La nanoprécipitation.....	31
II-6-3 Méthodes dérivées de l'émulsion-évaporation de solvant ou de la nanoprécipitation .....	32
II-6-4 L'encapsulation de principe actif par polymérisation in situ.....	38
II-7 Techniques de purification des NPs .....	41
II-7-1 Purification des NPs par ultracentrifugation .....	41
II-7-2 Purification des NPs par filtration tangentielle .....	42
II-7-3 Purification des NPs par chromatographie d'exclusion stérique.....	43
II-7-4 Isolement des NPs purifiées par lyophilisation .....	44
II-8 Propriétés des nanovecteurs déterminées après formulation.....	45
II-8-1 Méthodes de caractérisation des propriétés physico-chimiques de nanomédicaments .....	45

II-8-2 Caractérisations biopharmaceutiques .....	52
II-9 Devenir des nanomédicaments dans l'organisme .....	56
III- Impacts des propriétés mécaniques des nanoparticules sur les mécanismes biologiques .....	62
III-1 Effets de la déformation des NPs sur leur circulation dans le sang .....	64
III-2 Effets de la rigidité des NPs sur leur temps de circulation dans l'organisme et la biodistribution .....	67
III-3 Effets de la rigidité des NPs sur leur pénétration cellulaire et tissulaire .....	70
III-3-1 Simulations informatiques permettant de modéliser l'effet de la rigidité des NPs sur la pénétration cellulaire et tissulaire .....	71
III-3-2 Effet de la composition de la NP .....	75
III-3-3 Effet de la structure de la NP .....	76
III-3-4 Effet combiné de la rigidité et de la composition des NPs .....	76
III-3-5 Effet combiné de la rigidité et de la morphologie des NPs .....	78
III-3-6 Effet combiné de la rigidité et du caractère hydrophobe/hydrophile des NPs .....	80
III-4 Impact des propriétés mécaniques sur la toxicité des NPs .....	82
III-5 Caractérisation des propriétés mécaniques des nanoparticules .....	83
III-6 Caractérisation des interactions des NPs avec les membranes cellulaires .....	87
III-6-1 Caractérisation par la microscopie confocale à balayage laser .....	87
III-6-2 Caractérisation par la cytométrie en flux .....	90
III-6-3 Caractérisation par la QCM-D .....	92
III-6-4 Caractérisation par la titration calorimétrique isotherme .....	93
III-6-5 Caractérisation par la résonance plasmonique de surface .....	95
IV- Modulation des propriétés mécaniques des nanoparticules .....	96
IV-1 Procédés de formulation aboutissant directement à des NPs de propriétés contrôlées .....	97
IV-2 Procédés de formulation permettant de modifier la rigidité de NPs préalablement préparées .....	103
IV-2-1 Influence du type de réticulation des NPs mis en jeu sur leurs propriétés mécaniques .....	104

IV-2-2 Influence du temps de stockage des NPs sur leurs propriétés mécaniques	105
IV-2-3 Influence de la lyophilisation des NPs sur leurs propriétés mécaniques.....	106
IV-2-4 Influence de la température sur des NPs thermo-réactives .....	106
V- Conclusion.....	108
VI- Références bibliographiques .....	109

## Liste des abréviations

ABC	Clairance sanguine accélérée
ADME	Absorption, distribution, métabolisme, élimination
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFM	Microscopie à force atomique
ARN	Acide ribonucléique
Ca	Nombre capillaire
CARPA	Pseudo-allergie liée à l'activation du complément
CGMD	Modélisation moléculaire dynamique à grains
Cryo-MET	Cryo-microscopie électronique à transmission
D <sub>h</sub>	Diamètre hydrodynamique
DL	Taux de charge du nanovecteur en principe actif
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
DMPC	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DOPC	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DPD	Simulation de la dynamique des particules dissipatives
DSC	Calorimétrie différentielle à balayage
E/H/E	Eau dans huile dans eau
EPR	Effet de perméabilité et de rétention accru
FDA	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux
GUV	Vésicule unilamellaire géante
H/E	Huile dans eau
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
ICH	Conseil international d'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain
ITC	Titration calorimétrique isotherme
LP	Libération prolongée
LUV(s)	Vésicule(s) unilamellaire(s) de grande taille
MEB	Microscopie électronique à balayage
MET	Microscopie électronique à transmission
MgCl <sub>2</sub>	Chlorure de magnésium
MLV(s)	Vésicule(s) multilamellaire(s)
NC(s)	Nano-capsule(s)
NP(s)	Nanoparticule(s)

NTA	Analyseur de suivi individuel de particules
PAA	Poly(aminoacide)
PACA	Poly(cyanoacrylate d'alkyle)
PBS	Tampon phosphate salin
PCL	Polycaprolactone
PdI	Indice de polydispersité
PEG	Poly(éthylène glycol)
PLA	Poly lactide
PLA-PEG	Poly lactide – poly(éthylène glycol)
PLG	Polyglycolide
PLGA	Poly(lactide-co-glycolide)
QCM-D	Microbalance à cristal de quartz avec contrôle de la dissipation
$R_h$	Rayon hydrodynamique
RPS	Résonance plasmonique de surface
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique
SLN	Nanoparticule lipidique solide
SLS	Diffusion statique de la lumière
SUV(s)	Vésicule(s) unilamellaire(s) de petite taille
UV	Ultra-violets

## Liste des Figures

<i>Figure 1 : Structure générale d'un nanomédicament.....</i>	<i>8</i>
<i>Figure 2 : Schéma de nanosphères, selon la localisation de la substance active ....</i>	<i>18</i>
<i>Figure 3 : Schéma d'une nanosphère lipidique solide .....</i>	<i>19</i>
<i>Figure 4 : Schéma de nanocapsules selon la localisation de la substance active....</i>	<i>20</i>
<i>Figure 5 : Schéma de liposomes selon la localisation de la substance active.....</i>	<i>21</i>
<i>Figure 6 : Schéma de polymersomes selon la localisation de la substance active... </i>	<i>23</i>
<i>Figure 7 : Schéma d'une micelle et d'une micelle inverse .....</i>	<i>24</i>
<i>Figure 8 : Schéma de la structure générale d'un dendrimère .....</i>	<i>25</i>
<i>Figure 9 : Structure du PLGA (poly(lactide-co-glycolide)).....</i>	<i>28</i>
<i>Figure 10 : Structure des polymères PACA, PAA et PCL respectivement a, b et c..</i>	<i>29</i>
<i>Figure 11 : Principe de l'émulsion-évaporation de solvant.....</i>	<i>31</i>
<i>Figure 12 : Principe de la nanopréciipitation.....</i>	<i>32</i>
<i>Figure 13 : Schéma de la formation de gouttelettes d'émulsions par microfluidique en « flow focusing » (a) ou en « cross flowing » (b).....</i>	<i>33</i>
<i>Figure 14 : Principe de la nanopréciipitation auto-organisée.....</i>	<i>35</i>
<i>Figure 15 : Principe de la nanopréciipitation par électrospray.....</i>	<i>36</i>
<i>Figure 16 : Principe de la nanopréciipitation par "salting out".....</i>	<i>37</i>
<i>Figure 17 : Principe de l'encapsulation de principe actif par polymérisation in situ ..</i>	<i>38</i>
<i>Figure 18 : Schéma du fonctionnement général d'un spray-dryer pour la formulation de NPs.....</i>	<i>40</i>
<i>Figure 19 : Principe de la purification de NPs par ultracentrifugation .....</i>	<i>41</i>
<i>Figure 20 : Principe de la purification de NPs par filtration tangentielle.....</i>	<i>42</i>
<i>Figure 21 : Principe de la purification de NPs par chromatographie d'exclusion stérique .....</i>	<i>43</i>
<i>Figure 22 : Principe de la microscopie électronique à transmission .....</i>	<i>47</i>
<i>Figure 23 : Principe de la diffusion dynamique de la lumière (DLS) .....</i>	<i>49</i>
<i>Figure 24 : Principe de l'analyse de suivi individuel de NPs .....</i>	<i>50</i>
<i>Figure 25 : Profil de libération type représentant l'évolution de la concentration plasmatique d'une substance active en fonction du temps.....</i>	<i>53</i>
<i>Figure 26 : Profil type d'une libération contrôlée d'une substance active .....</i>	<i>54</i>
<i>Figure 27 : Physiologie d'une paroi vasculaire saine et d'une paroi vasculaire sous effet EPR.....</i>	<i>58</i>
<i>Figure 28 : Différentes générations de nanovecteurs .....</i>	<i>60</i>

<i>Figure 29 : Comportement des NPs dans les vaisseaux sanguins en fonction de leurs propriétés mécaniques</i> .....	65
<i>Figure 30 : Simulation moléculaire dynamique représentant le mécanisme d'internalisation cellulaire d'une NP rigide (a) et d'une NP souple (b) (Sun et al. 2015)</i> .....	71
<i>Figure 31 : Principe de la modélisation moléculaire dynamique à grains (CGMD) (Shen, Ye and Li, 2018)</i> .....	72
<i>Figure 32 : Mécanismes d'internalisation des NPs par les cellules</i> .....	74
<i>Figure 33 : Compositions possibles des NPs hybrides</i> .....	75
<i>Figure 34 : Structures possibles des NPs hybrides</i> .....	76
<i>Figure 35 : Mécanismes d'internalisation en fonction de l'élasticité des NPs (Guo et al. 2018)</i> .....	77
<i>Figure 36 : Vitesses d'internalisation théoriques des NPs par la membrane en fonction de leur morphologie et de leur rigidité/élasticité selon L. Chen et al., 2018</i> .....	78
<i>Figure 37 : Vitesses d'internalisation théoriques des NPs par la membrane en fonction de leur morphologie et de leur rigidité/élasticité selon Shen et al., 2019</i> .....	79
<i>Figure 38 : Principe du microscope à force atomique (AFM)</i> .....	83
<i>Figure 39 : Principe de la technique de nano-indentation par AFM</i> .....	84
<i>Figure 40 : Courbes de forces d'approche et de retrait obtenues par AFM</i> .....	85
<i>Figure 41 : Structure d'un GUV</i> .....	87
<i>Figure 42 : Image de la membrane d'un GUV, obtenue en microscopie confocale à balayage laser (Ariola et al. 2006)</i> .....	88
<i>Figure 43 : Schéma d'une NP (en rouge) interagissant avec la membrane d'un GUV (en vert)</i> .....	89
<i>Figure 44 : Principe de la microscopie confocale à balayage laser</i> .....	89
<i>Figure 45 : Principe de la cytométrie en flux</i> .....	91
<i>Figure 46 : Principe de la QCM-D (B.Wang 2011)</i> .....	92
<i>Figure 47 : Principe de la titration calorimétrique isotherme</i> .....	93
<i>Figure 48 : Principe de la résonance plasmonique de surface (RPS)</i> .....	95
<i>Figure 46 : Impact de la concentration en agent réticulant ou en monomère sur la rigidité finale de l'hydrogel (Hui et al. 2019)</i> .....	97
<i>Figure 47 : Impact du degré de réticulation du noyau polymérique et de la quantité d'eau entre le noyau et l'enveloppe lipidique sur la rigidité des NPs (Hui et al. 2019)</i> .....	98

<i>Figure 48 : Impact du type de précurseur utilisé dans la synthèse de la silice et de l'épaisseur de cette couche de silice (Hui et al. 2019).....</i>	<i>99</i>
<i>Figure 49 : Classification des différents types de NPs en fonction de la valeur de leur module d'élasticité .....</i>	<i>100</i>
<i>Figure 50 : Stratégies de modulation de l'élasticité des NPs.....</i>	<i>102</i>
<i>Figure 51 : Principe de la réticulation chimique .....</i>	<i>104</i>
<i>Figure 52 : Principe de la réticulation physique .....</i>	<i>105</i>

## Liste des Tableaux

<i>Tableau 1 : Tableau récapitulatif des principaux avantages et limites des nanomédicaments .....</i>	<i>17</i>
<i>Tableau 2 : Tableau récapitulatif des différentes catégories de nanovecteurs .....</i>	<i>26</i>

## Liste des Équations

<i>Équation 1 : Formules mathématiques du taux de charge (DL) et de l'efficacité d'encapsulation (EE).....</i>	<i>51</i>
<i>Équation 2 : Expression du module d'Young .....</i>	<i>63</i>
<i>Équation 3 : Equation de la loi de Hooke.....</i>	<i>63</i>
<i>Équation 4 : Formule du nombre capillaire (Ca) .....</i>	<i>65</i>
<i>Équation 5 : Équation relative au modèle de Hertz.....</i>	<i>86</i>
<i>Équation 6 : Équation relative au modèle de Sneddon.....</i>	<i>86</i>

## I- Introduction

La formulation de nanovecteurs, est une technique prometteuse développée dès la fin des années 1970, qui permet une nouvelle approche de l'administration des substances actives, en contrôlant leur devenir *in vivo* (pharmacocinétique, biodistribution, interactions avec les cellules, toxicité...). Ces nanovecteurs, éléments de taille nanométrique (1-100 nm généralement), permettent un transport ciblé de la substance active, vers le site à traiter (Vauthier and Couvreur 2008). Les propriétés physico-chimiques des nanovecteurs, ainsi que leur composition, jouent un rôle important dans la nature des interactions biologiques engagées avec les organes, tissus et cellules. Aujourd'hui, nous savons que la morphologie des nanoparticules (NPs), leur taille, ainsi que leurs propriétés de surface, sont particulièrement impliquées dans leurs interactions avec le vivant (Ernsting et al. 2008; Verma and Stellacci 2010). Cependant, il a été récemment démontré que les propriétés mécaniques des nanovecteurs, sont elles aussi responsables de l'activité biologique, et influencent les mécanismes de régulation cellulaire (Anselmo et al. 2015; Banquy et al. 2009; Chen et al. 2018; Ye et al. 2018). Néanmoins, ces propriétés mécaniques ne sont encore que peu souvent caractérisées, et encore moins considérées comme étant un élément primordial à prendre en compte dans le développement d'un nanomédicament.

Les objectifs de ce travail de thèse seront de décrire comment les propriétés mécaniques des nanoparticules peuvent influencer leur devenir *in vivo*, et ainsi prouver que l'efficacité thérapeutique d'un nanomédicament, peut être fortement gouvernée par les caractéristiques mécaniques de sa structure.

Ce manuscrit suivra un plan en trois grandes parties : une première partie sur les nanomédicaments en général, une deuxième partie sur l'impact des propriétés mécaniques des nanoparticules sur les mécanismes biologiques, et une troisième partie sur la modulation de ces propriétés mécaniques. Ce manuscrit s'achèvera avec une conclusion, ainsi que la liste des références bibliographiques mentionnées.

## II- Généralités sur les nanomédicaments

### II-1 Définition

Les nanomédicaments sont définis comme étant composés d'une substance active et d'un vecteur à l'échelle nanométrique ( $10^{-9}$  m), appelé nanotechnologie, qui va transporter ce principe actif vers une zone cible (récepteur, cellule, organe...). Les nanomédicaments sont constitués, entre autres, d'un ou plusieurs nanomatériaux. Or, ces nanomatériaux répondent à des normes fixées par la Commission Européenne, qui définit les nanomatériaux de la manière suivante (Fattal and Hillaireau 2020) :

« Un nanomatériau est un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres ou sous forme d'agrégat ou encore sous forme d'agglomérat, dont au moins 50% des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 et 100 nm ».

La norme ISO TS 80004-1, définit les nanomatériaux de manière plus large que la Commission Européenne : « Un nanomatériau est un matériau dont au moins une dimension externe est à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire comprise approximativement entre 1 et 100 nm, ou qui possède une structure interne ou de surface à l'échelle nanométrique ».

Le terme de nanotechnologies est défini de manière plus large, comme étant une technologie qui permettrait le contrôle, la manipulation, l'étude et la fabrication de structures et de dispositifs de taille nanométrique.

D'une manière générale, un nanomédicament est composé d'une matrice (solide) ou d'un réservoir (liquide), contenant notamment la substance active. Il est possible de trouver dans la littérature des structures de type « cœur - couronne » pour décrire la structure générale des nanomédicaments (Fattal 2019; Vauthier and Couvreur 2008), mais ce type de structure n'étant pas systématiquement vérifié pour tous les nanomédicaments, nous avons préféré donner une structure type plus universelle. La structure générale d'un nanomédicament est présentée en Figure 1.

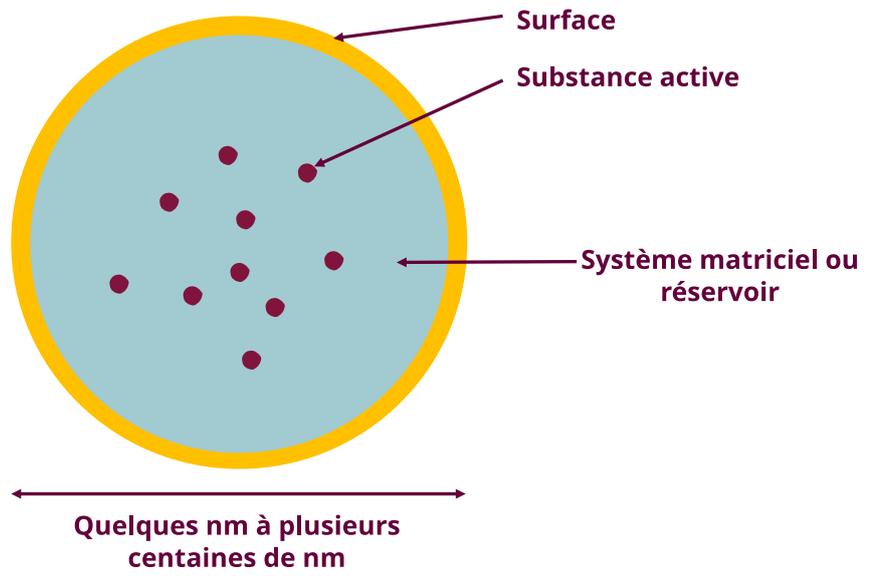


Figure 1 : Structure générale d'un nanomédicament

## II-2 Apports de l'échelle nanométrique

Les nanovecteurs ont généralement une taille de l'ordre de quelques nanomètres, à plusieurs centaines de nanomètres. Leur taille va grandement influencer leur devenir dans l'organisme, mais aura aussi un impact sur le procédé de formulation qu'elles impliqueront.

Des nanovecteurs de taille inférieure à 5-10 nm, pourront être éliminés dans les urines, car ils sont capables de traverser l'endothélium rénal (Boudier, Pallota, and Clarot 2020; Poon et al. 2019). Ces nanovecteurs n'auront donc pas nécessairement besoin d'être constitués de matériaux biodégradables, c'est-à-dire que l'organisme ne sera pas en mesure, grâce à ses enzymes, macrophages etc..., de dégrader le nanovecteur.

En revanche, en ce qui concerne les nanovecteurs de taille supérieure à 5-10 nm, ils devront obligatoirement être formulés avec un matériau biodégradable, car, ne pouvant pas passer à travers l'endothélium rénal ni être excrétés dans la bile par transcytose, leur seule manière d'être éliminés sera la dégradation par l'organisme (Du, Yu, and Zheng 2018; Frédéric Lagarce 2014).

Comme mentionné précédemment, la taille nanométrique de ces particules permet un ciblage des cellules malades. Le principal inconvénient de certains principes actifs, notamment des anti-cancéreux, est qu'ils sont toxiques, non seulement pour les cellules tumorales, mais aussi pour les cellules saines, ce qui induit une forte toxicité générale. Le fait que les nanovecteurs soient capables de se distribuer aux cellules malades, en évitant les cellules saines, permet de réduire considérablement la toxicité et donc les effets secondaires. Cela a été démontré notamment dans le cas de la doxorubicine, qui une fois formulée sous forme liposomale, avait des effets toxiques myocardiques réduits (Giodini et al. 2017), ou dans le cas du paclitaxel, qui avait une toxicité neurologique et néphrologique moindre sous forme de NP liée à l'albumine (Bernabeu et al. 2017; Giodini et al. 2017).

Les nanovecteurs, de par leur taille nanométrique, possèdent un rapport surface / volume élevé, ce qui leur confère des propriétés particulières, comme par exemple une capacité d'encapsulation de molécules actives importante.

Ils auront également la capacité de franchir des barrières biologiques, jusqu'alors infranchissables par les substances actives seules, non formulées sous forme de nanomédicament. Effectivement, les nanovecteurs sont potentiellement capables de traverser la barrière cutanée, mais aussi la barrière hémato-encéphalique, intestinale, foeto-placentaire etc... ce qui risquerait de poser, par la suite, des problèmes de dissémination et de toxicité systémique...(De Jong and Borm 2008; Teng et al. 2021).

### II-3 Applications actuelles et futures des nanotechnologies

Dès le début des années 1980, la nanomédecine a commencé à se développer et est très vite devenue une science prometteuse. De nombreux nanomédicaments sont actuellement en cours de développement et sont entrés en essai clinique. Les applications des nanomédicaments sont multiples, et parmi elles, les plus développées concernent un grand nombre de domaines :

- L'administration orale de protéines et de peptides (McClements 2018; Sadeghi et al. 2020)
- L'administration parentérale (Joshi and Müller 2009; Wissing, Kayser, and Müller 2004)
- L'administration par voie orale (L.Ensign, A.Date, and J.Hanes 2017; O.Farokhzad, E.Pridgen, and F.Alexis 2016)
- L'administration de médicaments intracérébrale (Dong 2018; Kaur et al. 2008)
- L'administration ophtalmique (Janagam, Wu, and Lowe 2016; Qamar et al. 2019)
- Les formulations topiques (Garcês et al. 2018; Goyal et al. 2016; Gupta, Agrawal, and Vyas 2012)
- Les applications diagnostiques et théranostiques (Azzazy and Mansour 2009; Chen, Ehlerding, and Cai 2014)
- Les applications cosmétiques (Ahmad et al. 2018; Khezri, Saeedi, and Maleki Dizaj 2018)
- L'administration de gènes (Ditto, Shah, and Yun 2009; Kafshdooz et al. 2016)
- L'administration nasale (Csaba, Garcia-Fuentes, and Alonso 2009; Cunha et al. 2017; Shim and Yoo 2020)
- L'administration pulmonaire (Kaur et al. 2012; Mangal et al. 2017; Mansour, Rhee, and Wu 2009)
- L'imagerie biomédicale (Han et al. 2019; Sheng et al. 2014)
- L'administration de vaccins (Facciola et al. 2019; kheirollahpour et al. 2019; Zhao et al. 2014)

Depuis l'approbation du Doxil (suspension liposomale de doxorubicine) par la FDA (Food and Drug Administration) en 1995 (Barenholz 2012), médicament qui a été le 1<sup>er</sup> nanomédicament mis sur le marché, des NPs de fer et de dextrane, ou d'autres nanomédicaments comme l'Abraxane (suspension colloïdale de paclitaxel lié à l'albumine) ont été mis sur le marché (Zhong et al. 2018).

Les nanotechnologies ont, dès leur découverte, suscité un vif intérêt dans le traitement du cancer. Depuis, elles n'ont cessé de se développer pour mettre au point des outils thérapeutiques, mais aussi de diagnostic du cancer.

Les applications des nanotechnologies ne se limitent pas simplement au traitement du cancer, elles s'élargissent aux domaines des infections (bactériennes, virales, fongiques ou parasitaires), des maladies auto-immunes, des troubles métaboliques, des maladies cardio-vasculaires, ou encore des pathologies d'ordre neuro-dégénératif (Vauthier and Couvreur 2008; Yetisgin et al. 2020).

De nombreuses stratégies de modification des propriétés physico-chimiques des nanomédicaments sont envisageables, en induisant par exemple des modifications de la taille, de la morphologie, de la composition, des propriétés mécaniques etc..., ce qui les rend, en partie, très attrayants, et donne de grands espoirs quant aux applications futures.

À l'heure actuelle, une multitude d'essais sont en cours, sur des techniques innovantes mettant en jeu des nanotechnologies activées par des stimuli externes, telles que la thérapie photothermique, photodynamique ou photoacoustique, la thérapie thermo-chimique, la thérapie ultrasonore etc... (Jaques et al. 2014; Khafaji et al. 2019; Kim and Lee 2018; Liu et al. 2019).

De nombreux espoirs reposent sur le développement de ce nouveau moyen d'administration des principes actifs, notamment dans les domaines des vaccins ou de l'inflammation (Danhier et al. 2012). De plus, le développement de ces nanotechnologies est très rapide, ce qui augure d'un essor de celles-ci dans les années à venir, pour de multiples applications.

## II-4 Atouts et limites des nanomédicaments

### *II-4-1 Atouts des nanomédicaments*

Les nanomédicaments possèdent de nombreux atouts qui les rendent prometteurs et très attractifs. Parmi leurs atouts les plus attrayants, nous pouvons citer :

- La capacité des NPs à augmenter la solubilité de principes actifs peu solubles (Da Silva et al. 2020)
- Leur aptitude à augmenter la stabilité de molécules sensibles, qui, sous forme libre, seraient dégradées immédiatement et donc inactives *in vivo* (McClements 2018)
- Leur propension à augmenter ou contrôler la biodisponibilité, la pharmacocinétique, la biodistribution et/ou le métabolisme de certaines molécules (Pathak and Raghuvanshi 2015)
- Leur tendance à augmenter l'index thérapeutique d'un principe actif, c'est-à-dire en améliorant l'efficacité de la molécule active et/ou en réduisant sa toxicité (Bottini et al. 2014)
- La possibilité de moduler la libération, notamment avec les formes à libération prolongée (LP) (Natarajan et al. 2014)

De plus, comme expliqué précédemment, les nanomédicaments ciblent les cellules, tissus et organes malades, cela va donc engendrer une plus grande spécificité des nanotechnologies par rapport au principe actif non formulé sous forme de nanomédicament.

### *II-4-2 Notions de nanotoxicologie*

Bien que le potentiel des nanomédicaments soit extrêmement engageant, ils ne sont malheureusement pas dénués de tous risques. De par leur essor relativement récent, nous n'avons que peu de recul sur la toxicité des nanotechnologies, et c'est en partie ce qui rend craintives les industries pharmaceutiques, mais aussi la sphère médicale et certains patients, pour commercialiser et utiliser ce nouveau type de formulation.

Pour parler de la toxicité des nanomédicaments, on peut utiliser le terme de « nanotoxicologie », qui est directement relié à la toxicité des nanotechnologies.

Les nanomédicaments, comme tous types de médicaments, peuvent provoquer des réactions allergiques quand ils sont administrés. En fonction du diamètre des nanovecteurs, de leur composition chimique (Lundqvist et al. 2008), et de la nature hydrophobe ou hydrophile de leur surface, combinés à leur grande surface spécifique, cela amène au recrutement plus ou moins important de protéines sériques qui s'adsorbent alors sur les nanovecteurs (Biazar et al. 2011). Un recrutement massif de protéines sériques peut amener à l'activation du système de complément, qui a pour but d'éliminer les éléments étrangers à l'organisme tels que les nanomédicaments. Dans de rares cas, ce mécanisme peut s'emballer et aboutir au syndrome appelé « CARPA », pour « complement activation-related pseudoallergy », soit une pseudo-allergie liée à l'activation du complément (Szebeni and Storm 2015). Les symptômes engendrés peuvent aller jusqu'à des dépressions respiratoires potentiellement graves.

Ce syndrome est à relier avec l'utilisation du PEG (poly(éthylène) glycol), sur des nanovecteurs que l'on appelle donc « pégylés » (Mohamed et al. 2019). Ces nanovecteurs font l'objet de nombreuses recherches grâce à leur propriété d'échappement au système immunitaire, car en effet, ils sont moins reconnus par ce dernier et limitent le phénomène d'opsonisation, qui sera décrit plus précisément en II-9. Cependant, ils n'empêchent pas pour autant totalement la fixation de certaines fractions de la protéine du complément comme les fractions C3a, C3b ou encore C5a (Szebeni 2018). La protéine C3b est impliquée dans la reconnaissance par le système immunitaire ; son activation, suite à la reconnaissance d'un agent étranger à l'organisme, ici une NP pégylée, sera à l'origine d'une réaction inflammatoire. De plus, du fait que le PEG soit présent sur un grand nombre de nanomédicaments sur le marché, il pourrait y avoir un effet dose atteint rapidement par la multiplication des administrations, et déclencher ce syndrome.

Les administrations répétées de nanovecteurs pégylés peuvent également provoquer une clairance rapide de ceux-ci : c'est ce que l'on appelle le phénomène de clairance sanguine accélérée, ou phénomène ABC pour « *accelerated blood clearance* » (Abu Lila, Kiwada, and Ishida 2013; Shiraishi et al. 2013). Dans ce cas, l'organisme est capable de développer des anticorps anti-PEG, ce qui rendra les nanomédicaments pégylés inefficaces, car instantanément reconnus puis éliminés (Kozma et al. 2020; Verhoef et al. 2014).

Néanmoins, il existe maintenant des alternatives à l'utilisation des PEG, qui sont, tout comme ce dernier, des polymères hydrophiles neutres capables de retarder la reconnaissance puis l'élimination du nanovecteur par le système immunitaire. Ces potentielles alternatives aux PEG, peuvent être des polymères synthétiques ou naturels, pouvant se présenter sous forme zwitterionique, c'est-à-dire que ce sont des molécules présentant dans leur structure à la fois une charge positive et une charge négative. Parmi les alternatives aux PEG les plus prometteuses, nous pouvons retrouver : des polyglycérols, des polyaminoacides, des polyacrylamides, de la polyvinylpyrrolidone, ou encore des polyméthacrylates (Thi et al. 2020).

La réponse inflammatoire est donc un type de toxicité à prendre en compte pour les nanomédicaments, mais ça n'est pas la seule.

Les nanomédicaments peuvent également être toxiques pour les gènes. Cette génotoxicité peut s'exprimer de différentes manières (Donaldson, Poland, and Schins 2010; Magdolenova et al. 2014) :

- Par une interaction directe avec les bases de l'ADN provoquant des mutations irréversibles
- Par l'induction de la production de radicaux libres qui viennent ensuite léser l'ADN
- Par le dérèglement du phénomène de séparation des chromosomes lors de la mitose
- Par l'interaction avec des protéines nucléaires impliquées dans les mécanismes de réplication, transcription ou réparation
- Par la perturbation des fonctions de contrôle du cycle cellulaire

Les nanomédicaments peuvent dans certains cas, induire un stress oxydant au niveau des cellules, engendrant une diminution des stocks intracellulaires des molécules anti-oxydantes, une peroxydation des lipides, accompagnée d'une modification de l'homéostasie calcique. À terme, ces modifications peuvent endommager l'ADN, et altérer les voies de signalisation de l'inflammation, pouvant mener à la transformation d'une lignée cellulaire en une lignée cancéreuse (Manke, Wang, and Rojanasakul 2013).

La taille nanométrique des nanomédicaments pose question, et surtout inquiète quant au pouvoir de dissémination des nanovecteurs dans tout l'organisme, et leur accumulation dans les tissus avant de pouvoir être dégradées.

Il est admis que les NPs ne doivent pas dépasser les 200 nm, car au-delà de cette taille, il y a plus de risque qu'elles soient captées et retenues par le foie ou la rate (phénomène appelé rétention hépatosplénique), ce qui, pour cette dernière, favoriserait des réactions immunitaires qui seraient la cause d'une élimination accélérée des NPs lors de la deuxième administration de ces mêmes NPs (Bertrand and Leroux 2012; Frédéric Lagarce 2014). Ce mécanisme, plus connu sous le nom d'effet EPR, signifiant effet de perméabilité et de rétention accru, sera plus largement décrit en II-9.

Par ailleurs, une taille inférieure à 100 nm, couplée à une faible pression interstitielle au niveau des tumeurs, permet aux NPs de traverser l'endothélium fenestré des vaisseaux sanguins irriguant les tumeurs, et donc d'atteindre les cellules cibles tumorales et non pas les cellules saines (Danhier, Feron, and Prétat 2010).

Toutefois, il est compliqué, d'un point de vue procédé de fabrication, de contrôler parfaitement la taille des NPs. En effet, même si la polydispersité est relativement bien contrôlée, la distribution de taille des NPs ne sera jamais parfaitement monodisperse. Seule une distribution de taille, plus ou moins large, sera obtenue. La transposition de l'échelle du laboratoire à l'échelle industrielle de la production de nanomédicaments s'avère donc difficile à mettre en place et n'est encore que peu développée. De plus, des questions de stabilité des nanomédicaments ainsi que de contrôle des impuretés se poseront, en vue de la mise sur le marché.

Les différents procédés de formulation, quels qu'ils soient, aboutissent à la formation de NPs peu chargées en substance active (quelques pourcents seulement). Ce faible taux de charge en substance active par rapport au vecteur, communément appelé DL pour « drug loading », pose question quant à la quantité de nanomédicament, donc de matériau matrice (polymère, lipide...), qui devra être administrée pour atteindre un effet thérapeutique suffisant. Il faudra s'assurer qu'une telle quantité de matériau matrice ne sera pas toxique pour l'organisme. L'équation du DL sera détaillée en II-8-2-2, Équation 1.

Les principaux avantages et limites des nanomédicaments sont récapitulés dans le Tableau 1.

*Tableau 1 : Tableau récapitulatif des principaux avantages et limites des nanomédicaments*

<b>Avantages</b>	<b>Limites</b>
Formulation de principes actifs peu solubles	Effets secondaires : réactions d'hypersensibilité, génotoxicité
Protection de molécules sensibles	Clairance rapide après administrations répétées pour les NPs pégylées
Meilleur ciblage des tumeurs par effet EPR, diminution des effets secondaires	Dissémination et accumulation
Contrôle du devenir <i>in vivo</i>	Production délicate
Augmentation de l'index thérapeutique	Cadre réglementaire complexe
Possibilité de formuler des formes LP	
Ciblage des thérapies	

## II-5 Différentes catégories de nanovecteurs

### II-5-1 Types de nanovecteurs

Plusieurs types de nanovecteurs sont décrits dans la littérature, et même des sous-types de nanovecteurs peuvent apparaître, en fonction de la localisation de la substance active dans leur structure, de leur composition, et de la structure des nanovecteurs.

#### II-5-1-1 Les nanosphères

Les nanosphères sont composées d'une matrice d'excipient (polymère ou lipide) : le principe actif peut être adsorbé sur sa surface ou encapsulé dans la particule (voire les deux). Ces deux options sont représentées en Figure 2.

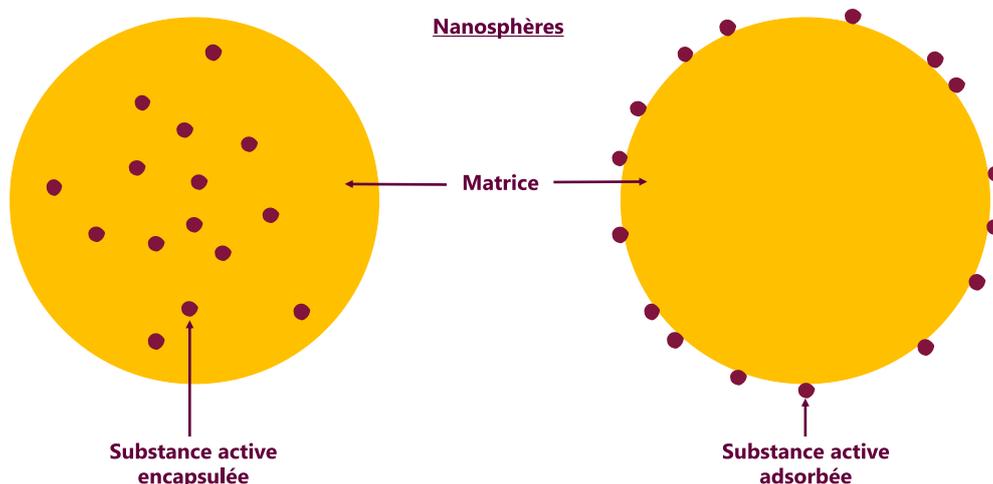
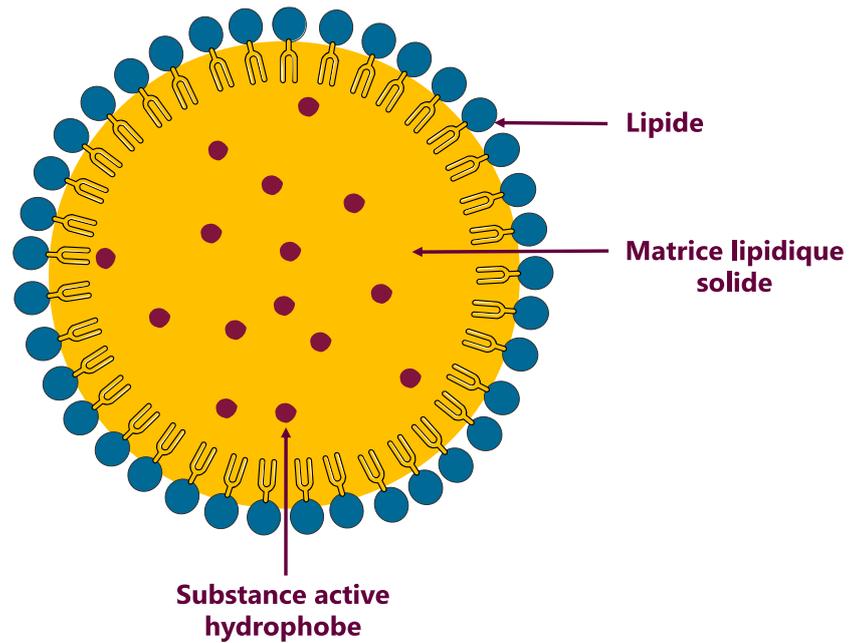


Figure 2 : Schéma de nanosphères, selon la localisation de la substance active

Il est important de noter que si la matrice d'excipient est composée d'un polymère hydrophile, la substance active encapsulée ou adsorbée sera hydrophile. De même, si la matrice d'excipient est composée de lipides, la substance active véhiculée sera hydrophobe.

### *II-5-1-2 Les nanosphères lipidiques solides*

Les nanosphères lipidiques solides ou SLN pour « solid lipid nanoparticles », sont des nanovecteurs composés d'une matrice de lipides sous forme solide. La matrice étant composée de lipides dont les queues sont hydrophobes, les substances actives hydrophobes seront beaucoup mieux encapsulées que des substances actives hydrophiles (Müller, Mäder, and Gohla 2000). La structure type d'un SLN est représentée en Figure 3.



*Figure 3 : Schéma d'une nanosphère lipidique solide*

### II-5-1-3 Les nanocapsules

Les nanocapsules sont des systèmes vésiculaires (structure cœur-enveloppe) dans lesquels le principe actif est contenu dans une cavité constituée d'un noyau interne (liquide le plus souvent, ou gazeux) entouré d'une membrane polymérique ou lipidique : le principe actif peut être solubilisé dans le noyau interne, piégé dans l'enveloppe ou adsorbé à la surface de la capsule (Pinto Reis et al. 2006). La Figure 4 représente des nanocapsules où la substance active est localisée à différents endroits.

