

Université de Montréal

**Impact de nanophytoglycogènes neutres et chargés sur les propriétés  
biophysiques du surfactant pulmonaire**

*Par*

Laurianne Gravel Tatta

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté aux études supérieures et postdoctorales en vue de l'obtention du grade de  
maître ès sciences (M. Sc.) en chimie

Août 2021

© Laurianne Gravel Tatta, 2021



Université de Montréal

Département de chimie, Faculté des arts et des sciences

---

*Ce mémoire intitulé*

**Impact de nanophytoglycogènes neutres et chargés sur les propriétés biophysiques du surfactant pulmonaire**

*Présenté par*

**Laurianne Gravel Tatta**

*A été évalué par un jury composé des personnes suivantes*

**Suzanne Giasson**

Président-rapporteur

**Antonella Badia**

Directeur de recherche

**Christian Pellerin**

Membre du jury

## Résumé

Les poumons présentent de nombreux avantages en tant que voie d'administration de médicaments. Ils possèdent une grande surface (70-100 m<sup>2</sup>) pour l'adsorption de molécules et de particules, une mince barrière épithéliale, une faible acidité ainsi qu'un système vasculaire sous-jacent abondant. L'administration par inhalation est une approche prometteuse pour le traitement du cancer des poumons et des infections microbiennes comorbides dans 33% des cas puisqu'elle permet la livraison ciblée d'agents chimiothérapeutiques. Les nanoparticules sont des vecteurs idéaux d'acheminements ciblés de médicaments avec des avantages tels qu'une stabilité élevée/une longue durée de conservation ainsi qu'une capacité de transport élevée. Les nanoparticules inhalées atteignant les alvéoles pulmonaires interagissent avec le surfactant pulmonaire. Ce mélange de lipides et de protéines tapisse l'interface eau/air des alvéoles servant ainsi de barrière. L'interaction physique et chimique des nanoparticules avec le surfactant pulmonaire déterminera leur clairance, rétention et translocation. Nous proposons l'utilisation de nanoparticules de phytoglycogène, extraites de maïs sans OGM, pour l'administration pulmonaire d'un peptide anticancéreux et antimicrobien à double action dont l'administration par voie orale ou par injection est problématique. Le nanophytoglycogène, composé de molécules de glucose, est non-biopersistant, non-toxique et est certifié GRAS (*Generally Recognized as Safe*) par le Food and Drug Administration pour l'ingestion. Cependant, son innocuité pour l'inhalation reste à déterminer. Avant de déterminer l'efficacité du nanophytoglycogène à des fins de nanotransporteur organique pour la délivrance par aérosol de peptides thérapeutiques, son impact sur les propriétés biophysiques et sur la structure de phase du surfactant pulmonaire doit premièrement être caractérisé.

L'objectif du projet est d'étudier les effets de nanophytoglycogène de différentes charges sur les propriétés physicochimiques de modèles du surfactant pulmonaire en utilisant les monocouches Langmuir. Plus précisément, il est question d'étudier les effets des nanoparticules sur l'activité de surface, la morphologie, la réversibilité ainsi que l'épaisseur du film du surfactant pulmonaire. L'imagerie par microscopie à angle de Brewster (BAM, *Brewster Angle Microscopy*),

les isothermes (pression de surface vs aire moléculaire) ainsi que l'ellipsométrie à l'interface eau-air permettent une conjecture des effets néfastes potentielles du nanophytoglycogène sur les poumons.

À l'aide de ces techniques, il a été possible d'étudier des monocouches de phospholipides et de protéines, représentant le surfactant pulmonaire. En présence de nanoparticules anioniques et quasi-neutres, les différentes monocouches ne subissaient aucune perturbation. Cependant, les résultats ont démontré que les nanoparticules cationiques se lient aux phospholipides anioniques, ce qui augmente l'épaisseur de la monocouche et ainsi le travail requis pour effectuer un cycle respiratoire. Ces travaux ont démontré l'importance de la charge des nanomatériaux lors de leur interaction avec le surfactant pulmonaire. De plus, les résultats de cette étude ont aussi permis de classer les nanophytoglycogènes quasi-neutre et anionique comme étant des vecteurs de médicaments potentiels.

**Mots-clés :** surfactant pulmonaire, délivrance de médicaments, nanoparticules, inhalation, phytoglycogène, charge de surface, monocouche Langmuir

## Abstract

The human lungs present many advantages as a drug delivery route, namely a high surface area (70-100 m<sup>2</sup>) for the adsorption of molecular species and particles, a thin epithelial barrier, an abundant underlying vasculature, and low acidity. Inhalation delivery is expected to be an ideal approach for the treatment of lung cancer and associated pulmonary infection (33% of cases) as it allows the site-specific physical delivery of chemotherapeutic. Nanoparticle carriers broaden the options for targeted drug delivery systems with advantages including high stability/long shelf life and high carrier capacity. In the alveoli, inhaled nanoparticles interact with lung (pulmonary) surfactant, a lipid/protein mixture that lines the alveolar air/fluid interface and serves as a primary barrier to uptake. The physical/chemical interaction of the nanoparticles with the surfactant determines their clearance, retention, and translocation. We propose to use novel phytyglycogen nanoparticles, extracted from non-GMO corn, for the pulmonary delivery of a dual action anticancer and antimicrobial peptide that is problematic to deliver orally or by injection. Nanophytyglycogen, composed of glucose molecules, is non-biopersistent, non-toxic and is GRAS (Generally Recognized as Safe) for oral ingestion. However, its safety for inhalation remains to be determined. Before evaluating the efficacy of nanophytyglycogen to serve as an organic nanocarrier for the aerosol delivery of peptide therapeutics, their impact on the biophysical properties and phase structure of lung surfactant must first be characterized.

The objective of the research is to investigate the effect of nanophytyglycogens of different surface charge on the physicochemical properties of pulmonary surfactant model systems using Langmuir monolayers. More specifically, the effect of the nanoparticles on the surface activity, morphology, reversibility, and film thickness of pulmonary surfactant is studied. Isotherms (surface pressure vs. molecular area), BAM (Brewster Angle Microscopy) imaging, and ellipsometry at the air-water interface allow a surmise of the potential adverse effects of nanophytyglycogen on the lungs.

Using these techniques, it was possible to study monolayers of phospholipids and proteins, representing the pulmonary surfactant. In the presence of anionic and quasi-neutral

nanoparticles, the different monolayers didn't undergo any disturbance. However, the results demonstrated that cationic nanoparticles bind to anionic phospholipids, which increases the thickness of the monolayer and thus the work required to complete a respiratory cycle. This study has demonstrated the importance of nanoparticle's surface charge during their interaction with pulmonary surfactant. In addition, the results of this study also made it possible to classify the quasi-neutral and anionic nanophytoglycogens as being potential drug vectors.

**Keywords:** lung surfactant, drug delivery, nanoparticles, inhalation, phytoglycogen, surface charge, Langmuir monolayer

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	xi
Liste des sigles et abréviations.....	xvii
Remerciements.....	xxi
Chapitre 1 – Introduction générale.....	1
1.1    Les poumons : une voie d’entrée prometteuse pour l’administration de médicaments.....	2
1.1.1    Les avantages des poumons et de l’inhalation.....	2
1.1.2    Transport des particules dans le système respiratoire.....	3
1.2    Les nanoparticules : des vecteurs idéaux.....	4
1.2.1    Avantages des nanoparticules.....	5
1.2.2    Effets néfastes potentiels.....	7
1.3    Nanoparticules de phytoglycogène.....	8
1.3.1    Synthèse.....	9
1.3.2    Avantages et utilisations.....	10
1.4    Surfactant pulmonaire.....	14
1.4.1    Phospholipides.....	15
1.4.2    Protéines pulmonaires.....	16
1.4.2.1    Protéines pulmonaires A et D.....	16
1.4.2.2    Protéines pulmonaires B et C.....	17



1.5	Les modèles du surfactant pulmonaire en présence de nanoparticules .....	20
1.6	Objectifs de la recherche .....	22
	Références Chapitre 1 .....	24
Chapitre 2 – Méthodes.....		31
2.1	Les monocouches Langmuir .....	31
2.1.1	Instrumentation .....	31
2.1.2	Isothermes $\pi$ -A : mesure de la pression de surface en fonction de l'aire moléculaire 33	
2.2	Méthodes basées sur la polarisation de la lumière .....	35
2.2.1	Description de la polarisation de la lumière .....	36
2.2.2	Ellipsométrie à l'interface eau-air .....	37
2.2.3	Microscopie à l'angle de Brewster (BAM).....	40
	Références Chapitre 2 .....	45
Chapitre 3 – Are Plant-Based Carbohydrate Nanoparticles Safe for Inhalation? Investigating Their Interactions with Pulmonary Surfactant using Langmuir Monolayers .....		47
3.1	Abstract .....	49
3.2	Introduction.....	50
3.3	Experimental Section .....	53
3.3.1	Materials.....	53
3.3.2	Surface Pressure-Area Isotherms.....	54
3.3.3	Brewster Angle Microscopy (BAM) Imaging .....	54
3.3.4	Ellipsometry Measurements .....	55
3.3.5	Monolayer Compression–Expansion Cycles.....	55
3.4	Results and Discussion .....	56

3.4.1	Monolayer Compression Isotherms.....	56
3.4.2	Film Morphology and Thickness.....	57
3.4.3	Monolayer Compression–Expansion Cycles.....	65
3.5	Conclusions.....	69
3.6	Acknowledgment .....	69
	Références Chapitre 3 .....	70
	Supporting Information.....	75
	Chapitre 4 – Conclusions et perspectives .....	89
	Références Chapitre 4 .....	91



## Liste des tableaux

<b>Table 3.1.</b> Hydrodynamic Diameters and Zeta Potentials of the Nanophytoglycogens.....	54
---	----



## Liste des figures

<b>Figure 1.1.</b> Circulation de particules inhalées dans le système respiratoire. ....	4
<b>Figure 1.2.</b> Aire de surface spécifique en fonction de la taille de la particule sphérique. ....	6
<b>Figure 1.3.</b> Structure dendritique et composition chimique des nanoparticules de phytoglycogène .....	9
<b>Figure 1.4.</b> Structure générique d'un dendrimère.....	11
<b>Figure 1.5.</b> Schéma des alvéoles et du surfactant pulmonaire à l'interface eau-air. ....	15
<b>Figure 1.6.</b> Composition en pourcentage massique du surfactant pulmonaire. ....	15
<b>Figure 1.7.</b> Schématisation de la formation du réservoir par la SP-B et la SP-C durant le cycle de compression et d'expansion. ....	19
<b>Figure 2.1.</b> Bain Langmuir utilisé pour la préparation d'une monocouche Langmuir.....	32
<b>Figure 2.2.</b> Représentation schématique des différentes phases d'une monocouche phospholipidique lors d'un isotherme de la pression de surface en fonction de l'aire moléculaire .....	34
<b>Figure 2.3.</b> Composantes électrique (E) et magnétique (B) d'un champ électromagnétique perpendiculaire à la direction de propagation (z).....	35
<b>Figure 2.4.</b> Polarisation linéaire (a) et (b), circulaire (c) et elliptique (d) de la lumière. ....	37
<b>Figure 2.5.</b> Configuration d'un ellipsomètre.....	38
<b>Figure 2.6.</b> Isotherme ellipsométrique du DPPC sur une sous-phase contenant 150 mM de NaCl, 50 mM de Tris, et 2,5 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ à pH de 7,4 .....	40
<b>Figure 2.7.</b> Principe de la microscopie à angle de Brewster .....	42
<b>Figure 2.8.</b> Montage BAM au-dessus d'un bain Langmuir où P est le polariseur, C le compensateur, A l'analyseur et CCD la caméra/détecteur .....	43
<b>Figure 2.9.</b> Isotherme $\pi$ vs A et images BAM d'une monocouche de DPPC sur une sous-phase d'eau .....	44
<b>Figure 3.1.</b> Structures of (a) native nanophytoglycogen and (b) phospholipids. (c) Amino acid sequence of super mini-B.....	50

**Figure 3.2.** Surface pressure–molecular area ( $\pi$ – $A$ ) isotherms of (a) DPPC/POPG (7:3 mol/mol) and (b) DPPC/POPG (7:3 mol/mol) with 3.0 wt% super mini-B at 22 °C on Tris-buffered saline in the absence and presence of nanophytoglycogen at a 1:100 molar ratio of nanoparticles in the subphase to phospholipid at the surface. Note that the molecular area represents the average molecular area of phospholipid. ....57

**Figure 3.3.** BAM images (430  $\mu$ m x 538  $\mu$ m) of DPPC/POPG (7:3 mol/mol) as a function of the surface pressure on (a) Tris-buffered saline. Tris-buffered saline containing (b) native nanophytoglycogen, (c) anionic nanophytoglycogen, and (d) cationic nanophytoglycogen. For (a-c), the lighter regions are the condensed phase and the darker regions are the liquid-expanded or fluid phase, while the opposite contrast is observed for (d). ....58

**Figure 3.4.** BAM images (430  $\mu$ m x 538  $\mu$ m) of DPPC/POPG (7:3 mol/mol) with 3.0 wt% super mini-B as a function of the surface pressure on (a) Tris-buffered saline. Tris-buffered saline containing (b) native nanophytoglycogen, (c) anionic nanophytoglycogen, and (d) cationic nanophytoglycogen. ....59

**Figure 3.5.** Change in the ellipsometric angle ( $\delta\Delta$ ) as a function of the surface pressure. (a) DPPC/POPG (7:3 mol/mol) and 3.0 wt% super mini-B at 22 °C on Tris-buffered saline in the absence and presence of nanophytoglycogen. (b) POPG, DPPC/POPG (7:3 mol/mol), and DPPC/POPG (7:3 mol/mol) with 3.0 wt% super mini-B at 22 °C on Tris-buffered saline in the presence of cationic nanophytoglycogen. ....63

**Figure 3.6.** Schematic of proposed interaction of cationic nanophytoglycogen with the model membranes formed at the air/water interface. At low compression, the cationic nanoparticles are preferentially bound to the anionic, POPG-rich fluid phase of the monolayer leading to the reversed contrast observed in BAM and increased thickness changes in ellipsometry. At high compression, there is the formation of multilayer structures in the fluid phase and loss of nanoparticles from the interface. ....64

**Figure 3.7.** Compression–expansion cycles for DPPC/POPG (7:3 mol/mol) on (a) Tris buffered saline. Tris buffered saline containing (b) native nanophytoglycogen, (c) anionic nanophytoglycogen, and (d) cationic nanophytoglycogen. The x-axis is given as the area relative to the area at 25 mN m<sup>-1</sup> of the compression segment of cycle 1. The insets represent the relative

area at  $35 \text{ mN m}^{-1}$  of the compression (solid line and closed symbol) and expansion (dashed line and open symbol) segments as a function of the number of cycles. The data points and error bars represent the mean and standard deviation of four independent measurements. Cycle 1 black, cycle 2 red, cycle 3 blue, cycle 4 brown, cycle 5 green, cycle 10 yellow, cycle 15 purple, and cycle 20 light blue.....67

**Figure 3.8.** Compression–expansion cycles for DPPC/POPG (7:3 mol/mol) with 3.0 wt% super mini-B on (a) Tris buffered saline. Tris buffered saline containing (b) native nanophytoglycogen, (c) anionic nanophytoglycogen, and (d) cationic nanophytoglycogen. The x-axis is given as the area relative to the area at  $25 \text{ mN m}^{-1}$  of the compression segment of cycle 1. The insets represent the relative area at  $35 \text{ mN m}^{-1}$  of the compression (solid line and closed symbol) and expansion (dashed line and open symbol) segments as a function of the number of cycles. The data points and error bars represent the mean and standard deviation of four independent measurements. Cycle 1 black, cycle 2 red, cycle 3 blue, cycle 4 brown, cycle 5 green, cycle 10 yellow, cycle 15 purple, and cycle 20 light blue. ....68

**Figure S1.** Surface pressure–molecular area ( $\pi$ – $A$ ) isotherms of DPPC/POPG (7:3 mol/mol) and DPPC/POPG (7:3 mol/mol) with 3.0 wt% super mini-B at  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  on Tris buffered saline. Note that the molecular area represents the average molecular area of phospholipid. ....75

**Figure S2.** BAM images ( $430 \text{ }\mu\text{m} \times 538 \text{ }\mu\text{m}$ ) of DPPC/POPG (7:3 mol/mol) with 3.0 wt% super mini-B as a function of the surface pressure on an aqueous subphase containing  $150 \text{ mM NaCl}$  and cationic nanophytoglycogen at a 1:100 nanoparticle-to-phospholipid molar ratio.....76

**Figure S3.** Surface pressure–molecular area ( $\pi$ – $A$ ) isotherms of POPG at  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  on Tris buffered saline in the presence and absence of cationic nanophytoglycogen. ....77

**Figure S4.** Change in the ellipsometric angle ( $\delta\Delta$ ) as a function of the molecular area. (a) DPPC/POPG (7:3 mol/mol) and 3.0 wt% super mini-B at  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  on Tris buffered saline in the absence and presence of nanophytoglycogen. (b) POPG, DPPC/POPG (7:3 mol/mol), and DPPC/POPG (7:3 mol/mol) with 3.0 wt% super mini-B at  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  on Tris buffered saline in the presence of cationic nanophytoglycogen. ....78



**Figure S5.** Change in the ellipsometric angle ( $\delta\Delta$ ) as a function of (a) surface pressure and (b) molecular area for DPPC/POPG (7:3 mol/mol) at 22 °C on Tris buffered saline in the absence and presence of cationic nanophytoglycogen. ....79

**Figure S6.** Change in the ellipsometric angle ( $\delta\Delta$ ) as a function of (a) surface pressure and (b) molecular area for POPG at 22 °C on Tris buffered saline in the absence and presence of cationic nanophytoglycogen. ....80

**Figure S7.** Change in the ellipsometric angle ( $\delta\Delta$ ) as a function of (a) surface pressure and (b) molecular area for DPPC at 22 °C on Tris buffered saline in the absence and presence of cationic nanophytoglycogen. ....81

**Figure S8.** BAM images (430  $\mu\text{m}$  x 538  $\mu\text{m}$ ) of DPPC/POPG (7:3 mol/mol) as a function of the surface pressure on an ultrapure water subphase containing cationic nanophytoglycogen at a 1:100 nanoparticle-to-phospholipid molar ratio. ....82

**Figure S9.** Relative areas of the compression (solid line and closed symbol) and expansion (dashed line and open symbol) segments as a function of the number of cycles for DPPC/POPG (7:3 mol/mol) at the following surface pressures: (a) 30  $\text{mN m}^{-1}$ , (b) 35  $\text{mN m}^{-1}$ , (c) 40  $\text{mN m}^{-1}$ , and (d) 45  $\text{mN m}^{-1}$ . ....84

**Figure S10.** Relative areas of the compression (solid line and closed symbol) and expansion (dashed line and open symbol) segments as a function of the number of cycles for DPPC/POPG (7:3 mol/mol) with 3.0 wt% super mini-B at the following surface pressures: (a) 30  $\text{mN m}^{-1}$ , (b) 35  $\text{mN m}^{-1}$ , (c) 40  $\text{mN m}^{-1}$ , and (d) 45  $\text{mN m}^{-1}$ . ....86

**Figure S11.** Change in the relative area (relative area of compression – relative area of expansion) as a function of the number of cycles for DPPC/POPG (7:3 mol/mol) at the following surface pressures: (a) 30  $\text{mN m}^{-1}$ , (b) 35  $\text{mN m}^{-1}$ , (c) 40  $\text{mN m}^{-1}$ , and (d) 45  $\text{mN m}^{-1}$ . The data points and error bars represent the mean and standard deviation of four independent measurements. ....87

**Figure S12.** Change in the relative area (relative area of compression – relative area of expansion) as a function of the number of cycles for DPPC/POPG (7:3 mol/mol) with 3.0 wt% super mini-B at the following surface pressures: (a) 30  $\text{mN m}^{-1}$ , (b) 35  $\text{mN m}^{-1}$ , (c) 40  $\text{mN m}^{-1}$ , and (d) 45  $\text{mN m}^{-1}$ . The data points and error bars represent the mean and standard deviation of four independent measurements. ....88





## Liste des sigles et abréviations

AFM : *Atomic Force Microscopy* – Microscopie à force atomique

BAM : *Brewster Angle Microscopy* – Microscopie à angle de Brewster

DOPC : 1,2-dioleoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine

DPPC: 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine

FDA : Food and Drug Administration

GRAS: *Generally Recognized as Safe*

LC: *Liquid Condensed*, liquide condensée

LE : *Liquid Extended*, liquide étendue

NP(s): nanoparticule(s)

PA : Acide palmitique

PC : Phosphatidylcholine

PE : Phosphatidyléthanolamine

PG : Phosphoglycérol

PI : Phosphatidylinositol

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

POPC: 1-palmitoyl-2-oleoyl-glycéro-3-phosphocholine

POPG: 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycérol

SLN : *Solid Lipid Nanoparticles*, Nanoparticules lipidiques solides

SP-A : *surfactant protein A*, protéine pulmonaire A

SP-B : *surfactant protein B*, protéine pulmonaire B

SP-C : *surfactant protein C*, protéine pulmonaire C

SP-D : *surfactant protein D*, protéine pulmonaire D

TC : *Tilted Condensed*, condensée inclinée

$T_m$  : température de transition

UC : *Untilted condensed*, condensée non inclinée

*Pour nonna et Jacquie Jacquie girl,*



## Remerciements

Vous tenez présentement entre vos mains le fruit de 3 années d'efforts. Durant ces 3 années, j'ai vécu beaucoup de bas et beaucoup de hauts. J'en ai appris beaucoup sur le monde de la recherche en chimie et encore plus sur moi. J'ai grandi en tant que scientifique et en tant que femme adulte. Je suis extrêmement fière du parcours accompli, se fut haut en couleur, mais au combien gratifiant et enrichissant.

Ce cheminement n'aurait pas été possible sans ma directrice, Antonella. Je tiens à vous remercier de m'avoir acceptée dans votre groupe, d'avoir cru en moi et de m'avoir laissé ma chance. Je veux vous remercier de m'avoir appris à me faire confiance, à travailler fort et à prendre la vie un jour à la fois. Vous êtes une pédagogue hors pair, présente pour ses étudiants et investie dans le projet de chacun. J'espère que vous réalisez à quel point cette maîtrise est importante pour moi et que vous y êtes pour beaucoup. Merci pour tout.

I would also like to thank Christine DeWolf from Concordia University. Thank you, Christine, for your support and everything you taught me during my master, I learned a lot because of you. You and Antonella were and will always be role models to me. A special thank you to Dalia from Christine's group. Thank you, Dalia, for your mental support and for the good laughs we had. I would also like to thank all members (and ex-member) of the group, thank you Renaud, Hala, Mahshid and Janet.

J'aimerais remercier mes deux collègues (que je considère plus comme mes grandes sœurs scientifiques) Fadwa et Ons. Merci de m'avoir accueillie à bras ouverts et de m'avoir appuyée tout au long de mon parcours. Merci de m'avoir écoutée, de m'avoir conseillée. Vous êtes toutes les deux de grandes inspirations pour moi. Vous m'avez aidée à me bâtir en tant que scientifique et en tant que femme. Je vous en serai éternellement reconnaissante.

Je voudrais aussi remercier le vétéran du groupe Badia, Éric. Merci pour ton aide tout au long de ma maîtrise. Sans toi j'aurais probablement passé beaucoup trop de temps sur plusieurs problèmes. Un gros merci aussi à Jacqueline qui m'a tout appris dans le monde merveilleux des



monocouches Langmuir et qui est restée disponible tout au long de maîtrise pour m'aider. Merci aussi à Patricia qui a ensoleillé mes journées grâce à sa bonne humeur et son positivisme. Merci Patricia pour ton écoute et tes précieux conseils, j'ai grandement évolué grâce à toi. Merci à mon stagiaire Christophe de m'avoir accompagné durant la fin de ma maîtrise et d'avoir fait avancer le projet dans une nouvelle direction. Conserve ta soif d'apprendre et ta curiosité, elles te mèneront loin.

Finalement, j'aimerais remercier tous mes proches pour le support qu'ils m'ont offert durant ces années. Merci à ma mère Nathalie pour son support financier, son écoute et ses sages paroles qui ont su me rassurer. Merci à mon père Antonio d'avoir payé mes études et d'avoir cru en moi durant tout mon parcours académique. Tous les deux, vous m'avez toujours encouragée à me dépasser, à persévérer et à m'écouter pour que je me respecte, pour que je sois heureuse. Je vous aime plus que tout. Merci aussi à mon frère Marc-Antoine, je t'aime fort grand frère. Merci à mes amies, particulièrement Flavie, Frédérique et Nadia, pour votre support. Merci de m'avoir écoutée, de m'avoir conseillée et de m'avoir changé les idées lorsque j'en avais besoin. Je vous aime de tout mon cœur. Le dernier et non le moindre, un énorme merci à mon copain Jean-Philippe. Merci d'avoir été là pour moi durant ces années, d'avoir cru en moi et de m'avoir encouragée à persévérer. Tu m'as appris à avoir confiance en moi et à me dépasser. Merci pour tous ces beaux moments passés ensemble, pour tous nos fous rires, je vous en souhaite à l'infini. Je t'aime plus que tout.

# Chapitre 1 – Introduction générale

## 1.1 Motivation

Le cancer des poumons représente 13% des différents types de cancers et 25% des morts dues au cancer. Au Canada, on estime que 81 canadiens sont diagnostiqués du cancer des poumons tous les jours, et 58 en meurent. Ceci représente pratiquement 30 000 cas par année et 22 000 décès.<sup>1</sup> Les nombreuses injections et traitements de chimiothérapie à répétition peuvent être accablants pour un patient déjà épuisé. L'intérêt pour faciliter le traitement de ce cancer commun est ainsi bien présent. L'utilisation de nanoparticules de phytyglycogène comme vecteur de médicaments pourrait changer la façon dont le cancer du poumon est traité. Le nanophytyglycogène est une nanoparticule composée de molécules de glucose, ce qui le rend non-biopersistant et non-toxique. L'innovation de ce traitement, outre l'utilisation d'un nanomatériau physiologiquement compatible, est l'administration du nanophytyglycogène par inhalation, ce qui permet un traitement moins intrusif que son injection et plus efficace que son ingestion. Le but ultime de ce projet est d'administrer par les voies respiratoires, à l'aide du nanophytyglycogène, un peptide anticancéreux et antimicrobien à double action dont l'administration par voie orale ou par injection est problématique.

Avant que cette technique devienne pratique commune, plusieurs étapes sont nécessaires pour démontrer son efficacité. Le nanophytyglycogène est certifié GRAS (*Generally Recognized as Safe*) par le Food and Drug Administration pour l'ingestion, mais pas pour l'inhalation. Il faut ainsi premièrement s'assurer que la présence de cette nanoparticule dans les poumons n'affectera pas le cycle respiratoire. Deuxièmement, il faut étudier l'insertion et la rétention du médicament dans le nanophytyglycogène ainsi que le relargage du thérapeutique dans les poumons. Troisièmement, une étude clinique est nécessaire afin de s'assurer de l'efficacité de transport du nanophytyglycogène dans un milieu *in vivo*. Mon projet consiste ainsi à effectuer la première étape d'une longue série d'études pouvant faire avancer le traitement du cancer des poumons.

Le présent mémoire propose donc une étude des effets néfastes potentiels de nanoparticules de phytoglycogène sur les poumons. Le premier chapitre est une introduction générale portant sur différents sujets essentiels pour la compréhension de cette étude, tels que les avantages des nanoparticules et des poumons dans le traitement de diverses maladies, la présentation du nanomatériau étudié, une description du fonctionnement et des composantes des poumons, ainsi que les objectifs détaillés de cette recherche. Les trois chapitres suivants porteront respectivement sur la théorie des techniques utilisées lors de ce projet (chapitre 2), sur les résultats obtenus, présentés sous forme d'article publié dans le journal Langmuir, lors de l'étude des effets néfastes potentiels du nanophytoglycogène sur le surfactant pulmonaire (chapitre 3) et, finalement, le chapitre 4 conclura le présent mémoire avec quelques perspectives d'amélioration du projet et la proposition de travaux futurs.

## **1.2 Les poumons : une voie d'entrée prometteuse pour l'administration de médicaments**

Les poumons sont responsables de l'échange gazeux avec le réseau sanguin et permettent ainsi l'oxygénation de toutes les cellules du corps. Due à la fréquence élevée des cycles respiratoires, l'inhalation est la voie d'exposition aux particules aéroportées la plus importante.<sup>2</sup> Cet organe essentiel à la vie peut ainsi être utilisé dans le domaine de la nanomédecine comme voie d'entrée pour différents traitements.

### **1.2.1 Les avantages des poumons et de l'inhalation**

L'inhalation d'ingrédients thérapeutiques actifs est une voie d'administration prometteuse. L'inhalation est une méthode moins invasive que l'injection dans le système sanguin.<sup>3-4</sup> Tout récemment, un inhalateur d'insuline a été mis sur le marché, permettant aux personnes diabétiques d'inhaler leur insuline au lieu de se l'injecter.<sup>5</sup> L'injection est une méthode peu pratique étant donné la fréquence élevée de l'administration de cette hormone<sup>6</sup> et la possibilité d'infection à la suite de nombreuses injections au même site.<sup>7</sup> L'inhalation de médicaments est aussi plus avantageuse que l'ingestion de ceux-ci puisque, contrairement aux voies respiratoires, la voie gastro-intestinale possède un haut taux de dégradation enzymatique

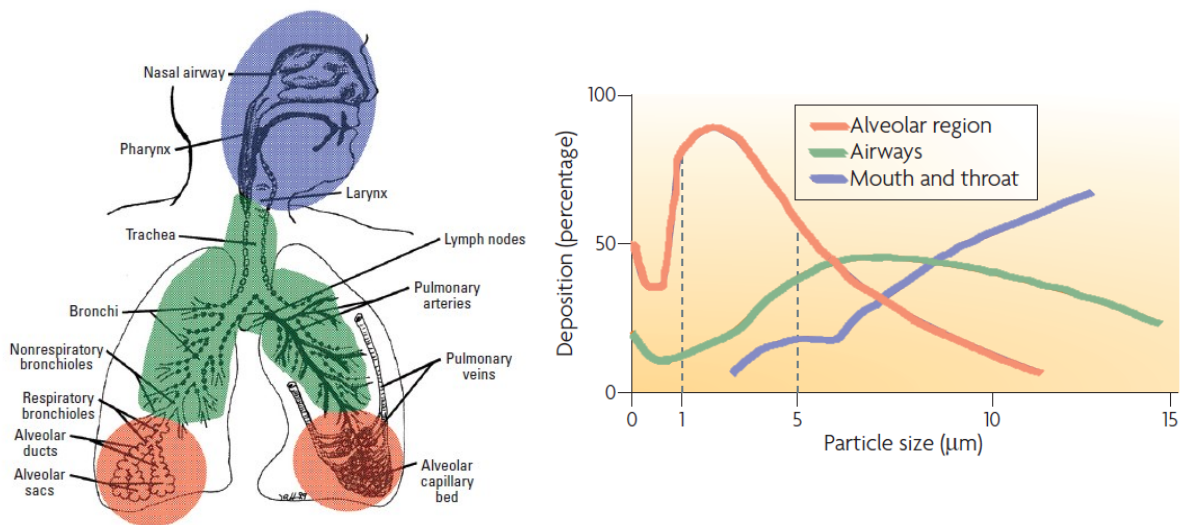
ainsi que des membranes peu perméables.<sup>4, 6</sup> Un médicament inhalé aura ainsi moins de chance de se faire dégrader et aura plus tendance à se faire absorber par le système que s'il est ingéré.