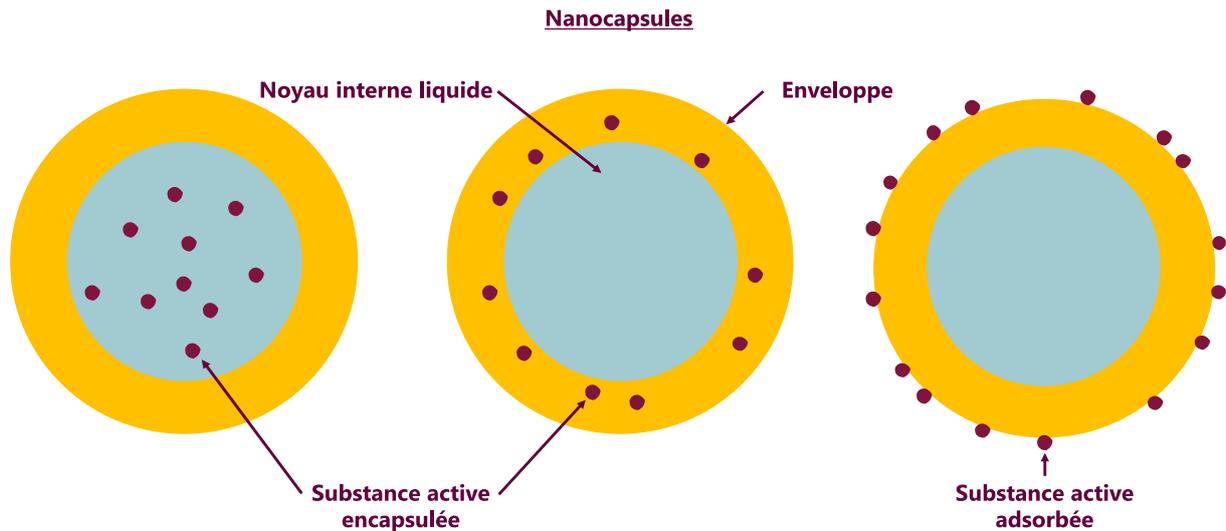


Figure 4 : Schéma de nanocapsules selon la localisation de la substance active

#### II-5-1-4 Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules sphériques composées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques, et plus particulièrement de phospholipides. Le liposome peut à la fois porter des principes actifs hydrophiles et hydrophobes, selon l'endroit où celui-ci est situé, respectivement dans le noyau aqueux ou dans la bicouche lipidique. Ces deux options sont représentées en Figure 5.

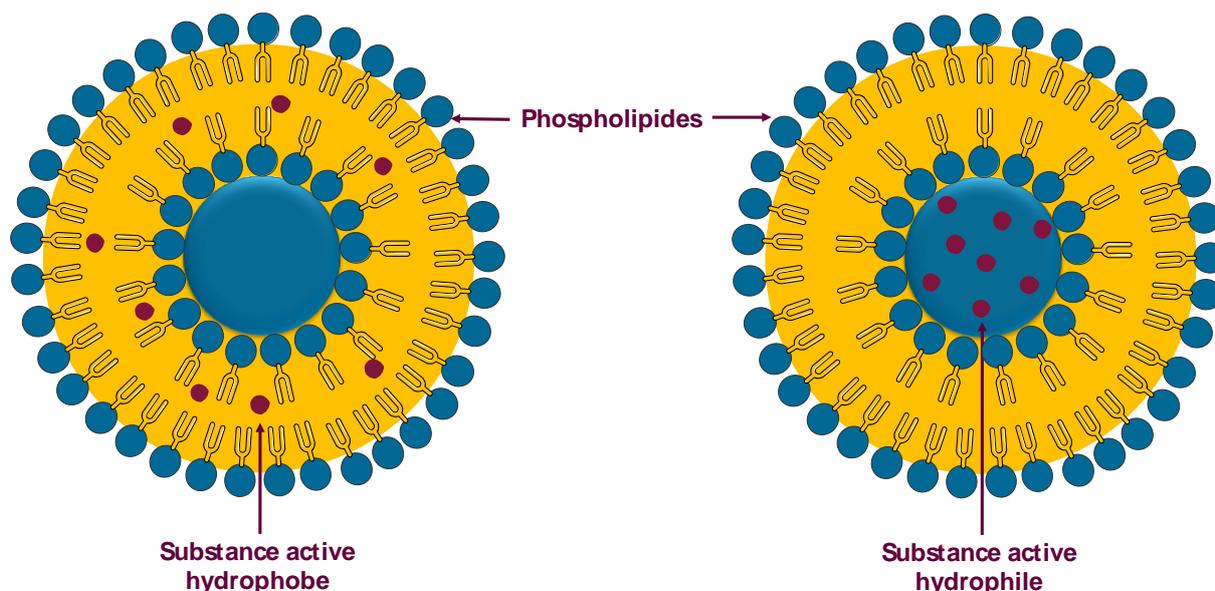


Figure 5 : Schéma de liposomes selon la localisation de la substance active

Il existe différentes catégories de liposomes, en fonction de leur taille, ainsi que du nombre de bicouches lipidiques qui les composent (Woodle and Papahadjopoulos 1989).

Les plus petits liposomes, composés d'une seule bicouche de phospholipides, sont appelés SUVs pour « small unilamellar vesicles », pour vésicules unilamellaires de petite taille. Ils ont une taille inférieure à 100 nm.

Les LUVs, pour « large unilamellar vesicles », signifiant vésicules unilamellaires de grande taille, sont composés d'une bicouche phospholipidique et ont une taille comprise entre 100 et 1000 nm.

Quand les liposomes ont un diamètre de plus d'1  $\mu\text{m}$ , on parle alors de GUVs, pour « giant unilamellar vesicles », voulant dire vésicules unilamellaires géantes, avec elles aussi seulement une bicouche de phospholipides.

Enfin, il existe une catégorie de liposomes particuliers que l'on appelle MLVs pour « multilamellar vesicles », qui sont des vésicules multilamellaires, c'est-à-dire composées de plusieurs bicouches de phospholipides, et qui peuvent avoir, selon le nombre de bicouches qu'elles contiennent, une taille comprise entre 100 et 1000 nm pour les MLVs composées de deux bicouches, et une taille supérieure à 1  $\mu\text{m}$  pour les MLVs composées de trois bicouches ou plus.

### II-5-1-5 Les polymersomes

Les polymersomes ont une structure similaire à celle des liposomes. En revanche, les phospholipides sont remplacés par des copolymères amphiphiles à blocs, c'est-à-dire que deux polymères sont assemblés ensemble : un polymère central hydrophobe, et un polymère hydrophile aux extrémités (Discher and Ahmed 2006). Tout comme les liposomes, la substance active, en fonction de son hydrophobie ou hydrophilie, peut être située soit au niveau de la partie hydrophobe, soit dans le cœur hydrophile, respectivement. Ces deux options sont représentées en Figure 6.

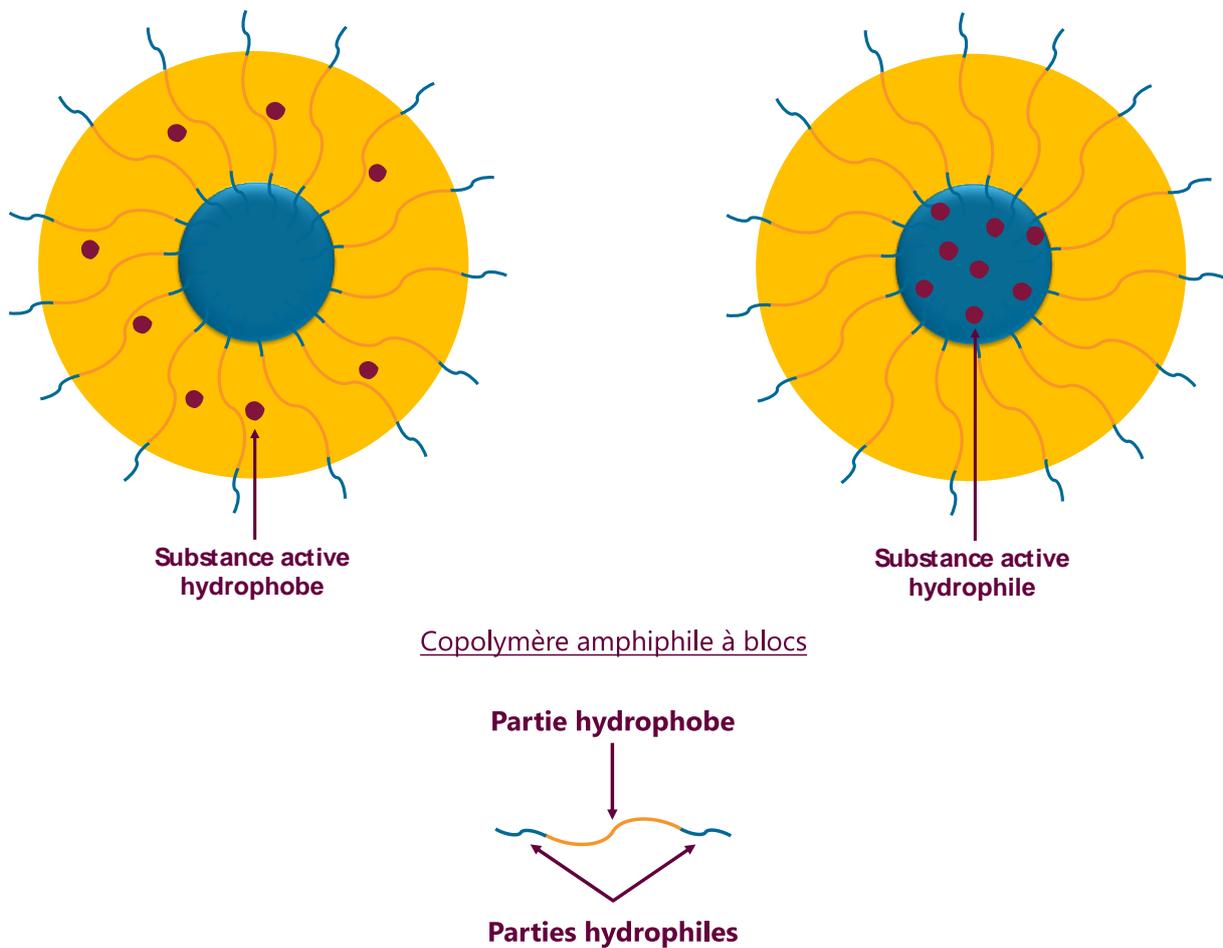


Figure 6 : Schéma de polymersomes selon la localisation de la substance active

### II-5-1-7 Les micelles

Les micelles sont des assemblages organisés de molécules amphiphiles, c'est-à-dire de molécules ayant pour structure une tête polaire hydrophile et une queue apolaire hydrophobe. Cette molécule amphiphile peut être un lipide comme un polymère (Torchilin 2007). Quand les molécules amphiphiles sont ajoutées à une phase aqueuse, leurs queues apolaires se regrouperont et formeront ainsi un cœur hydrophobe, propice à l'encapsulation des substances actives hydrophobes. Quand les molécules amphiphiles sont ajoutées en phase huileuse, ce seront leurs têtes polaires qui se regrouperont, pour former un cœur hydrophile, qui permettra d'encapsuler des substances actives également hydrophiles : on parlera alors de micelle inverse (Walde et al. 1990). Les structures d'une micelle et d'une micelle inverse, sont représentées en Figure 7.

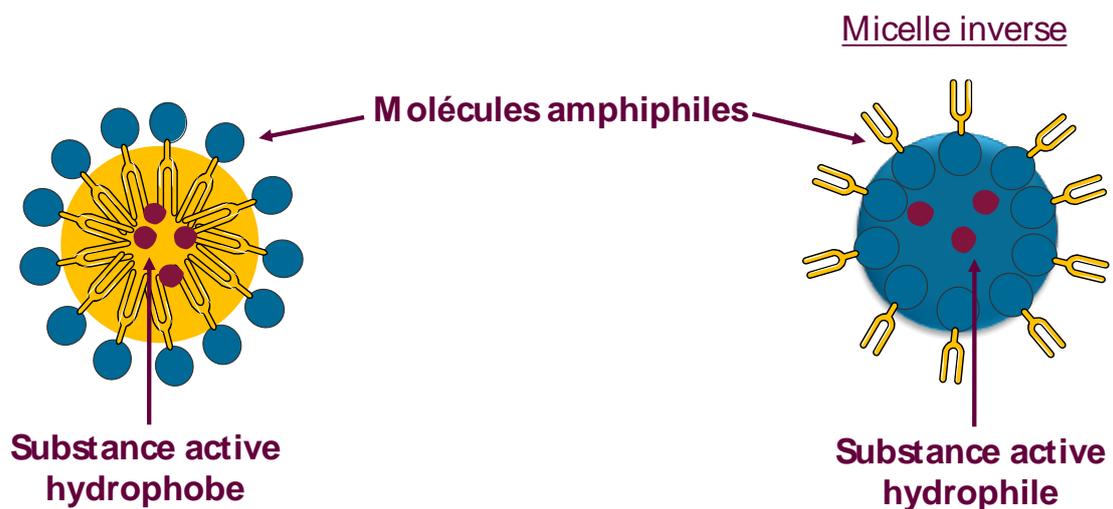


Figure 7 : Schéma d'une micelle et d'une micelle inverse

### II-5-1-6 Les dendrimères

Les dendrimères sont des macromolécules polymériques ramifiées à partir d'un élément central, autour duquel sont branchés de manière arborescente des monomères. Les dendrimères sont caractérisés par trois grandes régions spécifiques que sont : le cœur, les branches dendritiques et la périphérie (Chauhan 2018). La structure générale d'un dendrimère est représentée en Figure 8.

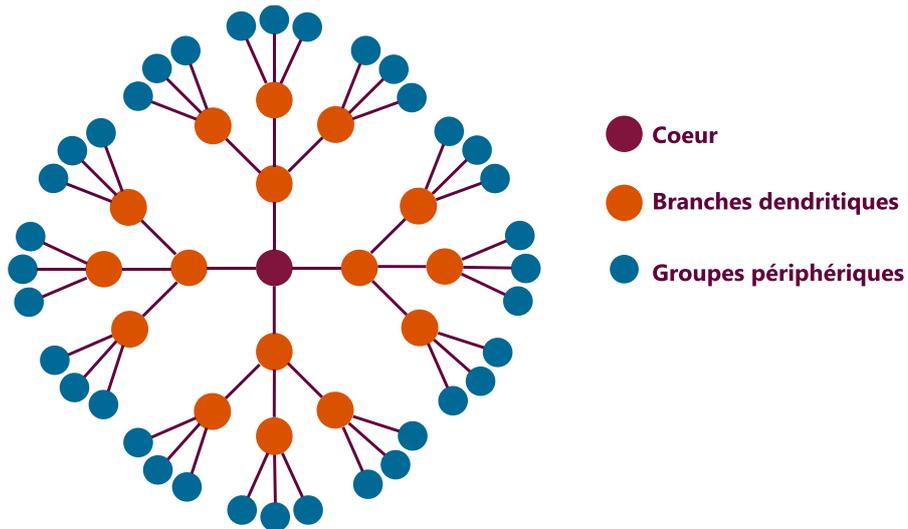


Figure 8 : Schéma de la structure générale d'un dendrimère

*À noter qu'il existe une infinité de types de ramification des dendrimères, et que les ramifications représentées schématiquement ne sont qu'un exemple de branchement possible.*

Toutes ces catégories de nanovecteurs sont résumées dans le Tableau 2, et classées selon leur composition et leur type de système (réservoir ou matriciel).

*Tableau 2 : Tableau récapitulatif des différentes catégories de nanovecteurs*

	<b>Nanovecteurs polymériques</b>	<b>Nanovecteurs lipidiques</b>	<b>Dérivés lipides-polymères</b>
<b>Systèmes matriciels</b>	Nanosphères Dendrimères Micelles Polymersomes	Nanosphères lipidiques solides (SLN) Liposomes Micelles	SLN + PEG Liposome + PEG
<b>Systèmes réservoirs</b>	Nanocapsules polymériques Polymersomes	Nanocapsules lipidiques Liposomes	Nanocapsules lipidiques + PEG Liposome + PEG

Dans ce tableau, nous pouvons remarquer que les nanosphères, les micelles, et les nanocapsules se trouvent à la fois dans la catégorie des nanovecteurs polymériques et des nanovecteurs lipidiques. En effet, les nanosphères, en fonction du matériau qui les composent, peuvent être hydrophiles ou hydrophobes. De même, les micelles peuvent être constituées de polymère ou de lipides, et les nanocapsules peuvent avoir un cœur constitué d'eau ou d'huile. On note également que les liposomes et les polymersomes sont présents à la fois dans les systèmes matriciels et dans les systèmes réservoirs. De fait, si la substance active est située dans le cœur aqueux, ces nanovecteurs sont alors considérés comme un réservoir de substance active. En revanche, si cette dernière est piégée dans les chaînes hydrophobes, on peut alors les considérer comme des systèmes matriciels. La colonne des dérivés lipides-polymères reprend simplement la colonne des nanovecteurs lipidiques, auxquels on a ajouté du PEG, un polymère hydrophile, pour aboutir à des molécules à la fois hydrophiles et hydrophobes.

## *II-5-2 Matériaux les plus utilisés*

On peut classer les types de NPs en fonction du matériau qui les compose, en deux catégories : les NPs composées de matériaux naturellement présents dans l'organisme, et les NPs composées de matériaux non présents nativement dans le corps.

### *II-5-2-1 Matériaux naturellement présents dans l'organisme*

Les matériaux naturellement présents dans l'organisme, utilisables dans la formulation de NPs, peuvent être :

- Les phospholipides
- Les lipides
- Les protéines, telles que l'albumine (Karimi et al. 2016)
- Les saccharides ou polysaccharides, ces derniers étant des polymères naturels, tel que l'acide hyaluronique

Le fait que ces matériaux soient naturellement présents dans l'organisme, fait d'eux des matériaux totalement biocompatibles et biodégradables. Par conséquent, les NPs composées de ces matériaux sont bien tolérées par l'organisme, qui ne les reconnaît pas comme des composés étrangers, et ne provoque pas de réaction d'hypersensibilité ou leur dégradation immédiate.

### *II-5-2-2 Matériaux non présents naturellement dans l'organisme*

Les NPs composées de matériaux non présents naturellement dans l'organisme, quant à elles, regroupent les NPs composées de matériaux d'origine synthétique ou naturelle.

Parmi les matériaux synthétiques, on retrouve en grande majorité les polymères synthétiques, et plus rarement des huiles synthétiques. Les NPs synthétiques possèdent des caractéristiques intéressantes par rapport aux NPs composées de matériaux naturellement présents dans l'organisme, comme une stabilité thermique supérieure, ou la possibilité de modifier leurs surfaces en pouvant y greffer de nombreux composés.

Les matériaux d'origine naturelle sont utilisés en moindres proportions, mais sont de plus en plus étudiés, et permettent la formulation de NPs de métaux comme le fer, l'oxyde de fer, l'or ou l'argent par exemple, mais aussi de NPs de silice naturelle. Les saccharides, ou polysaccharides, polymères d'origine naturelle mais non présents naturellement dans le corps, tels que le chitosane ou l'alginate, sont eux aussi fréquemment utilisés dans la formulation de nanomatériaux.

Parmi les différents nanosystèmes développés, les NPs de polymères synthétiques sont l'un des systèmes les plus prometteurs (El-Say and El-Sawy 2017). Les NPs polymériques sont généralement composées d'un polymère biodégradable et biocompatible, tel que le poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) (Swider et al. 2018), ce qui le rend adapté à toute application médicale. Le PLGA a été approuvé par la FDA en 1989 pour l'autorisation de mise sur le marché du Lupron Depot (Zhong et al. 2018). De nombreuses études ont démontré la sécurité du PLGA et son innocuité en ce qui concerne les applications médicales (Grabowski et al. 2015; Semete et al. 2010).

Parmi les autres polymères (Han et al. 2018), les principaux utilisés en nanomédecine sont le PLA (poly(acide lactique) ou polylactide), et le PGA (poly(acide glycolique) ou polyglycolide), car ils sont biocompatibles et biodégradables.

Un des avantages du PLGA, est que c'est un co-polymère composé de PLA et de PGA, et que l'on peut faire varier le ratio acide lactique / acide glycolique, ce qui aura un impact sur les caractéristiques physico-chimiques du polymère, notamment concernant sa biodégradabilité. En effet, plus le ratio d'acide glycolique est important, plus la NP se dégradera rapidement (Hirenkumar and Steven 2012). La structure du PLGA est illustrée dans la Figure 9.

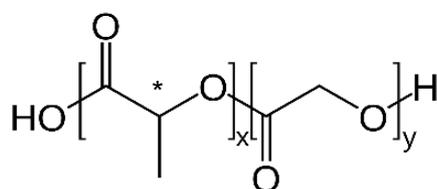


Figure 9 : Structure du PLGA (poly(lactide-co-glycolide))

*x* représente le nombre d'unités d'acide lactique  
*y* représente le nombre d'unité d'acide glycolique

La structure du PLGA comporte un carbone asymétrique (indiqué par \* sur la Figure 9) sur la partie de l'acide lactique, ce qui rend la molécule chirale et permet la formation de deux énantiomères :

- Le D- acide lactique, pour acide lactique dextrogyre
- Le L- acide lactique, pour acide lactique lévogyre

Généralement, les formes D et L se retrouvent en proportion égale dans la molécule de PLGA, mais si cette proportion varie, on peut supposer qu'il pourrait y avoir un impact sur les propriétés physico-chimiques du PLGA.

D'autres polymères tels que le PACA (poly(cyanoacrylate d'alkyle)), représenté en Figure 10 a), le PAA (poly(aminoacide)), représenté en Figure 10 b), ou la PCL (polycaprolactone), représentée en Figure 10 c), pourraient être utilisés comme matériaux pour la fabrication des NPs (Vauthier, Labarre, and Ponchel 2007). Pour être utilisés en nanomédecine, les polymères doivent répondre à différents critères. Ils doivent être biodégradables, être biologiquement dégradés et éliminés pour éviter leur accumulation et permettre ainsi une ré-administration sans risque de surdosage, ils doivent être non toxiques et non immunogènes (Vauthier and Bouchemal 2009).

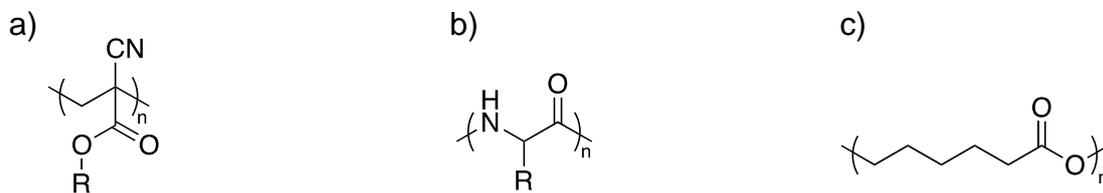


Figure 10 : Structure des polymères PACA, PAA et PCL respectivement a, b et c

Les polymères étant des matériaux extrêmement utilisés pour le développement de nanosystèmes d'administration de principes actifs, et dont les propriétés mécaniques seront aisément modifiables, nous allons, dans ce manuscrit, nous focaliser sur les nanoparticules polymériques.

## II-6 Procédés de formulation des NPs polymériques

Il existe deux techniques principales pour fabriquer des nanoparticules polymériques : la nano-précipitation et l'émulsion-évaporation (Pinto Reis et al. 2006; Vauthier and Bouchemal 2009), comme décrit ci-dessous. Ces techniques et leurs dérivés, ainsi que le spray-drying, utilisent des polymères préformés. D'autres techniques de préparation des NPs existent, comme la technique par polymérisation *in situ*, où la polymérisation se fait pendant la formation des NPs et ne requiert pas de polymère préalablement formé (Pinto Reis et al. 2006).

### *II-6-1 L'émulsion-évaporation de solvant*

La technique d'émulsion-évaporation de solvant est basée sur la formation d'une émulsion composée d'une phase organique contenant le polymère, et d'une phase aqueuse contenant un agent tensioactif ou un stabilisateur. L'émulsion alors obtenue est une émulsion directe de type huile dans eau (H/E). Le principe actif, en fonction de sa solubilité, peut être introduit soit dans la phase organique s'il est hydrophobe, soit dans la phase aqueuse s'il est hydrosoluble, mais ce cas de figure nécessite la formation d'une double émulsion eau dans huile dans eau (E/H/E). Le plus souvent, le principe actif est incorporé dans la phase organique, pour assurer un piégeage maximal, et donc maximiser la charge médicamenteuse de la nanosuspension. Les deux phases sont émulsionnées selon des procédés mécaniques (mélange à haut cisaillement) ou des procédés à haute énergie (ultrasons), suivis d'une étape d'évaporation de la phase organique. Lors de l'évaporation du solvant, le polymère dissout dans la phase organique précipite, encapsulant ainsi le principe actif, et forme une nanosuspension dans la phase aqueuse (G. Nava-Arzaluz et al. 2012; Vauthier, C.; Ponchel 2016). Majoritairement, ce sont des nanosphères qui sont produites par cette technique. La technique d'émulsion-évaporation de solvant est décrite dans la Figure 11.

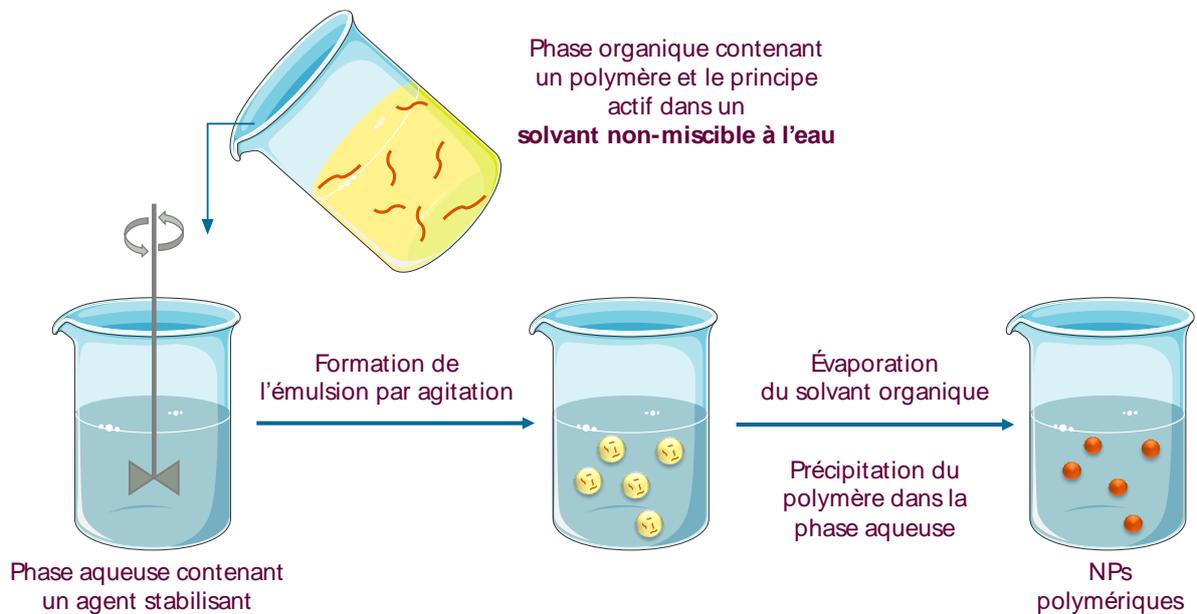


Figure 11 : Principe de l'émulsion-évaporation de solvant

Une fois les NPs en suspension dans la phase aqueuse, elles doivent être purifiées. Les techniques de purification des NPs sont représentées dans la partie II-7.

#### II-6-2 La nanoprécipitation

En ce qui concerne le processus de nano-précipitation, contrairement à la méthode d'émulsion-évaporation de solvant, la phase organique est miscible avec la phase aqueuse. Lorsque la solution de polymère est ajoutée au non-solvant, une désolvation rapide du polymère se produit, et provoque sa précipitation, conduisant à la formation des particules (Martínez Rivas et al. 2017), comme le montre la Figure 12. L'ajout de la phase organique à la phase aqueuse doit être effectué dans des conditions d'agitation (Salatin et al. 2017). Cette technique est moins complexe et moins consommatrice d'énergie que la méthode d'évaporation par émulsion-solvant, et largement applicable. Il est possible d'obtenir des nanosphères ou des nanocapsules par cette technique.

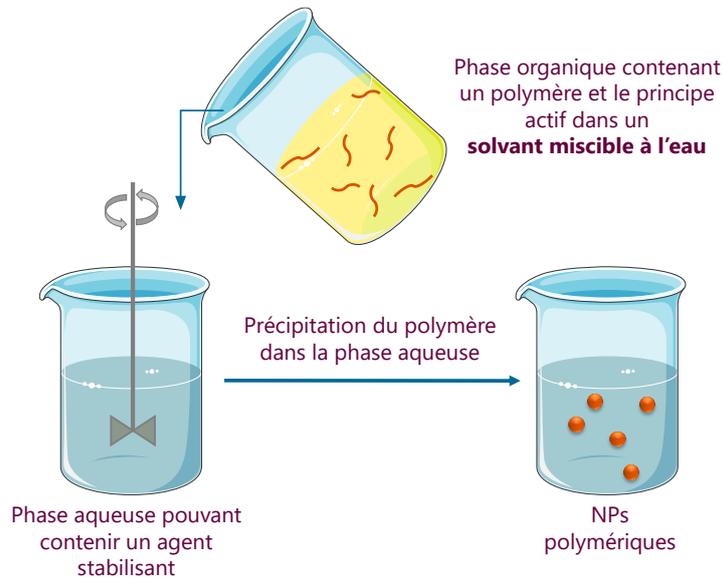


Figure 12 : Principe de la nanoprecipitation

L'un des inconvénients des deux techniques que nous venons de décrire, est que les caractéristiques des NPs obtenues sont très dépendantes des conditions de manipulations, donc manipulateur-dépendant, et par conséquent assez peu reproductibles.

Il existe des méthodes dérivées de la nanoprecipitation ou de l'émulsion-évaporation de solvant, qui permettent de gagner en homogénéité et de s'abroger des conditions de manipulation.

### *II-6-3 Méthodes dérivées de l'émulsion-évaporation de solvant ou de la nanoprecipitation*

Il existe des méthodes de préparation des NPs polymériques, dérivées des méthodes conventionnelles que nous venons de décrire, qui ont été mises au point afin d'optimiser ces méthodes traditionnelles.

#### II-6-3-1 Méthode dérivée de l'émulsion-évaporation de solvant

La microfluidique est une des meilleures méthodes pour mélanger de manière homogène la phase organique à la phase aqueuse, à un débit et un rapport volumique spécifiques.

Le principe de la microfluidique peut être appliqué à la technique de formation de NPs par nanoprecipitation ou par émulsion-évaporation de solvant. Cette dernière étant la plus couramment utilisée, nous allons la décrire plus en détail.

Le circuit de la puce microfluidique comporte, le plus souvent, deux entrées de phase aqueuse, entourant une entrée de phase organique (Amoyav and Benny 2019). Cette technique, appelée « flow focusing » est représentée en Figure 13 a). Il peut cependant ne comporter que deux entrées, une de phase organique et l'autre de phase aqueuse ; cette technique de « cross flowing » est représentée en Figure 13 b). Les gouttelettes d'émulsion résultant de ce mélange de phase aqueuse (contenant, comme dans la méthode traditionnelle mais en moindre quantité, un agent stabilisant), avec une phase organique (contenant dans la plupart des cas le principe actif à encapsuler, et par exemple un polymère dans un solvant), sont récoltées à la sortie de l'appareil, puis le solvant organique est évaporé. Le polymère, initialement miscible au solvant organique, après l'évaporation de ce dernier, se retrouve en phase aqueuse et précipite, encapsulant le principe actif : la nanoparticule est alors formée (Wang, Wang, and Han 2011).

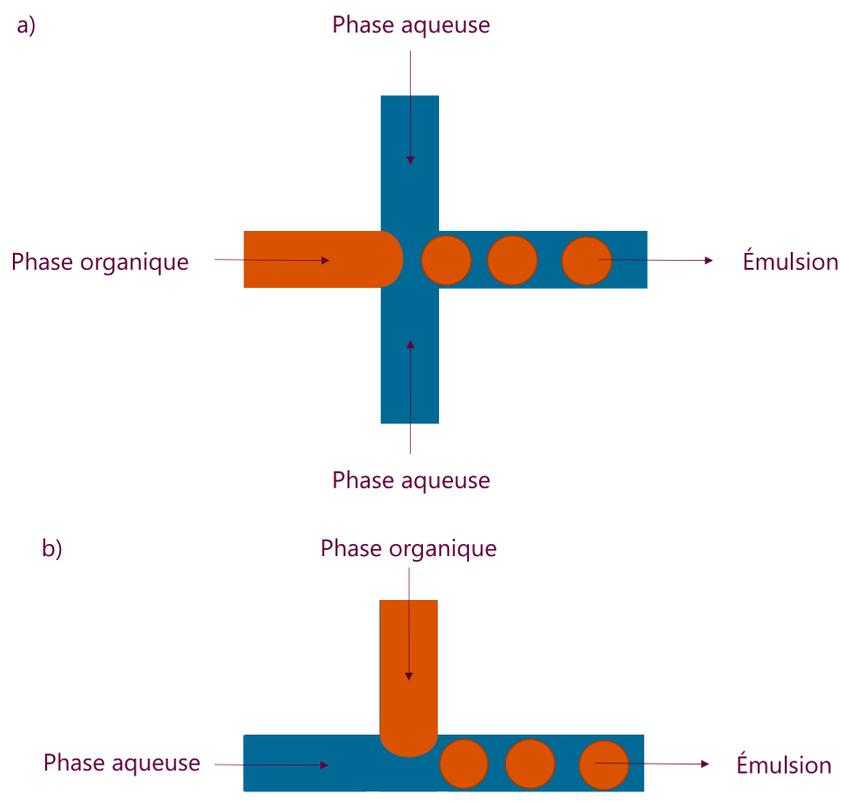


Figure 13 : Schéma de la formation de gouttelettes d'émulsions par microfluidique en « flow focusing » (a) ou en « cross flowing » (b)

Le principe de la microfluidique peut être aussi appliqué à la nanoprécipitation, donc on pourrait également classer cette méthode de préparation des NPs dans les méthodes dérivées de la nanoprécipitation. Néanmoins, la technique de nanoprécipitation en microfluidique est beaucoup moins courante que celle par émulsion-évaporation de solvant.

Concernant la technique par nanoprécipitation en microfluidique, le principe est presque le même que par émulsion-évaporation de solvant, hormis le fait que le solvant organique est miscible à la phase aqueuse (contenant également un agent stabilisant). De ce fait, la phase organique se mélange à la phase aqueuse mais le polymère non soluble dans l'eau précipite directement (pas de formation intermédiaire d'une émulsion), et forme la nanoparticule contenant le principe actif. Cette technique nécessite une puce, contenant le circuit de microfluidique, de structure particulière, de manière à casser le flux de NPs pour gagner en homogénéité (Hamdallah et al. 2020).

Tout comme les méthodes de préparation standards, les NPs ainsi obtenues doivent être purifiées.

Ces deux techniques de formation des NPs sont exactement les mêmes qu'en méthode traditionnelle, seulement le procédé est miniaturisé et est beaucoup moins manipulateur-dépendant, ce qui fait d'elle une méthode très reproductible et moins consommatrice de matières premières.

Au cours de la dernière décennie, cette technique a suscité un intérêt croissant dans le domaine de la fabrication de NPs en raison des nombreux avantages décrits ci-après. L'utilisation de la microfluidique pour la production de NPs améliore la reproductibilité par rapport aux méthodes conventionnelles et la méthode est facilement modulable (Gdowski et al. 2018; Vauthier and Bouchemal 2009). De plus, elle permet une transposition à l'échelle industrielle plus aisée que les méthodes de préparation conventionnelles des NPs, en standardisant les différents paramètres impliqués dans les caractéristiques finales des NPs.

Dans les techniques conventionnelles, la précipitation du polymère est régie par l'inertie et la viscosité entre les phases aqueuse et organique, ce qui entraîne une instabilité et des turbulences. La microfluidique permet de surmonter l'inertie, ce qui rend cette méthode très reproductible. La population de NPs obtenue présente généralement une taille définie, une faible polydispersité, une grande efficacité d'encapsulation du médicament dans un processus de formulation en une seule étape

(Morikawa et al. 2018). Il a été démontré que les plates-formes de microfluidique permettent de diminuer significativement la polydispersité des NPs (De Solorzano et al. 2016). L'utilisation de la microfluidique pour la fabrication des nanosystèmes, améliore le contrôle et la reproductibilité des études précliniques, permettant d'économiser du temps et des ressources, en raison des petits volumes d'échantillons nécessaires à la fabrication.

## II-6-3-2 Méthodes dérivées de la nanoprécipitation

### II-6-3-1-1 La nanoprécipitation auto-organisée

Cette technique de préparation des NPs est retrouvée dans la littérature sous l'acronyme SORP pour « self-organized precipitation », et consiste à d'abord dissoudre un polymère et le principe actif dans un bon solvant, puis ajouter un moins bon solvant pour le polymère mais miscible au premier solvant. Ensuite, le bon solvant s'évapore petit à petit, ce qui fait précipiter le polymère dans l'autre solvant, encapsulant le principe actif. Pour réaliser cette technique, il faut en toute logique, que le bon solvant ait un point d'ébullition plus faible que le moins bon solvant, afin qu'il s'évapore en premier (Liu et al. 2020). Le principe de ce type de dérivé de la technique de nanoprécipitation est représenté en Figure 14.