Les poumons possèdent de nombreux avantages tels qu'une grande surface (70-100 m<sup>2</sup>), favorisant l'adsorption/absorption locale et rapide de molécules.<sup>2-4, 6, 8-9</sup> Les poumons sont aussi un milieu acide faible, où l'activité protéolytique, soit la décomposition des protéines, est limitée.<sup>4, 10-11</sup> Il est ainsi possible d'administrer localement et de manière efficace un médicament directement aux poumons. Cependant, les possibilités de traitements vont au-delà des poumons. En effet, la barrière épithéliale fine (0,2 µm)<sup>4</sup> des alvéoles (**Figure 1.1**) ainsi que le système vasculaire sous-jacent abondant permettent aux médicaments de pénétrer dans le réseau sanguin. Il est donc possible de cibler l'organe désiré et d'y livrer un médicament grâce à la perméabilité des membranes et au vaste réseau de vaisseaux sanguins.<sup>2, 4, 6, 9</sup> L'inhalation de médicament est une route de livraison locale et systémique ne se limitant pas qu'aux traitements de maladies pulmonaires, mais vise plutôt l'ensemble du corps humain. Par exemple, de manière locale, l'inhalation de médicaments est couramment utilisée pour traiter les crises d'asthmes.<sup>12</sup> La livraison systémique est utilisée comme traitement pour contrôler le diabète mentionné précédemment (Afrezza®), pour aider les gens à cesser de fumer avec les inhalateurs de nicotine<sup>13</sup> (Nicorette®) ou pour remplacer certains vaccins intramusculaires comme ceux de la grippe saisonnière avec des vaccins intranasaux par exemple.<sup>14</sup>

### 1.2.2 Transport des particules dans le système respiratoire

La taille des particules inhalées dicte leur parcours dans le système respiratoire ainsi que leur destination. La majorité des particules d'environ 8-13 µm sera déposée dans la région nasopharyngée du système respiratoire représentée en violet dans la **Figure 1.1**. Ces particules seront déposées dans les voies respiratoires supérieures par impaction, soit lorsqu'elles entrent en collision avec les parois dû à leur grande inertie.<sup>2, 4, 9</sup> Plus la taille diminue, plus les particules auront tendance à se déposer dans les régions trachéobronchique et alvéolaire, représentées en vert et en orange respectivement (**Figure 1.1**). Les particules de tailles intermédiaires (environ 3-8 µm) se déposent par sédimentation gouvernée par les forces gravitationnelles. Elles seront prises au piège par le mucus qui tapisse les voies respiratoires supérieures et seront éjectées par

une toux par exemple.<sup>2,4,9</sup> Le mécanisme de déposition principal des particules présentes dans les alvéoles (1-3  $\mu\text{m}$ ) est la diffusion gouvernée par le mouvement Brownien, soit lorsqu'elles possèdent de petits mouvements aléatoires. Les particules avec une taille d'environ 1  $\mu\text{m}$  et moins se rendent jusqu'aux alvéoles, mais sont trop petites pour y être déposées. Elles auront plutôt tendance à être expirées dû à leur faible inertie.<sup>2-4</sup> Il est aussi question de précipitation électrostatique, mais seulement lorsque les particules possèdent une charge électrique. Une petite taille facilite ainsi le passage des particules dans les poumons et même le passage à travers les cellules épithéliales leur permettant d'atteindre le réseau sanguin.<sup>15</sup> Par contre, l'inhalation directe de thérapeutique engendre une courte durée des effets pharmaceutiques et requiert l'inhalation d'une grande quantité.<sup>16</sup>



**Figure 1.1.** Circulation de particules inhalées dans le système respiratoire. Figures modifiées des références<sup>15, 17-18</sup>

### 1.3 Les nanoparticules : des vecteurs idéaux

Dans cette optique, les nanoparticules (NPs) sont des vecteurs idéaux d'acheminement spécifique de molécules thérapeutiques puisqu'elles permettent d'améliorer la stabilité, la biodisponibilité, le ciblage, l'absorption, les effets pharmaceutiques ainsi que l'activité biologique du médicament.<sup>11</sup> Tout matériau organique ou inorganique dont l'une des dimensions est de 1 à

100 nm et dont les propriétés physicochimiques sont fortement affectées par la dimension réduite est considéré comme une nanostructure.

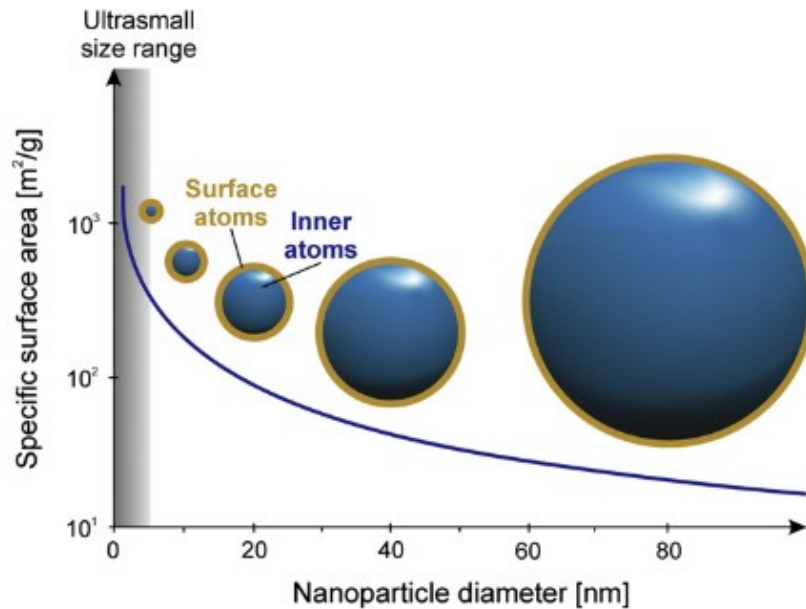
### 1.3.1 Avantages des nanoparticules

Les nanoparticules sont versatiles puisqu'elles possèdent une multitude de caractéristiques variables. Il est possible d'en choisir la composition chimique et de fonctionnaliser leur surface afin d'obtenir une reconnaissance spécifique d'une région et de contrôler le relargage du médicament. De plus, l'encapsulation des médicaments dans des NPs permet de les protéger du milieu biologique afin d'arriver intact à destination.<sup>2</sup> Il est aussi possible de choisir la taille adéquate selon la région cible désirée.

La faible solubilité dans l'eau représente une limitation pour de nombreux thérapeutiques.<sup>2, 9, 19-20</sup> Ceux-ci doivent être administrés en grande quantité à l'aide de vecteurs aqueux et de surfactants ou en les modifiant directement. Cependant, ces changements peuvent influencer l'efficacité du médicament<sup>21</sup> ainsi qu'apporter des effets secondaires pouvant mettre en danger la santé des patients.<sup>6</sup> Les nanoparticules permettent ainsi la livraison de thérapeutiques en petites quantités en augmentant leur solubilité dans l'eau grâce aux nombreuses possibilités dans la composition chimique de ces vecteurs.<sup>22</sup> Par exemple, des NPs de triglycérides ou de polymères permettent d'augmenter la solubilité de médicaments lipophiles, ce qui améliore par le fait même leur effet thérapeutique.<sup>3</sup> Les nombreuses possibilités dans la composition chimique permettent aussi de sélectionner des molécules tolérables physiologiquement afin d'éviter certains effets néfastes possibles. Par exemple, les nanoparticules lipidiques solides (SLN) sont couramment utilisées comme vecteur de médicaments puisqu'elles sont composées de phospholipides physiologiques, ce qui leur confère une faible toxicité.<sup>3</sup> Cette variété permet aussi de contrôler le relargage du médicament en choisissant un matériau avec un taux de dégradation précis dans le corps.<sup>4</sup>

Les nanoparticules possèdent un rapport *aire de surface/volume* élevé comparativement aux grandes particules, ce qui les rend plus actives biologiquement.<sup>2, 15, 23</sup> En effet, le ratio *nombre d'atomes en surface/nombre d'atomes totaux* augmente avec la diminution de la taille des particules, ce qui les rend plus réactives en surface (**Figure 1.2**). Ainsi, les nanoparticules d'une

taille de 10 nm et moins ont un nombre significatif d'atomes en surface comparativement au nombre total d'atomes. Il est possible de bénéficier de cette caractéristique puisqu'elle confère à la NP une grande capacité de transport, une augmentation d'absorption ainsi qu'une augmentation dans l'interaction avec les tissus biologiques. La combinaison de la grande surface des poumons et de l'activité en surface des NPs offre la possibilité de livraison ciblée de médicaments.<sup>3-4</sup>



**Figure 1.2.** Aire de surface spécifique en fonction de la taille de la particule sphérique. Figure reproduite de la référence<sup>24</sup>

Il est aussi possible de fonctionnaliser la surface des NPs afin de cibler la région désirée. L'ajout de groupements fonctionnels permet entre autres de minimiser l'interaction des NPs avec les molécules biologiques qui pourraient s'y lier et influencer son parcours dans le corps.<sup>23</sup> Cet ajout peut aussi favoriser la présence des NPs afin d'augmenter leur séjour dans le système et ainsi obtenir des effets prolongés de la médication et diminuer la fréquence des doses nécessaires. La modification en surface peut également faciliter l'encapsulation du médicament, l'absorption du complexe NP-Thérapeutique ainsi que le contrôle du relargage du médicament.<sup>3-</sup>

<sup>4</sup> De plus, si la nanoparticule est modifiée avec des groupements chargés, elle se déposera plus

efficacement dans les poumons, particulièrement si elle est chargée positivement.<sup>2, 18</sup> En effet, on retrouve à la surface de nanoparticules chargées diverses biomolécules telles que des oligonucléotides, des peptides, des virus, ainsi que des petites molécules thérapeutiques.<sup>25-29</sup>

Comme mentionné précédemment, la taille d'une particule est un paramètre important afin de pouvoir accéder à la région alvéolaire sans être expiré. C'est pourquoi les complexes NPs-Thérapeutiques sont souvent suspendus en aérosol de gouttelettes liquides ou sèches. Ceci permet d'obtenir un diamètre offrant un maximum de déposition dans les basses voies respiratoires (diamètre aérodynamique de 1-3  $\mu\text{m}$ )<sup>2, 4</sup>, sans avoir à modifier la nanoparticule elle-même. Cette dispersion colloïdale en solution aqueuse permet d'uniformiser la distribution du médicament dans les alvéoles.<sup>6</sup> La suspension en gouttelettes de ces complexes requiert l'utilisation de dispositifs d'inhalation comme un nébuliseur, un inhalateur de poudre sèche ou un aérosol doseur.<sup>2</sup> Avec ces dispositifs, la déposition des NPs dans les poumons dépend du volume inhalé, de la vitesse d'inhalation et de la pause de respiration à la suite de l'inhalation.<sup>9</sup>

Le contrôle qu'offre les NPs comme vecteur de médicaments permet de réduire les doses administrées et ainsi les effets secondaires associés aux traitements.<sup>3-4, 9, 19, 30</sup>

### **1.3.2 Effets néfastes potentiels**

Les nanoparticules sont présentes dans notre environnement ambiant. Que celles-ci soient créées de manière intentionnelle ou pas, elles se retrouvent dans l'air et nous y sommes exposées par les voies respiratoires, gastro-intestinales, cutanées et sanguines.<sup>2</sup> Les avantages associés aux nanoparticules comme transporteurs de médicaments et aux poumons comme voie d'entrée favorisent aussi l'inhalation et l'absorption de particules non désirées pouvant induire une dysfonction cellulaire ainsi qu'une réponse de stress oxydatif.<sup>15</sup>

90%<sup>31</sup> des particules aéroportées proviennent de sources naturelles telles que le désert, les feux de forêt, les volcans et l'évaporation des eaux des océans.<sup>32</sup> Ces particules possèdent une taille entre 100 nm et 2,5  $\mu\text{m}$ , ce qui les rend potentiellement dangereuses pour le fonctionnement des poumons puisqu'elles peuvent s'y déposer.<sup>31-33</sup> De manière générale, l'exposition à ce type de particules engendre des symptômes tels que l'irritation de la peau, des



yeux, de la gorge, et du nez ainsi que l'aggravation de symptômes chez des gens ayant préalablement des conditions respiratoires.<sup>32, 34</sup>

Le 10% restant provient de particules aéroportées produites par les humains.<sup>31</sup> La révolution industrielle aura engendré l'augmentation de particules aéroportées due à des sources anthropiques telles que les moteurs à combustion internes, les centrales électriques et les usines à papier.<sup>15</sup> L'exposition quotidienne à ces sources de particules peut favoriser l'apparition d'une toux chronique.<sup>35</sup>

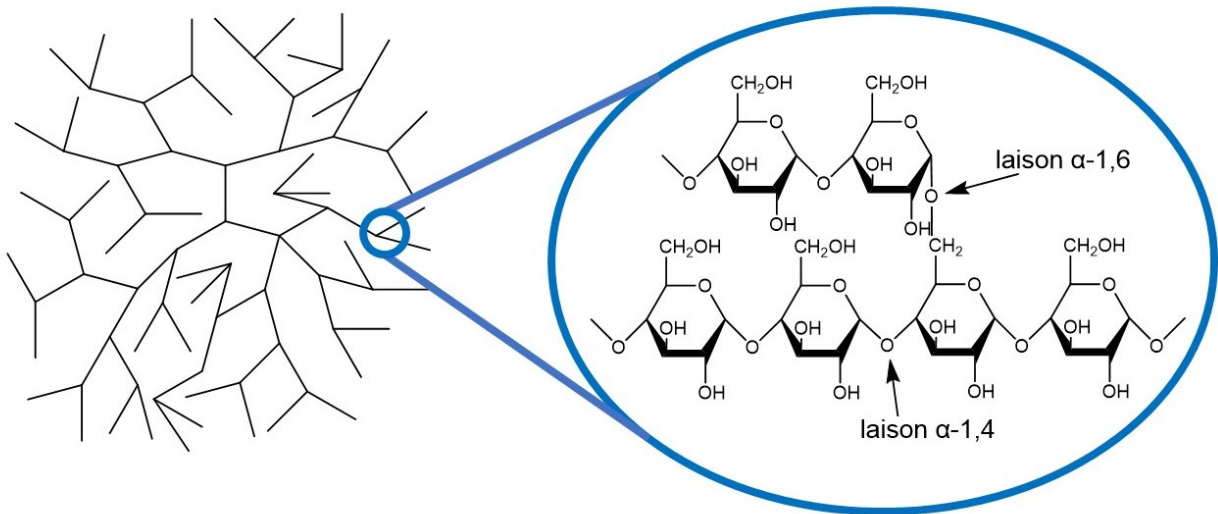
Le développement de la nanotechnologie apporte aussi sa part à l'exposition des humains aux nanoparticules. Les travailleurs d'usine de béryllium, utilisé sous forme de nanoparticule dans les ordinateurs et autres produits électroniques, peuvent développer la maladie chronique du béryllium qui implique de la toux chronique, de l'essoufflement, de la fatigue ainsi que la perte de poids.<sup>36</sup> La silice, qui est un composant très fréquent dans les nanoparticules atmosphériques,<sup>37-39</sup> se retrouve naturellement dans les roches, le sable et le sol, mais est aussi utilisée dans les appareils électroniques, la peinture ainsi que dans les cosmétiques.<sup>40</sup> L'exposition à la silice peut mener à une fibrose pulmonaire ainsi qu'au cancer des poumons et est reliée à plusieurs maladies auto-immunes telles que la sclérodermie.<sup>40-42</sup>

Ces exemples ne représentent qu'une infime partie d'une multitude d'études effectuées. Étant donné les nombreuses caractéristiques possibles, il existe une quantité exponentielle de différentes nanoparticules, chacune pouvant affecter le système respiratoire de manières variées. Que la particule soit de source naturelle ou humaine, que sa formation soit intentionnelle ou non, son danger potentiel doit être étudié. Il est ainsi primordial d'évaluer la nanotoxicité d'une nanoparticule en fonction de ses différentes caractéristiques avant de l'utiliser dans le domaine de la nanomédecine.

## **1.4 Nanoparticules de phytoglycogène**

Dans cette optique, des nanoparticules de phytoglycogène extraites de manière durable de maïs sucrés sans-OGM sont utilisées dans ce projet puisqu'elles sont tolérables physiologiquement. Le phytoglycogène est une biomacromolécule constituée d'unités de glucose

connectées par des liaisons glycosidiques  $\alpha(1-4)$  avec des embranchements  $\alpha(1-6)$  à tous les 10-12 unités, créant une structure similaire à un dendrimère (**Figure 1.3**).<sup>43-44</sup> Le nanophytoglycogène est ainsi considéré comme un polymère dendritique. Les nanoparticules de phytoglycogène sont certifiées GRAS (*Generally Recognized as Safe*) par le Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis. Elles sont non-biopersistantes, non-toxiques, non-immunogènes, hypoallergènes et biodégradables.<sup>45</sup>



**Figure 1.3.** Structure dendritique et composition chimique des nanoparticules de phytoglycogène

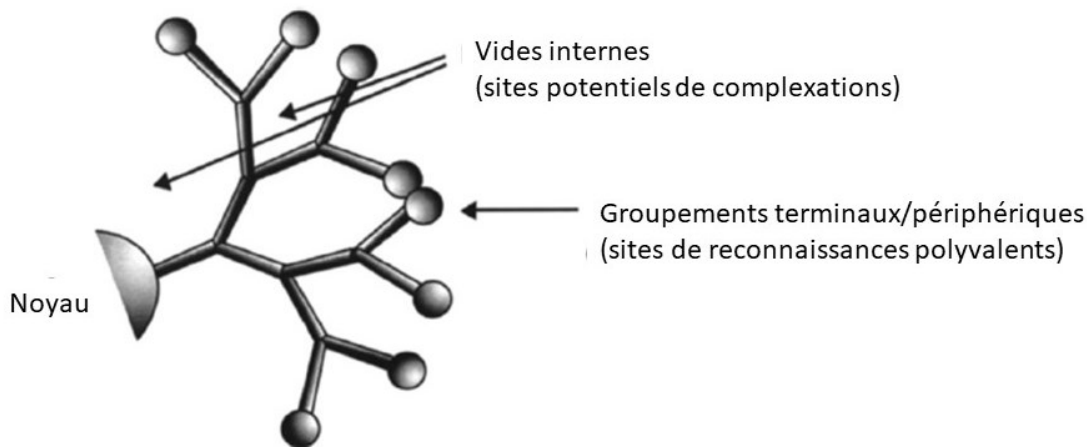
### 1.4.1 Synthèse

La préparation des nanoparticules effectuée par Glysantis © démontre bien la simplicité du produit. La production commence avec des grains de maïs contenant 75% d'humidité qu'ils vont combiner avec de l'eau déionisée et pulvériser au mélangeur. La purée obtenue est par la suite centrifugée afin d'en récolter le surnageant qui sera filtré pour en retirer les matériaux fibreux, protéines et lipides non désirés. Le rétentat est par la suite mélangé avec de l'éthanol afin de faire précipiter le phytoglycogène et centrifugé à nouveau. La pastille résultante, contenant les nanoparticules, est mise au four à 50 °C pendant 24 heures et broyée afin de passer

dans un tamis de 0,354 mm.<sup>20, 46</sup> Des nanoparticules de phytoglycogène de basse viscosité, hydrophiles, monodisperses et hautement stables en solution aqueuse, puisqu'elles ne s'agrègent pas, sont obtenues.<sup>19, 21-22</sup> Les nanoparticules de phytoglycogène possèdent en effet une faible polydispersité de seulement 10%.<sup>47</sup> Une nanoparticule de phytoglycogène possède une taille d'environ 35 nm, une masse molaire de  $4,16 \times 10^6$  g/mol et est constituée d'une seule macromolécule contenant  $2,59 \times 10^4$  unités de glucose.<sup>46</sup> Bien que la synthèse soit simple et directe, un polymère dendritique (**Figure 1.3**) avec des propriétés physicochimiques avantageuses, telles que la possibilité de fonctionnaliser sa surface et d'y encapsuler des médicaments, est obtenu.

### 1.4.2 Avantages et utilisations

La structure générale d'un dendrimère consiste en un noyau duquel émerge des branchements qui contiennent d'autres embranchements à leur extrémité, et ce, de manière répétitive (**Figure 1.4**).<sup>19, 22</sup> Il y a ainsi un gradient de densité, allant de plus faible à plus élevé en partant du centre.<sup>48</sup> Chaque ajout d'une génération d'embranchements ajoute une quantité exponentielle de groupements fonctionnels<sup>19</sup>, ce qui donne à la structure l'allure d'un arbre, d'où son surnom *tree-like structure*. L'avantage de la structure dendrimérique est la possibilité d'augmenter la surface exposée, et ce, même pour une particule d'une taille de plus de 10 nm. Pour le phytoglycogène, les nanoparticules grandissent vers l'extérieur avec l'ajout de glucose jusqu'à ce que les enzymes responsables de cette croissance soient stériquement inhibées.<sup>44</sup> Plus le nombre de générations augmente, plus le centre de la nanoparticule est blindé de l'environnement extérieur et plus le dendrimère adopte une forme sphérique. Ceci leur confère une structure compacte ainsi qu'un nombre élevé de groupements fonctionnels en périphérie.<sup>22</sup> Des études sur la structure du phytoglycogène par diffusion des neutrons à petit angle ont confirmé la forme sphérique de la nanoparticule.<sup>46</sup>



**Figure 1.4.** Structure générique d'un dendrimère. Figure modifiée de la référence<sup>22</sup>

Cette structure quasi-dendrimérique permet aux nanoparticules de phytoglycogène d'être utilisées dans les cosmétiques comme agent hydratant. Elles peuvent contenir jusqu'à 250%<sup>46</sup> de leur masse en eau grâce au vaste réseau de ponts hydrogènes possibles entre les molécules d'eau et de glucose.<sup>43</sup> La spectroscopie infrarouge permet de caractériser l'organisation des molécules d'eau prises au sein du polymère dendritique. En effet, la vibration du lien O-H dépend de son environnement et est influencée par les interactions possibles avec les molécules voisines. Ce type d'étude a confirmé que la structure quasi-dendrimérique du nanophytoglycogène lui permet de mieux lier et organiser les molécules d'eau comparativement aux polysaccharides linéaires.<sup>44, 49</sup> Elles sont donc idéales dans les crèmes hydratantes puisqu'elles apportent de l'hydratation à la peau et possèdent une grande capacité de rétention d'humidité. La peau demeure donc hydratée longtemps.

Cette structure quasi-dendrimérique permet aussi au nanophytoglycogène d'être utilisé dans le secteur alimentaire afin d'encapsuler des nutriments. Ce type de NPs permet la livraison par voie orale de ces composés bioactifs qui auraient perdu leur activité à la suite de la digestion de l'aliment qui les contient. Chen et al<sup>50</sup> ont utilisé le nanophytoglycogène afin d'augmenter la solubilité de la lutéine, un composé présent dans plusieurs fruits et légumes, jouant un rôle important comme antioxydant dans la prévention de cataractes, dans la dégénération maculaire

et dans d'autres troubles oculaires. Une fois complexée avec la NP, la lutéine possède une plus grande perméabilité aux membranes des cellules épithéliales, la rendant plus bioactive. Chen et al<sup>51</sup> ont aussi obtenu les mêmes conclusions pour la quercitrine, une molécule présente dans plusieurs fruits et légumes, ayant des propriétés anti-inflammatoires et antivirales. Les nanoparticules de phytoglycogène permettent aussi l'acheminement de suppléments cytotoxiques, mais essentiels. Alkie et al<sup>52</sup> les ont en effet utilisées afin d'acheminer par voie orale du sélénium, élément supportant la santé des animaux, et ont démontré une biodisponibilité identique ainsi qu'une cytotoxicité réduite comparativement à l'administration du métal seul.

Il est possible de choisir le nombre de générations de la structure dendrimérique pour contrôler l'accès au centre de la nanoparticule. Un taux intermédiaire de générations permet d'y insérer un médicament tout en le protégeant des enzymes afin qu'il arrive intact à destination. Un plus haut taux de générations engendre de nombreuses extrémités et permet l'ajout de groupements fonctionnels afin d'obtenir un ciblage spécifique.<sup>19, 21-22</sup> La nanoparticule peut être chargée en médicaments de deux manières. La première consiste en une encapsulation non covalente où les molécules thérapeutiques sont simplement contenues dans l'espace interne du dendrimère.<sup>19, 22</sup> Une fois au centre, les molécules peuvent interagir faiblement avec le dendrimère avec des ponts hydrogènes ou des interactions électrostatiques par exemple. La deuxième méthode consiste en la formation de liaisons ioniques ou covalentes entre le médicament et les groupements fonctionnels se trouvant aux extrémités du dendrimère.<sup>19, 21</sup>

Une fois la molécule thérapeutique arrivée à destination, il faut évidemment la relâcher du dendrimère. La libération du médicament dépend de son interaction avec la particule. Par exemple, un médicament encapsulé dans le cœur du dendrimère par interaction hydrophobique peut être relargué lors d'un changement de pH rendant le cœur hydrophile. Ce mécanisme de libération sensible au pH dépend ainsi du profil de protonation/déprotonation du cœur de la nanoparticule. Ce changement de pH peut aussi cliver les liaisons covalentes entre le dendrimère et les molécules thérapeutiques, permettant ainsi de les relarguer.<sup>21</sup> L'environnement acide des tumeurs ainsi que la présence d'enzyme à proximité peuvent aider à cet effet. Il est possible

de modifier tous ces paramètres afin d'obtenir une reconnaissance spécifique ainsi qu'un relargage contrôlé des molécules thérapeutiques.

Les nanoparticules de phytoglycogène sont ainsi utilisées dans le domaine de la médecine. Elles permettent d'acheminer des gènes par voie orale. Alkie et al.<sup>53</sup> ont utilisé le nanophytoglycogène chargé positivement à l'aide de groupements de glycidyltriméthylammonium afin d'encapsuler de l'ARN double brin qui induit la production d'interférons de type 1 essentiels au système immunitaire lors d'infections virales. Le complexe NPs-ARN s'est avéré à améliorer l'assimilation de l'ARN chez les truites arc-en-ciel comparativement au double brin seul. Les nanoparticules de phytoglycogène allongent l'activité thérapeutique, diminuant ainsi la fréquence d'administration nécessaire, et sont moins toxiques que les complexes de liposomes couramment utilisés pour l'acheminement de gènes.<sup>54</sup> La capacité à modifier la surface des nanoparticules a été mise en pratique par Perrone et al.<sup>55</sup> Ils ont fonctionnalisé le nanophytoglycogène avec des groupements d'acide mercaptonicotinique afin de développer un complexe ciblant le mucus. La nanoparticule modifiée s'est avérée à mieux adhérer au mucus et à prendre plus de temps pour se décomposer comparativement à la nanoparticule non modifiée. Cette modification permet ainsi d'augmenter le temps de rétention et l'absorption du nanophytoglycogène dans le système en modifiant ses propriétés adhésives sans pour autant affecter sa faible cytotoxicité. Les nanoparticules de phytoglycogène agissent aussi comme adjuvant dans les vaccins afin de stimuler une réponse immunitaire plus forte.<sup>56-57</sup>

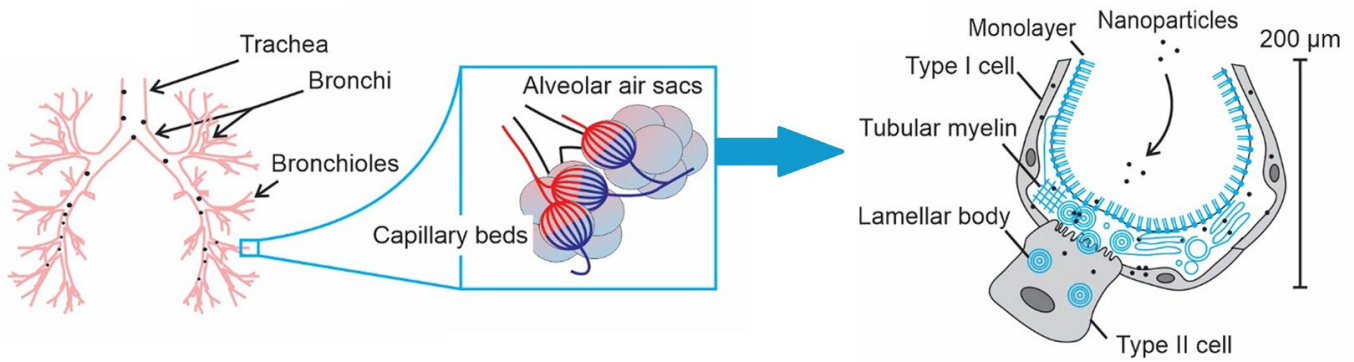
La structure quasi-dendrimérique possède de nombreux avantages. Cependant, la composition chimique joue un rôle essentiel.<sup>22</sup> Premièrement, les nanoparticules de phytoglycogène sont solubles dans l'eau, ce qui règle donc le problème d'insolubilité des médicaments. Xie et al.<sup>58</sup> ont utilisé le nanophytoglycogène fonctionnalisé avec des groupements d'octénysuccinate hydroxypropyle afin d'augmenter la solubilité de 12 000 fois du niclosamide, un médicament utilisé pour traiter les infestations de ténias, un ver parasite, et ayant aussi des propriétés anticancéreuses. Ils ont aussi démontré, avec la même nanoparticule, l'augmentation de la solubilité de six ingrédients pharmaceutiques actifs, soit le célécoxib, le docétaxel, le fénofibrate, la griséofulvine, le resvératrol<sup>59</sup>, ainsi que le paclitaxel.<sup>60</sup> Deuxièmement, le nanophytoglycogène est biocompatible puisqu'il est composé majoritairement d'unités de

glucose. Il est donc un candidat prometteur pour agir comme lubrifiant dans les environnements biologiques, comme les articulations synoviales.<sup>61</sup> Le nanophytoglycogène est dégradé en sucre simple par le corps,<sup>43</sup> ce qui le rend non-biopersistant. En effet, les nanoparticules de phytoglycogène peuvent être hydrolysées par les enzymes présents dans le lysosome ainsi que dans le cytosol<sup>62-64</sup> et les monomères de glucose pourront être utilisés par la cellule pour la production d'énergie,<sup>20</sup> libérant par le fait même le thérapeutique qu'elles contiennent. Ce mécanisme de relargage est encore plus efficace dans certaines cellules cancéreuses où le métabolisme du glycogène et ses enzymes de dégradation sont plus actifs que dans les cellules saines en raison de l'environnement hypoxique.<sup>62-63</sup> Ceci peut ainsi être utilisé à son avantage afin de cibler une cellule cancéreuse et d'y relarguer efficacement un peptide anticancéreux par exemple.

La structure ainsi que la composition chimique du nanophytoglycogène lui confèrent donc plusieurs avantages dans son rôle de vecteur de médicament. Étant donné son diamètre (non-hydraté) d'environ 35 nm, le nanophytoglycogène atteindra la région alvéolaire des poumons et entrera en contact avec le surfactant pulmonaire (**Figure 1.5**).

## 1.5 Surfactant pulmonaire

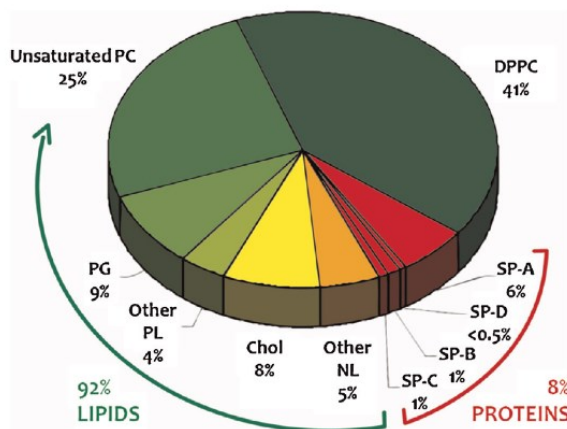
Le surfactant pulmonaire consiste en un mélange de lipides et de protéines sécrétés par des cellules épithéliales de type II, formant une monocouche à l'interface eau-air des alvéoles pulmonaires (**Figure 1.5**). Ces dernières sont de petites tailles, sont présentes en grande quantité (plus de 300 millions<sup>2-3</sup>) et occupent ainsi une grande aire de surface afin de maximiser les échanges gazeux avec le sang. La présence du surfactant pulmonaire est nécessaire puisqu'il permet d'éviter un collapsus pulmonaire dû à la haute courbure des alvéoles. Le surfactant pulmonaire est ainsi l'élément clé de la mécanique respiratoire puisqu'il diminue la tension de surface ainsi que le travail relié à la respiration.<sup>65-68</sup>



**Figure 1.5.** Schéma des alvéoles et du surfactant pulmonaire à l'interface eau-air. Figure modifiée de la référence<sup>69</sup>

### 1.5.1 Phospholipides

Les composants majeurs du surfactant pulmonaire sont les lipides (92% massique), dont la majorité est des phospholipides<sup>66-67</sup> (**Figure 1.6**). Ce sont des molécules amphiphiles possédant une tête polaire et deux chaînes alkyles hydrophobes. La première interagit avec l'eau alors que la queue hydrophobe est exposée à l'air afin d'éviter tout contact avec l'eau, formant ainsi un film de l'épaisseur d'une molécule à l'interface eau-air.<sup>70</sup> C'est cette monocouche qui permet d'éviter l'effondrement des alvéoles pulmonaires en réduisant la tension de surface.