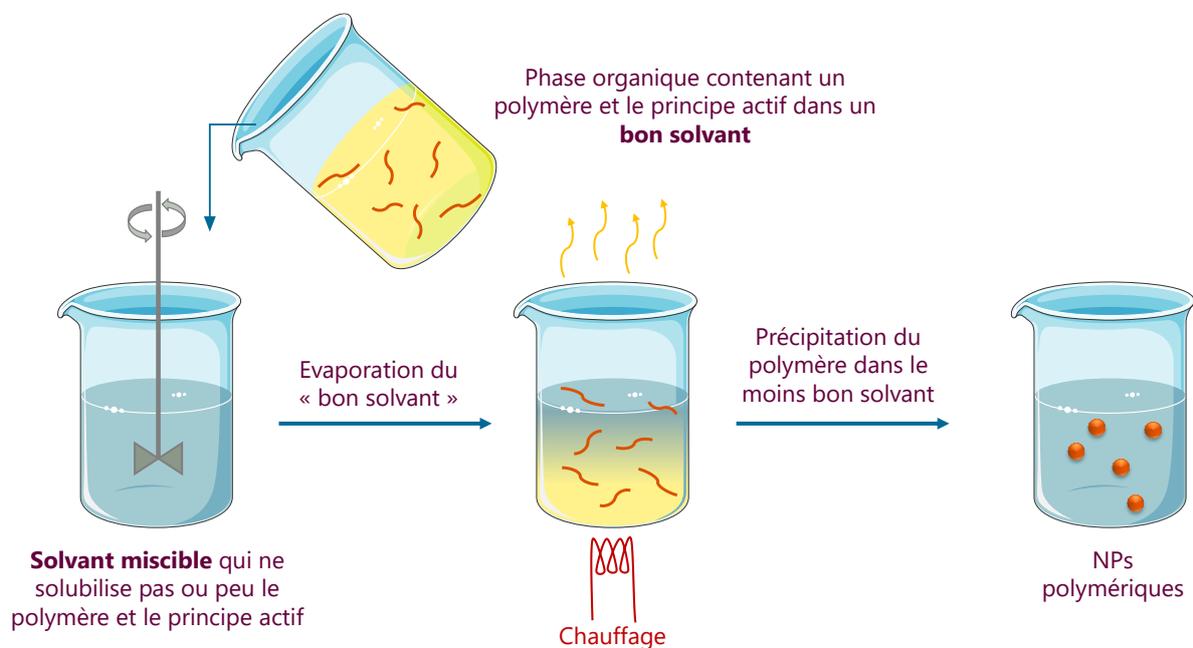


Figure 14 : Principe de la nanoprécipitation auto-organisée

### II-6-3-1-2 La nanoprécipitation par électrospray

La nanoprécipitation par électrospray consiste à nébuliser une solution non miscible à l'eau, contenant le polymère et le principe actif, dont les gouttes sont récoltées dans une phase aqueuse sous agitation. Les gouttelettes de polymère précipitent dans la phase aqueuse, encapsulant le principe actif de manière uniforme car la taille des gouttelettes est contrôlée (Luo et al. 2015). Le principe de ce type de dérivé de la technique de nanoprécipitation est représenté en Figure 15.

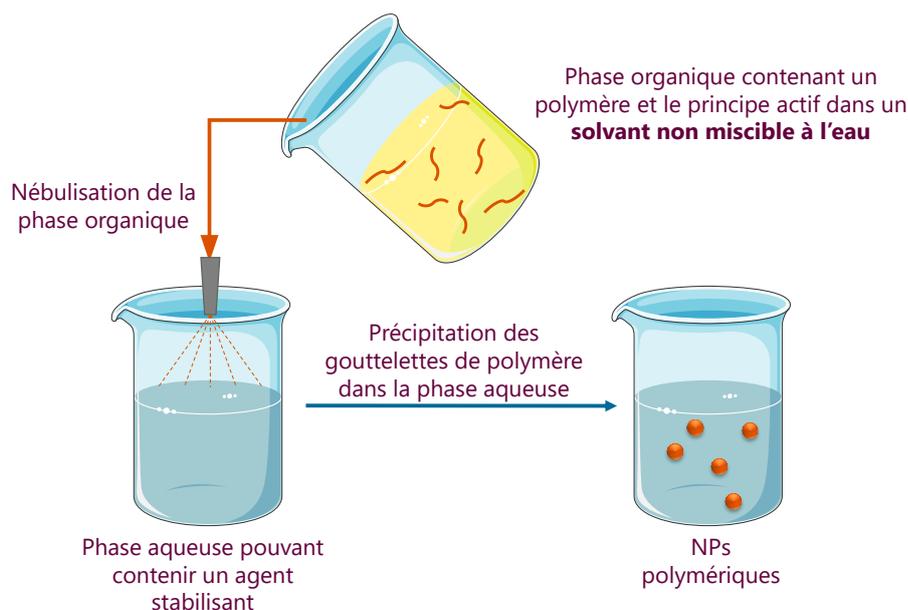


Figure 15 : Principe de la nanoprécipitation par électrospray

### II-6-3-1-3 La nanoprécipitation par « salting-out »

La technique de la nanoprécipitation par « salting out » nécessite une étape préalable de la formation d'une émulsion de type huile dans eau mais avec un solvant organique miscible à la phase aqueuse. Afin que l'émulsion puisse se faire, il faut une très forte agitation, mais surtout que la phase aqueuse soit saturée en électrolytes, dont l'un des plus utilisés est le chlorure de magnésium ( $MgCl_2$ ). Cette forte saturation en électrolytes empêche le solvant organique de diffuser dans l'eau. De l'eau est ensuite ajoutée, afin de diluer l'émulsion, et permettre au solvant organique de diffuser, ce qui aura pour conséquence la précipitation du polymère, et la formation de NPs (Tiruwa 2016). Cette méthode permet la préparation de nanosphères. Le principe de la nanoprécipitation par « salting out » est décrit en Figure 16.

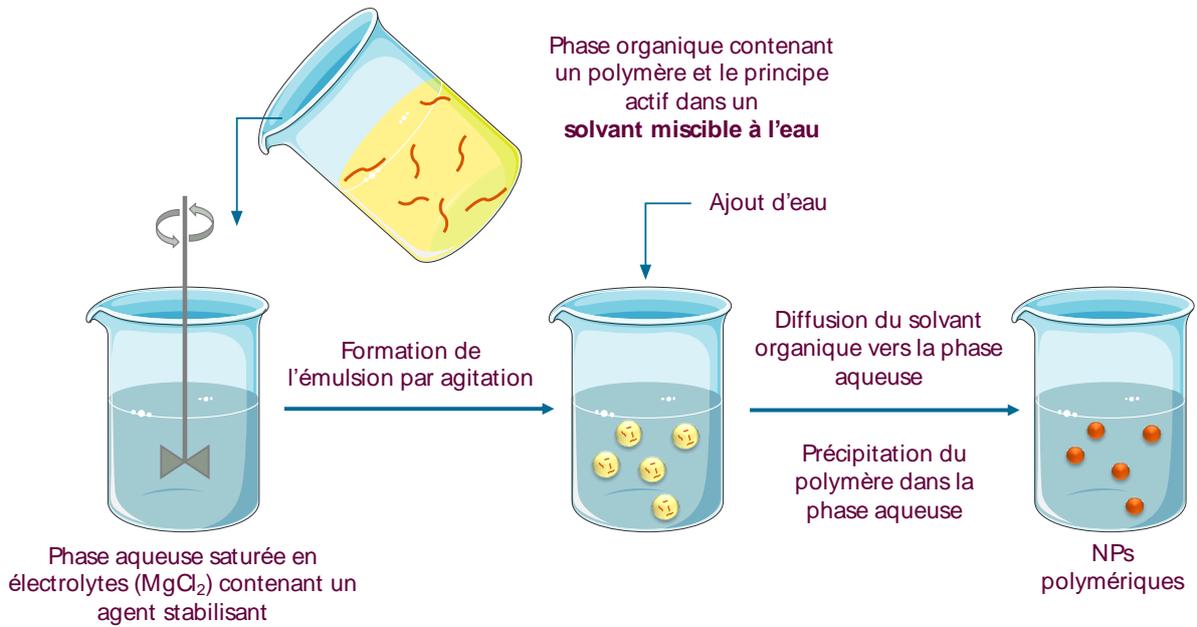


Figure 16 : Principe de la nanopréciipitation par "salting out"

Les méthodes qui viennent d'être décrites sont les principales utilisées, mais il existe énormément d'autres techniques dérivées, qui, pour améliorer l'étape de mélange ou d'évaporation du solvant afin de gagner en homogénéité, peuvent être combinées à des procédés annexes. C'est le cas par exemple de la nanopréciipitation assistée par sonication, qui permet de mieux contrôler l'étape de mélange, ou la nanopréciipitation assistée par la chaleur, pour catalyser l'étape d'évaporation du solvant (Liu et al. 2020).

#### II-6-4 L'encapsulation de principe actif par polymérisation *in situ*

Le procédé d'encapsulation d'un principe actif par polymérisation est notamment utilisé pour la préparation de nanocapsules, dont le cœur peut-être aussi bien aqueux que huileux, mais il permet aussi la formulation de nanosphères. Cette technique consiste tout d'abord à former une dispersion de gouttelettes contenant le principe actif à encapsuler et un solvant, dans un solvant non miscible (une phase aqueuse le plus souvent). Ensuite, des monomères sont introduits dans l'émulsion, puis par un changement du milieu, tel qu'une variation de pH (ajout d'un acide ou d'une base) ou de température, la polymérisation des monomères est initiée : le polymère formé se dépose alors autour des gouttelettes de principe actif pour venir les stabiliser (Vauthier and Bouchemal 2009). Afin de consolider cette enveloppe de polymère, des agents réticulants peuvent être ajoutés. Le principe de la préparation de NPs par polymérisation *in situ* est représenté en Figure 17.



Figure 17 : Principe de l'encapsulation de principe actif par polymérisation *in situ*

### *II-6-5 Le spray-drying*

La préparation de NPs par *spray-drying*, c'est-à-dire par séchage par pulvérisation, est une technique simple, rapide et économique, mais aussi reproductible et transposable à l'échelle industrielle. Cette méthode permet de partir d'une solution contenant un solvant ainsi qu'une matrice (par exemple un polymère), dans lequel est mise en solution ou en suspension une substance active, et d'aboutir à des NPs (généralement des nanosphères) directement séchées (Malamatari et al. 2020). Celle-ci convient parfaitement aux composés sensibles à la chaleur car elle ne nécessite pas de chauffe du principe actif ou des excipients (Arpagaus 2019).

Grâce à cette technique, il est possible d'obtenir une poudre de nanoparticules, de distribution de taille contrôlée et monodisperse, de morphologie et de porosité définies, avec une importante efficacité d'encapsulation (Arpagaus 2019). De plus, il s'agit d'un procédé de formulation en une seule étape, pouvant produire en continu, et qui dépend beaucoup moins de la solubilité du principe actif avec la matrice que les techniques de préparation de NPs vues précédemment. Cette poudre de NPs ainsi obtenue, est particulièrement adaptée à l'administration pulmonaire (Adi et al. 2010; Pilcer, Vanderbilt, and Amighi 2009; Sansone et al. 2009).

Les étapes de préparation de NPs par *spray-dryer* sont les suivantes :

- 1) Chauffage du gaz séchant
- 2) Atomisation de la solution à pulvériser
- 3) Séchage des gouttelettes grâce au gaz
- 4) Séparation des particules selon leur taille et collecte des NPs sèches

Le principe de fonctionnement d'un *spray dryer*, dans le cas de la formulation de NPs est décrit en Figure 18.

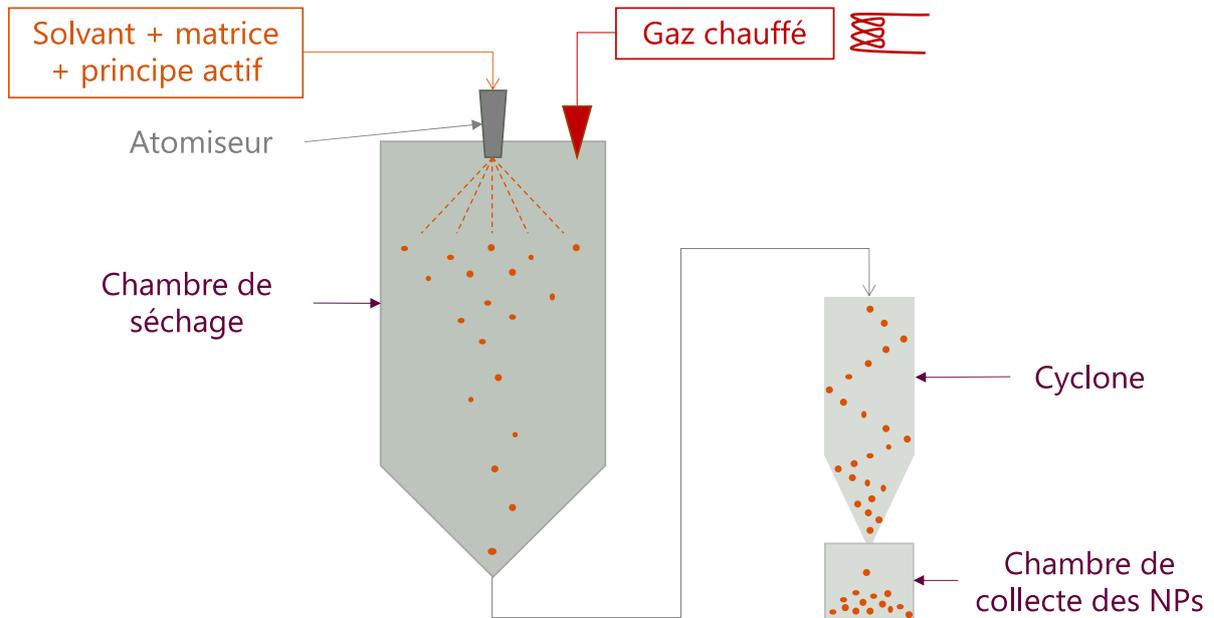


Figure 18 : Schéma du fonctionnement général d'un spray-dryer pour la formulation de NPs

Malgré tous ses atouts, le spray-dryer n'est pas la technique de préparation des NPs la plus simple à mettre en place, et ne permet d'aboutir qu'à la formation de nanosphères et non pas de nanocapsules. De plus, la complexité de cet équipement, sa consommation énergétique mais surtout son coût élevé, peuvent être un frein à son utilisation systématique.

## II-7 Techniques de purification des NPs

Une fois les NPs préparées, elles subiront une étape de purification et d'isolement. En effet, avant d'être mis sur le marché, la pureté des nanovecteurs sera contrôlée. Une étape de purification des NPs s'avère donc indispensable, afin de s'affranchir de toute éventuelle impureté qui pourrait nuire à l'efficacité du nanomédicament et/ou engendrer des effets indésirables. Nous allons détailler ici les méthodes de purification et d'isolement des NPs les plus utilisées.

### II-7-1 Purification des NPs par ultracentrifugation

L'ultracentrifugation est une technique qui permet de séparer les nanovecteurs des impuretés selon leur densité. Le plus souvent, les nanovecteurs se retrouvent projetés dans le fond du tube à essais, et les impuretés, moins denses, restent dans le surnageant qui peut ensuite être prélevé et éliminé, afin de ne garder que les nanovecteurs. Cette technique est spécialement adaptée à la purification de nanovecteurs, car ils ont une densité proche de celle des impuretés, et une simple centrifugation ne permettrait pas une séparation suffisante (Serhan et al. 2019; Xu and Cölfen 2021). L'ultracentrifugation permet d'aller à des vitesses de plus de 15000 rotations par minute, ce qui favorise la sédimentation des nanovecteurs, par rapport aux impuretés. Le principe de la purification des nanovecteurs par cette technique d'ultracentrifugation est représenté en Figure 19.

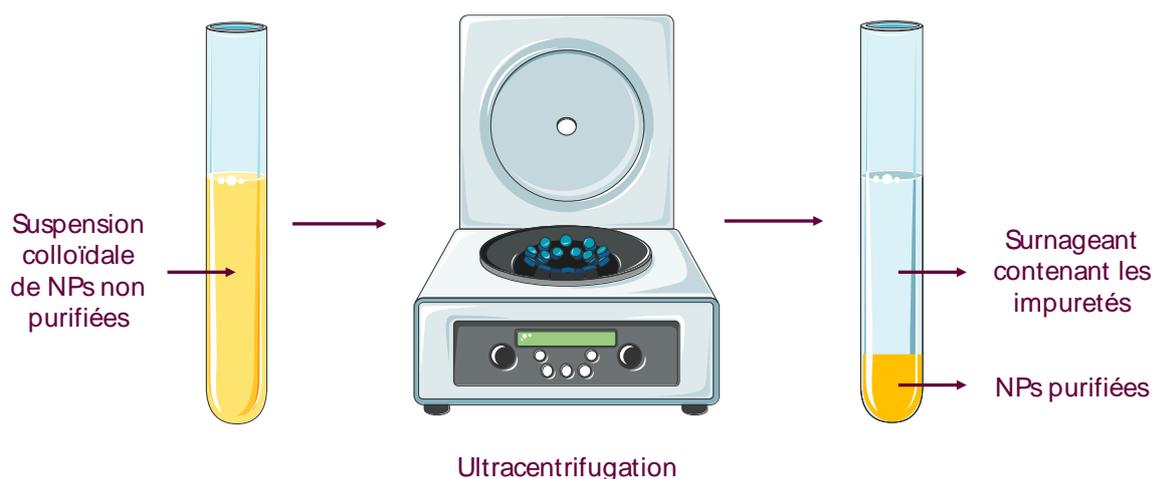


Figure 19 : Principe de la purification de NPs par ultracentrifugation

## II-7-2 Purification des NPs par filtration tangentielle

La filtration tangentielle, quant à elle, permet de séparer les nanovecteurs des impuretés par ségrégation de tailles. Une pression est exercée sur le compartiment contenant l'échantillon de nanovecteurs et les impuretés ; ces impuretés, généralement plus fines que les nanovecteurs, passent à travers la membrane, tandis que les nanovecteurs sont retenus par cette membrane (Serhan et al. 2019; Shah et al. 2020). Le principe de la purification des nanovecteurs par filtration tangentielle est représenté en Figure 20.

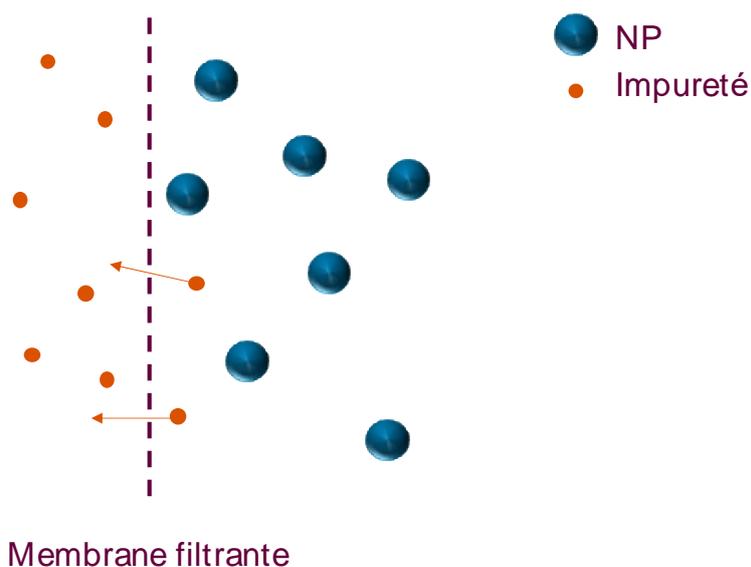


Figure 20 : Principe de la purification de NPs par filtration tangentielle

Une autre technique de purification, pouvant s'apparenter à la technique de filtration, est la dialyse (Sweeney, Woehrle, and Hutchison 2006). Dans ce cas, une membrane sépare un compartiment contenant le milieu composé des nanovecteurs et des impuretés, d'un compartiment accepteur. Par différence de pression osmotique entre les deux compartiments, les impuretés sont attirées dans le compartiment receveur, tandis que les nanovecteurs sont retenus par la membrane et restent dans le compartiment initial.

### II-7-3 Purification des NPs par chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique, communément appelée SEC pour « size exclusion chromatography », est une technique qui met en jeu les différences de volume hydrodynamique entre les nanovecteurs et les impuretés. Les impuretés ont un volume hydrodynamique moins important que les nanovecteurs, elles vont donc passer à travers tous les pores du gel, et mettrons donc plus de temps à traverser la colonne que les nanovecteurs qui passeront directement entre les billes de gel, sans les traverser (Pitkänen and Striegel 2016). Le principe de la purification de nanovecteurs par chromatographie d'exclusion stérique est représenté en Figure 21.

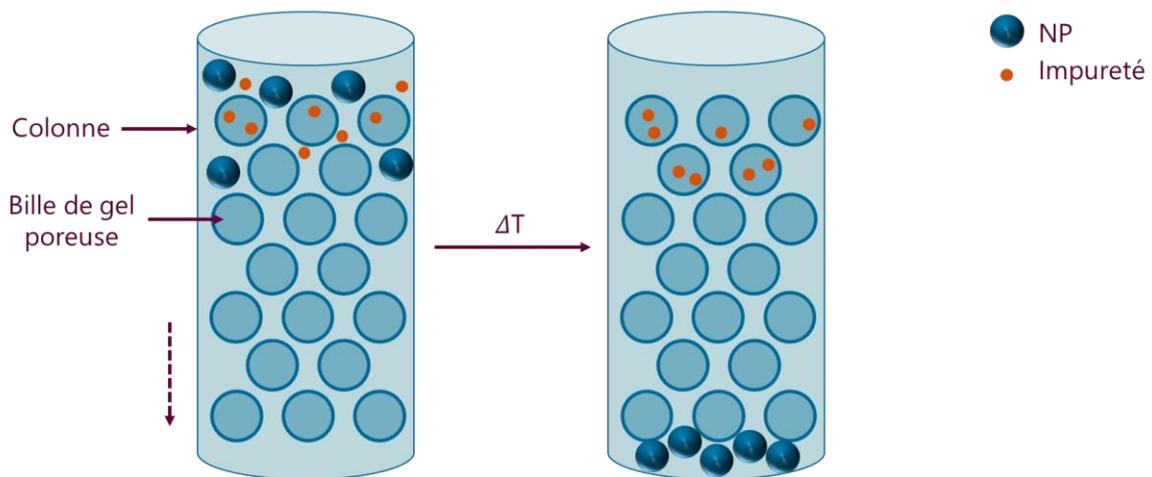


Figure 21 : Principe de la purification de NPs par chromatographie d'exclusion stérique

#### II-7-4 Isolement des NPs purifiées par lyophilisation

Une fois que les NPs ont été purifiées grâce à l'une des différentes méthodes décrites précédemment, elles se trouvent toujours sous forme d'une suspension colloïdale. Or, afin d'enlever toute l'eau ou solvant résiduel, dans le but d'améliorer la stabilité des NPs, une étape de lyophilisation des NPs est nécessaire.

Le principe de la lyophilisation est basé sur la sublimation : après une étape de surgélation, l'échantillon subit un vide poussé, qui, avec une hausse de la température, induit une évaporation de l'eau ou du solvant. L'eau ou le solvant contenu dans l'échantillon passe alors d'un état solide à un état gazeux. L'échantillon est ainsi purifié de son eau ou solvant résiduels, et on récupère le lyophilisat sous forme solide (Abdelwahed et al. 2006).

## II-8 Propriétés des nanovecteurs déterminées après formulation

Avant de pouvoir utiliser un nanomédicament, et *in fine*, envisager sa mise sur le marché, plusieurs caractérisations de cette forme galénique particulière sont nécessaires. Ces caractérisations sont d'ordre physico-chimiques, biopharmaceutiques et pharmacologiques.

### *II-8-1 Méthodes de caractérisation des propriétés physico-chimiques de nanomédicaments*

Concernant les caractéristiques physico-chimiques, en général, on admet que des paramètres clés sont à définir impérativement avant de pouvoir envisager la suite du développement du nanomédicament (Boudier et al. 2020; Vauthier and Couvreur 2008). Ces paramètres à définir sont les suivants :

- La taille ainsi que la distribution de taille
- La morphologie
- La surface spécifique
- La charge de surface
- La chimie de surface
- La composition chimique
- L'état d'agglomération et/ou d'agrégation
- L'état physique de la substance active au sein de la NP
- L'évaluation de la quantité de substance active encapsulée dans les NPs

Les propriétés mécaniques, telles que la rigidité ou encore la déformabilité, ne font pas partie des paramètres à impérativement contrôler avant de développer un nanomédicament, bien qu'il soit recommandé de le faire quand cela est possible (Fattal 2019).

Pour chacun de ses paramètres, il existe différentes méthodes de caractérisation qui pourront leur être appliquées :

- La taille et la distribution de taille pourront être déterminés par différents types de microscopie, mais également par DLS (diffusion dynamique de la lumière), SLS (diffusion statique de la lumière) ou encore par NTA (analyse du suivi individuel des nanoparticules)

- La morphologie des NPs pourra être caractérisée par différents types de microscopie (électronique, à force atomique, etc...) ou par SLS
- La charge de surface sera déterminée par électrophorèse laser Doppler
- La chimie de surface sera déterminée par microscopie électronique ou à force atomique
- La composition chimique des NPs pourra être spécifiée par microscopie, spectroscopie Raman ou encore par spectrométrie photoélectronique X
- L'état d'agglomération et d'agrégation pourront être déterminés en microscopie électronique ou à force atomique
- L'état physique de la substance active au sein de la NP pourra être caractérisée par cristallographie ou par calorimétrie différentielle à balayage (DSC)
- L'évaluation de la quantité de substance active encapsulée dans les NPs pourra être réalisée grâce à des méthodes de dosage, comme par la spectrophotométrie UV-visible ou la chromatographie liquide haute performance

*Seules les méthodes de caractérisations principalement utilisées seront décrites ici.*

Afin de garantir la sécurité et l'efficacité du nanomédicament, les méthodes de caractérisation des nanomédicaments doivent également être évaluées. Chaque méthode d'analyse utilisée pour caractériser chaque paramètre doit être suffisamment précise, c'est-à-dire capable de donner toujours le même résultat ; exacte, autrement dit apte à donner la vraie valeur ; et tout autant robuste, à savoir le moins sensible possible aux variations dues au contexte expérimental.

Les moyens analytiques à disposition des scientifiques pour mesurer la taille, la distribution de taille, la morphologie, la chimie de surface, la composition chimique et l'état d'agglomération et/ou d'agrégation des NPs, sont en général différents types de microscopie très répandus.

Il peut s'agir de la microscopie électronique à transmission (MET), de la microscopie électronique à balayage (MEB), ou de la microscopie à force atomique (AFM) dans la plupart des cas. Bien que la cryo-MET (cryo-microscopie électronique à transmission) soit rarement utilisée, à cause de sa complexité de mise en place, elle

reste la technique de microscopie la plus adaptée à l'analyse d'échantillons liquides (Klang and Matsko 2014).

En effet, les trois types de microscopies précédemment cités nécessitent le séchage des échantillons, c'est-à-dire que les NPs ne se retrouveront pas dans un milieu similaire au milieu biologique, ce qui induira des différences de comportement. Ces différences comportementales se situeront notamment au niveau de l'agglomération ou l'agrégation, mais aussi au niveau de la morphologie des NPs, car les couches d'hydratation et de solvation sont très influentes sur la morphologie. La cryo-MET, quant à elle, permet de figer les NPs dans leur milieu biologique, grâce à une congélation rapide, ce qui ne modifiera pas le comportement des NPs (Stewart 2017).

C'est généralement la MET qui est la plus utilisée, c'est pourquoi nous allons décrire plus en détail son principe de fonctionnement.

Le principe du microscope électronique à transmission est représenté en Figure 22.

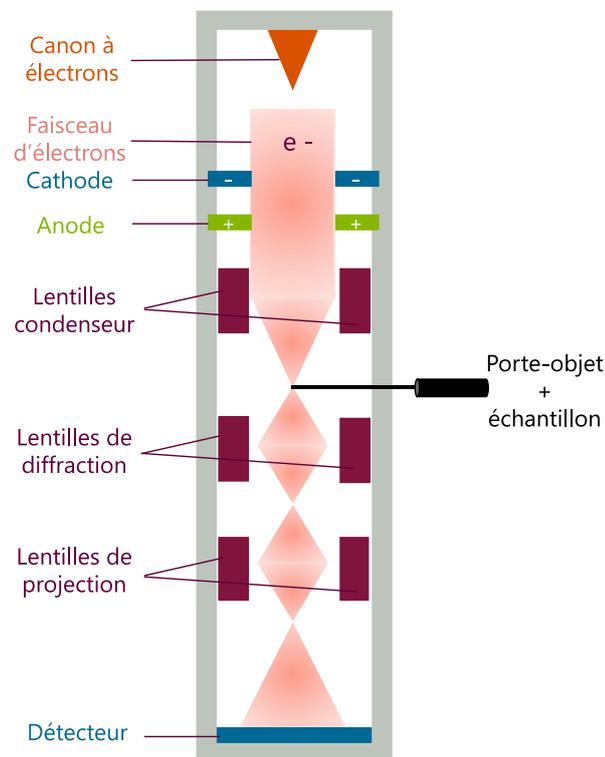


Figure 22 : Principe de la microscopie électronique à transmission

Cette technique de microscopie implique la transmission d'un faisceau d'électrons à travers l'échantillon de NPs, par le biais de différentes lentilles. Les électrons transmis interagissent avec les NPs en fonction de la densité, de l'épaisseur et de la composition chimique de l'échantillon, puis arrivent au détecteur, qui convertit les électrons transmis en une image de l'échantillon de NPs (Klang and Matsko 2014).

La méthode analytique, de loin la plus utilisée, pour obtenir des valeurs de taille et de polydispersité d'un échantillon de NPs en solution, est la DLS, pour « Dynamic Light Scattering » (Kaszuba et al. 2008; Xu 2008). Le principe de cet équipement est basé sur la diffusion dynamique de la lumière. Lorsque le faisceau laser atteint les NPs, la lumière diffusée par les NPs qui suivent un mouvement brownien, est collectée à un angle de diffusion de  $173^\circ$  par rapport au faisceau incident, à l'aide d'un détecteur de comptage de photons. Ce détecteur convertit les fluctuations de l'intensité de la lumière diffusée en un signal électronique, qui est ensuite traité électroniquement pour corrélérer l'intensité du signal avec la taille des NPs. L'appareil nous donne alors la valeur du diamètre hydrodynamique  $D_h$  et du rayon hydrodynamique  $R_h$ . Ces variables sont les plus couramment utilisées et les plus reconnues pour déterminer de manière la plus précise possible la taille des NPs, car elles tiennent compte de la couche de solvatation notamment, contrairement au diamètre déterminé en microscopie. La notion de polydispersité est liée à la distribution en taille des NPs présentes dans un échantillon. On la mesure grâce à l'indice de polydispersité (communément abrégé Pdl pour « Polydispersity Index »), qui doit être inférieur à 0,2 pour qualifier la distribution d'une population de NPs monodisperse. Le principe de la DLS est présenté en Figure 23.

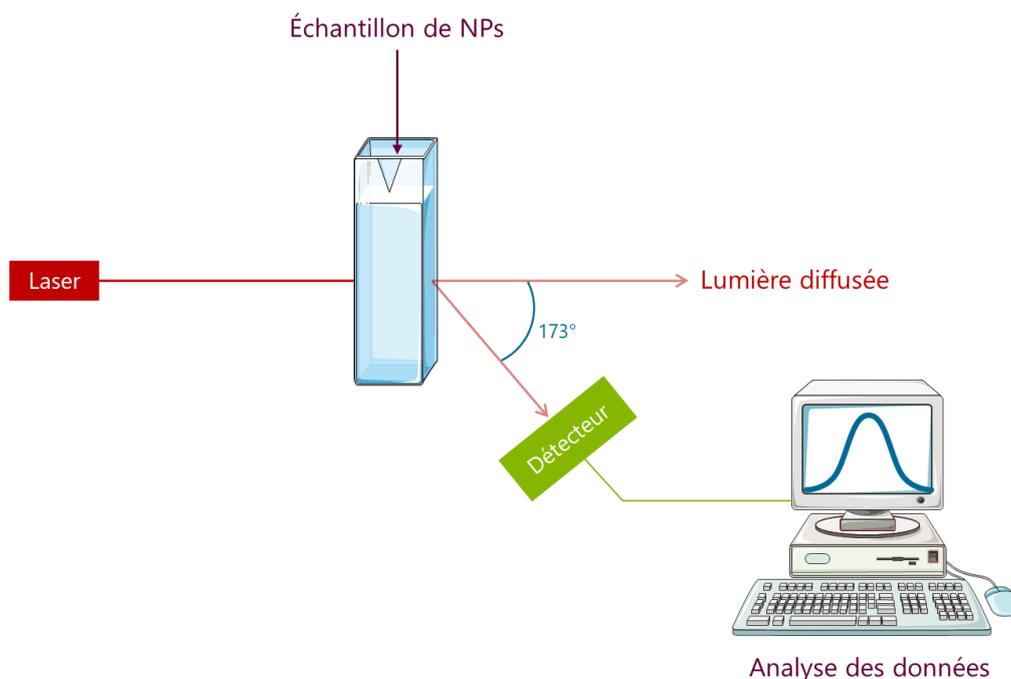


Figure 23 : Principe de la diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La taille, ainsi que la distribution de taille des NPs, peuvent également être déterminées par une technique appelée NTA pour « Nanoparticles Tracking Analysis » (Hole et al. 2013), qui permettra de suivre individuellement les NPs en solution. Cette analyse permet aussi de calculer la concentration des NPs dans l'échantillon. Le principe de cet appareil repose sur la diffusion de la lumière : un faisceau laser est envoyé sur les NPs en solution, à chaque fois que le laser rencontre une NP il se retrouve en partie diffusé vers un microscope qui permet de recueillir l'image de la NP. Comme dans le cas de la DLS, ces NPs en solution sont soumises au mouvement Brownien, plus on les verra bouger rapidement, plus elles seront petites, et inversement. Le principe du NTA est décrit en Figure 24.

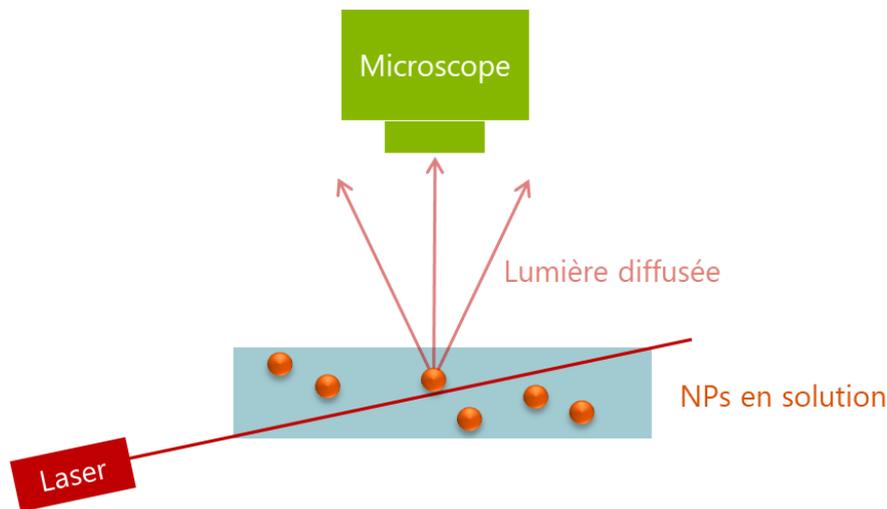


Figure 24 : Principe de l'analyse de suivi individuel de NPs

La charge de surface est le plus souvent caractérisée par le potentiel zêta ( $\zeta$ ), que l'on peut obtenir généralement *via* le même appareil que celui utilisé pour déterminer la taille des NPs en DLS, mais en utilisant la technique de l'électrophorèse laser Doppler (Xu 2008). Cette fois, l'appareil ne mesure plus la diffusion de la lumière mais la mobilité électrophorétique des NPs chargées, sous l'effet d'un champ électrique appliqué à l'échantillon. Le potentiel zêta correspond à la différence de potentiel entre la couche de Stern et le liquide, et caractérise l'intensité de la répulsion ou de l'attraction électrostatique ou électrique entre NPs. La couche de Stern est une couche d'ions, située à la surface du nanovecteur, et de charge opposée à celle du liquide dans lequel se trouve le nanovecteur. Ce paramètre nous donne des renseignements sur la charge de la NP évidemment, mais aussi, de manière plus indirecte, sur les causes de dispersion, d'agrégation ou encore de floculation des NPs, et donc sur la stabilité de l'échantillon. Les échantillons présentant une valeur absolue de potentiel zêta supérieure à 30 mV (soit positif, soit négatif), sont considérés comme étant relativement stables, car les nanovecteurs pourront suffisamment se repousser pour ne pas s'agréger. En revanche, un potentiel zêta négatif proche de la neutralité pourra potentiellement déstabiliser la suspension colloïdale.

L'état physique de la substance active au sein de la NP doit être contrôlé, afin de vérifier qu'elle se trouve sous forme dissoute ou dispersée par exemple, selon ce que l'on souhaite obtenir. Pour ce faire, il existe des outils d'analyse capable de renseigner des informations comportant sur l'état cristallin (structure organisée en

cristaux) ou amorphe (structure non ordonnée) de la substance active, comme la cristallographie ou encore la calorimétrie différentielle à balayage (DSC).

Ensuite, il sera primordial de déterminer la quantité de principe actif encapsulé dans la NP, afin de connaître la dose exacte de substance active qui sera administrée aux patients. Pour cela, deux paramètres seront à prendre en considération (Liu et al. 2020) :

- Le taux de charge des NPs en substance active, plus communément appelé « drug loading » (DL)
- L'efficacité d'encapsulation (EE)

Les formules mathématiques descriptives permettant de calculer ces deux paramètres sont données dans l'Équation 1.

$$DL (\%) = \frac{\text{masse de substance active dans la NP}}{\text{masse totale de la NP}} \times 100 = \frac{mSA}{mSA + mPolymère} \times 100$$

$$EE (\%) = \frac{\text{masse de substance active dans la NP}}{\text{masse initiale de substance active ajoutée}} \times 100$$

*Équation 1 : Formules mathématiques du taux de charge (DL) et de l'efficacité d'encapsulation (EE)*

Le taux de charge nous renseigne sur la quantité de substance active encapsulée dans la NP, par exemple si le DL = 15%, cela signifie qu'il y a 15% de la masse totale de la NP qui est la substance active, les 85% restants sont le matériaux matrice, par exemple le polymère.

L'efficacité d'encapsulation, quant à elle, représente la capacité de la NP à encapsuler la substance active, et va nous renseigner sur la quantité de substance active à introduire au départ, pour atteindre la quantité encapsulée souhaitée. Par exemple si l'EE est de 50%, cela signifie que seulement 50% de la substance active a été encapsulée, les 50% restant seront éliminés lors de la purification des NPs. Dans cet exemple, il faudra donc introduire au départ deux fois plus de substance active que la quantité finale souhaitée.

L'EE et le DL sont étroitement liés, l'EE dépendra du DL que l'on souhaitera obtenir. A partir d'un certain DL, le nanovecteur ne sera plus en mesure d'encapsuler plus de substance active, le système sera saturé, et l'EE décroîtra à mesure que l'on tentera de rajouter encore plus de substance active.

La quantité de substance active encapsulée dans les nanovecteurs peut être dans certains cas déterminée par spectrophotométrie UV-visible, mais le plus souvent, un dosage de la substance active est réalisé en HPLC (chromatographie liquide haute performance).