**Figure 1.6.** Composition en pourcentage massique du surfactant pulmonaire. Figure reproduite de la référence<sup>68</sup>



Le surfactant pulmonaire est majoritairement composé de phospholipides ayant une tête polaire zwitterionique, la phosphatidylcholine (PC). Le phospholipide le plus abondant, soit environ 40% du surfactant pulmonaire<sup>66-68</sup>, est le 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (DPPC), un phospholipide ayant des chaînes alkyles saturées. On y retrouve aussi des PC ayant des chaînes alkyles insaturées, comme le 1-palmitoyl-2-oleoyl-glycéro-3-phosphocholine (POPC). Des phospholipides possédant une tête polaire anionique, phosphoglycérol (PG), représentent une portion moindre d'environ 8%<sup>67</sup>, dont la majorité est occupée par le 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoglycérol (POPG), un phospholipide insaturé anionique. Il y a également d'autres types de têtes polaires comme la phosphatidylinositol (PI) et la phosphatidyléthanolamine (PE) ainsi que des lipides neutres, principalement le cholestérol.<sup>67-68</sup>

71

La présence de phospholipides saturés et insaturés apporte un équilibre dans le film. Certains phospholipides saturés, comme le DPPC, sont en phase gel à température physiologique. Ils ont la capacité de former des structures compactes et permettent ainsi d'atteindre des tensions de surface qui s'approchent de  $0 \text{ mN m}^{-1}$  (vs la tension de surface de l'eau d'environ  $72 \text{ mN m}^{-1}$ <sup>72</sup>). Le DPPC est le phospholipide générant majoritairement cette valeur basse de tension de surface.<sup>67-68</sup> Certains phospholipides insaturés, comme le POPG, ou saturés, mais ayant de courtes chaînes alkyles, sont plutôt en phase fluide à la température du corps, apportant une certaine fluidité à la monocouche et rendant le cycle respiratoire réversible. Ils facilitent aussi l'adsorption des phospholipides en phase gel à la surface.<sup>66-67</sup>

## 1.5.2 Protéines pulmonaires

Le 8% restant dans la composition du surfactant pulmonaire est occupé par les protéines pulmonaires, appelées *surfactant proteins* (SPs) en anglais. Elles sont divisées en deux catégories, soit les grandes protéines hydrophiles non actives en surface ainsi que les petites protéines hydrophobes actives en surface.<sup>67-68</sup>

### 1.5.2.1 Protéines pulmonaires A et D

La première catégorie comprend deux protéines pulmonaires, la SP-A et la SP-D, qui jouent un rôle important dans la défense contre les pathogènes (organismes causant des maladies).<sup>67-68</sup>

<sup>73</sup> Ces deux protéines font partie de la famille des collectines (collagène/lectine<sup>74</sup>) reconnue pour se lier à une variété de microorganismes.<sup>68</sup> En effet, elles interagissent avec différents microbes tels que des champignons, de la levure, des bactéries, des allergènes, des virus ainsi que des substrats inorganiques environnementaux afin de former des agglomérats.<sup>74-76</sup> Cette structure facilite leur reconnaissance ainsi que leur élimination. Un autre mécanisme de défense utilisé par ces protéines pulmonaires est l'opsonisation qui consiste en l'identification de ces microorganismes comme étant nocifs.<sup>74, 76</sup> La SP-A et la SP-D permettent aussi l'inhibition de la croissance de plusieurs bactéries en formant une barrière physique empêchant l'absorption de nutriments. Elles sont aussi reconnues pour augmenter la phagocytose, un processus éliminant des pathogènes.<sup>75</sup> De plus, ces protéines favorisent la production d'intermédiaires réactifs de l'oxygène et de l'azote, pouvant tuer certains pathogènes.<sup>76</sup>

Il a été prouvé sur des rats qu'une déficience de la SP-A entraîne une élimination retardée des microbes, une augmentation de la réponse inflammatoire ainsi qu'une diminution d'intermédiaires réactifs de l'oxygène et de l'azote. Une administration de la SP-A a réglé tous ces symptômes. Une trop petite quantité de la SP-D entraîne une diminution de l'absorption de macrophages, cellules responsables de la détection et de l'élimination de pathogènes, ainsi qu'une augmentation de réponse inflammatoire.<sup>74</sup> En effet, les deux protéines régulent l'inflammation, soit en la favorisant afin d'alerter la présence de pathogènes, soit en la diminuant lorsque la réponse est trop élevée et pourrait affecter l'échange gazeux lors de la respiration.<sup>74</sup> La SP-A possède aussi un rôle dans la mécanique respiratoire qui est de favoriser l'adsorption de DPPC à l'interface eau-air<sup>66-67</sup> ainsi que de participer à la formation de myéline tubulaire (**Figure 1.5**), un réservoir important de phospholipides.<sup>74</sup> Pour sa part, la SP-D régule l'homéostasie du surfactant pulmonaire en contrôlant la sécrétion et l'adsorption de phospholipides.<sup>74</sup> Cependant, ces deux protéines ne sont pas essentielles pour le cycle respiratoire en soi.

### **1.5.2.2 Protéines pulmonaires B et C**

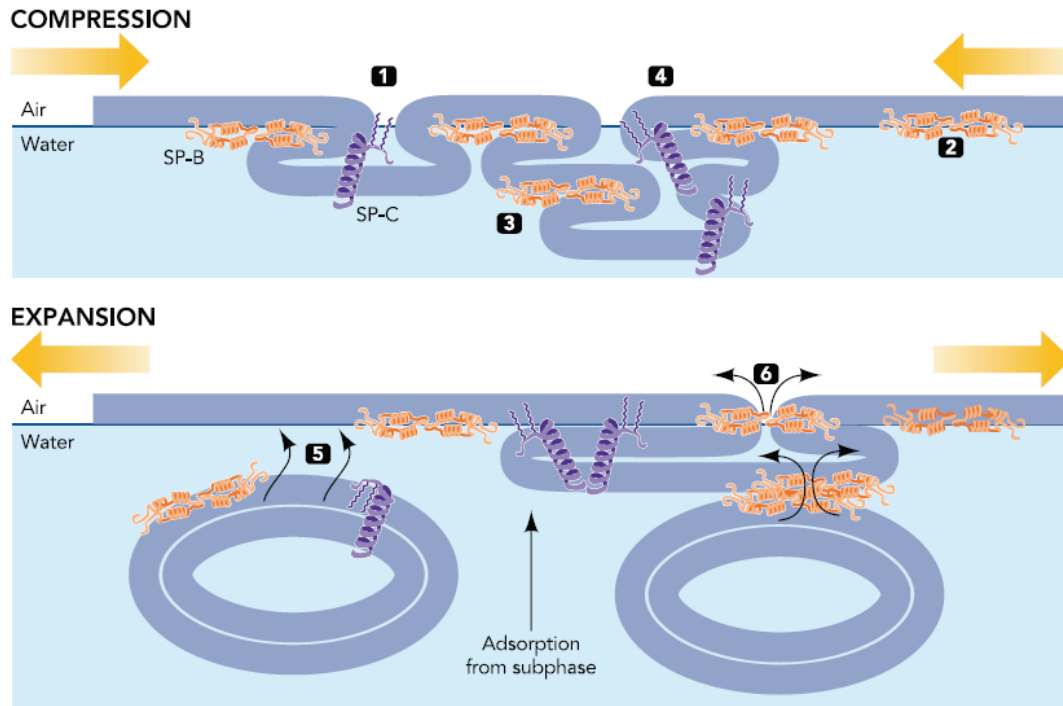
La deuxième catégorie comprend aussi deux protéines pulmonaires, soit la SP-B et la SP-C, les protéines hydrophobes et actives en surface. Celles-ci jouent un rôle primordial dans la réversibilité du cycle respiratoire en favorisant l'adsorption et la désorption de phospholipides à l'interface eau-air des alvéoles.<sup>77-78</sup> Lors de l'expiration, l'aire disponible pour les phospholipides

diminue, forçant certains à quitter l'interface eau-air. De manière générale, ce sont les phospholipides insaturés qui quittent la monocouche puisqu'ils sont instables à haute compression. Les phospholipides exclus seront maintenus sous la monocouche, formant un réservoir. Cette étape du cycle respiratoire se nomme le *squeeze-out*. Lors de l'inhalation, les phospholipides seront incorporés à nouveau dans le film, et ce, sans perte de matériel. Dans cette optique, la SP-B et la SP-C participent à la formation de ce réservoir qui est composé d'une bicouche de phospholipides attachée à la monocouche, permettant l'insertion et le retrait des phospholipides lors du cycle de compression/expansion (**Figure 1.7**).

La SP-B est un dimère d'environ 17 kDa constitué de 79 acides aminés.<sup>67</sup> Elle joue un rôle important dans l'adsorption de nouveau matériel à l'interface lors de l'inspiration. Sa charge de 7+<sup>68</sup> ainsi que sa structure tridimensionnelle favorisent son interaction avec les phospholipides, particulièrement avec le POPG ou autres phospholipides anioniques<sup>67</sup>, afin d'augmenter leur pouvoir surfactant, favorisant la stabilité du film. Étant donné sa nature amphiphile, la SP-B permet de lier le réservoir à la monocouche ainsi que de lier une bicouche à une autre (**Figure 1.7**).

La SP-C exclut les phospholipides autres que DPPC de l'interface lors de l'expiration<sup>67</sup> grâce à sa charge nette positive (3+) et à sa structure tridimensionnelle. Elle permet aussi de maintenir la structure du réservoir sous la monocouche, entre autres grâce à des chaînes alkyles ancrées dans la monocouche, et de maintenir les phospholipides en bicouche (**Figure 1.7**). Cette protéine très hydrophobe de 35 acides aminés (4,5 kDa) est la seule protéine pulmonaire qui se retrouve uniquement dans les poumons.<sup>67</sup>

La SP-B et la SP-C permettent ainsi de retirer sélectivement les phospholipides fluides de l'interface eau-air afin de favoriser une monocouche riche en DPPC qui permettra de conserver une basse tension de surface lors de l'expiration. Elles permettent aussi de répartir à nouveau à l'interface les phospholipides maintenant dans le réservoir lors de l'inspiration, évitant ainsi une perte de matériel. La SP-B et la SP-C travaillent en synergie afin de favoriser la réduction de tension de surface et la stabilité du film lors du cycle respiratoire.



**Figure 1.7.** Schématisation de la formation du réservoir par la SP-B et la SP-C durant le cycle de compression et d'expansion. Figure reproduite de la référence<sup>79</sup>

Il a été démontré qu'il est possible de survivre à une carence de la SP-C alors qu'une carence de la SP-B est mortelle pour l'homme.<sup>80-81</sup> C'est ainsi cette dernière qui est priorisée lors de la fabrication de modèles du surfactant pulmonaire. Certains modèles proviennent d'extraits de lavages pulmonaires d'animaux (principalement porcins et bovins), comprenant ainsi l'entièreté (ou presque) des molécules présentes dans le mélange du surfactant pulmonaire. Ces extraits (i.e. Infasurf ©) sont utilisés comme thérapie de remplacement du surfactant pulmonaire afin de traiter des maladies telles que le syndrome de détresse respiratoire (SDR) et le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA). Certains modèles comprennent des phospholipides synthétiques, mais requièrent l'ajout de la SP-B extraite de ces lavages pulmonaires. Cette méthode d'extraction rend la préparation des modèles ardue et la composition de ceux-ci variable.

Walter et al.<sup>73, 82</sup> ont ainsi développé une protéine synthétique analogue à la SP-B, permettant d'éviter les lavages de poumons d'animaux afin d'obtenir ce peptide. Cette méthode permet un meilleur contrôle sur la qualité du produit ainsi que l'obtention d'un meilleur taux de reproductibilité. La super mini-B contient 41 de 79 acides aminés, tout en maintenant sa charge positive ainsi que sa configuration tridimensionnelle essentielles afin de remplir son rôle dans l'interaction avec la monocouche. L'analogue s'est avéré atteindre la réoxygénation chez le rat déficient du surfactant pulmonaire lorsqu'il est administré en tant que traitement en combinaison avec d'autres phospholipides, prouvant son efficacité. La super mini-B permet ainsi de concevoir des modèles du surfactant pulmonaire plus simples et reproductibles.

## **1.6 Les modèles du surfactant pulmonaire en présence de nanoparticules**

La possibilité de reproduire le surfactant pulmonaire simplement a permis l'étude en laboratoire de l'interaction de nanoparticules avec ces modèles. À l'aide de cette méthode *in vitro*, il a été prouvé que, pour les NPs de tailles adéquates pour accéder aux alvéoles pulmonaires, les plus grandes ont tendance à affecter plus grandement la monocouche en retirant des phospholipides de celle-ci lors de la compression.<sup>10-11</sup>

Étant donné l'amphiphilie des phospholipides dans le surfactant pulmonaire, l'hydrophilicité/hydrophobicité des nanoparticules joue un rôle important dans leur interaction avec la monocouche. Des simulations de dynamique moléculaire ainsi que des études *in vitro* ont démontré que les nanoparticules hydrophobes ont tendance à être intégrées dans la monocouche alors que les nanoparticules hydrophiles ont plus de facilité à traverser le surfactant pulmonaire.<sup>10-11, 17, 30, 83-85</sup> Cette rétention des nanoparticules hydrophobes dans la monocouche a tendance à engendrer une perturbation structurelle et ainsi un changement dans la capacité du surfactant pulmonaire à réduire la tension de surface.

En effet, Valle et al.<sup>86</sup> ont démontré, avec des nanoparticules de polystyrène et de poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA), que plus la nanoparticule est hydrophobe, plus celle-ci sera maintenue dans une monocouche d'Infasurf © et plus elle détériora son activité de surface, soit

sa capacité à réduire la tension de surface. Cette rétention dans la monocouche peut causer de l'inflammation.<sup>87</sup> La toxicité des nanoparticules hydrophobes a aussi été démontrée pour des nanoparticules de carbone (nanotubes de carbone/ nanoplaquettes de graphène<sup>88-89</sup>, fullerènes C<sub>60</sub><sup>90</sup>, nanodiamants<sup>91-92</sup>), des nanoparticules de polyorganosiloxane<sup>8, 17, 93</sup>, des nanoparticules de polystyrène fonctionnalisées avec des groupements carboxyliques<sup>94-95</sup> ainsi que des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec des groupements alkyles<sup>96</sup>.

Les nanoparticules hydrophiles sont ainsi d'intérêt pour l'acheminement de thérapeutiques afin de pouvoir pénétrer la monocouche et cibler la région désirée.<sup>11</sup> En revanche, il ne faut pas tenir pour acquis que cette capacité de translocation ne vient pas sans effets secondaires. Par exemple, des nanoparticules hydrophiles de silice ont induit des changements sur l'organisation interfaciale et le comportement de phase de monocouches de DPPC<sup>84</sup>, de DPPC/DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine)<sup>97</sup>, de DPPC/PA (acide palmitique)<sup>98</sup> et de DPPC/POPG.<sup>99-100</sup> Ces effets ont été attribués au comportement hydrophobique acquis par la nanoparticule lors de l'adsorption de surfactants à sa surface. Hu et al<sup>83</sup> ont étudié une monocouche d'Infasurf © en présence de nanoparticules hydrophobes (polystyrène) et hydrophiles (hydroxyapatite). Bien que les images acquises à l'aide de la microscopie à force atomique (AFM) confirment que les nanoparticules hydrophobes ont tendance à s'imprégner dans la monocouche, les deux types de nanoparticules inhibent certaines propriétés biophysiques du film et induisent des changements dans la structure du film. Leurs simulations en dynamique moléculaire ont aussi démontré qu'en traversant une monocouche de DPPC :POPG + SP-B/-C, les nanoparticules hydrophiles retirent une certaine quantité de la SP-B.<sup>83</sup> Cependant, cette affirmation implique une autre caractéristique importante des nanoparticules, soit la charge à la surface.