### *II-8-2 Caractérisations biopharmaceutiques*

Une fois toutes les caractérisations physico-chimiques effectuées et validant les caractéristiques des NPs, les caractérisations biopharmaceutiques peuvent être envisagées (Vauthier and Couvreur 2008). Ces caractérisations biopharmaceutiques concernent :

- La détermination de la stabilité chimique de la substance active mais également sa stabilité dans les milieux biologiques auxquels elle sera soumise
- Le profil de la cinétique de libération du nanovecteur au cours du temps
- La détermination de l'absorption de la substance active par des cellules d'intérêt et son devenir, c'est-à-dire sa biodisponibilité
- La toxicité du nanovecteur vis-à-vis de l'organisme

#### *II-8-2-1 Caractérisation de la stabilité de la substance active*

La stabilité d'un médicament est définie par l'ICH (« International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals » pour conseil international d'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain) comme étant : « L'aptitude d'un médicament à conserver ses propriétés chimiques, physiques, microbiologiques et biopharmaceutiques dans les limites spécifiées pendant toute sa durée de validité ». Comme tout médicament, des études de stabilité devront être effectuées sur les nanomédicaments. Il s'agira de tests sur la stabilité chimique de la substance active, mais aussi sur sa stabilité dans les milieux biologiques auxquels elle sera soumise. Par exemple, comme les nanovecteurs sont majoritairement destinés à être administrés par voie intra-veineuse (IV), on pourra tester leur stabilité dans un milieu biosimilaire à pH physiologique, soit par exemple dans du PBS (tampon phosphate salin) à pH 7,4. L'intégrité ou la modification du nanovecteur après exposition aux milieux biosimilaires sera alors évaluée.

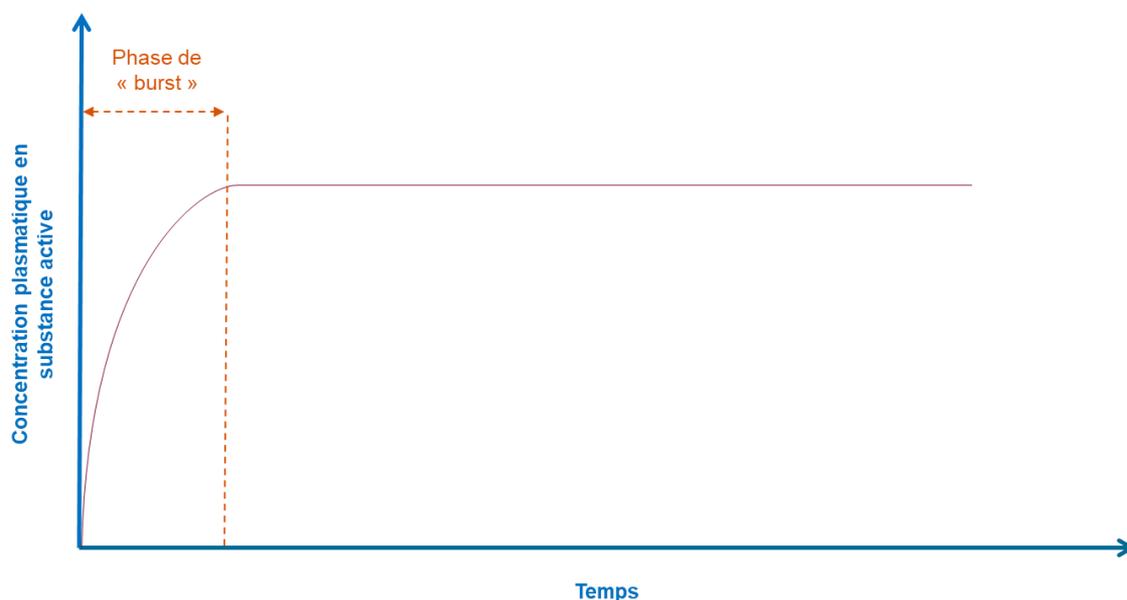
Différents facteurs peuvent influencer la stabilité des nanomédicaments, ils peuvent être de nature :

- Extrinsèque (température, humidité, lumière, oxygène...)
- Intrinsèque (interactions substance active - excipients, interactions contenant-contenu...)

La stabilité des nanomédicaments dans des conditions de stockage sera également évaluée.

#### *II-8-2-2 Caractérisation de la cinétique de libération de la substance active*

Un paramètre essentiel mais plus ou moins compliqué à maîtriser, est la libération de la substance active. Généralement, la cinétique de libération commence avec ce que l'on appelle une phase de « burst », c'est-à-dire une libération très importante de la substance active dès les premiers instants dans l'organisme, puis une libération beaucoup moins importante, ce qui stabilise les concentrations en substance active dans l'organisme (Rodrigues de Azevedo et al. 2017). Le profil de libération classique d'une substance active, avec une libération initiale de type « burst », est représenté en Figure 25.



*Figure 25 : Profil de libération type représentant l'évolution de la concentration plasmatique d'une substance active en fonction du temps*

À noter que ce type de graphique est simplifié, et ne représente pas le profil de libération de tous les nanovecteurs.

Pour réaliser ces cinétiques, les nanovecteurs sont soumis à des conditions similaires à celles qu'ils pourront rencontrer dans l'organisme, c'est-à-dire que les tests sont réalisés à 37°C dans un milieu biosimilaire à pH physiologique (pH = 7,4 pour des nanovecteurs administrés par voie IV).

La caractérisation du profil de la cinétique de libération est une étape capitale, afin de garantir la sécurité d'utilisation du nanomédicament. En effet, une libération trop importante de substance active pourra induire des effets toxiques sur l'organisme, mais une libération trop faible conduira à une inefficacité de la substance active. La libération doit se trouver dans ce que l'on appelle la zone thérapeutique, au-dessus du seuil d'efficacité mais sous le seuil de toxicité. Cette cinétique de libération idéale est représentée en Figure 26.

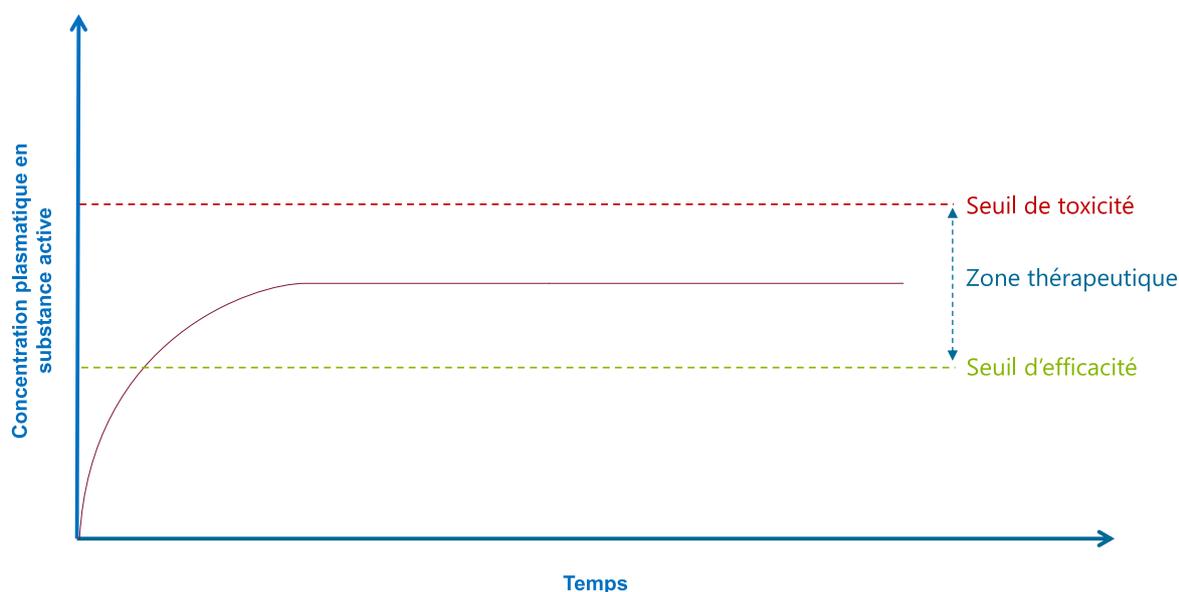


Figure 26 : Profil type d'une libération contrôlée d'une substance active

### *II-8-2-3 Caractérisation de la biodisponibilité*

Pour que le nanomédicament puisse exercer son effet thérapeutique, il est nécessaire que la substance active qu'il encapsule soit correctement distribuée aux cellules, tissus, et organes cibles. C'est ce que l'on appelle sa biodisponibilité. Elle devra être caractérisée *in vitro* puis *in vivo*. Les caractérisations *in vitro* mettront en évidence les mécanismes d'interactions entre le nanomédicament et les membranes cellulaires, et sont décrites en III-5. Pour ce qui est des caractérisations *in vivo*, elles permettront de confirmer ou non les résultats obtenus *in vitro*, grâce à l'expérimentation animale sur un modèle souvent modifié, et adapté à la pathologie que l'on souhaite traiter.

### *II-8-2-4 Caractérisation de la toxicité de la NP vis-à-vis de l'organisme*

La caractérisation de la toxicité du nanomédicament est elle aussi une étape indispensable. La toxicité potentielle du nanomédicament sera évaluée *in vitro* puis *in vivo*, tout comme pour la biodisponibilité, en faisant interagir le nanomédicament avec des cellules. La toxicité des produits de dégradation du nanomédicament sera elle aussi évaluée.

Bien que des effets toxiques puissent parfois être non négligeables, il ne faut jamais oublier le principe de bénéfice par rapport au risque, mais également prendre en compte le caractère potentiellement réversible des effets toxiques.

Une fois toutes ces étapes effectuées, l'efficacité du nanovecteur peut être évaluée *in vitro* puis *in vivo*, en comparaison avec l'efficacité du même principe actif mais non formulé sous forme de nanomédicament.

## II-9 Devenir des nanomédicaments dans l'organisme

À ce jour, la majorité des nanomédicaments sont administrés par voie intraveineuse, et arrivent donc directement dans la circulation générale, sans avoir à traverser différentes barrières biologiques. Après administration dans l'organisme, ils vont subir des étapes de pharmacocinétique, que l'on peut résumer sous l'acronyme ADME pour :

- Absorption
- Distribution
- Métabolisme
- Élimination

L'étape d'absorption, est inéluctablement liée au moyen d'administration du médicament. Dans le cas de l'administration d'un nanomédicament en IV, cette étape va donc être directe et complète. Ensuite, le nanomédicament se distribue à l'organe ou aux organes cibles, et y exerce son activité thérapeutique : c'est ce que l'on appelle la phase pharmacodynamique. L'étape de métabolisation permet de transformer le nanomédicament en métabolites éliminables. Enfin, le nanomédicament est éliminé de l'organisme, soit de manière inchangée par les urines après filtration glomérulaire ou par les fèces après excrétion par voie biliaire (NPs de diamètre inférieur à 5-10 nm), soit après dégradation (NPs de diamètre supérieur à 5-10 nm) (Fattal 2019; Frédéric Lagarce 2014).

Au tout début du développement de ces nanomédicaments, les scientifiques ont mis au point des vecteurs, aujourd'hui appelés vecteurs de première génération, composés de polymères ou de lipides encapsulant la substance active, comme le montre la Figure 28. La principale caractéristique de ces vecteurs est qu'ils n'ont subi aucune modification de leur surface. Après leur administration par voie IV, ces systèmes sont très rapidement reconnus puis éliminés par le système immunitaire, en particulier par des phagocytes mononucléés présents dans le flux sanguin. Ce phénomène est connu sous le nom d'opsonisation, et a pour conséquence un court temps de séjour dans le sang et une élimination rapide du nanovecteur. Ces vecteurs de 1<sup>ère</sup> génération possèdent un tropisme hépato-splénique, c'est-à-dire qu'ils se retrouvent dans le foie et la rate. Cela est dû au fait qu'ils sont capturés par les macrophages, secondairement à leur marquage par les opsonines. Or, ces macrophages se trouvent en grande quantité dans ces deux organes. Ce mécanisme peut être mis à profit pour cibler le foie, comme dans le cas de cancer hépatique, mais

l'élimination rapide de ces vecteurs, en seulement quelques heures, restreint les utilisations (Vauthier and Couvreur 2008).

Hélas, l'efficacité thérapeutique de ces vecteurs était relativement limitée à certaines applications bien précises. Afin d'atteindre d'autres parties de l'organisme, donc en évitant leur élimination rapide, les scientifiques ont amélioré la technologie et modifié la surface de ces vecteurs, en développant les vecteurs de deuxième génération. Pour améliorer leurs propriétés pharmacocinétiques, les nanovecteurs ont été optimisés par la modification de leur surface pour échapper à l'opsonisation.

Le greffage de chaînes hydrophiles sur leur surface, comme les chaînes de PEG (poly(éthylène glycol)), rendent la surface de la nanoparticule plus hydrophile et neutre, et limitent ainsi l'opsonisation. Pour exercer correctement cet effet, les chaînes de PEG doivent avoir une longueur suffisante (supérieure à 2000 Da), avec une densité de surface adaptée. Grâce à cette densité de surface suffisamment élevée, les chaînes de PEG induisent un encombrement stérique important qui limite l'opsonisation. La diminution de leur diamètre, en dessous de 100 nm, limite également l'opsonisation car les opsonines auront du mal à se fixer sur la NP en raison de son rayon de courbure réduit. En raison de cette échappatoire à la vigilance du système immunitaire, ces vecteurs sont décrits comme des nanovecteurs furtifs (Moghimi and Szebeni 2003), et peuvent circuler dans l'organisme sur des périodes pouvant aller jusqu'à plusieurs jours.

Cette deuxième génération de vecteurs est également classée comme ciblage passif, du fait que les NP n'atteignent pas directement une cible mais présentent un temps de circulation plus long, permettant aux nanomédicaments de s'accumuler passivement dans le tissu ciblé et donc d'augmenter l'efficacité thérapeutique. Cet effet de ciblage passif est particulièrement recherché dans les cas de cancers. En effet, dans la majorité des cancers, on observe une inflammation des tissus tumoraux, caractérisée par le recrutement de nombreux macrophages par le système immunitaire, qui libèrent, en réponse à l'inflammation, des cytokines. Ces cytokines sont responsables d'une augmentation de la perméabilité vasculaire, ce qui a pour conséquence de séparer les cellules endothéliales de la paroi vasculaire, qui ne sont donc plus jointives, telles que l'on peut les trouver dans les tissus sains. L'endothélium du vaisseau sanguin devient alors fenestré, ce qui permet d'accroître le passage des nanovecteurs vers les cellules tumorales. Ce mécanisme est appelé effet EPR, pour « enhanced permeability and retention effect », soit un effet de perméabilité et de

réétention accru (Yin, Liao, and Fang 2014). L'effet thérapeutique des nanovecteurs sera donc plus important dans les tissus tumoraux et/ou inflammés, et beaucoup moins important dans les tissus sains, ce qui limitera les effets secondaires dûs aux anti-cancéreux. De plus, les cellules tumorales favorisent l'angiogénèse, c'est-à-dire l'accroissement du réseau vasculaire autour de la tumeur pour alimenter les cellules malignes, en sécrétant des facteurs de croissance. La tumeur est alors très bien irriguée, ce qui permet d'augmenter encore la quantité de nanovecteur qui peut atteindre les cellules cancéreuses. De surcroît, le drainage lymphatique, à l'origine dans notre cas de l'élimination des nanovecteurs, est affaibli dans les tumeurs et n'exerce que relativement peu son effet. Ce mécanisme d'effet EPR est expliqué en Figure 27 b).

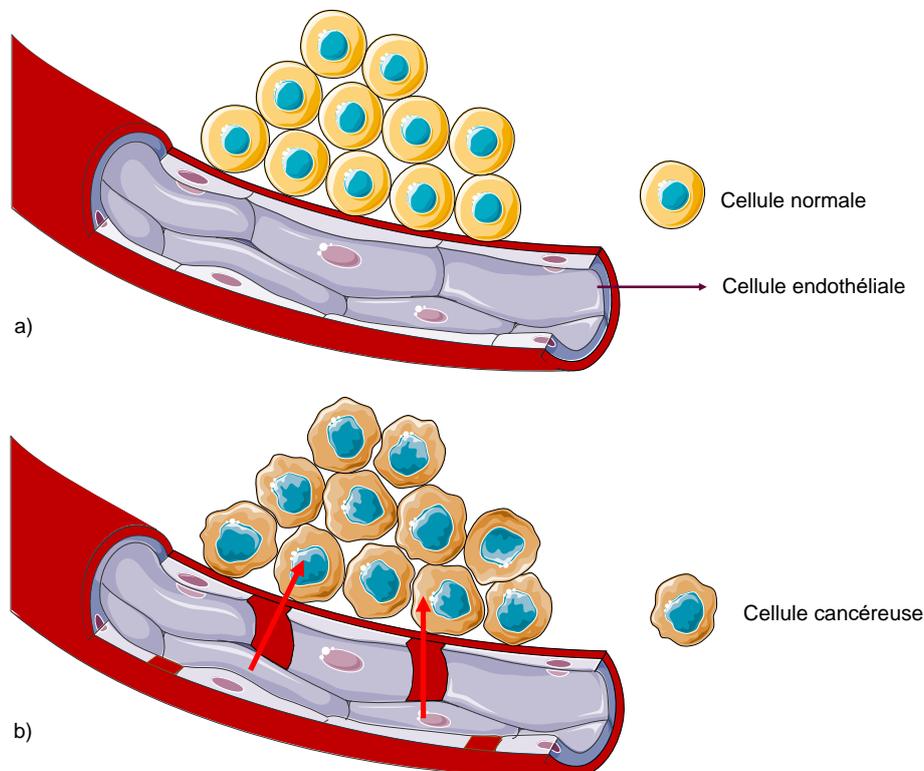


Figure 27 : Physiologie d'une paroi vasculaire saine et d'une paroi vasculaire sous effet EPR

- a) Schéma représentant la paroi saine d'un vaisseau sanguin, quand les cellules de l'organisme sont normales
- b) Schéma représentant l'effet EPR, induit par des cellules cancéreuses qui provoquent indirectement la séparation des cellules endothéliales de la paroi vasculaire

Malheureusement, ce mécanisme qui paraît idéal pour que les nanomédicaments anticancéreux soient très efficaces, ne l'est en réalité pas tant. L'effet EPR, pourtant bien mis en évidence dans les modèles précliniques notamment chez la souris, n'est qu'assez peu vérifié chez l'homme (Nichols and Bae 2014). Le caractère unique de chaque tumeur, dont les causes, les tissus touchés, l'évolution etc..., sont différents, font que l'effet EPR n'apparaît pas systématiquement. Toutefois, certains nanomédicaments anticancéreux qui agissent grâce à cet effet EPR sont tout de même efficaces. C'est en autres le cas du Doxil, liposome de doxorubicine (Barenholz 2012).

Une troisième génération de vecteur existe, et qui est encore plus spécifique que la deuxième. En effet, le ciblage est considéré comme actif, car les vecteurs portent sur leur surface des ligands spécifiques d'une cible cellulaire, en plus de leurs chaînes de PEG. Cela a pour effet de modifier le devenir *in vivo* du nanovecteur et de faciliter l'internalisation cellulaire des NPs par une interaction ligand-récepteur spécifique. Ces ligands peuvent être des anticorps, des peptides spécifiques etc... L'acide folique a été utilisé comme ligand dans ce type de vectorisation, pour le traitement de carcinomes ovariens (Hilgenbrink and Low 2005). Il a été démontré qu'il était capable *in vivo*, de cibler spécifiquement avec une grande affinité, son récepteur, surexprimé par les cellules cancéreuses (Stella et al. 2000, 2007).

Plus récemment encore, les scientifiques ont développé des nanovecteurs de 4<sup>ème</sup> génération. Leur structure ne diffère pas des NPs de 3<sup>ème</sup> génération, c'est-à-dire qu'elles possèdent aussi des chaînes de PEG et des ligands, hormis le fait qu'elles sont pourvues de composés sensibles à des *stimuli* extérieurs. Ces composés sont capables d'enclencher la libération du principe actif, seulement si un *stimulus* extérieur à la nanoparticule elle-même est présent (Boudier et al. 2020).

Cette nouvelle génération permet de libérer le principe actif seulement au niveau du site pathologique, ce qui est très avantageux notamment pour les principes actifs toxiques pour les cellules saines. Cela permet ainsi de diminuer considérablement les effets secondaires indésirables. Par exemple, on peut formuler ces nanovecteurs avec un composé sensible aux variations de pH. Le pH cellulaire étant plus acide chez les cellules tumorales (Damaghi, Wojtkowiak, and Gillies 2013), le nanovecteur va pouvoir libérer le principe actif seulement à partir d'une certaine acidité, ce qui va ainsi entraîner la destruction des cellules cancéreuses mais épargner les cellules saines, au pH plus élevé.

Les *stimuli* auxquels les nanovecteurs de 4<sup>ème</sup> génération peuvent être sensibles sont par exemple un rayonnement, une concentration en certains ions, ou une variation de température, ne se trouvant qu'au niveau du site à traiter, et pouvant être appliqués de manière totalement externe à l'organisme (pour les rayonnements notamment). C'est le cas par exemple des nanovecteurs composés de poly(acrylamide-n-isopropyle), qui est un polymère thermosensible, et donc ne se désagrègera et ne laissera s'échapper le principe actif que quand il se trouvera dans une certaine gamme de températures (Vauthier and Couvreur 2008). Ces quatre générations de nanosystèmes sont représentées en Figure 28.

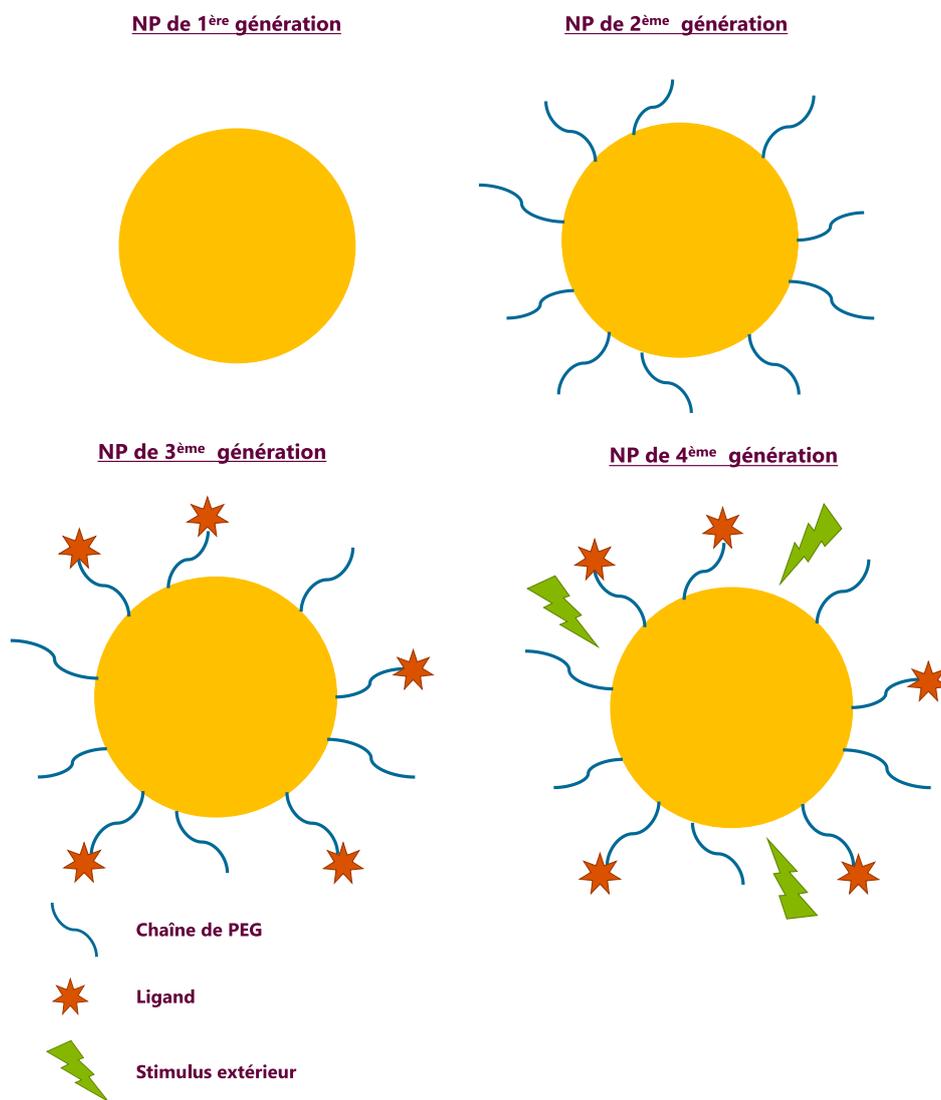


Figure 28 : Différentes générations de nanovecteurs

Depuis maintenant quelques années, émerge une nouvelle définition de cette 4<sup>ème</sup> génération de nanovecteurs. Ces derniers ne seraient plus décrits comme répondant à des *stimuli* extérieurs, mais comme ciblant spécifiquement le trafic intracellulaire. En effet, ces vecteurs seraient capables, après internalisation par les cellules, soit de libérer leur principe actif dans un des compartiments cellulaires, soit d'interférer avec les voies de trafic intracellulaire, pour leur permettre de libérer le principe actif à un site subcellulaire cible (Foroozandeh and Aziz 2018). Ce nouveau mode de ciblage des cellules est très encourageant, notamment pour la délivrance de gènes ou d'ARN (acide ribonucléique), dans les thérapies anti-cancéreuses (Shi et al. 2017).

Concernant l'élimination de ces nanovecteurs, comme il a été dit précédemment, les matériaux qui les composent doivent être biodégradables et/ou bioéliminés. Le PEG n'est pas un matériau biodégradable, mais est capable de se dissocier en fragments, qui eux sont solubles, et donc éliminés, dans les milieux biologiques aqueux. C'est aussi le cas par exemple des poly(cyanoacrylate d'alkyle) (PACA) qui ne sont que partiellement biodégradables. Cependant, pour être bioéliminés, ces fragments doivent avoir une masse molaire inférieure à celle du seuil de filtration rénale, c'est-à-dire inférieure à 10 000 g/mol (Vauthier and Couvreur 2008). Si ce n'est pas le cas, les fragments risquent de s'accumuler au niveau rénal et de se stocker dans les cellules rénales. Cette accumulation au fur et à mesure des administrations deviendrait alors une source de toxicité très importante. Si nous prenons le cas du PLGA, co-polymère extrêmement répandu dans la formulation de nanovecteurs, il a été démontré qu'il subit une hydrolyse de sa liaison ester, séparant ainsi l'acide lactique de l'acide glycolique (Hirenkumar and Steven 2012), qui sont éliminés par les voies métaboliques ou par excrétion rénale en quelques jours ou semaines.

### III- Impacts des propriétés mécaniques des nanoparticules sur les mécanismes biologiques

Le terme de « propriétés mécaniques », désigne le comportement du matériau, ici les NPs, lorsqu'il est soumis à une ou plusieurs contraintes mécaniques.

En s'inspirant des cellules, ou même des virus, qui sont capables de moduler leurs propriétés mécaniques pour réaliser certaines fonctions biologiques, les chercheurs ont émis l'hypothèse que les propriétés mécaniques des NPs pouvaient être corrélées à leur activité biologique (Hui et al. 2019). L'élasticité des NPs a une influence sur leur temps de circulation dans le sang, sur la biodistribution, leur internalisation cellulaire (Hui et al. 2019), etc...

Cependant, un consensus n'a pas été trouvé entre les différentes études menées à ce sujet. En effet, selon que l'on prend en compte ou non la morphologie des NPs (Chen et al. 2018; Shen et al. 2019), leur caractère hydrophile ou hydrophobe (Wang et al. 2019), la méthode utilisée pour caractériser la pénétration cellulaire (modélisation moléculaire dynamique à grains (Shen et al. 2019; Shen, Ye, and Li 2018), méthode de la dynamique dissipative des particules (Wang et al. 2019), résultats *in vitro* et *in vivo* (Anselmo et al. 2015; Guo et al. 2018)), les résultats sont différents.

Nous allons donc tenter de mieux comprendre quel est l'effet de la rigidité/élasticité des NPs sur les activités biologiques.

Il est tout d'abord important de définir quelques terminologies les plus employées, pour décrire les propriétés mécaniques des NPs. Parmi les termes clés définissant les propriétés mécaniques des NPs, on retrouve l'élasticité, la raideur, la rigidité, la dureté, la force, etc..., mais les plus largement utilisés dans la littérature sont l'élasticité et la rigidité, c'est pourquoi nous allons les définir.

L'élasticité est la capacité d'un objet à résister aux déformations causées par une contrainte, et à revenir à son état initial une fois que la contrainte est enlevée : il s'agit d'un phénomène réversible. Elle est définie par le module d'Young, qui correspond au ratio entre la contrainte de traction et la déformation. Son expression est représentée dans l'Équation 2.

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon}$$

*Équation 2 : Expression du module d'Young*

Avec  $E$  le module d'Young en Pa ou  $N.m^{-2}$ ,  $\sigma$  la contrainte en Pa ou  $N.m^{-2}$ , et  $\varepsilon$  l'allongement relatif ou déformation (adimensionnel).

La rigidité est la mesure à laquelle un objet résiste à une déformation causée par des forces appliquées. Elle correspond au ratio entre la force appliquée et la déformation correspondante, et est exprimée en N/m. Contrairement aux modules d'élasticité, qui sont des facteurs intrinsèques déterminés uniquement par le matériau lui-même, la rigidité d'un objet est liée non seulement à ses modules d'élasticité, mais aussi à sa dimension, à sa forme, et à la direction des forces appliquées.

La déformation, ici la déformation des NPs, correspond à la manière dont ces dernières réagissent quand elles sont soumises à des sollicitations mécaniques. La déformation est caractérisée par la loi de Hooke, qui permet d'appréhender le comportement de solides élastiques qui sont soumis à différentes contraintes mécaniques. L'équation de cette loi de Hooke est présentée en Équation 3.

$$F = -k\Delta l$$

*Équation 3 : Equation de la loi de Hooke*

Avec  $F$  la force de traction en N ;  $k$  la constante de rappel en N/m ; et  $\Delta l$  la variation de longueur en m.

### III-1 Effets de la déformation des NPs sur leur circulation dans le sang

Quand les NPs sont injectées par voie IV, elles se retrouvent dans la circulation sanguine. Leur objectif sera d'atteindre des organes cibles, et donc par conséquent, d'être entraînées facilement par le flux sanguin. Le flux sanguin se situe dans le régime d'écoulement de Stokes, c'est-à-dire que des particules rigides ne peuvent pas migrer sans l'aide de l'inertie (Leal 1980). Fatalement, les NPs rigides ne pourront donc pas être entraînées efficacement avec le flux sanguin vers les tissus cibles, et resteront au niveau des parois du vaisseau sanguin du site d'injection (Kumar and Graham 2011). Ce phénomène est appelé « marginalisation » : le mouvement des NPs dans l'écoulement sanguin se fait vers les parois du vaisseau sanguin (Carboni et al. 2014; Decuzzi et al. 2009; Godin et al. 2010; Kumar and Graham 2012; Ye et al. 2018).

Les NPs plus souples quant à elles, peuvent se déformer et ainsi être entraînées plus facilement vers organes cibles car elles se retrouvent au centre du flux sanguin et non pas au niveau des parois (Kumar and Graham 2011).

Les propriétés mécaniques sont donc très importantes à prendre en compte, car des NPs trop rigides n'atteindront pas les organes cibles, et donc le principe actif ne pourra jamais se distribuer correctement aux organes et alors garantir l'efficacité thérapeutique escomptée. Les comportements des NPs souples et rigides dans les vaisseaux sanguins sont représentés en Figure 29 a) et b) respectivement.

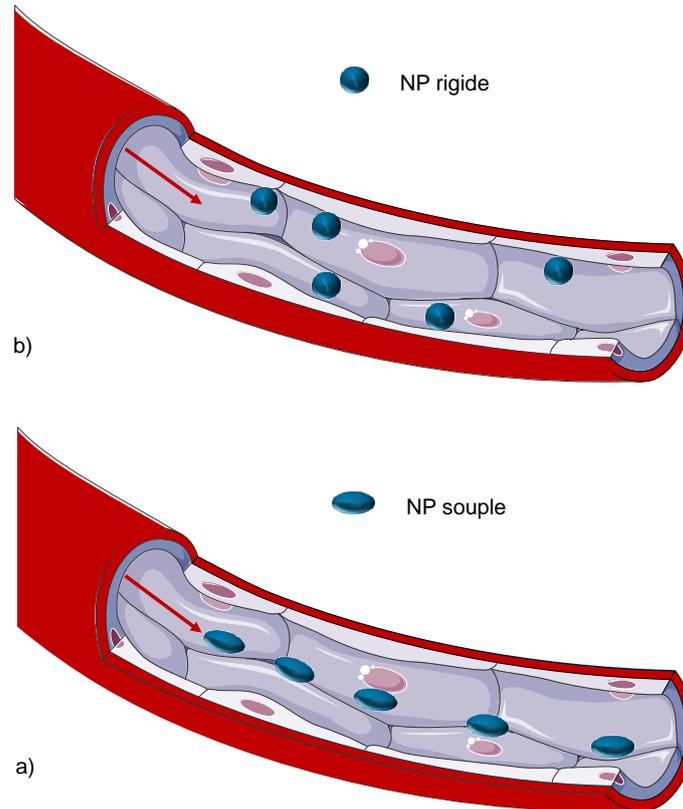


Figure 29 : Comportement des NPs dans les vaisseaux sanguins en fonction de leurs propriétés mécaniques

- a) Les NPs souples, donc déformables, se retrouvent au centre du vaisseau, entraînées par le flux sanguin
- b) Les NPs rigides se « marginalisent », c'est-à-dire qu'elles se retrouvent au niveau des parois vasculaires, car moins bien entraînées par le flux sanguin

Un des avantages des particules déformables, est qu'elles pourront passer à travers des capillaires dont le diamètre sera plus petit que le diamètre initial de la particule, ce qui limitera le risque d'occlusion des vaisseaux sanguins. En effet, il a été démontré qu'une particule souple d'1 $\mu$ m était capable de passer dans un vaisseau sanguin d'un diamètre de 400 nm (Key et al. 2015; Palange et al. 2017).

La rigidité d'une NP déformable est caractérisée par le nombre capillaire (Ca), dont l'équation est la suivante (Équation 4) :

$$Ca = \frac{\mu \dot{\gamma} a}{G_s}$$

Équation 4 : Formule du nombre capillaire (Ca)

Avec  $\mu$  la viscosité du fluide,  $\dot{\gamma}$  le taux de cisaillement du flux, et  $G_s$  le module de cisaillement de la NP.

Il existe une rigidité critique de la NP : quand la rigidité de la NP est inférieure ou égale à la rigidité critique, la vitesse de migration *via* la circulation sanguine est linéairement proportionnelle à la rigidité de la NP, tandis que si la rigidité de la NP est supérieure à la rigidité critique, la linéarité s'effondre (Singh, Li, and Sarkar 2013).

Les NPs déformables peuvent s'adapter rapidement au profil de flux sanguin imposé, et leur comportement dépendra de leur localisation dans le vaisseau sanguin. Les NPs souples avec un nombre capillaire suffisamment élevé migreront vers le centre du vaisseau, et plus ce nombre capillaire est faible, plus les NPs se trouveront sur les bords du vaisseau sanguin. On en déduit donc que plus une NP a un Ca élevé, plus elle migrera facilement vers les organes cibles car bien entraînée par le flux sanguin (Ye et al. 2018).

Cependant, la notion d'efficacité dépend de l'effet thérapeutique que l'on souhaite obtenir. Par exemple, un principe actif anti-cancéreux qui parviendrait aux organes grâce à l'effet EPR aurait plutôt un intérêt à se situer vers les parois du vaisseau sanguin (voir la Figure 27).

Dans ces circonstances, il devient aisé d'imaginer que plus les NPs seront proches des parois du vaisseau sanguin, plus elles auront de chances de pénétrer dans la tumeur et ainsi exercer leur activité anti-cancéreuse. Les NPs rigides, qui sont marginalisées donc qui restent près des parois et ne sont pas emportées par l'écoulement au centre du vaisseau, seront dans ce cas, potentiellement plus efficaces que des NPs plus souples (Carboni et al. 2014; Decuzzi et al. 2009).

Pour des applications telles qu'en bioimagerie, à des fins de diagnostic, où l'on souhaite que les NPs circulent dans le flux sanguin pendant une longue période afin de diffuser dans tous les organes, il est préférable d'avoir des NPs souples, qui seront efficacement entraînées au centre de l'écoulement sanguin (Carboni et al. 2014).

Suite à l'analyse de ces études, nous avons vu que les NPs souples circulent plus facilement dans le sang que les NPs rigides, mais il faut également prendre en compte leur temps de circulation dans le sang. En effet, une NP qui circule mieux mais qui est tout de suite reconnue puis éliminée par les macrophages ne sera pas efficace.

### III-2 Effets de la rigidité des NPs sur leur temps de circulation dans l'organisme et la biodistribution

Une étude a prouvé que plus le module d'Young est élevé, plus le temps de circulation des NPs dans l'organisme diminue (Zhang et al. 2012). Or le temps de circulation des NPs est corrélé positivement à leur accumulation dans les tissus, c'est-à-dire que plus une NP circulera longtemps dans l'organisme, plus elle aura de chances de parvenir aux tissus et organes cibles. Des travaux antérieurs ont tenté de prolonger le temps de circulation des NPs pour améliorer leur accumulation dans les tissus, et avoir une meilleure activité anti-tumorale par exemple (E.Blanco 2017). Cela est classiquement fait en modulant les propriétés physico-chimiques des NPs comme la taille, la morphologie et la charge de surface (E.Blanco 2017; Stevens and Schleimer 2016), mais les propriétés mécaniques de celles-ci peuvent également avoir un effet.

On admet généralement que les NPs peuvent être modifiées de quatre manières différentes pour prolonger leur temps de circulation sanguine, éviter leur élimination par les phagocytes, et ainsi diffuser le plus efficacement possible dans les cellules tumorales. Il s'agit de ce que l'on appelle communément la combinaison des paramètres « 4S » (Key et al. 2015; Ye et al. 2018), pour :

- « Size » : la taille des NPs
- « Shape » : la morphologie des NPs
- « Surface properties » : les propriétés de surface des NPs
- « Stiffness » : la rigidité des NPs

Ces paramètres peuvent être variés un à un pour voir l'impact de chacun sur le temps de circulation et la biodistribution des NPs, mais on peut également les faire varier simultanément. Certaines de ces combinaisons, comme celles de l'impact de la morphologie et de la rigidité, ou des propriétés de surface et de la rigidité, seront détaillées par la suite.

L'hypothèse que le module d'Young régit, entre autres, le temps de circulation et la biodistribution des particules d'hydrogel, a été vérifiée dans l'étude de Merkel *et al.*, 2011. La diminution du module d'Young de particules, a entraîné une modification de leur biodistribution : les particules souples peuvent contourner certains organes, tandis que les particules plus rigides sont capturées par ces organes et sont ensuite éliminées. Le temps de circulation des particules souples est donc augmenté par rapport au particules rigides, le module d'Young a bien un impact sur la biodistribution et le temps de circulation. Cette étude a également démontré qu'une diminution du

module d'Young des particules par 8 entraîne une augmentation de leur demi-vie plasmatique par 30 voire plus.

Bien que la rigidité reste encore le paramètre dont l'influence a été la moins étudiée, elle gagne de plus en plus d'intérêt et s'est révélée être un élément primordial à prendre en compte dans tous les mécanismes biologiques que met en jeu la délivrance de principes actifs à des organes cibles, comme par exemple pendant l'étape de biodistribution.

Une fois que les NPs sont dans la circulation systémique, elles vont se distribuer aux différents organes : c'est l'étape de biodistribution. D'une manière générale, l'accumulation des NPs dans les tissus (par exemple dans des tumeurs solides), relève de la biodistribution. Les NPs souples sont capables de se déformer sans perdre leur intégrité structurale, notamment lors des mécanismes de filtration biologique ; elles sont capables de passer par des pores de taille inférieure à leur diamètre, alors que les NPs rigides ne passent pas.

En raison de leur faible déformabilité, les NPs rigides de plus de 100 nm sont filtrées par la rate car elles ne peuvent pas passer à travers les fentes de celle-ci, dont un des rôles est de purifier le sang. Cela qui a pour conséquence une accumulation des NPs rigides dans cet organe, ce qui raccourcit leur temps de circulation (Zhang et al. 2012).

De plus, il a été démontré que les NPs souples échappent plus facilement à la dégradation par les macrophages que les NPs rigides, car elles sont capables de se déformer, et d'éviter ainsi la capture (Anselmo et al. 2015; Beningo and Wang 2002; Morachis, Mahmoud, and Almutairi 2012). Les NPs souples ont donc un temps de circulation augmenté par rapport aux NPs rigides (Anselmo et al. 2015; Anselmo and Mitragotri 2017). Cette caractéristique reflète, dans une certaine mesure, les mécanismes de défense contre les substances étrangères et les tissus pathologiques, étant donné que la plupart des substances endogènes présentes dans le sang (par exemple, les globules rouges sains) possèdent une très faible rigidité, tandis que les cellules pathologiques (par exemple, les globules rouges malades et vieillissants) et les matières étrangères (par exemple, les virus) sont relativement plus rigides (Best, Yan, and Caruso 2012; Mebius and Kraal 2005). Ce sont ces pathologies, qui affectent la rigidité des hématies, telle que la drépanocytose, et qui augmentent les risques de thrombo-occlusion des vaisseaux sanguins, qui ont incité les chercheurs à poursuivre

leurs investigations sur les effets de la rigidité des cellules ou particules sur leur localisation (Sen Gupta 2016).

Cependant, des résultats différents ont également été rapportés, cette étude prouve que l'accumulation de NPs souples dans la rate est significativement supérieure à celle de NPs rigides car les NPs souples circulent plus longtemps dans l'organisme, alors que les NPs rigides sont très rapidement éliminées (Anselmo et al. 2015).

Nous avons donc des conclusions antagonistes en fonction des études, certaines pour lesquelles les NPs rigides s'accumulent plus dans la rate, et certaines où ce sont les NPs souples qui s'y accumulent majoritairement. Il est donc très difficile de prédire réellement le devenir *in vivo* des NPs ; il s'agit très probablement d'un mécanisme multifactoriel pas encore totalement identifié.

### III-3 Effets de la rigidité des NPs sur leur pénétration cellulaire et tissulaire

Une fois que les NPs ont atteint la proximité des organes, elles vont pouvoir pénétrer dans les tissus. Depuis déjà plusieurs années, les chercheurs essaient d'améliorer la pénétration cellulaire des NPs en modifiant leur taille, leur forme, ou leur charge de surface, mais récemment, un nouvel axe de recherche est développé : améliorer la pénétration cellulaire des NPs en modulant leurs propriétés mécaniques.

Les NPs rigides ont tendance à s'accumuler en surface des tissus, alors que les NPs souples pénètrent en profondeur dans les tissus et ont donc une action anti-tumorale plus efficace (Hui et al. 2019). En effet, les NPs rigides ont plus de mal à passer à travers les espaces intercellulaires, et engagent des interactions plus fortes avec les cellules, ce qui les immobilise à la surface de l'organe. Cependant, une élasticité trop importante n'est pas non plus favorable à la pénétration cellulaire : les NPs ayant une élasticité modérée, peuvent s'avérer avoir une meilleure capacité de pénétration que les plus souples et les plus rigides. De plus, les NPs rigides sont capturées de manière moins spécifique par les organes, ce qui augmente potentiellement le risque d'effets secondaires indésirables.

D'une manière générale, les NPs souples sont plus internalisées que les NPs rigides (Anselmo and Mitragotri 2017). Cependant, un élément est à prendre en compte également : le type de cellule qui internalise les NPs, car selon la cellule, sa préférence pour internaliser plutôt des NPs souples ou rigides peut changer. C'est le cas pour les cellules de type HeLa (lignée cellulaire cancéreuse), qui vont favoriser l'absorption des NPs souples plutôt que des plus rigides (Morachis et al. 2012). Inversement, les cellules de type macrophage, vont préférentiellement internaliser des NPs rigides plutôt que des souples (Beningo and Wang 2002). Il est donc important de prendre en compte le type de cellule que l'on souhaite cibler, afin d'adapter les propriétés mécaniques des NPs qui les cibleront.

Malheureusement, il n'est pas aussi simple de conclure au fait que des NPs souples seraient mieux internalisées par les cellules tumorales, et auraient donc une activité anti-tumorale plus efficace. En effet, chaque cancer est différent, et chaque cellule cancéreuse réagira différemment face à l'internalisation des NPs. Une étude a démontré que des NPs en PEG rigides (3000 kPa) étaient plus internalisées par des cellules cancéreuses du type 4T1, que les mêmes NPs mais souples (10 kPa) (Anselmo et al. 2015). Dans deux autres études, des NPs hybrides (composées de

PLGA avec un lipide) rigides, entraînaient la mort de deux fois plus de cellules cancéreuses HeLa, que des NPs souples (Sun et al. 2015; L. Zhang et al. 2015).

Malgré le nombre grandissant d'études réalisées sur l'effet des propriétés mécaniques des NPs sur l'internalisation par les cellules, notamment cancéreuses, il n'est toujours pas possible d'en tirer une conclusion universelle : dans certains cas, les NPs souples sont plus facilement internalisées, tandis que pour d'autres cas, c'est l'inverse, avec une meilleure internalisation des NPs rigides. Une infinité de paramètres sont à prendre en compte, que ce soient des paramètres de formulation des NPs (type de matériau(x) utilisé(s), tailles, morphologie, propriétés de surface...), ou bien des paramètres biologiques, propres à chacun, mais surtout à chaque type de cancer, comme le type de cellules cancéreuses.

### *III-3-1 Simulations informatiques permettant de modéliser l'effet de la rigidité des NPs sur la pénétration cellulaire et tissulaire*

Une simulation moléculaire dynamique a été utilisée par Sun *et al.*, 2015 pour essayer de mieux comprendre l'effet de la rigidité des NPs sur leurs mécanismes d'internalisation par les cellules. On peut remarquer que la NP rigide (Figure 30 a) est totalement internalisée au bout de 480  $\mu$ s, tandis que la NP plus souple (Figure 30 b) n'est pas complètement internalisée au bout de ces 480  $\mu$ s. La NP souple subit une importante déformation durant l'internalisation cellulaire, ce qui ralentit le processus.

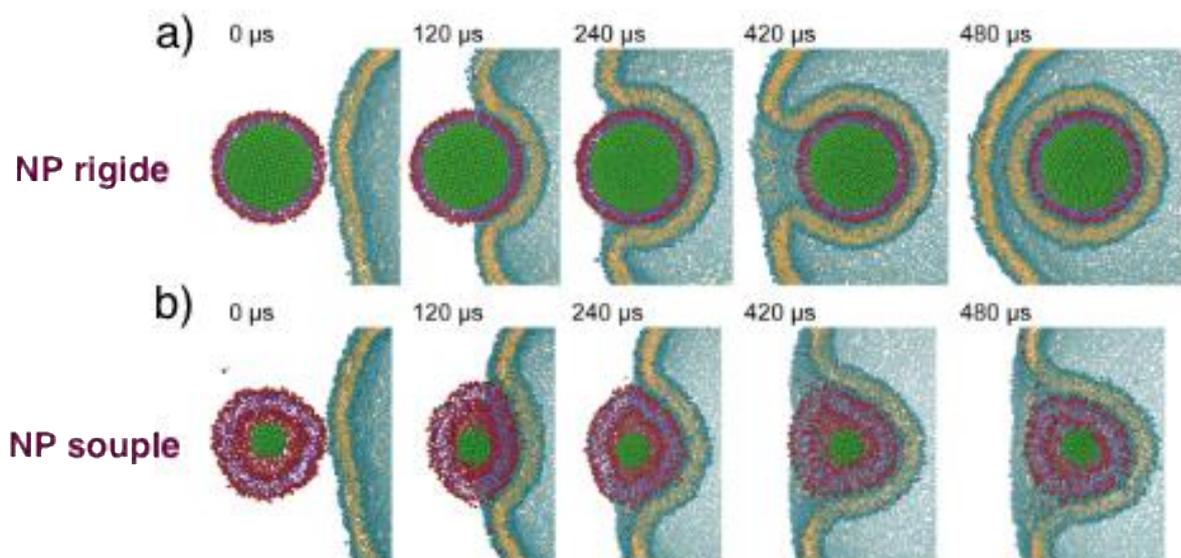


Figure 30 : Simulation moléculaire dynamique représentant le mécanisme d'internalisation cellulaire d'une NP rigide (a) et d'une NP souple (b) (Sun et al. 2015)

Il existe une technique dérivée de ce modèle de simulation moléculaire dynamique, qui est la technique par indentation. Ce système de simulation consiste à placer un modèle de NP sur un modèle de substrat rigide, puis à appliquer une force sur la NP *via* un pénétrateur sphérique. La déformation de la NP face à cette contrainte est modélisée par informatique, et on pourra ainsi comparer les réponses des NPs souples par rapport aux NPs rigides (L. Zhang et al. 2015).

En outre, les modèles qui ont permis d'aboutir à ces résultats (modèles basés sur des sphéroïdes majoritairement) simplifient trop les nombreux paramètres physico-chimiques *in vivo* clés, impliqués dans la pénétration cellulaire, tels que le flux et la pression du fluide interstitiel, la rigidité de l'organe en question, la composante de la matrice extracellulaire etc... La réalité des mécanismes mis en jeu *in vivo* peut donc être erronée par l'absence de contrôle précis de ces paramètres. L'internalisation efficace de NPs est un prérequis indispensable pour la bonne délivrance du principe actif, il est donc indispensable de comprendre au mieux tous les mécanismes impliqués.

La modélisation peut être un moyen de mieux anticiper le devenir *in vivo*. Il existe plusieurs techniques, dont une des plus utilisées est la modélisation moléculaire dynamique à grains (CGMD) (Chen et al. 2018; Li et al. 2013; Shen et al. 2019, 2018). C'est une technique de simulation informatique qui permet de modéliser l'évolution des NPs, par exemple lors de la pénétration à travers une membrane cellulaire, au cours du temps, et qui permet de tenir compte entre autres de leur taille, de leur forme et de leur élasticité. Le principe et le type d'image que l'on peut obtenir *via* cette simulation sont représentés en Figure 31 (Shen et al. 2018).

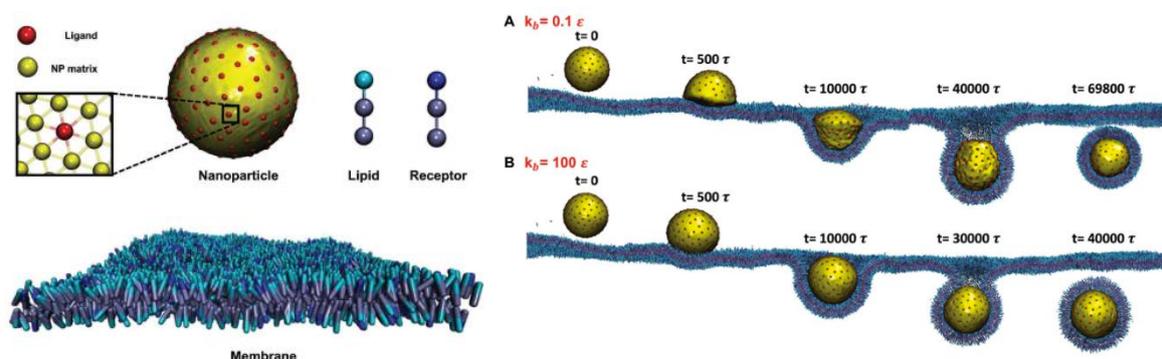


Figure 31 : Principe de la modélisation moléculaire dynamique à grains (CGMD) (Shen, Ye and Li, 2018)

Il existe un autre type de simulation de la pénétration des NPs à travers une membrane cellulaire, moins répandu que les précédents, que l'on appelle simulation de Monte Carlo. Celle-ci permet de nous renseigner sur les caractéristiques thermodynamiques du système avant et après la pénétration de la NP (mais pas pendant) (Van Lehn and Alexander-Katz 2014; Shen, Nieh, and Li 2016).

Afin de mieux comprendre les mécanismes dynamiques qui ont lieu au cours du processus d'internalisation des NPs, il est possible d'utiliser la simulation moléculaire dynamique atomique (Van Lehn and Alexander-Katz 2014).

Une fois les NPs arrivées au niveau tissulaire, elles vont pouvoir être internalisées par les cellules selon différents mécanismes. On en distingue 4 types principaux : la macropinocytose, l'endocytose clathrine-dépendante, l'endocytose cavéole-dépendante et enfin l'endocytose clathrine et cavéole indépendante. Ces trois derniers mécanismes font partie de la micropinocytose. Il existe également un autre mécanisme d'internalisation des NPs par les cellules, qui est la phagocytose, mais elle concerne des particules de taille généralement supérieure à 1  $\mu\text{m}$ , ce qui ne concerne donc que les NPs opsonisées.

La macropinocytose fait intervenir des filaments d'actine qui vont venir créer une invagination de la membrane cellulaire autour de la NP, et ainsi l'englober pour former une vésicule : le macropinosome.

L'endocytose clathrine-dépendante est un processus par lequel les NPs sont captées par des clathrines qui s'arrangent ensuite en réseau pour venir former une vésicule.

L'endocytose cavéole-dépendante est similaire à l'endocytose clathrine-dépendante, mis à part que les cavéoles, qui forment une vésicule autour de la NP, sont intégrées à la membrane, contrairement aux clathrines.

Enfin, l'endocytose clathrine et cavéole indépendante fait intervenir d'autres protéines (flotillines, CDC42 (GTPase) et l'ADP-ribosylation factor 6 (Arf6)).

Ces différents mécanismes d'internalisation des NPs par les cellules sont représentés en Figure 32.

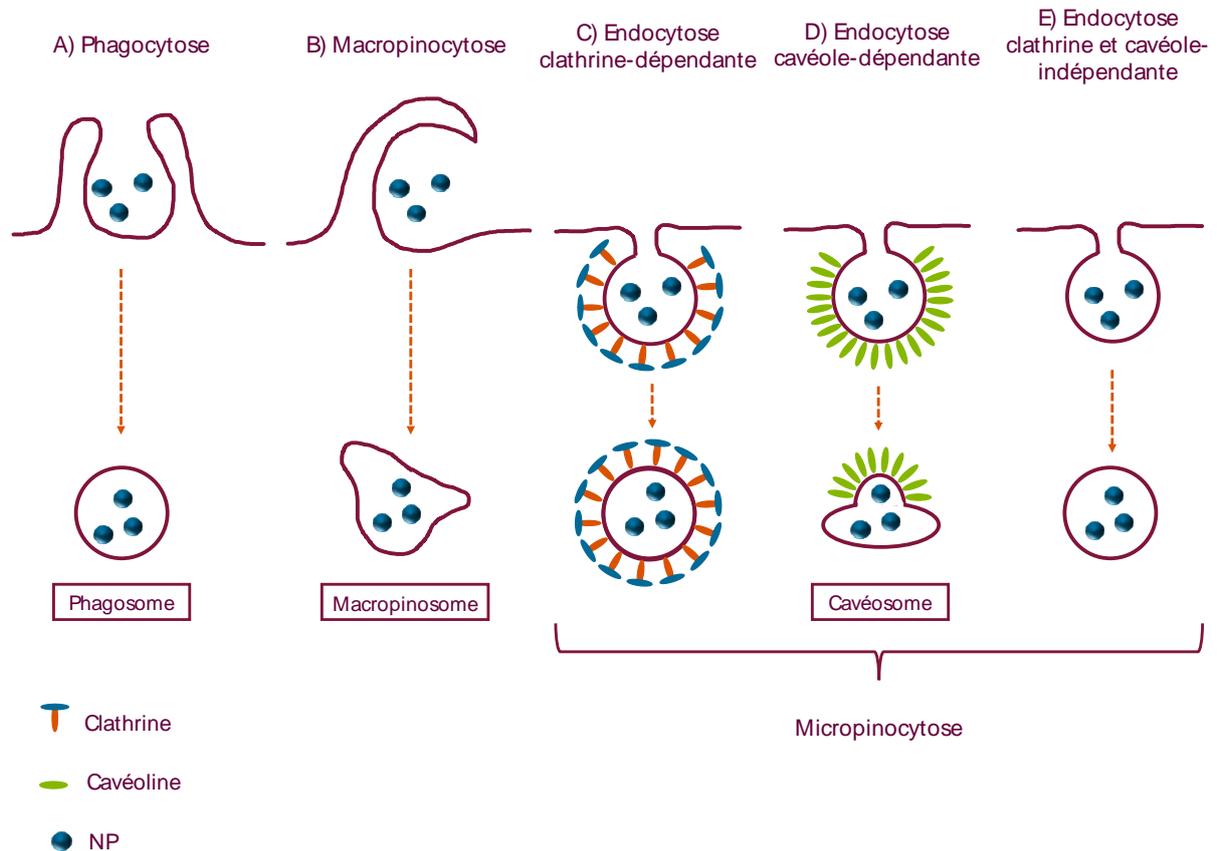


Figure 32 : Mécanismes d'internalisation des NPs par les cellules

- A) Phagocytose
- B) Macropinocytose
- C) Endocytose clathrine-dépendante
- D) Endocytose cavéole-dépendante
- E) Endocytose clathrine et cavéole-indépendante

À noter que ce schéma est simplifié et ne représente pas de manière détaillée tous les acteurs mis en jeu dans ces mécanismes d'internalisation.

À la suite de ces mécanismes, les vésicules formées fusionnent avec un endosome précoce avant d'être digérées par un lysosome (endocytose clathrine et cavéole dépendante) ou sont directement digérées par un lysosome (macropinocytose).

### III-3-2 Effet de la composition de la NP

En fonction de la composition de la NP, c'est-à-dire si elle est constituée de polymères, de lipides, des deux, ou même de tout autre chose, les propriétés mécaniques qui découleront de leur structure seront différentes.

Les NPs hybrides sont composées d'un noyau polymérique et d'une bicouche lipidique. Les lipides constituant la bicouche peuvent soit être directement en contact avec le noyau polymérique, soit être séparés par une couche d'eau plus ou moins importante. La Figure 33 décrit la structure de ce type de NPs.

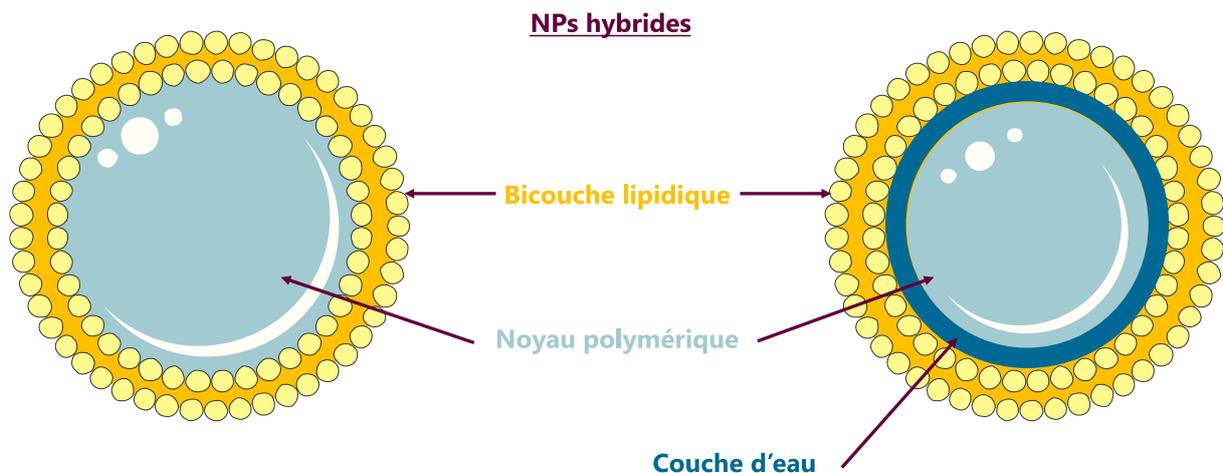


Figure 33 : Compositions possibles des NPs hybrides

Bien évidemment, la présence de cette couche d'eau aura un impact sur la rigidité finale de la NP : plus cette couche d'eau sera importante, plus la NP sera souple (Shen et al. 2016). Cela est confirmé par AFM (microscopie à force atomique) : le module d'Young est moins important pour les NPs avec une couche d'eau que pour les NPs sans eau. Les différences entre les propriétés mécaniques des NPs contenant ou non de l'eau, peuvent conduire à une absorption cellulaire différente, notamment chez les cellules HeLa (Sun et al. 2015; L. Zhang et al. 2015). Il a été démontré que les NPs ne contenant pas de couche d'eau entre son noyau polymérique et sa bicouche lipidique sont plus nombreuses à être internalisées que celles contenant une couche d'eau, ce qui indique que les NPs qui ne contiennent pas d'eau entrent dans les cellules HeLa de manière plus efficace. Cela nous renseigne également sur le mécanisme de pénétration des NPs : l'endocytose médiée par les clathrines.

Cette meilleure pénétration des NPs ne contenant pas d'eau est confirmée par des expérimentations *in vivo*, donc on en conclut qu'un principe actif anti-cancéreux sera d'autant plus efficace s'il est administré par des NPs hybrides ne contenant pas d'eau entre leur noyau polymérique et leur bicouche lipidique (Sun et al. 2015).

### III-3-3 Effet de la structure de la NP

Les NPs peuvent avoir une même composition, mais des structures différentes. C'est le cas de ces NPs hybrides. Certaines ne sont composées que d'une seule couche de lipides autour du noyau polymérique, tandis que d'autres sont composées d'une bicouche lipidique. Les NPs ne comportant qu'une monocouche de lipides sont plus rigides que celles comportant une bicouche lipidique, et sont mieux internalisées par des cellules cancéreuses (L. Zhang et al. 2015). Ces deux types de structures sont représentées dans la Figure 34.

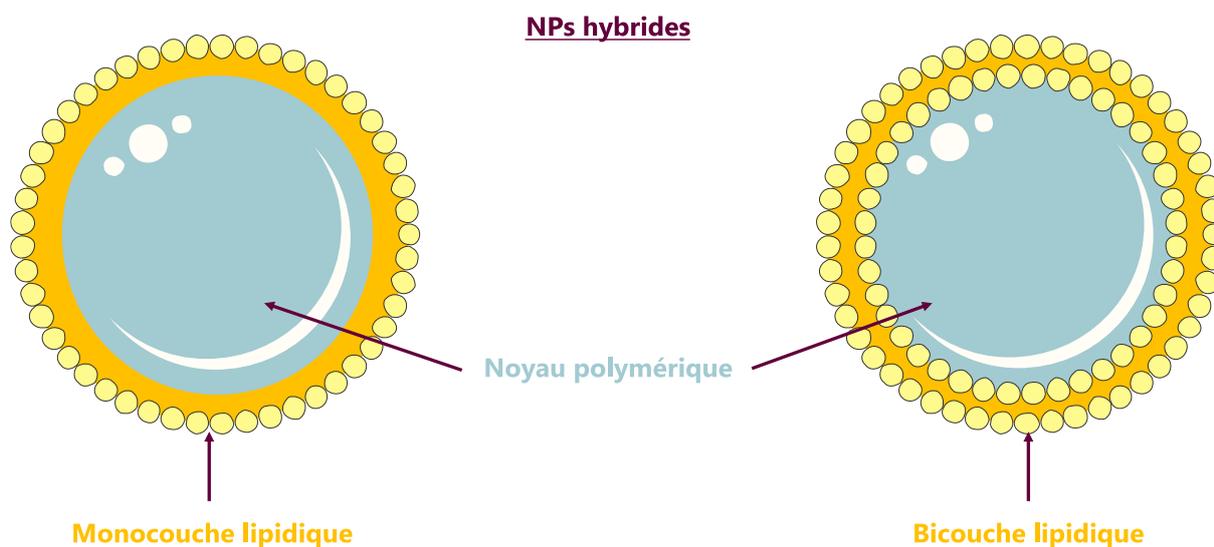
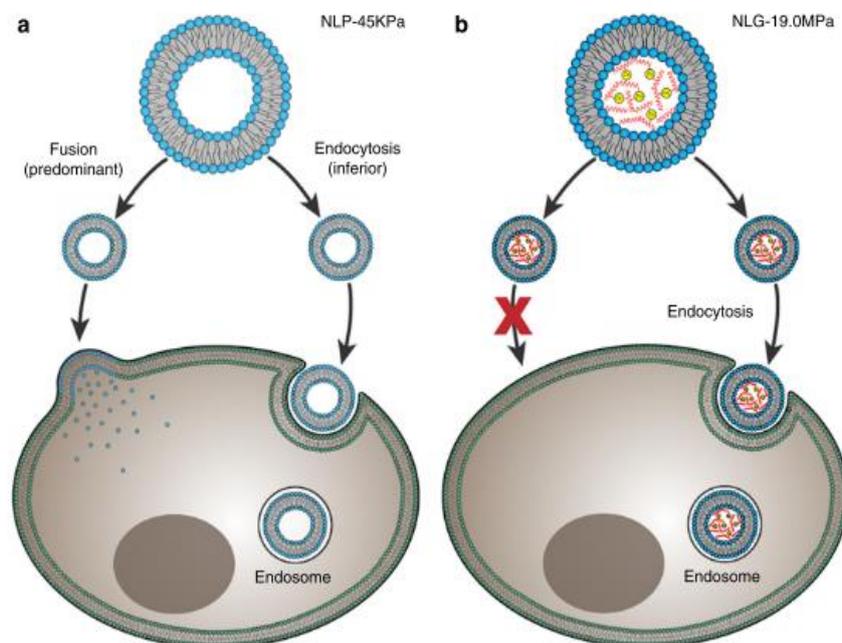


Figure 34 : Structures possibles des NPs hybrides

### III-3-4 Effet combiné de la rigidité et de la composition des NPs

Les mécanismes d'endocytose des NPs se sont révélés être différents en fonction de leur rigidité. Les NPs polymériques les plus souples sont majoritairement internalisées par macropinocytose, tandis que les plus rigides utilisent les voies médiées par les clathrines et les cavéoles. Les NPs avec un module d'Young intermédiaire sont quant à elles internalisées par de multiples mécanismes, ce qui entraîne un taux d'absorption plus élevé (Banquy et al. 2009; Hui et al. 2019).

Une autre étude, qui s'intéresse aux mécanismes empruntés par les nanoliposomes et les nanolipogels, a conclu d'une manière légèrement différente (Guo et al. 2018). Les liposomes, qui sont des types de nanovecteurs souples, fusionnent avec la membrane cellulaire de manière prédominante par rapport à l'endocytose, et libèrent le principe actif dans la cellule. En effet, les NPs souples se déformeraient, ce qui les rendrait énergétiquement défavorables à l'endocytose. Les nanolipogels, plus rigides, ne fusionnent pas avec la membrane, mais utilisent uniquement la voie des clathrines. Ces mécanismes sont représentés en Figure 35 (Guo et al. 2018). Il y a donc des différences mécanistiques en fonction de l'élasticité des NPs mais aussi en fonction de leur composition (lipidique, polymérique...).



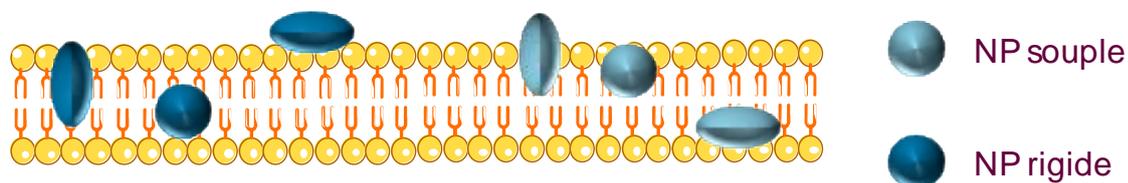
Cette théorie est confirmée dans l'étude de L. Zhang *et al.*, 2015, dans laquelle les résultats *in vitro* prouvent que les NPs plus rigides ont une efficacité d'absorption cellulaire plus élevée que les NPs souples. Cependant, les microparticules constituées d'un noyau et d'une coque de structure similaire à celle des NPs, présentent un effet biologique opposé à celui des NPs ; c'est-à-dire que les microparticules souples sont absorbées de manière plus efficace que les microparticules rigides. Ce phénomène pourrait être dû à la différence des voies d'absorption cellulaires mises en jeu, pour des particules de tailles différentes. Les NPs, seraient majoritairement absorbées par

endocytose, tandis que les microparticules, de taille supérieure à celle des NPs, seraient internalisées par un mécanisme de diffusion passive.

### *III-3-5 Effet combiné de la rigidité et de la morphologie des NPs*

Tous ces résultats sur l'effet de la rigidité de nanomatériaux sur leurs interactions avec le vivant ont été obtenus avec des NPs sphériques, alors que la morphologie des NPs est considérée depuis les dernières années, comme étant un paramètre important à prendre en compte. Dans une étude qui a été réalisée à ce sujet (Chen et al. 2018), il en ressort que plus les NPs sont souples, plus l'internalisation cellulaire des NPs sphériques et des NPs allongées verticalement par rapport à la membrane est ralentie. Au contraire, l'internalisation cellulaire est accélérée quand les NPs qui ont une forme allongée horizontalement par rapport à la membrane sont plus souples. Pour les NPs rigides, c'est l'inverse.

La souplesse/rigidité des NPs, corrélée à leur forme, a donc une très grande importance sur l'internalisation, car son efficacité peut être totalement inversée. L'internalisation théorique des NPs par la membrane en fonction de leur morphologie et de leur rigidité/élasticité, selon les résultats de cette publication est résumée en Figure 36.

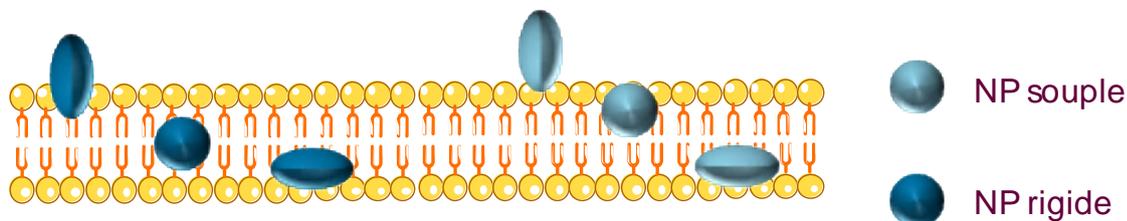


*Figure 36 : Vitesses d'internalisation théoriques des NPs par la membrane en fonction de leur morphologie et de leur rigidité/élasticité selon L. Chen et al., 2018*

Dans une seconde étude, les auteurs ont cherché la raison pour laquelle il y avait des différences de vitesses d'internalisation entre des NPs de mêmes taille et forme (Shen et al. 2019). L'efficacité de l'internalisation des NPs est guidée par 2 paramètres : la vitesse de recrutement des récepteurs qui vont permettre l'internalisation, et ce qui est appelé l'énergie de barrière. La vitesse de recrutement des récepteurs est déterminée par la vitesse de diffusion des récepteurs à la surface de la membrane, et par l'étendue de la surface de contact entre la NP et la membrane. L'énergie de barrière est principalement déterminée par les changements d'énergie libre des NPs et de la membrane.

Pour les NPs sphériques, les surfaces de contact sont similaires, que la NP soit souple ou rigide, par contre, les NPs sphériques souples ont une barrière énergétique nettement plus élevée que les NPs rigides, car elles se déforment beaucoup. En raison de l'augmentation de cette énergie de barrière, les NPs sphériques souples doivent recruter davantage de récepteurs pour pouvoir être internalisées, et sont donc plus lentement internalisées. De plus, la barrière énergétique augmente avec la taille des NPs, par conséquent, plus les NPs sont grandes, plus l'internalisation est lente.

Pour les NPs non sphériques, les NPs allongées horizontalement par rapport à la membrane, qu'elles soient souples ou rigides, doivent surmonter une plus grande énergie de barrière que les NPs allongées verticalement, cependant, elles sont complètement enveloppées par la membrane plus rapidement, donc seront plus vite internalisées que les NPs allongées verticalement. Les NPs allongées verticalement par rapport à la membrane, qu'elles soient souples ou rigides, seront toujours moins vite internalisées que les NPs sphériques ou allongées horizontalement. Dans cette étude, les mécanismes d'internalisation semblent donc être fortement gouvernés par la surface de contact entre la NP et la membrane, plus que par l'énergie de barrière. L'internalisation théorique des NPs par la membrane en fonction de leur morphologie et de leur rigidité/élasticité, selon les résultats de cette publication est résumée en Figure 37.



*Figure 37 : Vitesses d'internalisation théoriques des NPs par la membrane en fonction de leur morphologie et de leur rigidité/élasticité selon Shen et al., 2019*

Encore une fois, deux études concluent sur des résultats contradictoires. Il est très compliqué d'obtenir des résultats comparables entre les études, qui utilisent des méthodes, des modèles mathématiques, ou des valeurs d'élasticité et de rigidité différents.

Dans le cas de ces deux études, la méthode de modélisation utilisée était la même, soit la CGMD, et les valeurs de rigidité et d'élasticité sont définies, dans les deux cas, par le modèle d'Helfrich (Fedosov, Caswell, and Karniadakis 2010). Cependant, les modèles mathématiques des interactions ligand-récepteur, et certains paramètres comme la représentation des lipides de la membrane, entre autres, diffèrent. Cela pourrait expliquer, du moins en partie, les différences de vitesses d'internalisation des NPs par la membrane entre ces deux études.

### *III-3-6 Effet combiné de la rigidité et du caractère hydrophobe/hydrophile des NPs*

Une étude plus approfondie (Wang et al. 2019), prend en compte l'hydrophobicité des NPs, par simulation DPD (méthode de simulation de la dynamique des particules dissipatives). La simulation DPD est une méthode de simulation dynamique à grains dont chaque grain est composé de molécules soumises à trois types de forces : des forces conservatives, dissipatives et aléatoires. Elle intègre des particules, destinées à reproduire les forces hydrodynamiques propres à un fluide. Elle permet donc de reproduire, avec précision, le comportement dynamique de la bicouche lipidique (Shillcock and Lipowsky 2005).

Cette étude a démontré que les NPs rigides hydrophiles pénètrent mieux que les NPs souples, tandis que les NPs rigides hydrophobes pénètrent moins bien que les NPs souples. Les auteurs ont constaté que les NPs hydrophiles s'épandaient à la surface supérieure de la membrane cellulaire, en raison de l'attraction de celles-ci avec les têtes hydrophiles des phospholipides. En revanche, au cours de leur pénétration à travers la membrane, les NPs hydrophiles rencontrent les queues hydrophobes des phospholipides, et se retrouvent donc repoussées.

Il s'agit du mécanisme inverse pour les NPs hydrophobes : elles passent vite à travers la membrane car elles sont repoussées par la surface hydrophile, mais sont attirées par l'intérieur hydrophobe de la membrane qui les retient avant de pouvoir pénétrer complètement. Les NPs rigides hydrophiles et les NPs souples hydrophobes possèdent une plus faible barrière énergétique que leurs homologues hydrophobes et hydrophiles respectivement. En effet, l'énergie de barrière augmente quand il y a des répulsions entre la NP et la membrane, c'est-à-dire quand un élément hydrophile est en contact avec un élément hydrophobe, et inversement. Donc la plus faible énergie

de barrière pour une NP hydrophile quand elle est en contact avec la membrane hydrophobe, apparait quand sa surface de contact est réduite donc quand la NP est rigide. Au contraire, la plus faible énergie de barrière pour une NP hydrophobe quand elle est en contact avec une surface hydrophobe, apparait quand leur surface de contact est grande donc quand la NP est souple.

On déduit donc de cette étude que l'hydrophobicité et la déformation induite par les propriétés mécaniques des NPs, affectent conjointement le processus de pénétration des NPs à travers la membrane cellulaire.

### III-4 Impact des propriétés mécaniques sur la toxicité des NPs

Des études ont été réalisées afin de s'assurer qu'il n'y avait pas de différence de biocompatibilité et de biodégradabilité, c'est-à-dire *in fine* de toxicité, entre les NPs rigides et souples. Dans la plupart des tests de cytotoxicité standards réalisés, il a été démontré que des NPs d'élasticité diverses, mais de propriétés identiques, ne présentent pas de différences significatives en matière de toxicité (Liu et al. 2012; Merkel et al. 2011).

À travers ces différents articles, on se rend compte qu'il est extrêmement compliqué d'anticiper le comportement biologique des NPs. Effectivement, nombreuses sont les caractéristiques physico-chimiques et mécaniques à prendre en compte : la taille, la morphologie, la charge de surface, la composition chimique, l'hydrophobicité, la souplesse/rigidité... Toutes ces caractéristiques ont un impact fort sur les mécanismes biologiques, et il en ressort que les propriétés mécaniques ont un rôle prépondérant dans les interactions avec le vivant, c'est pourquoi il devient indispensable de bien les contrôler.

### III-5 Caractérisation des propriétés mécaniques des nanoparticules

Il existe actuellement une technique principalement utilisée pour caractériser les propriétés mécaniques des NPs, et plus particulièrement leur élasticité, qui permet de mesurer leur module d'Young ; il s'agit de la microscopie à force atomique (AFM). L'AFM est un appareil conçu pour effectuer une cartographie en relief de la surface d'un échantillon. Grâce à une sonde nanométrique (pointe à l'extrémité d'un *cantilever*), il est capable de balayer la surface d'un échantillon et ainsi nous renseigner sur sa topologie. On obtiendra alors une image en deux dimensions, d'une NP, d'un film, de cellules (Radmacher et al. 1992) etc..., avec une résolution proche de l'atome (de l'ordre de l'angström). Le principe de ce type d'appareil est décrit en Figure 38.