Les nanoparticules hydrophiles chargées négativement peuvent interagir électrostatiquement avec les protéines chargées positivement et ainsi potentiellement en retirer quelques-unes de la monocouche lors du cycle de compression/expansion.<sup>85</sup> En revanche, ce sont les nanoparticules hydrophiles chargées positivement qui semblent plus nuisibles au cycle respiratoire. En effet, elles demeurent proches des têtes polaires par l'entremise d'interactions électrostatiques avec les phospholipides chargés négativement. Pour les nanoparticules hydrophobes, ce sont plutôt celles chargées négativement qui semblent induire plus de

changements à la monocouche.<sup>30, 94</sup> Les NPs hydrophobes demeurent dans la monocouche et vont ainsi interagir en permanence avec la SP-B. Cette interaction peut dénaturer la protéine et potentiellement nuire aux cycles de compression-expansion étant donné son rôle essentiel dans la réversibilité du cycle respiratoire.<sup>86</sup>

Il est ainsi essentiel de trouver la balance entre les effets secondaires associés à l'inhalation de nanoparticules, tel que le retrait de la SP-B pouvant affecter la réversibilité du cycle respiratoire, et leur capacité à traverser la monocouche pour atteindre la région désirée. Dans cette perspective, des nanoparticules hydrophiles de différentes charges sont étudiées.

## **1.7 Objectifs de la recherche**

Ce projet de recherche se concentre sur l'étude de l'effet de nanoparticules de phytylglycogène sur le surfactant pulmonaire à l'aide de monocouches Langmuir. La charge des nanomatériaux étant un facteur influant sur leur toxicité, des nanoparticules quasi-neutres, anioniques et cationiques sont étudiées afin de déterminer le rôle des forces électrostatiques dans ce type d'interaction. Également, afin de déceler les rôles des différentes composantes présentes dans le surfactant pulmonaire, différents modèles sont étudiés. Le premier système analysé comprend du DPPC, le composant le plus abondant du surfactant pulmonaire. Ce phospholipide zwitterionique et saturé permet la réduction de tension de surface, mais n'est pas représentatif de l'ensemble du mélange puisqu'il manque de fluidité. C'est pourquoi le premier système étudié est composé de DPPC/POPG 70:30, ratio molaire représentant la quantité de phospholipides saturés et insaturés. Ce mélange comprend la phase condensée composée de DPPC ainsi que la phase fluide composée de POPG, un phospholipide insaturé possédant une charge nette négative. Ce système démontre donc le rôle de la charge des phospholipides dans leur interaction avec les nanoparticules de différentes charges. Le deuxième système étudié comprend le même ratio molaire de DPPC et de POPG avec un ajout de 3% massique de l'analogue de la protéine chargée positivement, super mini-B. Ce système permet ainsi l'étude d'un système plus représentatif du surfactant pulmonaire physiologique.

Plusieurs techniques sont employées afin d'obtenir un portrait global et détaillé des possibles effets néfastes liés à l'inhalation de nanophytylglycogènes. À l'aide d'un bain Langmuir,

il est possible d'obtenir une monocouche à l'interface eau/air afin d'imiter le surfactant pulmonaire recouvrant les alvéoles. Cette technique permet aussi d'effectuer des cycles de compression/expansion représentant la respiration. Les résultats obtenus sont des isothermes de la pression de surface en fonction de l'aire par molécule ( $\pi$ -A), donnant de l'information sur l'activité de surface et sur la structure de phase de la monocouche. La présence de NPs sous la monocouche du surfactant pulmonaire peut mener à un changement dans l'allure des isothermes, indiquant une possible altération des propriétés biophysiques. L'imagerie par microscopie à l'angle de Brewster (BAM) permet l'analyse en temps réel de la morphologie des monocouches. Tout changement dans la forme et la taille des domaines (organisation des phospholipides en phase solide) offre davantage d'information sur l'impact des nanoparticules sur le surfactant pulmonaire. L'ellipsométrie à l'interface eau-air est aussi utilisée afin de déceler tout changement d'épaisseur de la monocouche causé par les NPs, permettant d'infirmier ou de confirmer la présence de nanoparticules adsorbées au surfactant pulmonaire.

L'étude de nanoparticules de différentes charges ainsi que la combinaison de plusieurs techniques permettent d'obtenir un portrait global détaillé des effets néfastes potentiels du nanophytoglycogène afin de déterminer le candidat idéal comme vecteur de livraison de médicaments.



## Références Chapitre 1

1. Brenner, D. R.; Weir, H. K.; Demers, A. A.; Ellison, L. F.; Louzado, C.; Shaw, A.; Turner, D.; Woods, R. R.; Smith, L. M., Projected Estimates of Cancer in Canada in 2020. *Can. Med. Assoc. J.* **2020**, *192*, 199-205.
2. Yang, W.; Peters, J. I.; Williams, R. O., Inhaled Nanoparticles—A Current Review. *Int. J. Pharm.* **2008**, *356*, 239-247.
3. Paranjpe, M.; Müller-Goymann, C. C., Nanoparticle-Mediated Pulmonary Drug Delivery: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 5852-5873.
4. Sung, J. C.; Pulliam, B. L.; Edwards, D. A., Nanoparticles for Drug Delivery to the Lungs. *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 563-570.
5. Patton, J. S., Unlocking the Opportunity of Tight Glycaemic Control. *Diabetes Obes. Metab.* **2005**, *7*, S5-S8.
6. Anderson, C. F.; Grimmer, M. E.; Domalewski, C. J.; Cui, H., Inhalable Nanotherapeutics to Improve Treatment Efficacy for Common Lung Diseases. *WIREs Nanomed. Nanobi.* **2020**, *12*, 1-29.
7. Finucane, K.; Ambrey, P.; Narayan, S.; Archer, C. B.; Dayan, C., Insulin Injection Abscesses Caused by Mycobacterium Chelonae. *Diabetes Care* **2003**, *26*, 2483-2484.
8. Sachan, A.; Galla, H., Understanding the Mutual Impact of Interaction Between Hydrophobic Nanoparticles and Pulmonary Surfactant Monolayer. *Small* **2014**, *10* 1069-75.
9. Newman, S. P., Drug Delivery to the Lungs: Challenges and Opportunities. *Ther. Deliv.* **2017**, *8*, 647-661.
10. Lin, X.; Zuo, Y. Y.; Gu, N., Shape Affects the Interactions of Nanoparticles with Pulmonary Surfactant. *Sci. China Mater.* **2015**, *58*, 28-37.
11. Lin, X.; Bai, T.; Zuo, Y. Y.; Gu, N., Promote Potential Applications of Nanoparticles as Respiratory Drug Carrier: Insights from Molecular Dynamics Simulations. *Nanoscale* **2014**, *6*, 2759-2767.
12. Chu, E. K.; Drazen, J. M., Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2005**, *171*, 1202-1208.
13. Cummings, K. M.; Hyland, A., Impact of Nicotine Replacement Therapy on Smoking Behavior. *Annu. Rev. Public Health* **2005**, *26*, 583-599.
14. Birkhoff, M.; Leitz, M.; Marx, D., Advantages of Intranasal Vaccination and Considerations on Device Selection. *Indian J. Pharm. Sci.* **2009**, *71*, 729 - 731.
15. Oberdörster, G.; Oberdörster, E.; Oberdörster, J., Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environ. Health Perspect.* **2005**, *113*, 823-839.
16. Gessler, T.; Seeger, W.; Schmehl, T., Inhaled Prostanoids in the Therapy of Pulmonary Hypertension. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* **2008**, *21*, 1-12.
17. Sachan, A. K.; Harishchandra, R. K.; Bantz, C.; Maskos, M.; Reichelt, R.; Galla, H.-J., High-Resolution Investigation of Nanoparticle Interaction with a Model Pulmonary Surfactant Monolayer. *ACS Nano* **2012**, *6*, 1677-1687.
18. Patton, J. S.; Byron, P. R., Inhaling Medicines: Delivering Drugs to the Body Through the Lungs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 67-74.
19. Madaan, K.; Kumar, S.; Poonia, N.; Lather, V.; Pandita, D., Dendrimers in Drug Delivery and Targeting: Drug-Dendrimer Interactions and Toxicity Issues. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **2014**, *6*, 139-150.

20. Xue, J.; Luo, Y., Properties and Applications of Natural Dendritic Nanostructures: Phytoglycogen and its Derivatives. *Trends Food Sci. Tech.* **2021**, *107*, 432-444.
21. Lo, S.-T.; Kumar, A.; Sun, X., Delivery and Controlled Release of Therapeutics via Dendrimer Scaffolds. In *Nanoparticles for Biotherapeutic Delivery*, Future Science Ltd: 2015; Vol. 2, pp 14-28.
22. Abbasi, E.; Aval, S. F.; Akbarzadeh, A.; Milani, M.; Nasrabadi, H. T.; Joo, S. W.; Hanifehpour, Y.; Nejati-Koshki, K.; Pashaei-Asl, R., Dendrimers: Synthesis, Applications, and Properties. *Nanoscale Res. Lett.* **2014**, *9*, 247-257.
23. Parveen, R.; Shamsi, T. N.; Fatima, S., Nanoparticles-Protein Interaction: Role in Protein Aggregation and Clinical Implications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *94*, 386-395.
24. Zarschler, K.; Rocks, L.; Licciardello, N.; Boselli, L.; Polo, E.; Garcia, K. P.; De Cola, L.; Stephan, H.; Dawson, K. A., Ultrasmall Inorganic Nanoparticles: State-of-the-art and Perspectives for Biomedical Applications. *Nanomed.: Nanotechnol. Biol. Med.* **2016**, *12*, 1663-1701.
25. Cagno, V.; Andreozzi, P.; D'Alicarnasso, M.; Jacob Silva, P.; Mueller, M.; Galloux, M.; Le Goffic, R.; Jones, S. T.; Vallino, M.; Hodek, J.; Weber, J.; Sen, S.; Janeček, E.-R.; Bekdemir, A.; Sanavio, B.; Martinelli, C.; Donalisio, M.; Rameix Welti, M.-A.; Eleouet, J.-F.; Han, Y.; Kaiser, L.; Vukovic, L.; Tapparel, C.; Král, P.; Krol, S.; Lembo, D.; Stellacci, F., Broad-Spectrum Non-Toxic Antiviral Nanoparticles with a Virucidal Inhibition Mechanism. *Nat. Mater.* **2018**, *17*, 195-203.
26. Mahato, M.; Sharma, A. K.; Kumar, P., 4 - Nanoparticles for DNA Delivery. In *Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids*, Nimesh, S.; Chandra, R.; Gupta, N., Eds. Woodhead Publishing: 2017; pp 59-81.
27. Verma, A.; Stellacci, F., Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions. *Small* **2010**, *6*, 12-21.
28. Mitchell, M. J.; Billingsley, M. M.; Haley, R. M.; Wechsler, M. E.; Peppas, N. A.; Langer, R., Engineering Precision Nanoparticles for Drug Delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20*, 101-124.
29. Nel, A. E.; Mädler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M. V.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M., Understanding Biophysicochemical Interactions at the Nano–Bio Interface. *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 543.
30. Beck-Broichsitter, M.; Ruppert, C.; Schmehl, T.; Guenther, A.; Betz, T.; Bakowsky, U.; Seeger, W.; Kissel, T.; Gessler, T., Biophysical Investigation of Pulmonary Surfactant Surface Properties upon Contact with Polymeric Nanoparticles in Vitro. *Nanomed.: Nanotechnol. Biol. Med.* **2011**, *7*, 341-350.
31. Taylor, D. A., Dust in the Wind. *Environ. Health Perspect.* **2002**, *110*, A80-A87.
32. Buzea, C.; Pacheco, I. I.; Robbie, K., Nanomaterials and Nanoparticles: Sources and Toxicity. *Biointerphases* **2007**, *2*, MR17-71.
33. Shi, Z.; Shao, L.; Jones, T. P.; Lu, S., Microscopy and Mineralogy of Airborne Particles Collected During Severe Dust Storm Episodes in Beijing, China. *J. Geophys. Res.: Atmos.* **2005**, *110*, 1-10.
34. Habybabady, R. H.; Sis, H. N.; Paridokht, F.; Ramrudinasab, F.; Behmadi, A.; Khosravi, B.; Mohammadi, M., Effects of Dust Exposure on the Respiratory Health Symptoms and Pulmonary Functions of Street Sweepers. *Malays J Med Sci* **2018**, *25*, 76-84.
35. Pekkanen, J.; Timonen, K. L.; Ruuskanen, J.; Reponen, A.; Mirme, A., Effects of Ultrafine and Fine Particles in Urban Air on Peak Expiratory Flow among Children with Asthmatic Symptoms. *Environ. Res.* **1997**, *74*, 24-33.

36. Maier, L. A., Clinical Approach to Chronic Beryllium Disease and Other Nonpneumoconiotic Interstitial Lung Diseases. *J. Thorac. Imaging* **2002**, *17*, 273-284.
37. Phares, D. J.; Rhoads, K. P.; Johnston, M. V.; Wexler, A. S., Size-Resolved Ultrafine Particle Composition Analysis 2. Houston. *J. Geophys. Res. Atmos.* **2003**, *108*, 8420-8434.
38. Rhoads, K. P.; Phares, D. J.; Wexler, A. S.; Johnston, M. V., Size-Resolved Ultrafine Particle Composition Analysis 1. Atlanta. *J. Geophys. Res.: Atmos.* **2003**, *108*, 8418-8431.
39. Bzdek, B. R.; Horan, A. J.; Pennington, M. R.; Janecek, N. J.; Baek, J.; Stanier, C. O.; Johnston, M. V., Silicon is a Frequent Component of Atmospheric Nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 11137-11145.
40. Tervaert, J. W. C., Silicon Exposure and Vasculitis. In *Encyclopedia of Metalloproteins*, Kretsinger, R. H.; Uversky, V. N.; Permyakov, E. A., Eds. Springer New York: New York, NY, 2013; pp 1983-1988.
41. Noonan, C. W.; Pfau, J. C.; Larson, T. C.; Spence, M. R., Nested Case-Control Study of Autoimmune Disease in an Asbestose-Exposed Population. *Environ. Health Perspect.* **2006**, *114*, 1243-1247.
42. Markovits, D.; Schapira, D.; Wiener, A.; Nahir, A. M., Silica-Related Rheumatoid Arthritis without Lung Involvement. *Clin. Rheumatol.* **2003**, *22*, 53-55.
43. Grossutti, M.; Miki, C.; Dutcher, J. R., Phytoglycogen Nanoparticles: 1. Key Properties Relevant to Its Use as a Natural Moisturizing Ingredient. *H&PC Today* **2017**, *12*, 47-51.
44. Grossutti, M.; Dutcher, J. R., Correlation Between Chain Architecture and Hydration Water Structure in Polysaccharides. *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 1198-1204.
45. Whiting, P. Mirexus Inc. <http://mirexusbiotech.com/mirexus-inc/> (accessed July 16, 2021).
46. Nickels, J. D.; Atkinson, J.; Papp-Szabo, E.; Stanley, C.; Diallo, S. O.; Perticaroli, S.; Baylis, B.; Mahon, P.; Ehlers, G.; Katsaras, J.; Dutcher, J. R., Structure and Hydration of Highly-Branched, Monodisperse Phytoglycogen Nanoparticles. *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 735-743.
47. Dutcher, J. R.; Grossutti, M.; Atkinson, J.; Baylis, B.; Shamana, H.; Bergmann, E.; Nickels, J.; Katsaras, J., Phytoglycogen Nanoarticles: Exciting Science and Promising Technologies from Nature. *Phys. Can.* **2017**, *73*, 91-94.
48. Huang, L.; Yao, Y., Particulate Structure of Phytoglycogen Nanoparticles Probed Using Amyloglucosidase. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83*, 1665-1671.
49. Grossutti, M.; Bergmann, E.; Baylis, B.; Dutcher, J. R., Equilibrium Swelling, Interstitial Forces, and Water Structuring in Phytoglycogen Nanoparticle Films. *Langmuir* **2017**, *33*, 2810-2816.
50. Chen, H.; Yao, Y., Phytoglycogen to Increase Lutein Solubility and Its Permeation through Caco-2 Monolayer. *Food Res. Int.* **2017**, *97*, 258-264.
51. Chen, H.; Yao, Y., Phytoglycogen Improves the Water Solubility and Caco-2 Monolayer Permeation of Quercetin. *Food Chem.* **2017**, *221*, 248-257.
52. Alkie, T. N.; de Jong, J.; Moore, E.; DeWitte-Orr, S. J., Phytoglycogen Nanoparticle Delivery System for Inorganic Selenium Reduces Cytotoxicity without Impairing Selenium Bioavailability. *Int J Nanomedicine* **2020**, *15*, 10469-10479.
53. Alkie, T. N.; de Jong, J.; Jenik, K.; Klinger, K. M.; DeWitte-Orr, S. J., Enhancing Innate Antiviral Immune Responses in Rainbow Trout by Double Stranded RNA Delivered with Cationic Phytoglycogen Nanoparticles. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 13619-13631.