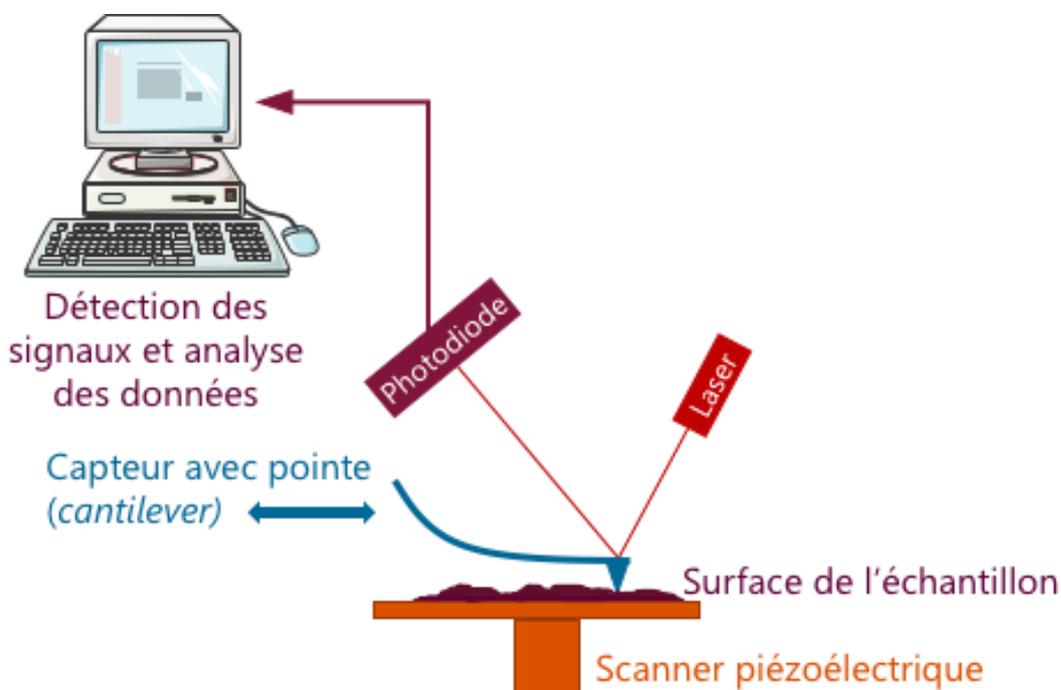


Figure 38 : Principe du microscope à force atomique (AFM)

La pointe du capteur se déplace sur l'échantillon, chaque changement de topologie fait varier la trajectoire du faisceau laser, celle-ci est détectée par une photodiode, puis les signaux sont analysés par outils informatiques, qui établiront une relation entre la variation de l'angle du faisceau laser et la topologie de surface de l'échantillon (Sitterberg et al. 2010).

Cette méthode nous informera sur la morphologie de la NP, mais ça n'est pas là son seul avantage ; elle pourra nous fournir des informations sur la conductivité, le potentiel de surface, le champ électrique ou encore l'élasticité des NPs. Cette dernière nous intéressera particulièrement, pour caractériser les propriétés mécaniques des

NPs (L. Zhang et al. 2015). La technique qui permet cela s'appelle la nano-indentation par AFM (Feindt 2018). Il existe deux types de pointe en fonction de la nature de l'échantillon à tester, la pointe à l'extrémité arrondie (modèle de Hertz), décrite en Figure 39 a) est plus adaptée aux échantillons de surface rigide, et l'extrémité pointue (modèle de Sneddon), décrite en Figure 39 b), sera plutôt utilisée dans le cadre d'échantillons plus mous.

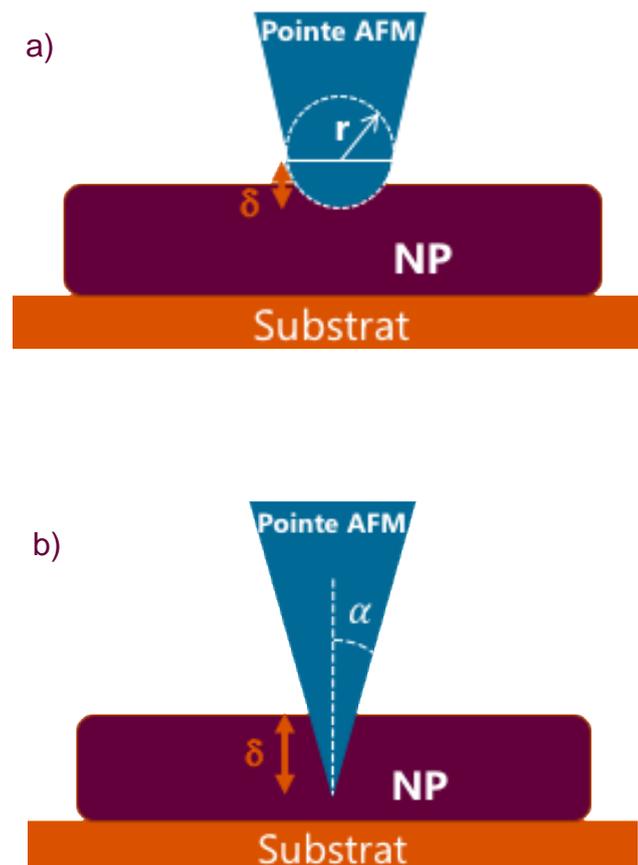


Figure 39 : Principe de la technique de nano-indentation par AFM

La sonde va exercer une force de compression sur la NP, ce qui va entraîner une déformation de celle-ci qui sera enregistrée sous la forme d'une courbe de force d'approche. Quand la sonde arrêtera d'appliquer cette force de compression, la pointe se relèvera, ce qui se traduira par l'enregistrement d'une courbe de force de retrait (Fischer, Stadler, and Erina 2013). Ces courbes de force d'approche et de retrait sont représentées sur le graphique en Figure 40.

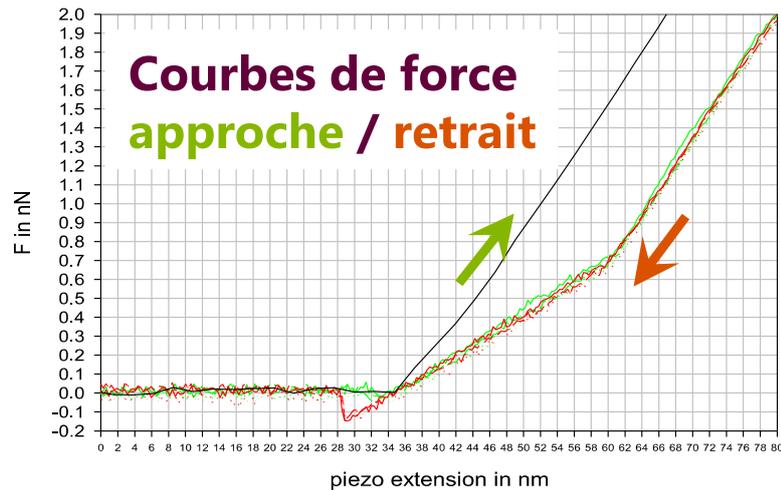


Figure 40 : Courbes de forces d'approche et de retrait obtenues par AFM

Il existe deux modes d'analyse en fonction du type d'échantillon dont on souhaite mesurer l'élasticité : le mode « contact », idéal pour les échantillons aux surfaces relativement rigides, et le mode « tapping », adapté aux échantillons de surface plus souple.

En mode « contact », la sonde reste en contact avec la surface tout au long de l'analyse. Le *cantilever* suit les déviations de la topographie, mais ce contact constant peut endommager à la fois l'échantillon (en particulier les échantillons mous) et la sonde, à cause des forces latérales qui apparaissent lors du mouvement de balayage.

En mode « tapping », le *cantilever* oscille et tape la surface au bas de son rebond (Giocondi et al. 2003).

Selon le mode utilisé, on choisira préférentiellement un modèle mathématique pour déterminer le module d'Young afin d'obtenir une valeur d'élasticité. Le modèle de Hertz classique, qui n'est valable qu'à une profondeur d'indentation beaucoup plus petite que le rayon de la pointe du capteur, n'est généralement pas applicable aux matériaux mous tels que les tissus biologiques et les liposomes, il sera donc utilisé en mode « contact ». L'équation mathématique du modèle de Hertz est représentée en Équation 5.

$$F = \frac{4}{3} \times \frac{E}{1 - \nu^2} \times \sqrt{r} \times \delta^{\frac{3}{2}}$$

*Équation 5 : Équation relative au modèle de Hertz*

Où  $F$  représente la force exercée par la pointe sur la surface,  $E$  le module d'Young,  $\nu$  le rapport de Poisson,  $r$  le rayon de la sphère qui modélise l'extrémité de la pointe (voir la Figure 39 a)) et  $\delta$  la déformation de surface.

Pour obtenir une estimation plus appropriée du module de Young des matériaux mous subissant une déformation finie, on adopte généralement la théorie de Sneddon, quand l'AFM est réglé en mode « tapping ». L'équation mathématique du modèle de Sneddon est représentée en Équation 6.

$$F = \frac{2}{\pi} \times \frac{E}{1 - \nu^2} \times \tan \alpha \times \delta^2$$

*Équation 6 : Équation relative au modèle de Sneddon*

Où  $F$  représente la force exercée par la pointe sur la surface,  $E$  le module d'Young,  $\nu$  le rapport de Poisson,  $\alpha$  la moitié de l'ouverture de l'angle de la pointe (voir la Figure 39 b)) et  $\delta$  la déformation de surface.

Une autre méthode de quantification des propriétés mécaniques des NPs consiste à mesurer les échantillons, non plus à l'échelle nanométrique comme avec l'AFM, mais à l'échelle macroscopique. Il s'agit de la rhéologie. Cette approche ne peut être appliquée directement à des NPs, mais peut être pratiquée sur des hydrogels, car ceux-ci peuvent être facilement synthétisés pour avoir une composition chimique identique aux NPs d'hydrogel, et donc avoir le même module de Young que ces NPs. Le module de cisaillement de l'hydrogel est obtenu grâce à l'utilisation d'un rhéomètre, puis converti en module d'Young en utilisant le rapport de Poisson.

## III-6 Caractérisation des interactions des NPs avec les membranes cellulaires

### III-6-1 Caractérisation par la microscopie confocale à balayage laser

Afin d'avoir des renseignements sur la manière dont les NPs pourront interagir avec le vivant, on pourra dans un premier temps effectuer des tests *in vitro* sur des membranes cellulaires. Par la suite, des tests *in vivo* pourront être envisagés si les résultats *in vitro* se sont montrés prometteurs, mais ils ne seront pas détaillés dans ce manuscrit.

La microscopie confocale à balayage laser est une des techniques les plus utilisées pour étudier l'association des NPs sur la surface de GUVs (« giant unilamellar vesicles », soit des vésicules unilamellaires géantes), mais également des cellules. Les GUVs sont des vésicules constituées d'une bicouche lipidique comprenant un ou plusieurs types de lipides amphiphiles (c'est-à-dire comprenant une partie hydrophile et une partie hydrophobe), dont le cœur et la surface sont hydrophiles, et l'intérieur de la bicouche est hydrophobe, et d'une taille allant de 1 à 200  $\mu\text{m}$ . La structure générale d'un GUV est représentée en Figure 41.

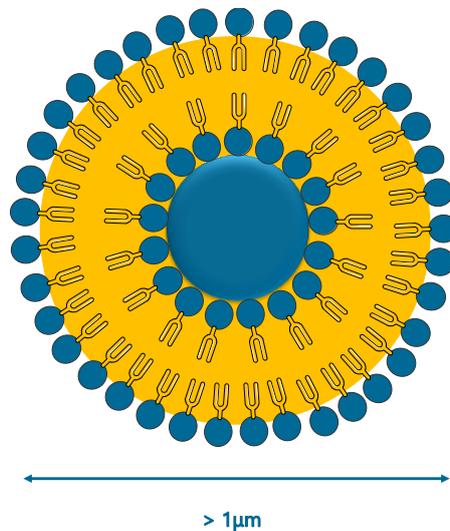


Figure 41 : Structure d'un GUV

*La partie hydrophile du lipide est représentée en bleu, sa partie hydrophobe en jaune.*

Il est très intéressant d'étudier l'interaction des NPs avec ces GUVs car ils ont la même structure que les cellules, elles aussi constituées d'une bicouche lipidique, mais la manipulation des GUVs est beaucoup plus aisée que celle des cellules. Les propriétés mécaniques des GUVs, en fonction des lipides qui les composent, peuvent

être très proches des propriétés mécaniques des cellules. En effet, dans la revue de Fenz & Sengupta, 2012, il a été reporté que des GUVs composés d'un mélange de DMPC (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), qui est un lipide, et de cholestérol, avaient un module de flexion très proche de celui des cellules, alors que des GUVs composés de DOPC (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), qui est également un lipide, avaient un module de flexion 5 fois inférieur à celui des cellules.

Les GUVs pourront donc être des modèles très intéressants, mais le choix des lipides les composant sera déterminant pour étudier le plus précisément possible, la pénétration des NPs à travers la bicouche lipidique. L'étude des interactions des NPs avec des cellules sera néanmoins nécessaire pour avoir des informations complémentaires et plus représentatives de ce qui aura lieu *in vivo*, car les GUVs ne permettent pas d'appréhender tous les mécanismes inhérents aux cellules. Comme indiqué précédemment, c'est la microscopie confocale à balayage laser qui permet d'étudier les associations des NPs à la surface des GUVs. La Figure 42 représente le type d'image que l'on peut obtenir avec cette technique, la surface de la membrane du GUV apparaît en vert. La Figure 43 représente l'interaction d'une NP, apparaissant en rouge comme dans la plupart des cas, avec la membrane d'un GUV en microscopie confocale à balayage laser.

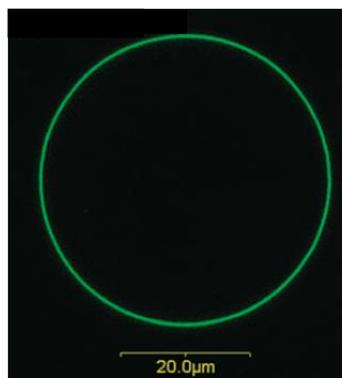


Figure 42 : Image de la membrane d'un GUV, obtenue en microscopie confocale à balayage laser (Ariola et al. 2006)

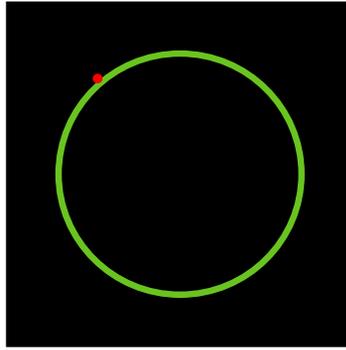


Figure 43 : Schéma d'une NP (en rouge) interagissant avec la membrane d'un GUV (en vert)

On pourra ainsi mieux comprendre les interactions des NPs avec les membranes cellulaires, en étudiant la vitesse d'association des NPs à la surface de la membrane du GUV, la pénétration ou non de la NP à travers la membrane, la vitesse de pénétration le cas échéant... Le principe de la microscopie confocale à balayage laser est représenté en Figure 44.

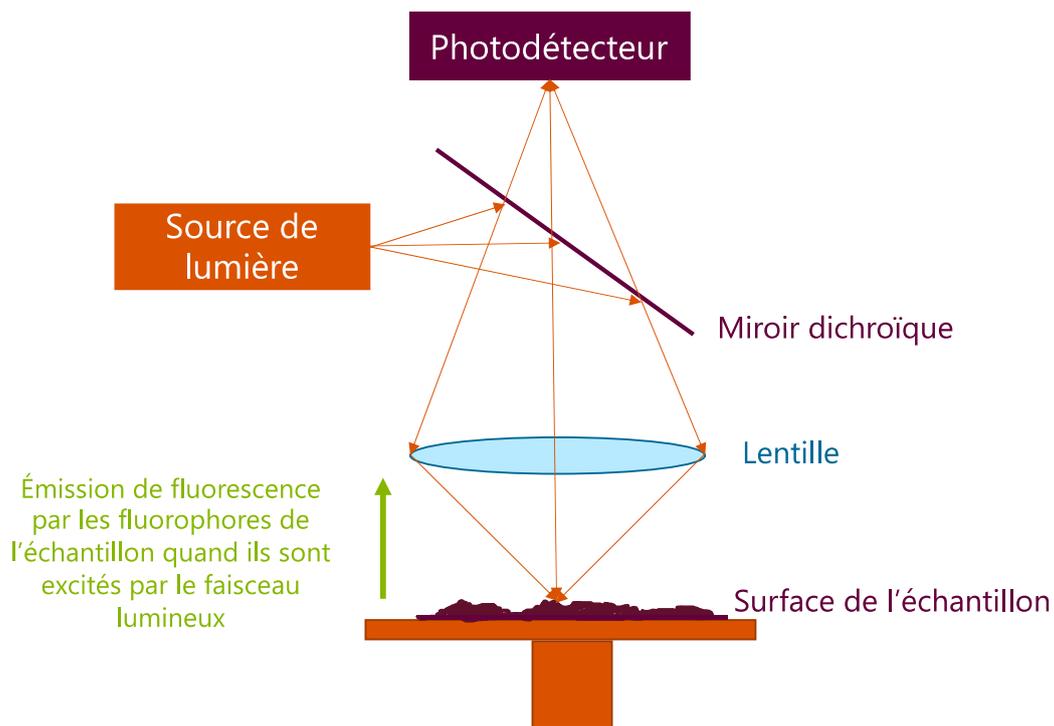


Figure 44 : Principe de la microscopie confocale à balayage laser

Le principe de ce microscope repose sur l'excitation des fluorophores de l'échantillon par un faisceau lumineux, le plus souvent un laser, mais il peut aussi fonctionner en fluorescence. Dans un premier temps il faut donc greffer des fluorophores sur l'échantillon (comme par exemple à la surface des NPs et à la surface des GUVs). Le faisceau laser est focalisé sur une petite partie de l'échantillon par un diaphragme (lentille). Si des fluorophores sont présents en ce point, ils émettent une

lumière ensuite filtrée par le miroir dichroïque, et l'image du point est retranscrite sur un écran. On déplace ensuite l'échantillon, ce qui permet de balayer sa surface avec le faisceau pour former l'image de fluorescence à une hauteur précise. On peut ensuite déplacer le faisceau verticalement puis recommencer pour ainsi obtenir différents plans de coupe, puis un traitement permet de reconstruire l'image en volume. Le microscope confocal permet donc de détecter les molécules fluorescentes avec une bonne résolution spatiale à 3 dimensions.

Cette méthode de caractérisation nous permettra de voir l'impact que peut avoir un changement dans les propriétés mécaniques de NPs, sur les membranes lipidiques.

### *III-6-2 Caractérisation par la cytométrie en flux*

Afin d'étudier plus en détails les interactions des NPs avec les membranes cellulaires, il sera possible de suivre la cinétique d'interaction et d'internalisation non plus par des GUVs, mais par des cellules Caco-2 et des macrophages, grâce à la microscopie confocale à balayage laser, mais aussi grâce à la vidéo-microscopie ou la cytométrie en flux. Cette dernière permet d'étudier précisément des particules isolées, ou des cellules etc... entraînées par un flux liquide ou gazeux. Cette technique de caractérisation nous donne des informations à la fois qualitatives et quantitatives sur les particules mises en suspension. Le principe de la cytométrie en flux est décrit en Figure 45.

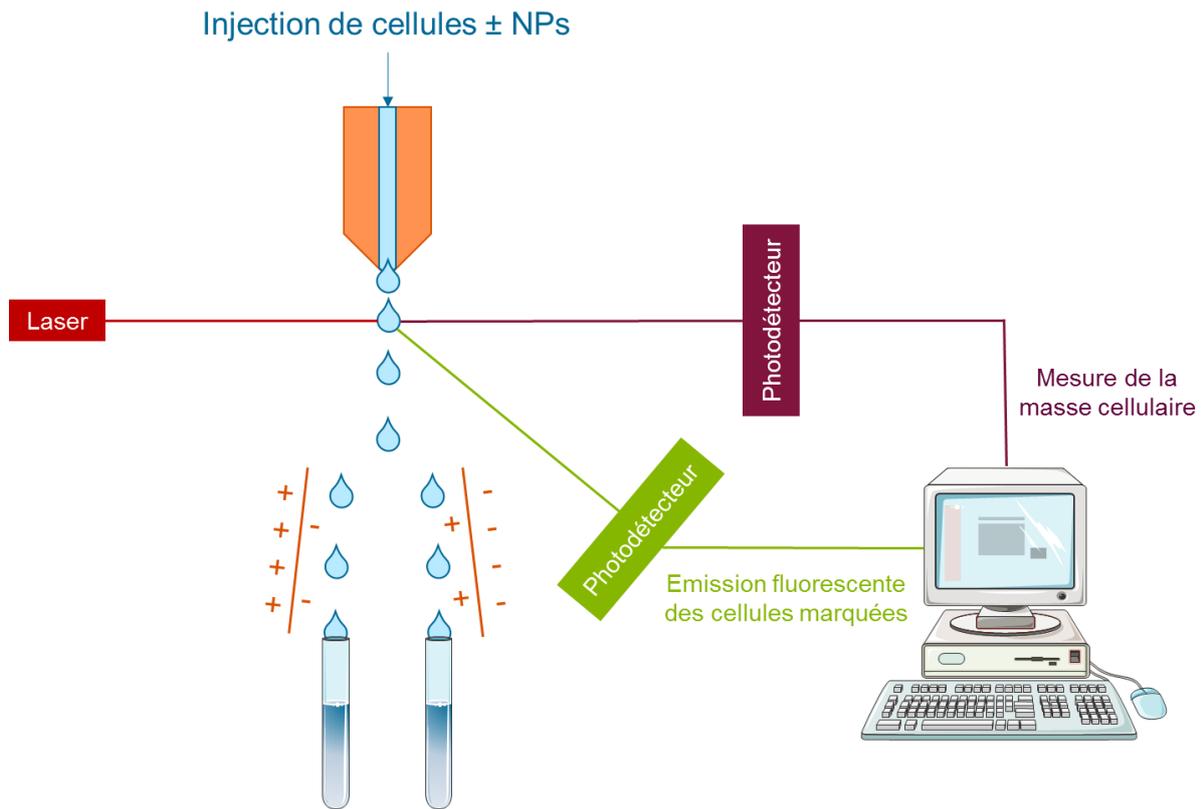


Figure 45 : Principe de la cytométrie en flux

L'appareil est composé de trois parties : une partie fluide, une partie optique, et enfin une partie électronique (informatique). La suspension de cellules, ou de cellules en présence de NPs dont on souhaite étudier les effets, passe au travers d'un faisceau lumineux, le plus souvent un laser. La lumière diffusée et émise, avec des angles caractéristiques en fonction de la nature de l'élément traversé, est récoltée par différents détecteurs après séparation des signaux par des filtres. Les composés présents dans l'échantillon sont séparés en fonction de leur charge (positive ou négative). Grâce à cette méthode, on peut déterminer : la taille des particules ou cellules, leur masse, leur granularité, leurs propriétés intrinsèques...

La cytométrie en flux nous permettra donc d'étudier l'influence des propriétés mécaniques des NPs sur les cellules, en comparant les signaux obtenus avec les cellules seules et avec les cellules en présence de NPs. Nous émettons l'hypothèse que ces changements d'élasticité des NPs peuvent avoir des impacts différents sur les signaux transmis aux détecteurs, et donc sur les cellules.

### III-6-3 Caractérisation par la QCM-D

La QCM-D (« quartz crystal microbalance with dissipation monitoring » = microbalance à cristal de quartz avec contrôle de la dissipation) est un appareil dont le principe repose sur l'oscillation d'un quartz piézoélectrique à une fréquence de résonance de 5 MHz, après application d'une tension alternative ; on dépose sur la surface du quartz une bicouche lipidique, qui reproduira la structure de la membrane cellulaire, et notre échantillon de NPs. Ce dépôt de NPs va perturber la fréquence d'oscillation du quartz d'une certaine manière en fonction de l'échantillon. Grâce à cette technique, il sera possible d'établir une relation entre la variation de masse de l'échantillon et la variation de fréquence d'oscillation du quartz, car cette variation de fréquence est proportionnelle à la variation de masse. De plus, cette méthode pourra nous renseigner sur les propriétés visco-élastiques de l'échantillon, car elle nous permettra de quantifier l'amortissement, et ainsi mesurer le facteur de dissipation relié aux propriétés visco-élastiques (Irwin et al. 2005). Le fonctionnement de la QCM-D est décrit en Figure 46 (Figure inspirée de (B.Wang 2011)).

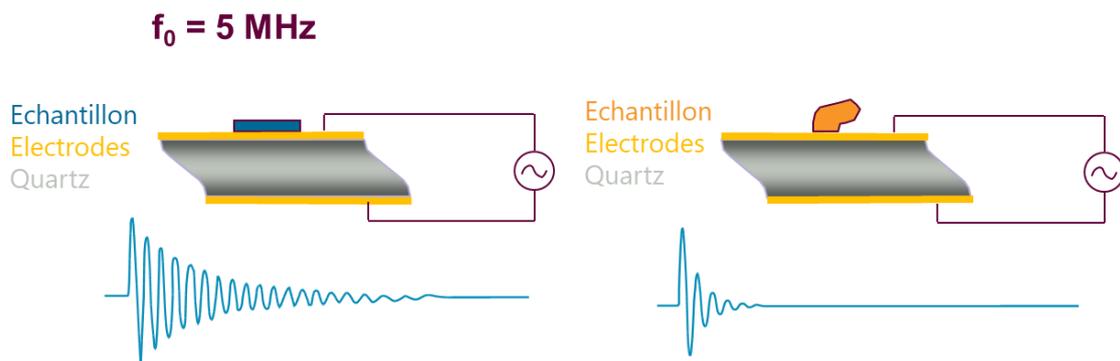


Figure 46 : Principe de la QCM-D (B.Wang 2011)

Si notre échantillon forme un film fin et rigide à la surface du quartz, l'amortissement de la fréquence d'oscillation du quartz sera lent et la dissipation sera faible. À l'inverse, si le film formé par l'échantillon est souple, l'amortissement sera rapide et la dissipation élevée. Ces informations sur la masse et les propriétés visco-élastiques de l'échantillon pourront être utiles pour déterminer l'association et donc les interactions et perturbations des NPs avec des membranes (Chen et al. 2016; Yousefi and Tufenkji 2016). De nombreuses autres applications de la QCM-D sont détaillées dans la revue de Cooper & Singleton, 2007.

### III-6-4 Caractérisation par la titration calorimétrique isotherme

La titration calorimétrique isotherme, ou ITC, est une technique de caractérisation qui repose sur une mesure directe de la chaleur libérée ou absorbée durant un évènement de liaison entre biomolécules. Elle permet une détermination de l'affinité de liaison, de la stœchiométrie, de l'entropie, et de l'enthalpie de la réaction de liaison en solution, sans avoir à recourir à un marquage. Elle nous permettra, dans notre cas, de mesurer l'adsorption de protéines ou de lipides membranaires à des NPs (Contini et al. 2018; Falconer and Collins 2011). En effet, lorsqu'une liaison s'effectue, de la chaleur est absorbée ou libérée. Cette chaleur est ensuite mesurée par un calorimètre hypersensible au cours d'une titration graduelle du ligand (ici les NPs) dans la cuve d'échantillonnage contenant la biomolécule étudiée (ici les protéines membranaires), et nous renseigne sur la nature et l'intensité de l'interaction. Le principe de fonctionnement de ce type d'appareil est décrit en Figure 47.

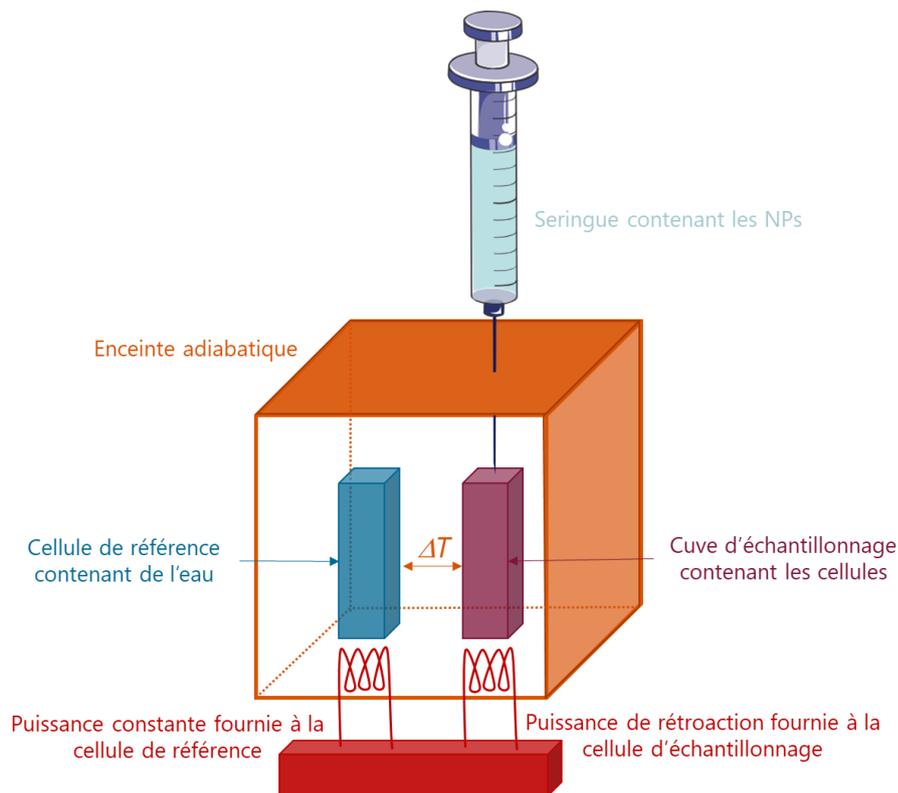


Figure 47 : Principe de la titration calorimétrique isotherme

Le microcalorimètre comporte deux cellules : une première cellule contient de l'eau et va servir de cellule de référence, la seconde contient l'échantillon à analyser. Le microcalorimètre doit maintenir ces deux cellules à la même température, et ce de manière extrêmement précise. Les dispositifs de mesure de la chaleur détectent la moindre différence de température entre la cellule de référence et celle de l'échantillon,

s'il y a eu la formation d'une liaison entre les protéines / lipides et les NPs, dès que ces dernières ont été ajoutées. En retour, les dispositifs qui mesurent la chaleur envoient l'information de la différence de chaleur aux dispositifs de chauffage, qui chauffent l'une ou l'autre des cellules pour compenser cette différence et ramener les deux cellules à la même température (Contini et al. 2018). La quantité de chaleur mesurée est directement proportionnelle au nombre de liaisons formées. Concernant l'interprétation des courbes obtenues qui sont générées par un système informatique :

- Si la réaction de liaison des NPs aux lipides et protéines est une réaction exothermique, c'est-à-dire qui dégage de la chaleur, la cellule contenant l'échantillon devient plus chaude que la cellule de référence, et les pics obtenus sur le graphique sont orientés vers le bas. À chaque injection de NPs correspond un nouveau pic, jusqu'à la saturation des liaisons possibles entre les NPs et les protéines ou lipides.
- Si la réaction de liaison des NPs aux biomolécules est une réaction endothermique, c'est-à-dire qui consomme de la chaleur, la cellule contenant l'échantillon devient moins chaude que la cellule de référence, et les pics obtenus sur le graphique sont orientés vers le haut.

Ce type d'appareil permet de comprendre la nature des interactions entre des protéines ou des lipides, et les NPs, et permet d'en explorer les moteurs thermodynamiques.

Grâce à cette technique, nous allons donc pouvoir étudier les micro-variations de températures engendrées, si les NPs ont interagi avec des protéines ou des lipides membranaires, et si cette interaction est importante ou non. En caractérisant la liaison des NPs avec des molécules membranaires, nous obtiendrons des renseignements sur l'interaction des NPs avec les membranes cellulaires. De plus, nous pourrons comparer les résultats obtenus avec des NPs de rigidités différentes, et déterminer si ces propriétés mécaniques ont un impact sur les interactions mises en jeu avec les membranes cellulaires.

### III-6-5 Caractérisation par la résonance plasmonique de surface

La résonance plasmonique de surface, ou RPS, est une technique qui permet de caractériser la liaison d'un ligand à son récepteur, ou dans notre cas, d'une NP à une bicouche lipidique de type membrane cellulaire (Stella et al. 2000). Le principe de la RPS repose sur l'excitation des électrons d'une surface métallique (or, cuivre, argent) à un certain angle, par un faisceau laser (photons). Les électrons excités permettent de convertir l'énergie des photons en plasmons au niveau de la surface métallique. Ce phénomène produit une onde ou champ électrique qui modifie l'angle de réfraction  $\theta$  du laser : cet angle de résonance changera en fonction de ce qui sera fixé à la surface. Le principe de la résonance plasmonique de surface, appliquée au cas des NPs, est représenté en Figure 48.

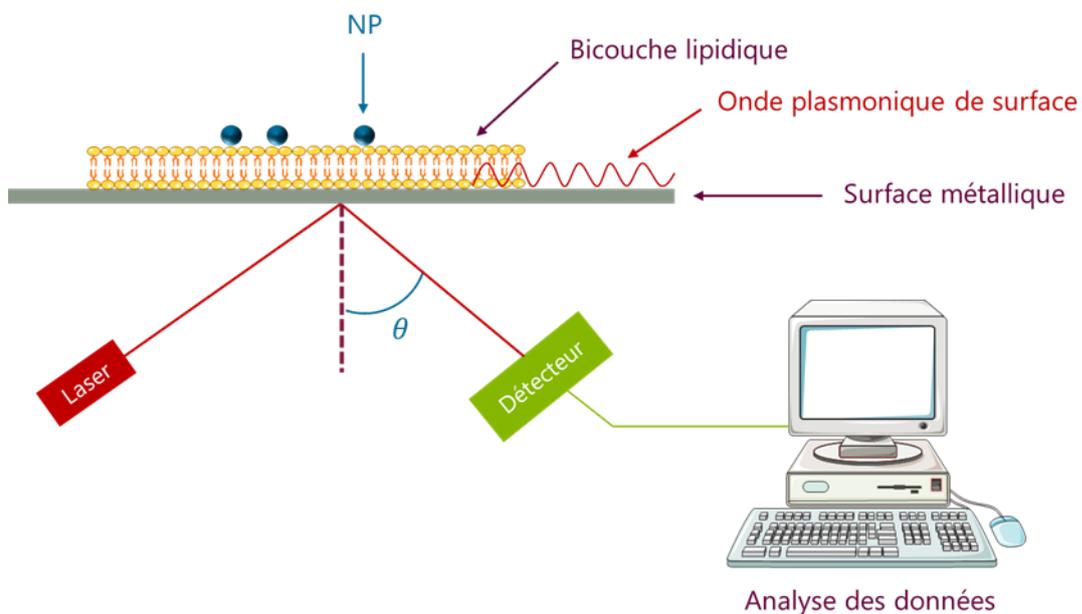


Figure 48 : Principe de la résonance plasmonique de surface (RPS)

#### IV- Modulation des propriétés mécaniques des nanoparticules

Il existe de nombreux procédés de formulation qui permettent de préparer des NPs aux propriétés mécaniques contrôlées. Ils reposent soit sur la composition intrinsèque des NPs (par exemple la concentration en polymère, en agent réticulant...), soit sur des procédés de fabrication (par exemple lyophilisation, agitation, chauffage...). De plus, il est possible d'agir soit pendant la formation des NPs, où ce sont les différents acteurs de la formation des NPs que l'on pourra faire varier pour moduler les propriétés mécaniques des NPs, soit après la formation des NPs, avec des facteurs extérieurs qui seront additionnés aux NPs préalablement préparées.

#### IV-1 Procédés de formulation aboutissant directement à des NPs de propriétés contrôlées

La première option qui s'offre à nous, pour préparer directement des NPs de propriétés mécaniques contrôlées, va donc être de jouer sur des éléments de formulation qui peuvent avoir un impact sur la rigidité des NPs. Les propriétés mécaniques des NPs d'hydrogel, par exemple, sont facilement contrôlables par différentes techniques. Ce type de NPs est caractérisé par une structure composée d'un réseau de polymères hydrophiles, dans un environnement riche en eau. Les paramètres pouvant avoir un impact sur la rigidité de l'hydrogel sont :

- La concentration en agent réticulant pendant la formation de l'hydrogel
- La concentration de monomères introduits durant la synthèse du gel
- Des paramètres de procédé tels que la lyophilisation (Hui et al. 2019). C'est le cas pour des micelles formées d'un copolymère dibloc de PLA - PEG (polylactide - poly(éthylène glycol)) en solution aqueuse, qui présentent un module d'Young plus élevé quand celles-ci sont lyophilisées (Stern et al. 2017).

En effet, on peut relativement facilement ajuster les propriétés mécaniques des NPs d'hydrogel. L'effet de la concentration en agent réticulant ou en monomère, sur la rigidité de l'hydrogel, est représenté dans la Figure 49 (Hui et al. 2019).

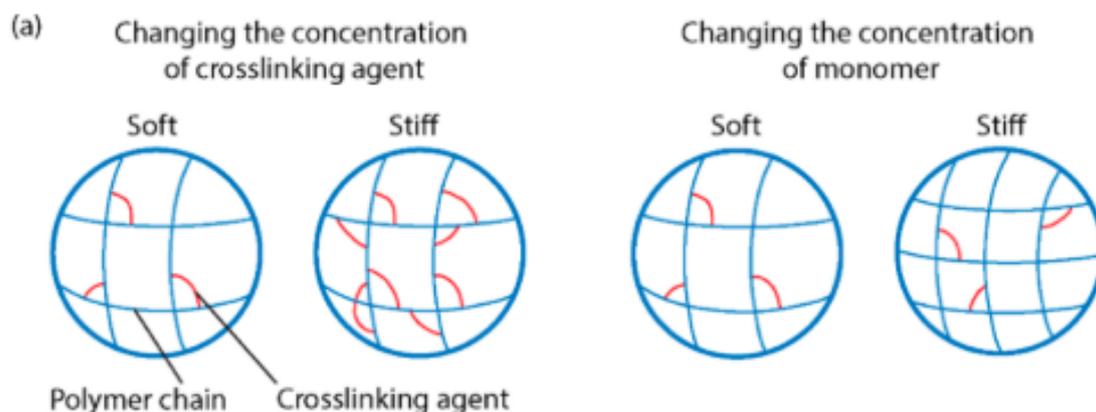


Figure 49 : Impact de la concentration en agent réticulant ou en monomère sur la rigidité finale de l'hydrogel (Hui et al. 2019)

Cet agent réticulant, comme son nom l'indique, va engendrer une réticulation. On entend par réticulation, la liaison par une sorte de « pont » entre deux molécules, de polymère par exemple. Ce « pont » peut être lui-même une molécule qui vient lier ses extrémités à deux chaînes de polymère, ou bien seulement une interaction ionique. Ces types de réticulation seront décrits plus en détail en partie IV-2-1.

La rigidité de NPs hybrides, composées d'un noyau polymérique et d'une bicouche lipidique, peut être facilement modulée, de deux manières. La première consiste à modifier le degré de réticulation du noyau polymérique interne (Guo et al. 2018), et la deuxième consiste à faire varier la quantité d'eau entre le noyau polymérique et l'enveloppe lipidique (Sun et al. 2015). Le fait d'augmenter la quantité d'eau entre le noyau et la couche superficielle de la NP diminue le module d'Young, et rend les NPs moins rigides. Le noyau polymérique joue un rôle important dans la rigidité des NPs hybrides. Si on décide de ne pas l'intégrer, on se retrouve avec une NP de structure de type liposome, qui possède un module d'Young plus faible. La conséquence du degré de réticulation du noyau, ou de la quantité d'eau présente entre le noyau et l'enveloppe, est représenté dans la Figure 50 (Hui et al. 2019).

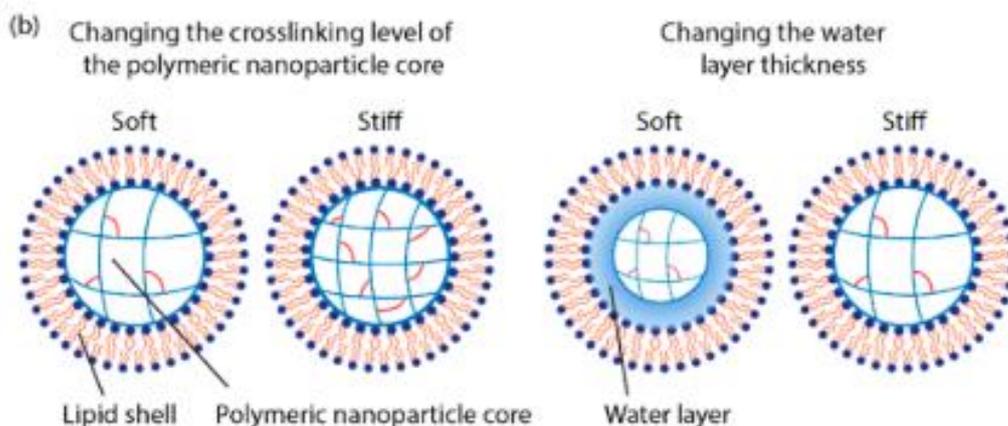


Figure 50 : Impact du degré de réticulation du noyau polymérique et de la quantité d'eau entre le noyau et l'enveloppe lipidique sur la rigidité des NPs (Hui et al. 2019)

Les nano-capsules (NCs) de silice sont composées d'un noyau lipidique et d'une enveloppe de silice (Y. Zhang et al. 2015). Il est possible de contrôler la rigidité des NCs de silice de deux manières, la première étant de changer de précurseur dans la synthèse de la silice (un organosilane pour les NCs souples et un alcoxyde de silicium pour les NCs rigides), et la seconde étant de faire varier l'épaisseur de la couche de silice (Zoldesi et al. 2008). Ces deux techniques de modulation de la rigidité sont présentées dans la Figure 51 (Hui et al. 2019).

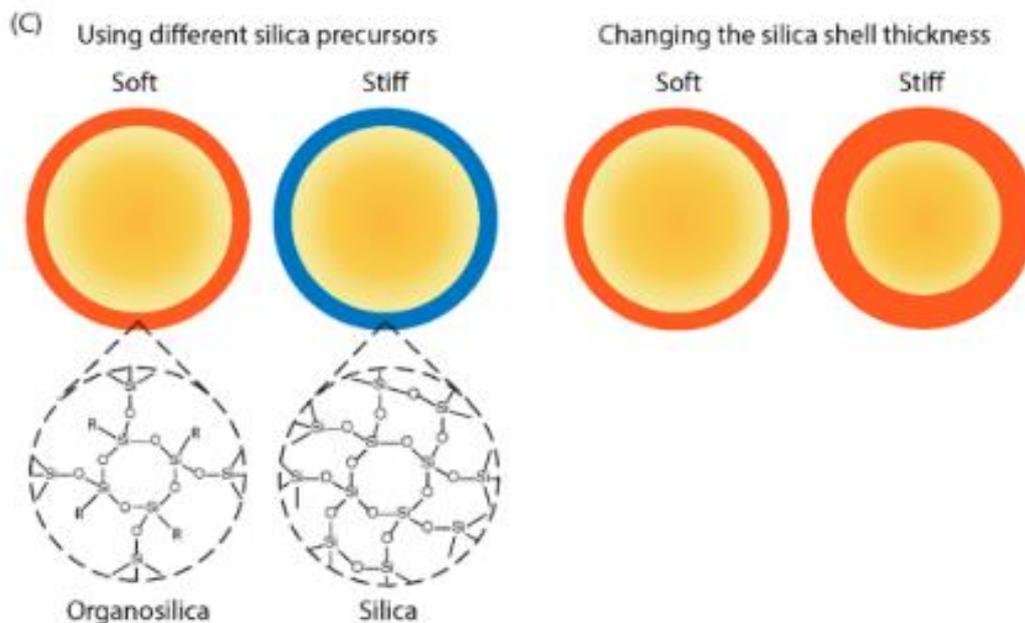


Figure 51 : Impact du type de précurseur utilisé dans la synthèse de la silice et de l'épaisseur de cette couche de silice (Hui et al. 2019)

Que ce soit pour l'hydrogel, pour les NPs hybrides comme pour les NCs de silice, plus on augmente la concentration en agent réticulant, plus le degré de réticulation augmente, et plus la rigidité augmente elle aussi. De même, plus le temps de réticulation augmente, plus la rigidité sera importante. La réticulation apparaît alors ici comme étant un moyen simple et efficace de faire varier les modules élastiques des NPs, dans une gamme de valeurs allant du kPa au GPa. La Figure 52 regroupe les différentes catégories de NPs en fonction de leur élasticité : plus on augmente le degré de réticulation, plus on va augmenter le module d'Young et ainsi rigidifier les NPs.

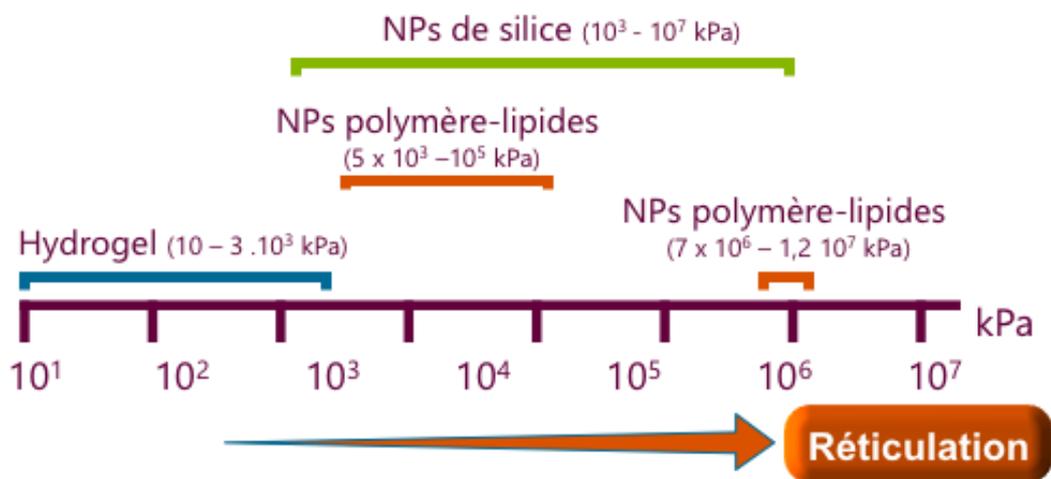


Figure 52 : Classification des différents types de NPs en fonction de la valeur de leur module d'élasticité

Les hydrogels possèdent un module d'Young entre 10 et  $3 \cdot 10^3$  kPa, ce qui en fait un des types de formulation les moins rigides. Entre  $10^3$  et  $10^7$  kPa, on retrouve les NPs de silice, qui couvrent une large plage de rigidité, car comme on vient de le voir, le type de précurseur utilisé pour synthétiser la silice a un impact sur la rigidité finale de la NP. Si le précurseur utilisé est un organosilane, on obtiendra des NPs souples, en revanche, si le précurseur est un alcoxyde de silicium, les NPs seront rigides. Cela s'explique par le fait que la structure de l'alcoxyde de silicium est beaucoup plus resserrée que celle de l'organosilane (voir Figure 51), ce qui aboutit à un maillage plus fin, et donc à une rigidité finale de la NP supérieure par rapport à une NP de silice préparée avec un organosilane.

Enfin, les NPs hybrides, composées à la fois de polymère et de lipides, peuvent avoir des valeurs de modules d'Young comprises entre  $5 \cdot 10^3$  et  $10^5$  kPa ou entre  $7 \cdot 10^6$  et  $1,2 \cdot 10^7$  kPa. Ces différences de rigidités relativement importantes, sont dues essentiellement à la composition de ces NPs hybrides. Si la NP possède une plus grande proportion de polymère par rapport aux lipides, elle sera plus rigide, et à l'inverse, si elle est majoritairement constituée de lipides, elle sera plus souple. Tous ces types de NPs pourront subir une réticulation, qui aura pour conséquence d'augmenter leur rigidité.

Un des avantages de ces techniques de modulation des propriétés mécaniques, est qu'elles n'engendrent aucun changement de taille, de forme ni des propriétés de surface des NPs, seule la rigidité varie.

Comme on vient de le voir, il existe différentes stratégies pour préparer des NPs de propriétés mécaniques contrôlées (Anselmo and Mitragotri 2017) :

- On peut jouer sur le choix du matériau qui composera l'enveloppe de la NP (Figure 53 d) : lipides, polymères, silices etc..., mais aussi quel type, car pour chacun de ces matériaux il en existe pléthore. Par exemple, si la NP est constituée de polymère, elle sera probablement plus rigide qu'une NP constituée de lipides, mais en faisant seulement varier le type de polymère, ou simplement son poids moléculaire, on pourra déjà avoir des résultats de rigidité différents.
- On peut également faire varier le nombre de couches du matériau utilisé (Figure 53 e), par exemple cela est couramment fait pour les NPs constituées de lipides, on peut faire une monocouche lipidique, une bicouche lipidique voire même une superposition de plusieurs couches. Plus on aura de couches de matériau lipidique, ou autre, plus la rigidité de la NP sera importante. Sans augmenter le nombre de couches, on peut tout simplement augmenter l'épaisseur de la couche, ce qui aura pour conséquence une rigidification de la NP. On peut, en outre, avoir à la place d'une NP constituée d'un noyau et d'une enveloppe (Figure 53 b), une NP avec seulement comme noyau une matrice polymérique par exemple, et pas de couche supplémentaire autour (Figure 53 a).
- On peut aussi ajouter un agent réticulant, qui pourra réticuler le noyau de la NP et/ou son enveloppe (Figure 53 f). Il aura pour but de rigidifier la NP, plus on en ajoutera, plus la NP deviendra rigide.
- Une technique moins courante mais tout aussi efficace, est la modulation de la porosité des NPs. Plus la NP sera poreuse, moins sa rigidité sera importante.
- Enfin, on a la possibilité de maintenir ou non le noyau qui constitue la NP, et ne garder que l'enveloppe (Figure 53 c). Si on décide de laisser le noyau, on obtiendra une NP plus rigide que si on lui retire. On peut bien évidemment reprendre toutes les possibilités des points précédents, pour une NP pour laquelle on aurait retiré le noyau.

Toutes ces options sont représentées en Figure 53.

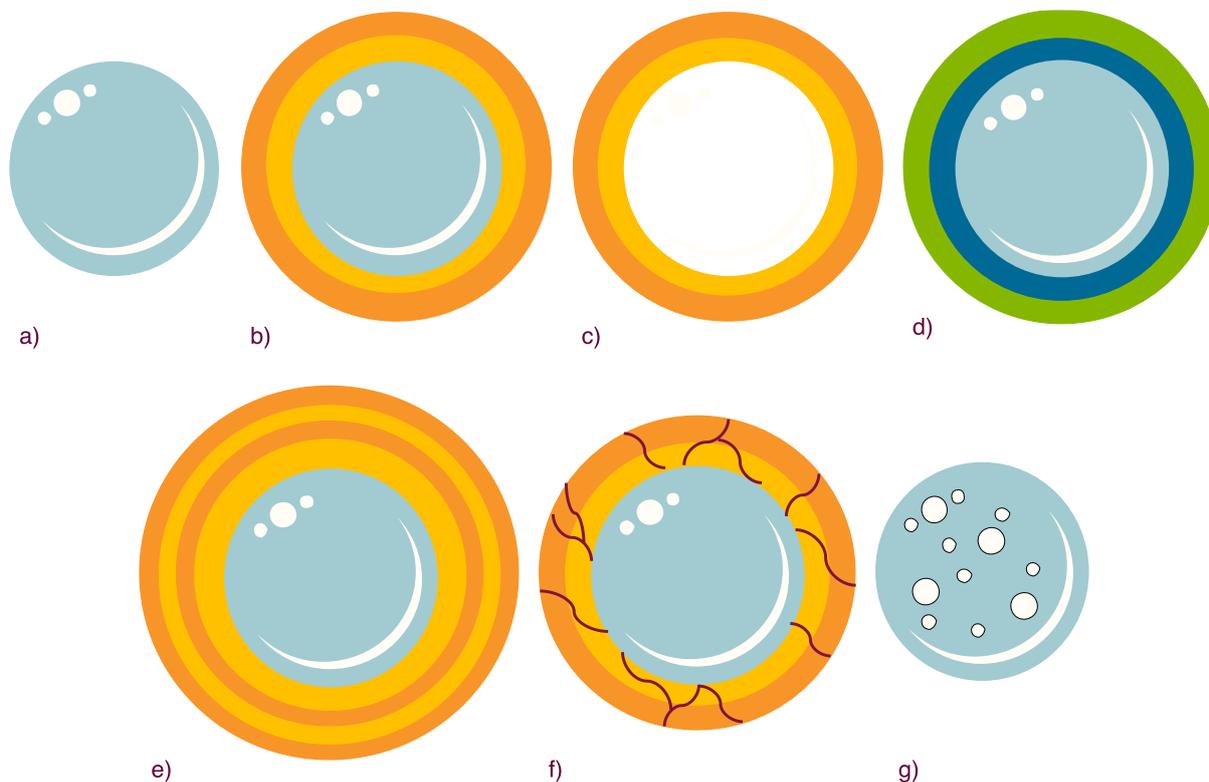


Figure 53 : Stratégies de modulation de l'élasticité des NPs

- a) NP seulement composée d'un noyau
- b) NP composée d'un noyau et d'une enveloppe
- c) NP pour laquelle on a retiré le noyau et où seule l'enveloppe subsiste
- d) NP dont l'enveloppe est composée d'un autre type de matériaux
- e) NP dont l'épaisseur ou le nombre de couches de l'enveloppe est augmenté
- f) NP dont l'enveloppe a été réticulée
- g) NP poreuse

Pour mettre au point des NPs de rigidité contrôlée, on peut les préparer avec des polymères ayant eux-mêmes une rigidité contrôlée. De cette manière, en changeant chimiquement le polymère (masse molaire, hydrophilie, ajout de substituant, nature des substituants...), on pourra moduler sa rigidité, et ainsi moduler la rigidité finale de la NP polymérique obtenue.

## IV-2 Procédés de formulation permettant de modifier la rigidité de NPs préalablement préparées

Comme on vient de le voir dans ces différents exemples, la réticulation apparaît comme une méthode simple et efficace pour contrôler la rigidité de NPs (Lemcoff et al. 2004), de gels (P.E. Donnelly, T. Chen 2016), de films (Liling et al. 2016), etc...

Parmi les paramètres que l'on pourra faire varier pour moduler la rigidité de NPs préparées au préalable, on trouvera également la réticulation mais appliquée secondairement, c'est à dire non pas durant la formation des NPs mais une fois les NPs formées, en ajoutant un agent réticulant qui va venir réticuler les molécules situées en surface des NPs, et ainsi rigidifier leur structure. Il sera donc envisageable de faire varier : le temps de réticulation, la concentration en agent réticulant, mais aussi la durée de stockage des NPs (Weiss et al. 2019), et encore bien d'autres paramètres.

Le type d'agent réticulant, en fonction du groupement chimique qu'il réticule, a un fort impact sur les propriétés mécaniques, mais aussi sur la microstructure des NPs (en lien avec leur porosité et leur aptitude à absorber de l'eau), leur morphologie, leurs propriétés thermiques, leur stabilité, etc...(Kumar et al. 2017).

Il existe deux principaux types de réticulation : la réticulation chimique et la réticulation physique. La réticulation chimique pourrait comprendre, en particulier pour les NPs d'hydrogel (Hamidi, Azadi, and Rafiei 2008) :

- La réticulation enzymatique
- La réticulation *via* des réactions entre groupements chimiques : avec des aldéhydes, des réactions d'addition ou de condensation, telles que les réactions de Schiff (Huaping et al. 2011) ou de Diels-Alder (Wang et al. 2018)
- La réticulation par polymérisation radicalaire
- La réticulation par irradiation

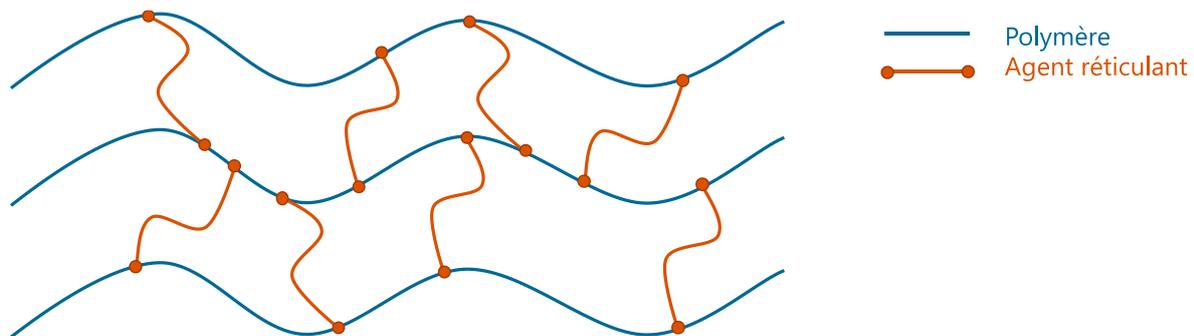
Quant à la réticulation physique, elle peut mettre en jeu (Hamidi et al. 2008):

- Des réactions de photo-réticulation
- Des réactions thermo-réactives (Wang et al. 2018)
- Des réactions pH-réactives (Elsner et al. 2006)
- Des interactions ioniques (Khunmanee, Jeong and Park, 2017)
- Des réactions entre un bloc amphiphile et un copolymère greffé
- Des réactions de cristallisation, par des systèmes homopolymères ou par la formation de stéréocomplexes

#### *IV-2-1 Influence du type de réticulation des NPs mis en jeu sur leurs propriétés mécaniques*

Comme il a été évoqué précédemment, il existe de nombreuses méthodes de réticulation envisageables pour augmenter la rigidité des NPs.

D'une manière générale, qu'elle soit physique ou chimique, la réticulation va nous permettre, par exemple, de relier deux chaînes de polymères constituant la NP, entre elles, et former ainsi un réseau tridimensionnel. Le fait de relier des molécules entre elles va engendrer un maillage plus dense de la structure des NPs, ce qui aura pour conséquence d'augmenter leur rigidité. Le principe de la réticulation chimique est représenté en Figure 54.



*Figure 54 : Principe de la réticulation chimique*

Ce type de réticulation est caractérisé par la formation de liaisons covalentes entre les chaînes de polymères, par le biais d'un agent chimique qui vient réaliser cette liaison. Le principe de la réticulation physique est représenté en Figure 55.

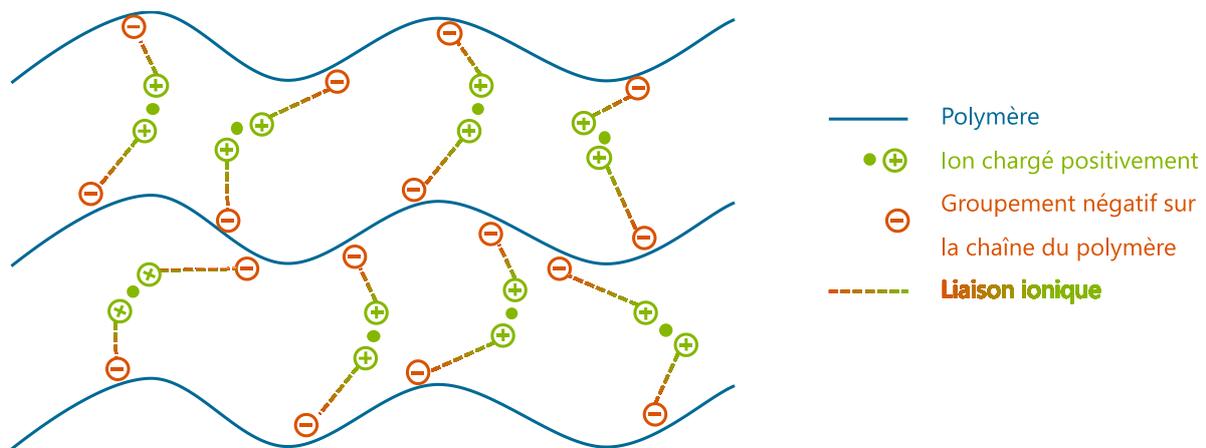


Figure 55 : Principe de la réticulation physique

La réticulation physique met en jeu non plus des liaisons covalentes, mais des liaisons ioniques. Ce procédé est plus simple que la réticulation chimique, et ne se fait pas *via* des agents réticulants le plus souvent toxiques et difficiles à éliminer.

Nous pouvons facilement imaginer que plus la concentration en agent réticulant ou en ion chargé positivement sera importante, plus le maillage du réseau de polymère sera fin, et plus la rigidité sera élevée. Le degré de réticulation a donc un fort impact sur les propriétés mécaniques des NPs.

#### IV-2-2 Influence du temps de stockage des NPs sur leurs propriétés mécaniques

Dans l'article de Weiss *et al.*, 2019, il a été démontré que la durée de stockage de NPs préalablement préparées, en l'occurrence ici de NPs d'hydrogel, avait un impact sur leurs propriétés mécaniques. En effet, les NPs d'hydrogel stockées pendant 4 semaines à 4°C, présentent un module d'Young plus important, et donc une rigidité plus élevée, que les NPs d'hydrogel pour lesquels les mesures des propriétés mécaniques ont été réalisées au bout d'une journée. De plus, cet effet du stockage sur les propriétés mécaniques est d'autant plus important que le temps de réticulation était élevé. Ici, la réticulation de l'hydrogel avec du glutaraldéhyde en tant qu'agent réticulant, a duré 3, 6, ou 9h. Ce temps de réticulation modulé seul, n'a aucun impact sur le module d'Young, qu'il soit de 3, 6, ou 9h : la rigidité des NPs est la même. En

revanche, quand ce temps de réticulation est associé à la durée de stockage, plus le temps de réticulation et le stockage augmentent, plus le module d'Young est élevé.

Grâce à cette étude, nous avons donc la preuve que des éléments externes à la préparation des NPs, comme leur durée de stockage, peuvent avoir un impact significatif sur leurs propriétés mécaniques.

#### *IV-2-3 Influence de la lyophilisation des NPs sur leurs propriétés mécaniques*

Certains procédés de fabrication, comme la lyophilisation, peuvent avoir une incidence sur les propriétés mécaniques des NPs. Effectivement, ce procédé se caractérise par l'élimination de l'eau contenue dans un échantillon de NPs par exemple. Or, l'eau contenue dans l'échantillon a des conséquences sur l'élasticité des NPs. Un échantillon de NPs non lyophilisé, qui contient une certaine quantité d'eau, aura un module d'Young plus faible qu'un échantillon de NPs lyophilisé, pour lequel toute l'eau aura été éliminée. L'absence d'eau sera donc caractérisée par des NPs plus rigides. C'est ce qui a été démontré dans l'étude de Stern *et al.*, 2017, où la lyophilisation de micelles de PLA-PEG a engendré une augmentation d'environ 100 kPa par rapport aux micelles non lyophilisées.

Les procédés de fabrication, comme la lyophilisation, peuvent donc bel et bien avoir un impact sur les propriétés mécaniques finales des NPs.

#### *IV-2-4 Influence de la température sur des NPs thermo-réactives*

Il existe quelques études dans lesquelles il a été mis en évidence que des nanocapsules, contenant un matériau thermo-sensible, pouvaient voir leur élasticité varier quand on leur appliquait différents stimuli extérieurs tels que des changements de température. Il s'agit donc, comme nous l'avons vu précédemment, d'un nanovecteur de 4<sup>ème</sup> génération.

Dans l'étude de Mueller *et al.*, 2005, les auteurs ont démontré que lorsque qu'ils chauffaient des nanocapsules à 35°C, ils obtenaient une diminution du module d'Young d'une centaine de MPa à seulement quelques MPa, ce qui se traduisait donc par une augmentation de l'élasticité avec la température. À cette température de 35°C, cette transition est réversible quand le matériau revient à température ambiante, donc les nanocapsules sont capables de se rigidifier à nouveau. Quand les auteurs chauffaient au-dessus de 35°C, par exemple à 70°C, ils diminuaient la rigidité de la

capsule mais cette opération était irréversible car elle entraînait la fusion de la paroi de la capsule, qui devenait beaucoup plus rigide qu'à l'origine lorsque qu'elle revenait à température ambiante.

Nous avons donc des éléments qui prouvent qu'il est possible d'augmenter l'élasticité d'une NP, ou au contraire la diminuer, en chauffant plus ou moins le système.

## V- Conclusion

Dans ce manuscrit, nous avons démontré que suite à son administration, le nanomédicament doit surmonter différents obstacles biologiques, afin de parvenir à sa cible thérapeutique. Parmi différentes propriétés physico-chimiques, les propriétés mécaniques des nanoparticules sont apparues comme jouant un rôle incontestable dans de nombreux mécanismes biologiques, comme la pénétration cellulaire, la circulation sanguine, la biodistribution, l'échappement au système immunitaire etc...

Selon la majorité des études analysées, il en ressort que les NPs souples s'accumulent davantage dans les tissus, circulent plus longtemps dans la circulation sanguine et sont moins vite éliminées que les NPs rigides. Les NPs souples auraient donc de plus grandes chances d'être efficaces. Ceci pourrait, en partie, expliquer pourquoi à l'heure actuelle, les nanomédicaments sur le marché sont des NPs à base de lipides ou liposomes, soient des nanovecteurs souples (Shi et al. 2017).

Cependant, malgré ces résultats, il n'est pas si simple de conclure à une meilleure efficacité des NPs souples en toutes circonstances. En effet, la grande hétérogénéité biologique des pathologies, notamment dans les cas de cancers, induite à la fois par des facteurs génétiques mais aussi par des facteurs extrinsèques, complique l'analyse des résultats. D'autre part, les autres paramètres physico-chimiques et méthodes de caractérisation des propriétés mécaniques ne sont pas les mêmes selon les études. Tous ces éléments nous amènent à des résultats non comparables et contradictoires entre les études.

Les propriétés mécaniques des NPs apparaissent donc comme étant indispensables à contrôler dans le développement de tout nanomédicament. L'enjeu sera de standardiser les méthodes de caractérisation des propriétés mécaniques des nanovecteurs, tout en prenant en compte l'impact de ces propriétés mécaniques combinées à d'autres paramètres physico-chimiques, afin d'obtenir des résultats comparables et pouvoir tirer des conclusions claires sur l'impact des propriétés mécaniques des NPs sur les mécanismes biologiques.

## VI- Références bibliographiques

Abdelwahed, Wassim, Ghania Degobert, Serge Stainmesse, and Hatem Fessi. 2006. "Freeze-Drying of Nanoparticles: Formulation, Process and Storage Considerations." *Advanced Drug Delivery Reviews* 58(15):1688–1713.

Abu Lila, Amr S., Hiroshi Kiwada, and Tatsuhiro Ishida. 2013. "The Accelerated Blood Clearance (ABC) Phenomenon: Clinical Challenge and Approaches to Manage." *Journal of Controlled Release* 172(1):38–47.

Adi, Handoko, Paul M. Young, Hak Kim Chan, Helen Agus, and Daniela Traini. 2010. "Co-Spray-Dried Mannitol-Ciprofloxacin Dry Powder Inhaler Formulation for Cystic Fibrosis and Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 40(3):239–47.

Ahmad, Usama, Zeeshan Ahmad, Ahmed Abdullah Khan, Juber Akhtar, Satya Prakash Singh, and Farhan Jalees Ahmad. 2018. "Strategies in Development and Delivery of Nanotechnology Based Cosmetic Products." *Drug Research* 68(10):545–52.

Amoyav, Benzion, and Ofra Benny. 2019. "Microfluidic Based Fabrication and Characterization of Highly Porous Polymeric Microspheres." *Polymers* 11(3).

Anselmo, Aaron C., and Samir Mitragotri. 2017. "Impact of Particle Elasticity on Particle-Based Drug Delivery Systems." *Advanced Drug Delivery Reviews* 108:51–67.

Anselmo, Aaron C., Mengwen Zhang, Sunny Kumar, Douglas R. Vogus, Stefano Menegatti, Matthew E. Helgeson, and Samir Mitragotri. 2015. "Elasticity of Nanoparticles Influences Their Blood Circulation, Phagocytosis, Endocytosis, and Targeting." *ACS Nano* 9(3):3169–77.

Ariola, Florly S., Deepti J. Mudaliar, Ronn P. Walvick, and Ahmed A. Heikal. 2006. "Dynamics Imaging of Lipid Phases and Lipid-Marker Interactions in Model Biomembranes." *Physical Chemistry Chemical Physics* 8(39):4517–29.

Arpagaus, Cordin. 2019. "PLA/PLGA Nanoparticles Prepared by Nano Spray Drying." *Journal of Pharmaceutical Investigation* 49(4):405–26.

Azzazy, Hassan M. E., and Mai M. H. Mansour. 2009. "In Vitro Diagnostic Prospects of Nanoparticles." *Clinica Chimica Acta* 403(1–2):1–8.

B.Wang, E. V. Ansly. 2011. *Surface Plasmon Resonance and Quartz Crystal Microbalance Methods for Detection of Molecular Interactions, in Chemosensors: Principles, Strategies, and Applications.*

Banquy, Xavier, Fernando Suarez, Anteneh Argaw, Jean Michel Rabanel, Peter Grutter, Jean François Bouchard, Patrice Hildgen, and Suzanne Giasson. 2009. "Effect of Mechanical Properties of Hydrogel Nanoparticles on Macrophage Cell Uptake." *Soft Matter* 5(20):3984–91.

Barenholz, Yechezkel. 2012. "Doxil® - The First FDA-Approved Nano-Drug: Lessons Learned." *Journal of Controlled Release* 160(2):117–34.

Beningo, Karen A., and Yu-li Wang. 2002. "Fc-Receptor-Mediated Phagocytosis Is Regulated by Mechanical Properties of the Target."

Bernabeu, Ezequiel, Maximiliano Cagel, Eduardo Lagomarsino, Marcela Moretton, and Diego A. Chiappetta. 2017. "Paclitaxel: What Has Been Done and the Challenges Remain Ahead." *International Journal of Pharmaceutics* 526(1–2):474–95.

- Bertrand, Nicolas, and Jean Christophe Leroux. 2012. "The Journey of a Drug-Carrier in the Body: An Anatomico-Physiological Perspective." *Journal of Controlled Release* 161(2):152–63.
- Best, James P., Yan Yan, and Frank Caruso. 2012. "The Role of Particle Geometry and Mechanics in the Biological Domain." *Advanced Healthcare Materials* 1(1):35–47.
- Biazar, Esmaeil, Majdi, Mandana Zafari, Maryam Avar, Saba Aminifard, Davood Zaeifi, Ai, Jafarpour, Montazeri, and Gh. 2011. "Nanotoxicology and Nanoparticle Safety in Biomedical Designs." *International Journal of Nanomedicine* 1117.
- Bottini, Massimo, Cristiano Sacchetti, Antonio Pietroiusti, Stefano Bellucci, Andrea Magrini, Nicola Rosato, and Nunzio Bottini. 2014. "Targeted Nanodrugs for Cancer Therapy: Prospects and Challenges." *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 14(1):98–114.
- Boudier, Ariane, Arnaud Pallota, and Igor Clarot. 2020. "Nanoparticules et Médicaments." *Innovation, Nanosciences et Nanotechnologies* 33(0).
- Carboni, Erik, Katherine Tschudi, Jaewook Nam, Xiuling Lu, and Anson W. K. Ma. 2014. "Particle Margination and Its Implications on Intravenous Anticancer Drug Delivery." *AAPS PharmSciTech* 15(3):762–71.
- Chauhan, Abhay Singh. 2018. "Dendrimers for Drug Delivery." *Molecules* 23(4).
- Chen, Feng, Emily Ehlerding, and Weibo Cai. 2014. "Theranostic Nanoparticles."
- Chen, Liping, Xuejin Li, Yunhan Zhang, Tongwei Chen, Shiyan Xiao, and Haojun Liang. 2018. "Morphological and Mechanical Determinants of Cellular Uptake of Deformable Nanoparticles." *Nanoscale* 10(25):11969–79.
- Chen, Qian, Shengming Xu, Qingxia Liu, Jacob Masliyah, and Zhenghe Xu. 2016. "QCM-D Study of Nanoparticle Interactions." *Advances in Colloid and Interface Science* 233:94–114.
- Contini, Claudia, Matthew Schneemilch, Simon Gaisford, and Nick Quirke. 2018. "Nanoparticle–Membrane Interactions." *Journal of Experimental Nanoscience* 13(1):62–81.
- Cooper, Matthew A., and Victoria T. Singleton. 2007. "A Survey of the 2001 to 2005 Quartz Crystal Microbalance Biosensor Literature: Applications of Acoustic Physics to the Analysis of Biomolecular Interactions." *Journal of Molecular Recognition* 20(3):154–84.
- Csaba, Noemi, Marcos Garcia-Fuentes, and Maria Jose Alonso. 2009. "Nanoparticles for Nasal Vaccination." *Advanced Drug Delivery Reviews* 61(2):140–57.
- Cunha, S., M. H. Amaral, J. M. Sousa Lobo, and A. C. Silva. 2017. "Lipid Nanoparticles for Nasal/Intranasal Drug Delivery." *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 34(3):257–82.
- Damaghi, Mehdi, Jonathan W. Wojtkowiak, and Robert J. Gillies. 2013. "pH Sensing and Regulation in Cancer." *Frontiers in Physiology* 4 DEC(December):1–10.
- Danhier, Fabienne, Eduardo Ansorena, Joana M. Silva, Régis Coco, Aude Le Breton, and Véronique Préat. 2012. "PLGA-Based Nanoparticles: An Overview of Biomedical Applications." *Journal of Controlled Release* 161(2):505–22.
- Danhier, Fabienne, Olivier Feron, and Véronique Préat. 2010. "To Exploit the Tumor Microenvironment: Passive and Active Tumor Targeting of Nanocarriers for Anti-Cancer Drug Delivery." *Journal of Controlled Release* 148(2):135–46.

- Decuzzi, Paolo, Renata Pasqualini, Wadih Arap, and Mauro Ferrari. 2009. "Intravascular Delivery of Particulate Systems: Does Geometry Really Matter?" *Pharmaceutical Research* 26(1):235–43.
- Discher, Dennis E., and Fariyal Ahmed. 2006. "Polymersomes." *Annual Review of Biomedical Engineering* 8:323–41.
- Ditto, Andrew J., Parth N. Shah, and Yang H. Yun. 2009. "Non-Viral Gene Delivery Using Nanoparticles." *Expert Opinion on Drug Delivery* 6(11):1149–60.
- Donaldson, Ken, Craig A. Poland, and Roel P. F. Schins. 2010. "Possible Genotoxic Mechanisms of Nanoparticles: Criteria for Improved Test Strategies." *Nanotoxicology* 4(4):414–20.
- Dong, Xiaowei. 2018. "Current Strategies for Brain Drug Delivery." *Theranostics* 8(6):1481–93.
- Du, Bujie, Mengxiao Yu, and Jie Zheng. 2018. "Transport and Interactions of Nanoparticles in the Kidneys." *Nature Reviews Materials* 3(10):358–74.
- E. Blanco, H. She. and M. Ferrar. 2017. "Principles of Nanoparticle Design for Overcoming Biological Barriers to Drug Delivery." *Physiology & Behavior* 176(5):139–48.
- El-Say, Khalid M., and Hossam S. El-Sawy. 2017. "Polymeric Nanoparticles: Promising Platform for Drug Delivery." *International Journal of Pharmaceutics* 528(1–2):675–91.
- Elsner, Nils, Veronika Kozlovskaya, Svetlana A. Sukhishvili, and Andreas Fery. 2006. "PH-Triggered Softening of Crosslinked Hydrogen-Bonded Capsules." *Soft Matter* 2(11):966–72.
- Ernsting, M., M. Murakami, A. Roy, and SD Li. 2008. "Factors Controlling the Pharmacokinetics, Biodistribution and Intratumoral Penetration of Nanoparticles." *Bone* 23(1):1–7.
- Facciola, A., G. Visalli, P. Laganà, V. L. A. Fauci, and R. Squeri. 2019. "The New Era of Vaccines: The 'Nanovaccinology.'" 7163–82.
- Falconer, Robert J., and Brett M. Collins. 2011. "Survey of the Year 2009: Applications of Isothermal Titration Calorimetry." *Journal of Molecular Recognition* 24(1):1–16.
- Fattal, Elias. 2019. "Nanotechnologies Pour La Nanomédecine Questions Sur La Toxicité et Aspects Réglementaires."
- Fattal, Elias, and Hervé Hillaireau. 2020. "Nanotoxicologie et Réglementation Des Nanomédicaments." *Innovation, Nanosciences et Nanotechnologies* 33(0).
- Fedosov, Dmitry A., Bruce Caswell, and George Em Karniadakis. 2010. "A Multiscale Red Blood Cell Model with Accurate Mechanics, Rheology, Dynamics." *Biophysical Journal* 98(10):2215–25.
- Feindt, Jared Alexander. 2018. "An Improved Numerical Method for Assessing Cell Elasticity from Atomic Force Microscopy Nanoindentation Data."
- Fenz, Susanne F., and Kheya Sengupta. 2012. "Giant Vesicles as Cell Models." *Integrative Biology (United Kingdom)* 4(9):982–95.
- Fischer, H., H. Stadler, and N. Erina. 2013. "Quantitative Temperature-Depending Mapping of Mechanical Properties of Bitumen at the Nanoscale Using the AFM Operated with PeakForce Tapping™ Mode." *Journal of Microscopy* 250(3):210–17.
- Foroozandeh, Parisa, and Azlan Abdul Aziz. 2018. "Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles." *Nanoscale Research Letters* 13.