54. Engelberth, S. A.; Hempel, N.; Bergkvist, M., Chemically Modified Dendritic Starch: A Novel Nanomaterial for siRNA Delivery. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 1766-1774.
55. Perrone, M.; Lopalco, A.; Lopodota, A.; Cutrignelli, A.; Laquintana, V.; Douglas, J.; Franco, M.; Liberati, E.; Russo, V.; Tongiani, S.; Denora, N.; Bernkop-Schnürch, A., Preactivated Thiolated Glycogen as Mucoadhesive Polymer for Drug Delivery. *Eur. J. Pharm. and Biopharm.* **2017**, *119*, 161-169.
56. Lu, F.; Mosley, Y.-Y. C.; Rodriguez Rosales, R. J.; Carmichael, B. E.; Elesela, S.; Yao, Y.; HogenEsch, H., Alpha-D-Glucan Nanoparticulate Adjuvant Induces a Transient Inflammatory Response at the Injection Site and Targets Antigen to Migratory Dendritic Cells. *NPI Vaccines* **2017**, *2*, 1-9.
57. Lu, F.; Mencia, A.; Bi, L.; Taylor, A.; Yao, Y.; HogenEsch, H., Dendrimer-Like Alpha-d-Glucan Nanoparticles Activate Dendritic Cells and Are Effective Vaccine Adjuvants. *J. Control. Release* **2015**, *204*, 51-59.
58. Xie, Y.; Yao, Y., Octenylsuccinate Hydroxypropyl Phytoglycogen Enhances the Solubility and In-Vitro Antitumor Efficacy of Niclosamide. *Int. J. Pharm.* **2018**, *535*, 157-163.
59. Xie, Y.; Yao, Y., Octenylsuccinate Hydroxypropyl Phytoglycogen, a Dendrimer-Like Biopolymer, Solubilizes Poorly Water-Soluble Active Pharmaceutical Ingredients. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *180*, 29-37.
60. Xie, Y.; Yao, Y., Incorporation With Dendrimer-Like Biopolymer Leads to Improved Soluble Amount and In Vitro Anticancer Efficacy of Paclitaxel. *J. Pharm. Sci.* **2019**, *108*, 1984-1990.
61. Adibnia, V.; Ma, Y.; Halimi, I.; Walker, G. C.; Banquy, X.; Kumacheva, E., Phytoglycogen Nanoparticles: Nature-Derived Superlubricants. *ACS Nano* **2021**.
62. Favaro, E.; Bensaad, K.; Chong, Mei G.; Tennant, Daniel A.; Ferguson, David J. P.; Snell, C.; Steers, G.; Turley, H.; Li, J.-L.; Günther, Ulrich L.; Buffa, Francesca M.; McIntyre, A.; Harris, Adrian L., Glucose Utilization via Glycogen Phosphorylase Sustains Proliferation and Prevents Premature Senescence in Cancer Cells. *Cell Metabolism* **2012**, *16*, 751-764.
63. Zois, C. E.; Harris, A. L., Glycogen Metabolism Has a Key Role in the Cancer Microenvironment and Provides New Targets for Cancer Therapy. *J Mol Med (Berl)* **2016**, *94*, 137-154.
64. Zois, C. E.; Favaro, E.; Harris, A. L., Glycogen Metabolism in Cancer. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *92*, 3-11.
65. Schürch, S.; Goerke, J.; Clements, J. A., Direct Determination of Surface Tension in the Lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1976**, *73*, 4698-4702.
66. Veldhuizen, R.; Nag, K.; Orgeig, S.; Possmayer, F., The Role of Lipids in Pulmonary Surfactant. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1998**, *1408*, 90-108.
67. Veldhuizen, E. J. A.; Haagsman, H. P., Role of Pulmonary Surfactant Components in Surface Film Formation and Dynamics. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2000**, *1467*, 255-270.
68. Parra, E.; Pérez-Gil, J., Composition, Structure and Mechanical Properties Define Performance of Pulmonary Surfactant Membranes and Films. *Chem. Phys. Lipids* **2015**, *185*, 153-175.
69. Radiom, M.; Sarkis, M.; Brookes, O.; Oikonomou, E. K.; Baeza-Squiban, A.; Berret, J. F., Pulmonary Surfactant Inhibition of Nanoparticle Uptake by Alveolar Epithelial Cells. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 19436.

70. Warriner, H.; Zasadzinski, J., Nanostructure and Dynamics of Biocompatible Surfactant Monolayers and Bilayers. In *Handbook of Nanostructured Biomaterials and Their Applications in Nanobiotechnology*, American Scientific Publishers: 2004; Vol. 1.
71. Seurnyck-Servoss, S. L.; Brown, N. J.; Dohm, M. T.; Wu, C. W.; Barron, A. E., Lipid Composition Greatly Affects the in Vitro Surface Activity of Lung Surfactant Protein Mimics. *Colloids Surf. B* **2007**, *57*, 37-55.
72. Hauner, I. M.; Deblais, A.; Beattie, J. K.; Kellay, H.; Bonn, D., The Dynamic Surface Tension of Water. *J. Phys. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 1599-1603.
73. Walther, F. J.; Waring, A. J.; Sherman, M. A.; Zasadzinski, J. A.; Gordon, L. M., Hydrophobic Surfactant Proteins and Their Analogues. *Neonatology* **2007**, *91*, 303-310.
74. McCormack, F. X.; Whitsett, J. A., The Pulmonary Collectins, SP-A and SP-D, Orchestrate Innate Immunity in the Lung. *J. Clin. Investig.* **2002**, *109*, 707-712.
75. Arika, S.; Nishitani, C.; Kuroki, Y., Diverse Functions of Pulmonary Collectins in Host Defense of the Lung. *J Biomed Biotechnol* **2012**, *2012*, 532071-532071.
76. Lawson, P. R.; Reid, K. B. M., The Roles of Surfactant Proteins A and D in Innate Immunity. *Immunol. Rev.* **2000**, *173*, 66-78.
77. Parra, E.; Moleiro, Lara H.; López-Montero, I.; Cruz, A.; Monroy, F.; Pérez-Gil, J., A Combined Action of Pulmonary Surfactant Proteins SP-B and SP-C Modulates Permeability and Dynamics of Phospholipid Membranes. *Biochem.* **2011**, *438*, 555-564.
78. Schürch, D.; Ospina, O. L.; Cruz, A.; Pérez-Gil, J., Combined and Independent Action of Proteins SP-B and SP-C in the Surface Behavior and Mechanical Stability of Pulmonary Surfactant Films. *Biophys. J.* **2010**, *99*, 3290-3299.
79. Perez-Gil, J.; Weaver, T. E., Pulmonary Surfactant Pathophysiology: Current Models and Open Questions. *Physiology* **2010**, *25*, 132-141.
80. Bringezu, F.; Ding, J.; Brezesinski, G.; Waring, A. J.; Zasadzinski, J. A., Influence of Pulmonary Surfactant Protein B on Model Lung Surfactant Monolayers. *Langmuir* **2002**, *18*, 2319-2325.
81. Klein, J. M.; Thompson, M. W.; Snyder, J. M.; George, T. N.; Whitsett, J. A.; Bell, E. F.; McCray, P. B.; Noguee, L. M., Transient Surfactant Protein B Deficiency in a Term Infant with Severe Respiratory Failure. *J. Pediatr.* **1998**, *132*, 244-248.
82. Walther, F. J.; Gordon, L. M.; Waring, A. J., Design of Surfactant Protein B Peptide Mimics Based on the Saposin Fold for Synthetic Lung Surfactants. *Biomed. Hub* **2016**, *1*, 1-21.
83. Hu, G.; Jiao, B.; Shi, X.; Valle, R. P.; Fan, Q.; Zuo, Y. Y., Physicochemical Properties of Nanoparticles Regulate Translocation across Pulmonary Surfactant Monolayer and Formation of Lipoprotein Corona. *ACS Nano* **2013**, *7*, 10525-10533.
84. Guzmán, E.; Liggieri, L.; Santini, E.; Ferrari, M.; Ravera, F., Effect of Hydrophilic and Hydrophobic Nanoparticles on the Surface Pressure Response of DPPC Monolayers. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 21715-21722.
85. Fan, Q.; Wang, Y. E.; Zhao, X.; Loo, J. S. C.; Zuo, Y. Y., Adverse Biophysical Effects of Hydroxyapatite Nanoparticles on Natural Pulmonary Surfactant. *ACS Nano* **2011**, *5*, 6410-6416.
86. Valle, R. P.; Huang, C. L.; Loo, J. S. C.; Zuo, Y. Y., Increasing Hydrophobicity of Nanoparticles Intensifies Lung Surfactant Film Inhibition and Particle Retention. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2014**, *2*, 1574-1580.

87. Jones, M.-C.; Jones, S. A.; Riffo-Vasquez, Y.; Spina, D.; Hoffman, E.; Morgan, A.; Patel, A.; Page, C.; Forbes, B.; Dailey, L. A., Quantitative Assessment of Nanoparticle Surface Hydrophobicity and Its Influence on Pulmonary Biocompatibility. *J Control Release* **2014**, *183*, 94-104.
88. Valle, R. P.; Wu, T.; Zuo, Y. Y., Biophysical Influence of Airborne Carbon Nanomaterials on Natural Pulmonary Surfactant. *ACS Nano* **2015**, *9*, 5413-5421.
89. Kapralov, A. A.; Feng, W. H.; Amoscato, A. A.; Yanamala, N.; Balasubramanian, K.; Winnica, D. E.; Kisin, E. R.; Kotchey, G. P.; Gou, P.; Sparvero, L. J.; Ray, P.; Mallampalli, R. K.; Klein-Seetharaman, J.; Fadeel, B.; Star, A.; Shvedova, A. A.; Kagan, V. E., Adsorption of Surfactant Lipids by Single-Walled Carbon Nanotubes in Mouse Lung upon Pharyngeal Aspiration. *ACS Nano* **2012**, *6*, 4147-4156.
90. Nisoh, N.; Karttunen, M.; Monticelli, L.; Wong-ekkabut, J., Lipid Monolayer Disruption Caused by Aggregated Carbon Nanoparticles. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 11676-11685.
91. Chakraborty, A.; Mucci, N. J.; Tan, M. L.; Steckley, A.; Zhang, T.; Forrest, M. L.; Dhar, P., Phospholipid Composition Modulates Carbon Nanodiamond-Induced Alterations in Phospholipid Domain Formation. *Langmuir* **2015**, *31*, 5093-5104.
92. Chakraborty, A.; Hertel, A.; Ditmars, H.; Dhar, P., Impact of Engineered Carbon Nanodiamonds on the Collapse Mechanism of Model Lung Surfactant Monolayers at the Air-Water Interface. *Molecules* **2020**, *25*, 714.
93. Harishchandra, R. K.; Saleem, M.; Galla, H.-J., Nanoparticle Interaction with Model Lung Surfactant Monolayers. *J R Soc Interface* **2010**, *7* S15-S26.
94. Xia, Z.; Woods, A.; Quirk, A.; Burgess, I. J.; Lau, B. L. T., Interactions Between Polystyrene Nanoparticles and Supported Lipid Bilayers: Impact of Charge and Hydrophobicity Modification by Specific Anions. *Environ. Sci. Nano* **2019**, *6*, 1829-1837.
95. Farnoud, A. M.; Fiegel, J., Calf Lung Surfactant Recovers Surface Functionality After Exposure to Aerosols Containing Polymeric Particles. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* **2016**, *29* (1), 10-23.
96. Tatur, S.; Badia, A., Influence of Hydrophobic Alkylated Gold Nanoparticles on the Phase Behavior of Monolayers of DPPC and Clinical Lung Surfactant. *Langmuir* **2012**, *28*, 628-639.
97. Guzmán, E.; Liggieri, L.; Santini, E.; Ferrari, M.; Ravera, F., DPPC–DOPC Langmuir Monolayers Modified by Hydrophilic Silica Nanoparticles: Phase Behaviour, Structure and Rheology. *Colloids Surf. A, Physicochem. Eng. Asp.* **2012**, *413*, 174-183.
98. Guzmán, E.; Liggieri, L.; Santini, E.; Ferrari, M.; Ravera, F., Influence of Silica Nanoparticles on Phase Behavior and Structural Properties of DPPC—Palmitic Acid Langmuir Monolayers. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **2012**, *413*, 280-287.
99. Behyan, S.; Borozenko, O.; Khan, A.; Faral, M.; Badia, A.; DeWolf, C., Nanoparticle-Induced Structural Changes in Lung Surfactant Membranes: An X-ray Scattering Study. *Environ. Sci.: Nano* **2018**, *5*, 1218-1230.
100. Borozenko, O.; Faral, M.; Behyan, S.; Khan, A.; Coulombe, J.; DeWolf, C.; Badia, A., Silica Nanoparticle-Induced Structural Reorganizations in Pulmonary Surfactant Films: What Monolayer Compression Isotherms Do Not Say. *ACS Appl. Nano Mater.* **2018**, *1*, 5268-5278.



## Chapitre 2 – Méthodes

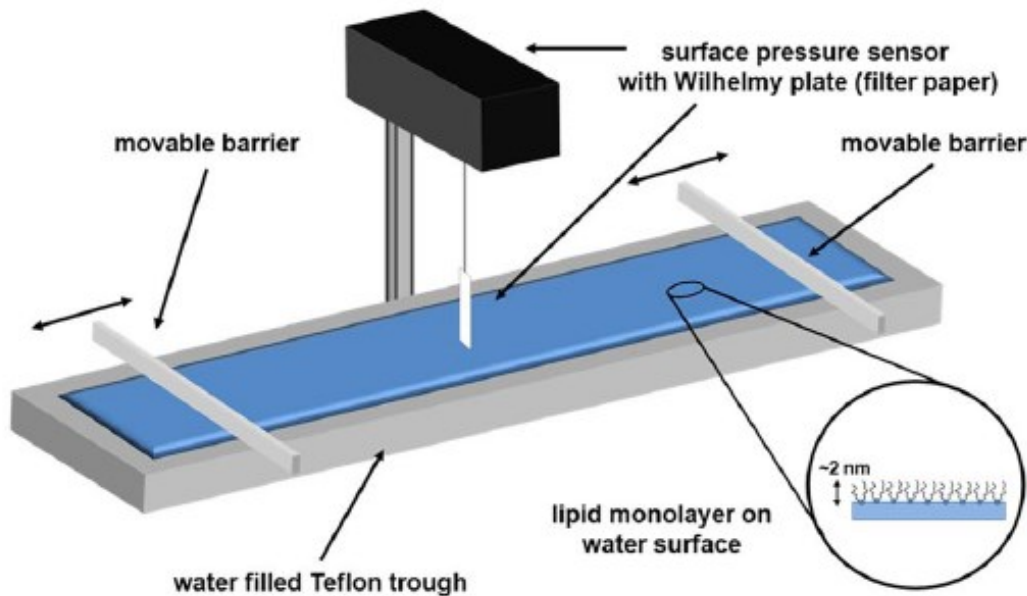
### 2.1 Les monocouches Langmuir

Les monocouches Langmuir (film d'une molécule d'épaisseur à l'interface eau-air) sont obtenues à l'aide de la technique *Langmuir film balance*, souvent appelée simplement bain Langmuir. Elle est utilisée pour effectuer des expériences *in vitro*, puisqu'elle permet un contrôle sur différents paramètres comme la composition de la monocouche ainsi que son état de phase. Il est possible de reproduire d'une manière simplifiée le surfactant pulmonaire recouvrant l'interface eau-air des alvéoles et d'en étudier le comportement.

#### 2.1.1 Instrumentation

Le montage associé à la formation d'une monocouche Langmuir est composé d'un bain de Teflon (**Figure 2.1**) contenant la sous-phase souvent composée d'eau ou d'une solution tampon représentant le liquide pulmonaire dans le cadre de cette étude. La monocouche Langmuir est formée à la surface de la sous-phase en y déposant, goutte à goutte à l'aide d'une seringue, une solution comprenant le surfactant pulmonaire dans un solvant organique volatil. Lors de l'évaporation du solvant, les molécules s'organisent pour former la monocouche. Deux barrières hydrophobes permettent de comprimer le film, offrant ainsi un contrôle sur la densité de surface (**Figure 2.1**). Le mouvement de ces barrières représente l'expansion des poumons lors de l'inspiration et la compression des poumons lors de l'expiration.