- Frédéric Lagarce. 2014. "Devenir Des Nanoparticules Utilisées Comme Médicament Dans l'organisme." *Innovation, Nanosciences et Nanotechnologies* 33(0).
- G. Nava-Arzaluz, Maria, Elizabeth Pinon-Segundo, Adriana Ganem-Rondero, and David Lechuga-Ballesteros. 2012. "Single Emulsion-Solvent Evaporation Technique and Modifications for the Preparation of Pharmaceutical Polymeric Nanoparticles." *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation* 6(3):209–23.
- Garcês, A., M. H. Amaral, J. M. Sousa Lobo, and A. C. Silva. 2018. "Formulations Based on Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for Cutaneous Use: A Review." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 112(November 2017):159–67.
- Gdowski, Andrew, Kaitlyn Johnson, Sunil Shah, Ignacy Gryczynski, Jamboor Vishwanatha, and Amalendu Ranjan. 2018. "Optimization and Scale up of Microfluidic Nanolipomer Production Method for Preclinical and Potential Clinical Trials." *Journal of Nanobiotechnology* 16(1):1–10.
- Giocondi, Marie-Cécile, Pierre Emmanuel Milhiet, Eric Lesniewska, and Christian Le Grimellec. 2003. "Microscopie à Force Atomique : De l'imagerie Cellulaire à La Manipulation Moléculaire." *Médecine/Sciences* 19(1):92–99.
- Giodini, Luciana, Francesco Lo Re, Davide Campagnol, Elena Marangon, Bianca Posocco, Eva Dreussi, and Giuseppe Toffoli. 2017. "Nanocarriers in Cancer Clinical Practice: A Pharmacokinetic Issue." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 13(2):583–99.
- Godin, Biana, Rita E. Serda, Jason Sakamoto, Paolo Decuzzi, and Mauro Ferrari. 2010. *Nanoparticles for Cancer Detection and Therapy*. Vol. 5.
- Goyal, Ritu, Lauren K. Macri, Hilton M. Kaplan, and Joachim Kohn. 2016. "Nanoparticles and Nanofibers for Topical Drug Delivery." (ii):77–92.
- Grabowski, Nadège, Hervé Hillaireau, Juliette Vergnaud, Nicolas Tsapis, Marc Pallardy, Saadia Kerdine-Römer, and Elias Fattal. 2015. "Surface Coating Mediates the Toxicity of Polymeric Nanoparticles towards Human-like Macrophages." *International Journal of Pharmaceutics* 482(1–2):75–83.
- Guo, Peng, Daxing Liu, Kriti Subramanyam, Biran Wang, Jiang Yang, Jing Huang, Debra T. Auguste, and Marsha A. Moses. 2018. "Nanoparticle Elasticity Directs Tumor Uptake." *Nature Communications* 9(1):1–9.
- Sen Gupta, Anirban. 2016. "Role of Particle Size, Shape, and Stiffness in Design of Intravascular Drug Delivery Systems: Insights from Computations, Experiments, and Nature." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 8(2):255–70.
- Gupta, Madhu, Udit Agrawal, and Suresh P. Vyas. 2012. "Nanocarrier-Based Topical Drug Delivery for the Treatment of Skin Diseases." *Expert Opinion on Drug Delivery* 9(7):783–804.
- Hamdallah, Sherif I., Randa Zoqlam, Peer Erfle, Mark Blyth, Alaaldin M. Alkilany, Andreas Dietzel, and Sheng Qi. 2020. "Microfluidics for Pharmaceutical Nanoparticle Fabrication: The Truth and the Myth." *International Journal of Pharmaceutics* 584(January).
- Hamidi, Mehrdad, Amir Azadi, and Pedram Rafiei. 2008. "Hydrogel Nanoparticles in Drug Delivery." *Advanced Drug Delivery Reviews* 60(15):1638–49.

- Han, Jinyu, Dandan Zhao, Dan Li, Xiaohua Wang, Zheng Jin, and Kai Zhao. 2018. "Polymer-Based Nanomaterials and Applications for Vaccines and Drugs." *Polymers* 10(1):1–14.
- Han, Xiangjun, Ke Xu, Olena Taratula, and Khashayar Farsad. 2019. "Applications of Nanoparticles in Biomedical Imaging." *Nanoscale* 11(3):799–819.
- Hilgenbrink, Andrew R., and Philip S. Low. 2005. "Folate Receptor-Mediated Drug Targeting: From Therapeutics to Diagnostics." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94(10):2135–46.
- Hirenkumar, Makadia, and Siegel Steven. 2012. "Poly Lactic-Co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier." *Polymers* 3(3):1–19.
- Hole, Patrick, Katherine Sillence, Claire Hannell, Ciaran Manus Maguire, Matthias Roeslein, Guillaume Suarez, Sonja Capracotta, Zuzana Magdolenova, Limor Horev-Azaria, Agnieszka Dybowska, Laura Cooke, Andrea Haase, Servane Contal, Stein Manø, Antje Vennemann, Jeans Jacques Sauvain, Kieran Crosbie Staunton, Sergio Anguissola, Andreas Luch, Maria Dusinska, Rafi Korenstein, Arno C. Gutleb, Martin Wiemann, Adriele Prina-Mello, Michael Riediker, and Peter Wick. 2013. "Interlaboratory Comparison of Size Measurements on Nanoparticles Using Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)." *Journal of Nanoparticle Research* 15(12).
- Huaping, Tan, Li Han, Peter J. Rubin, and Kacey G. Marra. 2011. "Hyaluronic Acid-Based Hydrogels through a Double Crosslinking Strategy." *J Tissue Eng Regen Med* 5(10):790–97.
- Hui, Yue, Xin Yi, Fei Hou, David Wibowo, Fan Zhang, Dongyuan Zhao, Huajian Gao, and Chun Xia Zhao. 2019. "Role of Nanoparticle Mechanical Properties in Cancer Drug Delivery." *ACS Nano* 13(7):7410–24.
- Irwin, E. F., J. E. Ho, S. R. Kane, and K. E. Healy. 2005. "Analysis of Interpenetrating Polymer Networks via Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring." *Langmuir* 21(12):5529–36.
- Janagam, Dileep, Linfeng Wu, and Tao Lowe. 2016. "Nanoparticles for Drug Delivery to the Anterior Segment of the Eye." *Physiology & Behavior* 176(1):100–106.
- Jaque, D., L. Martínez Maestro, B. Del Rosal, P. Haro-Gonzalez, A. Benayas, J. L. Plaza, E. Martín Rodríguez, and J. García Solé. 2014. "Nanoparticles for Photothermal Therapies." *Nanoscale* 6(16):9494–9530.
- De Jong, Wim H., and Paul J. A. Borm. 2008. "Drug Delivery and Nanoparticles: Applications and Hazards." *International Journal of Nanomedicine* 3(2):133–49.
- Joshi, Medha D., and Rainer H. Müller. 2009. "Lipid Nanoparticles for Parenteral Delivery of Actives." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 71(2):161–72.
- Kafshdooz, Taiebeh, Leila Kafshdooz, Abolfazl Akbarzadeh, Younes Hanifehpour, and Sang Woo Joo. 2016. "Applications of Nanoparticle Systems in Gene Delivery and Gene Therapy." *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* 44(2):581–87.
- Karimi, Mahdi, Sajad Bahrami, Soodeh Baghaee Ravari, Parham Sahandi Zangabad, Hamed Mirshekari, Mahnaz Bozorgomid, Somayeh Shahreza, Masume Sori, and Michael R. Hamblin. 2016. "Albumin Nanostructures as Advanced Drug Delivery Systems." *Expert Opinion on Drug Delivery* 13(11):1609–23.
- Kaszuba, Michael, David McKnight, Malcolm T. Connah, Fraser K. McNeil-Watson, and Ulf Nobbmann. 2008. "Measuring Sub Nanometre Sizes Using Dynamic Light Scattering." *Journal of Nanoparticle Research* 10(5):823–29.

- Kaur, Gunjeet, R. K. Narang, Goutam Rath, and Amit K. Goyal. 2012. "Advances in Pulmonary Delivery of Nanoparticles." *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology* 40(1–2):75–96.
- Kaur, Indu Pal, Rohit Bhandari, Swati Bhandari, and Vandita Kakkar. 2008. "Potential of Solid Lipid Nanoparticles in Brain Targeting." *Journal of Controlled Release* 127(2):97–109.
- Key, Jaehong, Anna Lisa Palange, Francesco Gentile, Santosh Aryal, Cinzia Stigliano, Daniele Di Mascolo, Enrica De Rosa, Minjung Cho, Yeonju Lee, Jaykrishna Singh, and Paolo Decuzzi. 2015. "Soft Discoidal Polymeric Nanoconstructs Resist Macrophage Uptake and Enhance Vascular Targeting in Tumors." *ACS Nano* 9(12):11628–41.
- Khafaji, Mona, Masoud Zamani, Mortaza Golizadeh, and Omid Bavi. 2019. "Inorganic Nanomaterials for Chemo/Photothermal Therapy: A Promising Horizon on Effective Cancer Treatment." *Biophysical Reviews* 11(3):335–52.
- kheirollahpour, Mehdi, Mohsen Mehrabi, Naser Mohammadpour Dounighi, Mohsen Mohammadi, and Alireza Masoudi. 2019. "Nanoparticles and Vaccine Development." *Pharmaceutical Nanotechnology* 8(1):6–21.
- Khezri, Khadijeh, Majid Saeedi, and Solmaz Maleki Dizaj. 2018. "Application of Nanoparticles in Percutaneous Delivery of Active Ingredients in Cosmetic Preparations." *Biomedicine and Pharmacotherapy* 106(July):1499–1505.
- Khunmanee, Sureerat, Younghyen Jeong, and Hansoo Park. 2017. "Crosslinking Method of Hyaluronic-Based Hydrogel for Biomedical Applications." *Journal of Tissue Engineering* 8.
- Kim, Hyung Shik, and Dong Yun Lee. 2018. "Near-Infrared-Responsive Cancer Photothermal and Photodynamic Therapy Using Gold Nanoparticles." *Polymers* 10(9):1–14.
- Klang, Victoria, and Nadejda B. Matsko. 2014. "Electron Microscopy of Pharmaceutical Systems." *Advances in Imaging and Electron Physics* 181:125–208.
- Kozma, Gergely Tibor, Taro Shimizu, Tatsuhiro Ishida, and Janos Szebeni. 2020. "Anti-PEG Antibodies: Properties, Formation, Testing and Role in Adverse Immune Reactions to PEGylated Nano-Biopharmaceuticals." *Advanced Drug Delivery Reviews* 154–155:163–75.
- Kumar, Amit, and Michael D. Graham. 2011. "Segregation by Membrane Rigidity in Flowing Binary Suspensions of Elastic Capsules." *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics* 84(6):1–17.
- Kumar, Amit, and Michael D. Graham. 2012. "Mechanism of Margination in Confined Flows of Blood and Other Multicomponent Suspensions." *Physical Review Letters* 109(10):1–5.
- Kumar, Anuj, Yujin Lee, Doyeon Kim, Kummara Madhusudana Rao, Jisoo Kim, Soyoung Park, Adnan Haider, Do Hyun Lee, and Sung Soo Han. 2017. "Effect of Crosslinking Functionality on Microstructure, Mechanical Properties, and in Vitro Cytocompatibility of Cellulose Nanocrystals Reinforced Poly (Vinyl Alcohol)/Sodium Alginate Hybrid Scaffolds." *International Journal of Biological Macromolecules* 95:962–73.
- L.Ensign, A.Date, and J.Hanes. 2017. "Nanoparticles for Oral Delivery: Design, Evaluation and State-of-the-Art." *Physiology & Behavior* 176(1):139–48.
- Leal, L. G. 1980. "Particle Motions in a Viscous Fluid." *Annual Review of Fluid Mechanics* 12(1):435–76.

- Van Lehn, Reid C., and Alfredo Alexander-Katz. 2014. "Fusion of Ligand-Coated Nanoparticles with Lipid Bilayers: Effect of Ligand Flexibility." *Journal of Physical Chemistry A* 118(31):5848–56.
- Lemcoff, N. Gabriel, Tighe A. Spurlin, Andrew A. Gewirth, Steven C. Zimmerman, James B. Beil, Stephanie L. Elmer, and H. George Vandever. 2004. "Organic Nanoparticles Whose Size and Rigidity Are Finely Tuned by Cross-Linking the End Groups of Dendrimers." *Journal of the American Chemical Society* 126(37):11420–21.
- Li, Ying, Brendan C. Abberton, Maartin Kröger, and Wing Kam Liu. 2013. *Challenges in Multiscale Modeling of Polymer Dynamics*. Vol. 5.
- Liling, Guo, Zheng Di, Xu Jiachao, Gao Xin, Fu Xiaoting, and Zhang Qing. 2016. "Effects of Ionic Crosslinking on Physical and Mechanical Properties of Alginate Mulching Films." *Carbohydrate Polymers* 136:259–65.
- Liu, Weijun, Xiangyan Zhou, Zhengwei Mao, Dahai Yu, Bing Wang, and Changyou Gao. 2012. "Uptake of Hydrogel Particles with Different Stiffness and Its Influence on HepG2 Cell Functions." *Soft Matter* 8(35):9235–45.
- Liu, Yijing, Pravin Bhattarai, Zhifei Dai, and Xiaoyuan Chen. 2019. "Photothermal Therapy and Photoacoustic Imaging via Nanotheranostics in Fighting Cancer." *Physiology & Behavior* 176(3):139–48.
- Liu, Yun, Guangze Yang, Da Zou, Yue Hui, Krishna Nigam, Anton P. J. Middelberg, and Chun Xia Zhao. 2020. "Formulation of Nanoparticles Using Mixing-Induced Nanoprecipitation for Drug Delivery." *Industrial and Engineering Chemistry Research* 59(9):4134–49.
- Lundqvist, Martin, Johannes Stigler, Giuliano Elia, Iseult Lynch, Tommy Cedervall, and Kenneth A. Dawson. 2008. "Nanoparticle Size and Surface Properties Determine the Protein Corona with Possible Implications for Biological Impacts." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(38):14265–70.
- Luo, Cj, Tomoyuki Okubo, Muhammad Nangrejo, and Mohan Edirisinghe. 2015. "Preparation of Polymeric Nanoparticles by Novel Electrospray Nanoprecipitation." *Polymer International* 64(2):183–87.
- Magdolenova, Zuzana, Andrew Collins, Ashutosh Kumar, Alok Dhawan, Vicki Stone, and Maria Dusinska. 2014. "Mechanisms of Genotoxicity. A Review of in Vitro and in Vivo Studies with Engineered Nanoparticles." *Nanotoxicology* 8(3):233–78.
- Malamatari, Maria, Anastasia Charisi, Stavros Malamataris, Kyriakos Kachrimanis, and Ioannis Nikolakakis. 2020. "Spray Drying for the Preparation of Nanoparticle-Based Drug Formulations as Dry Powders for Inhalation." *Processes* 8(7).
- Mangal, Sharad, Wei Gao, Tonglei Li, and Qi Tony Zhou. 2017. "Pulmonary Delivery of Nanoparticle Chemotherapy for the Treatment of Lung Cancers: Challenges and Opportunities." *Acta Pharmacologica Sinica* 38(6):782–97.
- Manke, Amruta, Liyang Wang, and Yon Rojanasakul. 2013. "Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity." *BioMed Research International* 2013.
- Mansour, Heidi M., Yun Seok Rhee, and Xiao Wu. 2009. "Nanomedicine in Pulmonary Delivery." *International Journal of Nanomedicine* 4:299–319.

- Martínez Rivas, Claudia Janeth, Mohamad Tarhini, Waisudin Badri, Karim Miladi, Hélène Greige-Gerges, Qand Agha Nazari, Sergio Arturo Galindo Rodríguez, Rocío Álvarez Román, Hatem Fessi, and Abdelhamid Elaissari. 2017. "Nanoprecipitation Process: From Encapsulation to Drug Delivery." *International Journal of Pharmaceutics* 532(1):66–81.
- McClements, David Julian. 2018. "Encapsulation, Protection, and Delivery of Bioactive Proteins and Peptides Using Nanoparticle and Microparticle Systems: A Review." *Advances in Colloid and Interface Science* 253:1–22.
- Mebius, Reina E., and Georg Kraal. 2005. "Structure and Function of the Spleen." *Nature Reviews Immunology* 5(8):606–16.
- Merkel, Timothy J., Stephen W. Jones, Kevin P. Herlihy, Farrell R. Kersey, Adam R. Shields, Mary Napier, J. Christopher Luft, Huali Wu, William C. Zamboni, Andrew Z. Wang, James E. Bear, and Joseph M. DeSimone. 2011. "Using Mechanobiological Mimicry of Red Blood Cells to Extend Circulation Times of Hydrogel Microparticles." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(2):586–91.
- Moghimi, S. M., and J. Szebeni. 2003. "Stealth Liposomes and Long Circulating Nanoparticles: Critical Issues in Pharmacokinetics, Opsonization and Protein-Binding Properties." *Progress in Lipid Research* 42(6):463–78.
- Mohamed, Marwa, Amr S. Abu Lila, Taro Shimizu, Eman Alaaeldin, Amal Hussein, Hatem A. Sarhan, Janos Szebeni, and Tatsuhiro Ishida. 2019. "PEGylated Liposomes: Immunological Responses." *Science and Technology of Advanced Materials* 20(1):710–24.
- Morachis, José M., Enas A. Mahmoud, and Adah Almutairi. 2012. "Physical and Chemical Strategies for Therapeutic Delivery by Using Polymeric Nanoparticles." *Pharmacological Reviews* 64(3):505–19.
- Morikawa, Yoshinori, Tatsuaki Tagami, Akihiro Hoshikawa, and Tetsuya Ozeki. 2018. "The Use of an Efficient Microfluidic Mixing System for Generating Stabilized Polymeric Nanoparticles for Controlled Drug Release." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 41(6):899–907.
- Mueller, Renate, Karen Köhler, Richard Weinkamer, Gleb Sukhorukov, and Andreas Fery. 2005. "Melting of PDADMAC/PSS Capsules Investigated with AFM Force Spectroscopy." *Macromolecules* 38(23):9766–71.
- Müller, Rainer H., Karsten Mäder, and Sven Gohla. 2000. "Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Controlled Drug Delivery - A Review of the State of the Art." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50(1):161–77.
- Natarajan, Jayaganesh V., Anastasia Darwitan, Veluchamy A. Barathi, Marcus Ang, Hla Myint Htoon, Freddy Boey, Kam C. Tam, Tina T. Wong, and Subbu S. Venkatraman. 2014. "Sustained Drug Release in Nanomedicine: A Long-Acting Nanocarrier-Based Formulation for Glaucoma." *ACS Nano* 8(1):419–29.
- Nichols, Joseph W., and You Han Bae. 2014. "EPR: Evidence and Fallacy." *Journal of Controlled Release* 190:451–64.
- O.Farokhzad, E.Pridgen, and F.Alexis. 2016. "Polymeric Nanoparticle Drug Delivery Technologies for Oral Delivery Applications." *Physiology & Behavior* 176(1):100–106.

- P.E. Donnelly, T. Chen, A. Finch. 2016. "Photocrosslinked Tyramine-Substituted Hyaluronate Hydrogels with Tunable Mechanical Properties Improve Immediate Tissue- Hydrogel Interfacial Strength in Articular Cartilage." *Physiology & Behavior* 176(1):139–48.
- Palange, Anna Lisa, Roberto Palomba, Ilaria F. Rizzuti, Miguel Ferreira, and Paolo Decuzzi. 2017. "Deformable Discoidal Polymeric Nanoconstructs for the Precise Delivery of Therapeutic and Imaging Agents." *Molecular Therapy* 25(7):1514–21.
- Pathak, Kamla, and Smita Raghuvanshi. 2015. "Oral Bioavailability: Issues and Solutions via Nanoformulations." *Clinical Pharmacokinetics* 54(4):325–57.
- Pilcer, Gabrielle, Francis Vanderbist, and Karim Amighi. 2009. "Preparation and Characterization of Spray-Dried Tobramycin Powders Containing Nanoparticles for Pulmonary Delivery." *International Journal of Pharmaceutics* 365(1–2):162–69.
- Pinto Reis, Catarina, Ronald J. Neufeld, António J. Ribeiro, and Francisco Veiga. 2006. "Nanoencapsulation I. Methods for Preparation of Drug-Loaded Polymeric Nanoparticles." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2(1):8–21.
- Pitkänen, Leena, and André M. Striegel. 2016. "Size-Exclusion Chromatography of Metal Nanoparticles and Quantum Dots." *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 80:311–20.
- Poon, Wilson, Yi Nan Zhang, Ben Ouyang, Benjamin R. Kingston, Jamie L. Y. Wu, Stefan Wilhelm, and Warren C. W. Chan. 2019. "Elimination Pathways of Nanoparticles." *ACS Nano* 13(5):5785–98.
- Qamar, Zufika, Farheen Fatima Qizilbash, Mohammad Kashif Iqbal, Asgar Ali, Jasjeet Kaur Narang, Javed Ali, and Sanjula Baboota. 2019. "Nano-Based Drug Delivery System: Recent Strategies for the Treatment of Ocular Disease and Future Perspective." *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation* 13(4):246–54.
- Radmacher, M., R. W. Tillmann, M. Fritz, and H. E. Gaub. 1992. "From Molecules to Cells: Imaging Soft Samples with the Atomic Force Microscope." *Science* 257(5078):1900–1905.
- Rodrigues de Azevedo, Cristiana, Moritz von Stosch, Mariana S. Costa, A. M. Ramos, M. Margarida Cardoso, Fabienne Danhier, Véronique Prétat, and Rui Oliveira. 2017. "Modeling of the Burst Release from PLGA Micro- and Nanoparticles as Function of Physicochemical Parameters and Formulation Characteristics." *International Journal of Pharmaceutics* 532(1):229–40.
- Sadeghi, Samira, Wai Kit Lee, Shik Nie Kong, Annanya Shetty, and Chester Lee Drum. 2020. "Oral Administration of Protein Nanoparticles: An Emerging Route to Disease Treatment." *Pharmacological Research* 158(February):104685.
- Salatin, Sara, Jaleh Barar, Mohammad Barzegar-Jalali, Khosro Adibkia, Farhad Kiafar, and Mitra Jelvehgari. 2017. "Development of a Nanoprecipitation Method for the Entrapment of a Very Water Soluble Drug into Eudragit RL Nanoparticles." *Research in Pharmaceutical Sciences* 12(1):1–14.
- Sansone, F., R. P. Aquino, P. Del Gaudio, P. Colombo, and P. Russo. 2009. "Physical Characteristics and Aerosol Performance of Naringin Dry Powders for Pulmonary Delivery Prepared by Spray-Drying." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 72(1):206–13.

- Semete, Boitumelo, Laetitia Booysen, Yolandy Lemmer, Lonji Kalombo, Lebogang Katata, Jan Verschoor, and Hulda S. Swai. 2010. "In Vivo Evaluation of the Biodistribution and Safety of PLGA Nanoparticles as Drug Delivery Systems." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 6(5):662–71.
- Serhan, Michael, Mark Sprowls, David Jackemeyer, Mindy Long, Ismael Diez Perez, Wolfgang Maret, Nongjian Tao, and Erica Forzani. 2019. "Purification Technologies for Colloidal Nanocrystals." *AIChE Annual Meeting, Conference Proceedings* 2019-Novem.
- Shah, Nishan K., Ryan Ivone, Jie Shen, and Samantha A. Meenach. 2020. "A Comparison of Centrifugation and Tangential Flow Filtration for Nanoparticle Purification: A Case Study on Acetalated Dextran Nanoparticles." *Particuology* 50:189–96.
- Shen, Zhiqiang, Mu Ping Nieh, and Ying Li. 2016. "Decorating Nanoparticle Surface for Targeted Drug Delivery: Opportunities and Challenges." *Polymers* 8(3):1–18.
- Shen, Zhiqiang, Huilin Ye, and Ying Li. 2018. "Understanding Receptor-Mediated Endocytosis of Elastic Nanoparticles through Coarse Grained Molecular Dynamic Simulation." *Physical Chemistry Chemical Physics* 20(24):16372–85.
- Shen, Zhiqiang, Huilin Ye, Xin Yi, and Ying Li. 2019. "Membrane Wrapping Efficiency of Elastic Nanoparticles during Endocytosis: Size and Shape Matter." *ACS Nano* 13(1):215–28.
- Sheng, Yang, Lun De Liao, Nitish V. Thakor, and Mei Chee Tan. 2014. "Nanoparticles for Molecular Imaging." *Journal of Biomedical Nanotechnology* 10(10):2641–76.
- Shi, Jinjun, Philip W. Kantoff, Richard Wooster, and Omid C. Farokhzad. 2017. "Cancer Nanomedicine: Progress, Challenges and Opportunities." *Nature Reviews Cancer* 17(1):20–37.
- Shillcock, Julian C., and Reinhard Lipowsky. 2005. "Tension-Induced Fusion of Bilayer Membranes and Vesicles." *Nature Materials* 4(3):225–28.
- Shim, Soojin, and Han Sang Yoo. 2020. "The Application of Mucoadhesive Chitosan Nanoparticles in Nasal Drug Delivery." *Marine Drugs* 18(12):1–17.
- Shiraishi, Kouichi, Mikiko Hamano, Huili Ma, Kumi Kawano, Yoshie Maitani, Taiki Aoshi, Ken J. Ishii, and Masayuki Yokoyama. 2013. "Hydrophobic Blocks of PEG-Conjugates Play a Significant Role in the Accelerated Blood Clearance (ABC) Phenomenon." *Journal of Controlled Release* 165(3):183–90.
- Da Silva, Flávia Lidiane Oliveira, Maria Betânia De Freitas Marques, Kelly Cristina Kato, and Guilherme Carneiro. 2020. "Nanonization Techniques to Overcome Poor Water-Solubility with Drugs." *Expert Opinion on Drug Discovery* 15(7):853–64.
- Singh, Rajesh Kumar, Xiaoyi Li, and Kausik Sarkar. 2013. "Lateral Migration of a Capsule in Plane Shear near a Wall." *Journal of Fluid Mechanics* 739:421–43.
- Sitterberg, Johannes, Aybike Özçetin, Carsten Ehrhardt, and Udo Bakowsky. 2010. "Utilising Atomic Force Microscopy for the Characterisation of Nanoscale Drug Delivery Systems." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 74(1):2–13.
- De Solorzano, Isabel Ortiz, Laura Uson, Ane Larrea, Mario Miana, Victor Sebastian, and Manuel Arruebo. 2016. "Continuous Synthesis of Drug-Loaded Nanoparticles Using Microchannel Emulsification and Numerical Modeling: Effect of Passive Mixing." *International Journal of Nanomedicine* 11:3397–3416.

- Stella, Barbara, Silvia Arpicco, Maria Teresa Peracchia, Didier Desmaële, Johan Hoebeke, Michel Renoir, Jean D'Angelo, Luigi Cattel, and Patrick Couvreur. 2000. "Design of Folic Acid-Conjugated Nanoparticles for Drug Targeting." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 89(11):1452–64.
- Stella, Barbara, Véronique Marsaud, Silvia Arpicco, Gérard Géraud, Luigi Cattel, Patrick Couvreur, and Jack Michel Renoir. 2007. "Biological Characterization of Folic Acid-Conjugated Poly(H2 NPEGCA-Co-HDCA) Nanoparticles in Cellular Models." *Journal of Drug Targeting* 15(2):146–53.
- Stern, Tal, Inon Kaner, Neta Laser Zer, Hila Shoal, Dvir Dror, Zakhariya Manevitch, Liraz Chai, Yifat Brill-Karniely, and Ofra Benny. 2017. "Rigidity of Polymer Micelles Affects Interactions with Tumor Cells." *Journal of Controlled Release* 257:40–50.
- Stevens, Whitney W., and Robert P. Schleimer. 2016. "AERD as an Endotype of Chronic Rhinosinusitis." *Immunol Allergy Clin North Am.* 36(4):669–80.
- Stewart, Phoebe L. 2017. "Cryo-Electron Microscopy and Cryo-Electron Tomography of Nanoparticles." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 9(2):1–16.
- Sun, Jiashu, Lu Zhang, Jiuling Wang, Qiang Feng, Dingbin Liu, Qifang Yin, Dongyan Xu, Yujie Wei, Baoquan Ding, Xinghua Shi, and Xingyu Jiang. 2015. "Tunable Rigidity of (Polymeric Core)-(Lipid Shell) Nanoparticles for Regulated Cellular Uptake." *Advanced Materials* 27(8):1402–7.
- Sweeney, Scott F., Gerd H. Woehrle, and James E. Hutchison. 2006. "Rapid Purification and Size Separation of Gold Nanoparticles via Diafiltration." *Journal of the American Chemical Society* 128(10):3190–97.
- Swider, Edyta, Olga Koshkina, Jurjen Tel, Luis J. Cruz, I. Jolanda M. de Vries, and Mangala Srinivas. 2018. "Customizing Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Particles for Biomedical Applications." *Acta Biomaterialia* 73:38–51.
- Szebeni, János. 2018. "Mechanism of Nanoparticle-Induced Hypersensitivity in Pigs: Complement or Not Complement?" *Drug Discovery Today* 23(3):487–92.
- Szebeni, Janos, and Gert Storm. 2015. "Complement Activation as a Bioequivalence Issue Relevant to the Development of Generic Liposomes and Other Nanoparticulate Drugs." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 468(3):490–97.
- Teng, Chuanfeng, Cuijuan Jiang, Sulian Gao, Xiaojing Liu, and Shumei Zhai. 2021. "Fetotoxicity of Nanoparticles: Causes and Mechanisms." *Nanomaterials* 11(3):1–25.
- Thi, Thai Thanh Hoang, Emily H. Pilkington, Dai Hai Nguyen, Jung Seok Lee, Ki Dong Park, and Nghia P. Truong. 2020. "The Importance of Poly(Ethylene Glycol) Alternatives for Overcoming PEG Immunogenicity in Drug Delivery and Bioconjugation." *Polymers* 12(2).
- Tiruwa, Renu. 2016. "A Review on Nanoparticles – Preparation and Evaluation Parameters." *Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research* 4(2):27–31.
- Torchilin, V. P. 2007. "Micellar Nanocarriers: Pharmaceutical Perspectives." *Pharmaceutical Research* 24(1):1–16.
- Vauthier, C.; Ponchel, G. 2016. *Methods for the Preparation of Nanoparticles by Polymerization*.
- Vauthier, Christine, and Kawthar Bouchemal. 2009. "Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles." *Pharmaceutical Research* 26(5):1025–58.

- Vauthier, Christine, and Patrick Couvreur. 2008. "Nanotechnologies Pour La Thérapeutique et Le Diagnostic." *Techniques de l'ingénieur* 33(0):1–25.
- Vauthier, Christine, Denis Labarre, and Gilles Ponchel. 2007. "Design Aspects of Poly(Alkylcyanoacrylate) Nanoparticles for Drug Delivery." *Journal of Drug Targeting* 15(10):641–63.
- Verhoef, Johan J. F., John F. Carpenter, Thomas J. Anchordoquy, and Huub Schellekens. 2014. "Potential Induction of Anti-PEG Antibodies and Complement Activation toward PEGylated Therapeutics." *Drug Discovery Today* 19(12):1945–52.
- Verma, Ayush, and Francesco Stellacci. 2010. "Effect of Surface Properties on Nanoparticle-Cell Interactions." *Small* 6(1):12–21.
- Walde, Peter, Anna Maria Giuliani, C. Andrea Boicelli, and Pier Luigi Luisi. 1990. "Phospholipid-Based Reverse Micelles." *Chemistry and Physics of Lipids* 53(4):265–88.
- Wang, Gang, Xiaodong Cao, Hua Dong, Lei Zeng, Chenxi Yu, and Xiaofeng Chen. 2018. "A Hyaluronic Acid Based Injectable Hydrogel Formed via Photo-Crosslinking Reaction and Thermal-Induced Diels-Alder Reaction for Cartilage Tissue Engineering." *Polymers* 10(9).
- Wang, Jing Tao, Juan Wang, and Jun Jie Han. 2011. "Fabrication of Advanced Particles and Particle-Based Materials Assisted by Droplet-Based Microfluidics." *Small* 7(13):1728–54.
- Wang, Shuo, Hui Guo, Yinfeng Li, and Xuejin Li. 2019. "Penetration of Nanoparticles across a Lipid Bilayer: Effects of Particle Stiffness and Surface Hydrophobicity." *Nanoscale* 11(9):4044–52.
- Weiss, Agnes Valencia, Thorben Fischer, Jagoba Iturri, Rafael Benitez, José Luis Toca-Herrera, and Marc Schneider. 2019. "Mechanical Properties of Gelatin Nanoparticles in Dependency of Crosslinking Time and Storage." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 175(May 2018):713–20.
- Wissing, S. A., O. Kayser, and R. H. Müller. 2004. "Solid Lipid Nanoparticles for Parenteral Drug Delivery." *Advanced Drug Delivery Reviews* 56(9):1257–72.
- Woodle, Martin C., and Demetrios Papahadjopoulos. 1989. "Liposome Preparation and Size Characterization." *Methods in Enzymology* 171(C):193–217.
- Xu, Renliang. 2008. "Progress in Nanoparticles Characterization: Sizing and Zeta Potential Measurement." *Particuology* 6(2):112–15.
- Xu, Xufeng, and Helmut Cölfen. 2021. "Ultracentrifugation Techniques for the Ordering of Nanoparticles." *Nanomaterials* 11(2):1–26.
- Ye, Huilin, Zhiqiang Shen, Le Yu, Mei Wei, and Ying Li. 2018. "Manipulating Nanoparticle Transport within Blood Flow through External Forces: An Exemplar of Mechanics in Nanomedicine." *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 474(2211).
- Yetisgin, Abuzer, Sibel Cetinel, Merve Zuvun, Ali Kosar, and Kutlu Ozlem. 2020. *Therapeutic Nanoparticles and Their Targeted Delivery Applications*.
- Yin, Hongzhuan, Long Liao, and Jun Fang. 2014. "Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect Based Tumor Targeting: The Concept, Application and Prospect." *JSM Clin Oncol Res* 2(1):1–5.

- Yousefi, Nariman, and Nathalie Tufenkji. 2016. "Probing the Interaction between Nanoparticles and Lipid Membranes by Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring." *Frontiers in Chemistry* 4(DEC):1–8.
- Zhang, Lei, Zhiqiang Cao, Yuting Li, Jean Rene Ella-Menye, Tao Bai, and Shaoyi Jiang. 2012. "Softer Zwitterionic Nanogels for Longer Circulation and Lower Splenic Accumulation." *ACS Nano* 6(8):6681–86.
- Zhang, Lu, Qiang Feng, Jiuling Wang, Shuai Zhang, Baoquan Ding, Yujie Wei, Mingdong Dong, Ji Young Ryu, Tae Young Yoon, Xinghua Shi, Jiashu Sun, and Xingyu Jiang. 2015. "Microfluidic Synthesis of Hybrid Nanoparticles with Controlled Lipid Layers: Understanding Flexibility-Regulated Cell-Nanoparticle Interaction." *ACS Nano* 9(10):9912–21.
- Zhang, Yu, Benedict You Wei Hsu, Changliang Ren, Xu Li, and John Wang. 2015. "Silica-Based Nanocapsules: Synthesis, Structure Control and Biomedical Applications." *Chemical Society Reviews* 44(1):315–35.
- Zhao, Liang, Arjun Seth, Nani Wibowo, Chun Xia Zhao, Neena Mitter, Chengzhong Yu, and Anton P. J. Middelberg. 2014. "Nanoparticle Vaccines." *Vaccine* 32(3):327–37.
- Zhong, Hao, Ging Chan, Yuanjia Hu, Hao Hu, and Defang Ouyang. 2018. "A Comprehensive Map of FDA-Approved Pharmaceutical Products." *Pharmaceutics* 10(4):1–19.
- Zoldesi, C. I., I. L. Ivanovska, C. Quilliet, G. J. L. Wuite, and A. Imhof. 2008. "Elastic Properties of Hollow Colloidal Particles." *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics* 78(5):1–8.



UNIVERSITÉ  
CAEN  
NORMANDIE

**U.F.R. Santé**

**Faculté des Sciences Pharmaceutiques**

VU, LE PRESIDENT DU JURY

CAEN, LE

VU, LE DIRECTEUR DE LA FACULTE  
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

CAEN, LE

L'université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses et mémoires. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

## **TITRE**

MODULATION DES PROPRIETES MECANQUES DES NANOPARTICULES, ET LEURS IMPACTS SUR LES MECANISMES BIOLOGIQUES

---

## **Résumé**

Les nanomédicaments, vecteurs d'espoir dans les pathologies telles que le cancer notamment, font l'objet d'études de plus en plus nombreuses. L'engouement envers ces systèmes de délivrance de substances actives soulève de nouvelles interrogations : quelles caractéristiques sont à prendre en compte dans le développement d'un nanomédicament, pour s'assurer que la substance active atteindra sa cible thérapeutique ? Parmi les éléments les plus déterminants, que sont la taille, la morphologie, la charge de surface etc..., quelle est la place des propriétés mécaniques des nanovecteurs ? Ces dernières ont-elles un impact sur les rouages de la machinerie biologique ? Dans ce manuscrit, nous démontrons que les propriétés mécaniques des nanoparticules ont une influence indéniable sur les mécanismes biologiques, et qu'il semble primordial d'intégrer une caractérisation systématique et standardisée de celles-ci, dans le développement de tout nouveau nanomédicament.

---

## **TITLE**

MODULATION OF THE MECHANICAL PROPERTIES OF NANOPARTICLES, AND THEIR IMPACT ON BIOLOGICAL MECHANISMS

---

## **Summary**

Nanomedicines, which are hopeful vectors for pathologies such as cancer, are the subject of more and more studies. The enthusiasm for these active substance delivery systems raises new questions: what characteristics should be taken into account in the development of a nanodrug to ensure that the active substance will reach its therapeutic target? Among the most important elements, such as size, morphology, surface charge, etc., what is the role of the mechanical properties of nanovectors? Do these properties have an impact on the biological machinery? In this manuscript, we demonstrate that the mechanical properties of nanoparticles have an undeniable influence on biological mechanisms, and that it seems essential to integrate a systematic and standardized characterization of these properties, in the development of any new nanomedicine.

---

## **Mots-clés**

Nanoparticules, propriétés mécaniques, mécanismes biologiques

---