**Figure 2.1.** Bain Langmuir utilisé pour la préparation d'une monocouche Langmuir. Figure reproduite de la référence<sup>1</sup>

Afin de mesurer la capacité du film phospholipidique à réduire la tension de surface, une balance Langmuir mesure la pression de surface ( $\pi$ ) à l'aide d'une plaque Wilhelmy selon l'équation suivante :

$$\pi = |\gamma_0 - \gamma| \quad (1)$$

où  $\gamma_0$  est la tension de surface de la sous-phase et  $\gamma$  celle de la sous-phase en présence de la monocouche à sa surface.<sup>2-3</sup> Ainsi, la pression de surface représente la diminution de la tension de surface de la sous-phase à l'aide du surfactant pulmonaire. La plaque Wilhelmy est une plaque de platine (ou de papier filtre) qui entre légèrement en contact avec l'eau. Celle-ci subit une force verticale ( $f$ ), due au mouillage, mesurée par la balance et est reliée à la tension de surface selon cette équation :

$$\gamma = \frac{f}{l \cos \theta} \quad (2)$$

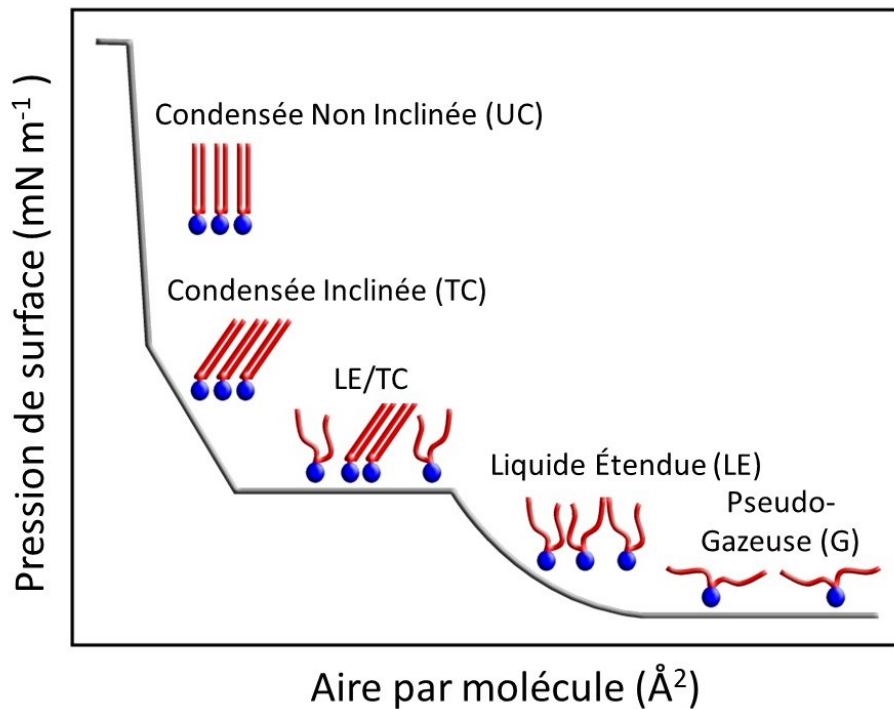
où  $l$  est le périmètre mouillé de la plaque et  $\theta$  est l'angle de contact entre la plaque et la sous-phase.<sup>4</sup> La prise de données consiste à mesurer la pression de surface en fonction de la diminution de l'aire moléculaire en fermant les barrières. Il est important de noter que l'aire moléculaire ne représente pas l'aire de la molécule, mais bien l'aire disponible que celle-ci peut occuper.

La technique du bain Langmuir offre ainsi un contrôle sur l'état de phase de la monocouche lors du cycle respiratoire et permet de reproduire les conditions physiologiques associées aux poumons.

### **2.1.2 Isothermes $\pi$ -A : mesure de la pression de surface en fonction de l'aire moléculaire**

Lors de la fermeture des barrières, représentant l'expiration, la monocouche est comprimée et doit se réorganiser avec la diminution de l'aire disponible. L'isotherme obtenu de la pression de surface en fonction de l'aire moléculaire ( $\pi$ -A) à la suite de cette compression permet d'identifier les quatre phases possibles d'une monocouche (**Figure 2.2**). À grande aire par molécule, donc à très basse pression de surface, la monocouche se retrouve dans la phase pseudo-gazeuse (G) où les phospholipides n'interagissent pas et bougent indépendamment l'un par rapport à l'autre, créant une phase en désordre. Lorsque l'aire disponible diminue, les phospholipides se réorganisent dû à la compression de la monocouche, forçant le film à adopter différentes phases qui dépendent de sa structure moléculaire. Généralement, la première phase formée est la phase liquide étendue (LE), aussi appelée phase fluide. Dans celle-ci, les chaînes alkyles sont désordonnées, mais interagissent tout de même faiblement entre elles à l'aide d'interaction de van der Waals, faisant diminuer la tension de surface (augmenter la pression de surface). Cette augmentation de pression est appelée aire de commencement. Il y a maintenant assez de phospholipides à la surface de l'eau afin de gêner son interaction avec la plaque Wilhelmy. Ceci diminue la force exercée sur la plaque et ainsi celle mesurée par la balance. Lorsque les chaînes alkyles sont courtes ou lorsqu'elles possèdent une ou des insaturations, seule la phase liquide étendue est observée lors de la compression latérale de la monocouche. En continuant la compression pour les autres types de phospholipides, un plateau correspondant à la coexistence de la phase liquide étendue et de la phase liquide condensée (LC), aussi appelée

phase solide, peut être atteint. Cette transition de premier ordre à pression constante est complète lorsque toute la phase LE est convertie en phase LC. Cette dernière est caractérisée par un ordre moléculaire bidimensionnel (ou positionnel) et une conformation majoritairement tout-trans des chaînes alkyles. Selon la taille de la tête par rapport à la queue, les queues peuvent être inclinées de la verticale vers leur voisin ou orientées verticalement. Ainsi, certaines molécules sont directement dans la phase condensée inclinée (TC, *tilted condensed*) ou dans la phase condensée non-inclinée (UC, *untilted condensed*) alors que certaines passent par la première pour atteindre la deuxième.<sup>2-3, 5-6</sup> Lorsque le film est trop comprimé, il y a rupture de celui-ci, soit la formation de multicouches, caractérisée par une diminution de la pression de surface. Cette rupture irréversible ne doit pas être confondue avec la formation du réservoir créée par la SP-B et la SP-C. Le réservoir est formé à plus petite pression de surface et est réversible en présence des protéines pulmonaires ou partiellement réversible lorsque la monocouche contient un mélange de phospholipides saturés et insaturés.<sup>4</sup>



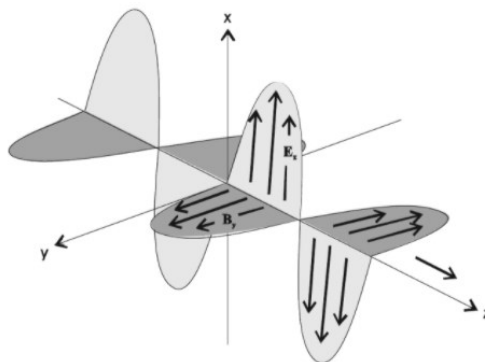
**Figure 2.2.** Représentation schématique des différentes phases d'une monocouche phospholipidique lors d'un isotherme de la pression de surface en fonction de l'aire moléculaire

Le DPPC, en raison de sa grande tête polaire, possède une disparité entre l'aire occupée par sa tête polaire et celle occupée par ses chaînes alkyles, forçant ces dernières à s'incliner afin de maximiser les interactions de van der Waals.<sup>7</sup> Cette orientation diminue les chances de rupture de la monocouche et permet d'atteindre de hautes pressions de surface.<sup>8</sup> C'est pour cette raison que le DPPC demeure majoritairement à l'interface eau-air lors de la formation du réservoir. Le POPG pour sa part demeure dans la phase liquide étendue tout au long de la compression. La présence d'une insaturation dans une de ses chaînes alkyles empêche l'adoption d'une conformation trans et compacte.<sup>4</sup> Étant instable à haute pression de surface, le POPG est majoritairement exclu de la monocouche lors de la formation du réservoir, jouant ainsi un rôle important dans la réversibilité du cycle respiratoire.

Tout changement dans l'allure d'un isotherme dû à l'ajout de nanoparticules dans la sous-phase peut donner de l'information sur leur impact sur l'efficacité du surfactant pulmonaire à réduire la tension de surface.

## 2.2 Méthodes basées sur la polarisation de la lumière

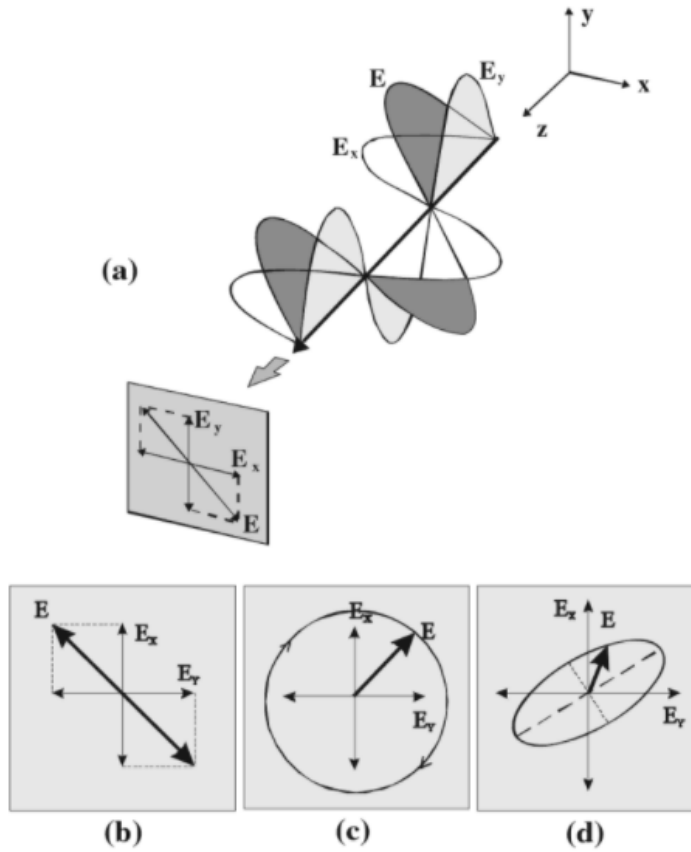
Afin d'obtenir de l'information sur la morphologie et l'épaisseur du film, la microscopie à l'angle de Brewster ainsi que l'ellipsométrie à l'interface eau-air sont utilisés respectivement. Ces deux méthodes se basent sur la réflexion de lumière polarisée.



**Figure 2.3.** Composantes électrique (E) et magnétique (B) d'un champ électromagnétique perpendiculaire à la direction de propagation (z). Figure reproduite de la référence<sup>9</sup>

### 2.2.1 Description de la polarisation de la lumière

La lumière est une onde électromagnétique possédant un champ magnétique (B) ainsi qu'un champ électrique (E) qui oscillent de manière orthogonale l'un par rapport à l'autre et par rapport au vecteur de propagation (z)<sup>10</sup> (**Figure 2.3**). La polarisation d'un rayon lumineux est définie seulement par l'oscillation du champ électrique. Celui-ci peut être décomposé en deux composantes qui oscillent perpendiculairement l'une par rapport à l'autre ( $E_x$  et  $E_y$  dans la **Figure 2.4(a)**). La variation autour de l'axe de propagation du vecteur résultant des deux composantes du champ électrique décrit l'état de polarisation de la lumière. Lorsque le vecteur résultant varie de manière aléatoire, la lumière n'est pas polarisée. Lorsqu'elle l'est, le champ électrique possède une oscillation bien définie (**Figure 2.4(a)**). Une lumière est polarisée linéairement lorsqu'elle possède qu'une seule composante soit dans le plan yz (polarisée-p), soit perpendiculaire au plan yz (polarisée-s)<sup>10-11</sup> ou lorsqu'elle possède les deux composantes (de même amplitude et de même phase) dont le vecteur résultant a une orientation intermédiaire (**Figure 2.4(b)**). Lorsque la lumière possède les deux composantes perpendiculaires du champ électrique de même amplitude, mais hors phase de  $90^\circ$ , la combinaison résulte en une lumière polarisée circulairement (**Figure 2.4(c)**). Lorsque les deux composantes du champ électrique sont hors phase (autre que  $45^\circ$ ) et/ou ne possèdent pas la même amplitude, la lumière est polarisée elliptiquement, soit la description la plus générale de l'état de polarisation (**Figure 2.4(d)**).<sup>10, 12</sup> Ainsi, l'état de polarisation de la lumière est déterminé par le rapport d'amplitude et la différence de phase des composantes du champ électrique parallèle et perpendiculaire au plan yz.<sup>13</sup>



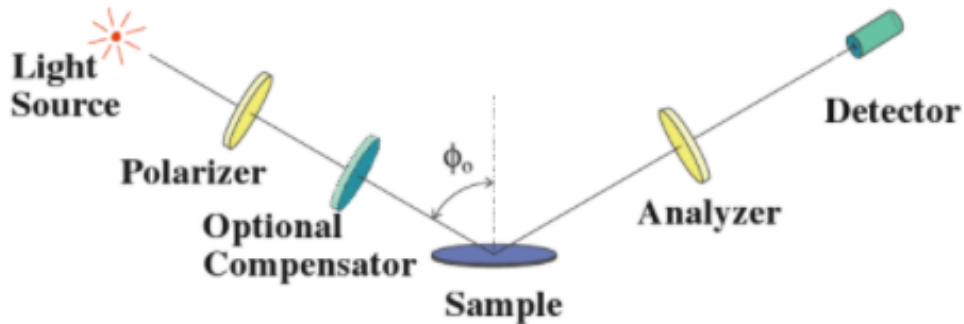
**Figure 2.4.** Polarisation linéaire (a) et (b), circulaire (c) et elliptique (d) de la lumière. Figure reproduite de la référence<sup>9</sup>

## 2.2.2 Ellipsométrie à l'interface eau-air

La technique d'ellipsométrie se base sur la capacité d'un film mince à influencer la polarisation de la lumière réfléchiée à sa surface.<sup>11, 13-14</sup> L'échantillon change la lumière polarisée (linéaire ou circulaire) en lumière polarisée elliptiquement, d'où le terme ellipsométrie. Puisque ce changement est dû aux propriétés de l'échantillon, il est possible d'obtenir ses informations, telles que l'épaisseur du film ainsi que son indice de réfraction et son coefficient d'absorption.<sup>11, 13, 15</sup> L'ellipsométrie à l'interface eau-air est une technique analogue à la réflectivité spéculaire de rayons X puisqu'elle permet aussi de déterminer l'épaisseur du film en obtenant son profil de densité d'électrons. Cependant, cette méthode nécessite l'accès à un accélérateur de particules,

demande beaucoup de temps et détruit le film dû à la haute énergie des rayons-x, ce qui limite le nombre de mesures possibles. Pour sa part, l'ellipsométrie à l'interface eau-air utilise un laser à relativement basse puissance, elle est non destructive<sup>7, 14-15</sup> et est plus rapide, ce qui permet de prendre plusieurs mesures à différentes pressions de surface/aires moléculaires.

Le montage est composé d'une source lumineuse, d'un polariseur afin de polariser la lumière linéairement, d'un compensateur qui polarisera la lumière circulairement, de l'échantillon où la lumière sera réfléchi, d'un analyseur qui repolarisera linéairement la lumière ainsi que d'un détecteur<sup>10-11, 13</sup> (**Figure 2.5**). Ce montage représente la conformation pour le *nulling ellipsometry* où il faut orienter le polariseur, le compensateur et l'analyseur afin d'obtenir le moins de luminosité possible au détecteur.<sup>11</sup> Dans le cas d'une mesure à l'interface eau-air, l'échantillon est le bain Langmuir présenté précédemment placé directement sous le montage optique. Il n'est pas donc nécessaire de déposer la monocouche sur un substrat.



**Figure 2.5.** Configuration d'un ellipsomètre. Figure reproduite de la référence<sup>9</sup>

En ellipsométrie, le changement de la polarisation est mesuré avec le rapport entre la lumière réfléchi et la lumière incidente selon cette équation simplifiée :

$$\tan\Psi e^{i\Delta} = -\tan A \frac{\tan C - \tan(P-C)}{1+i \tan C \tan(P-C)} \quad (3)$$

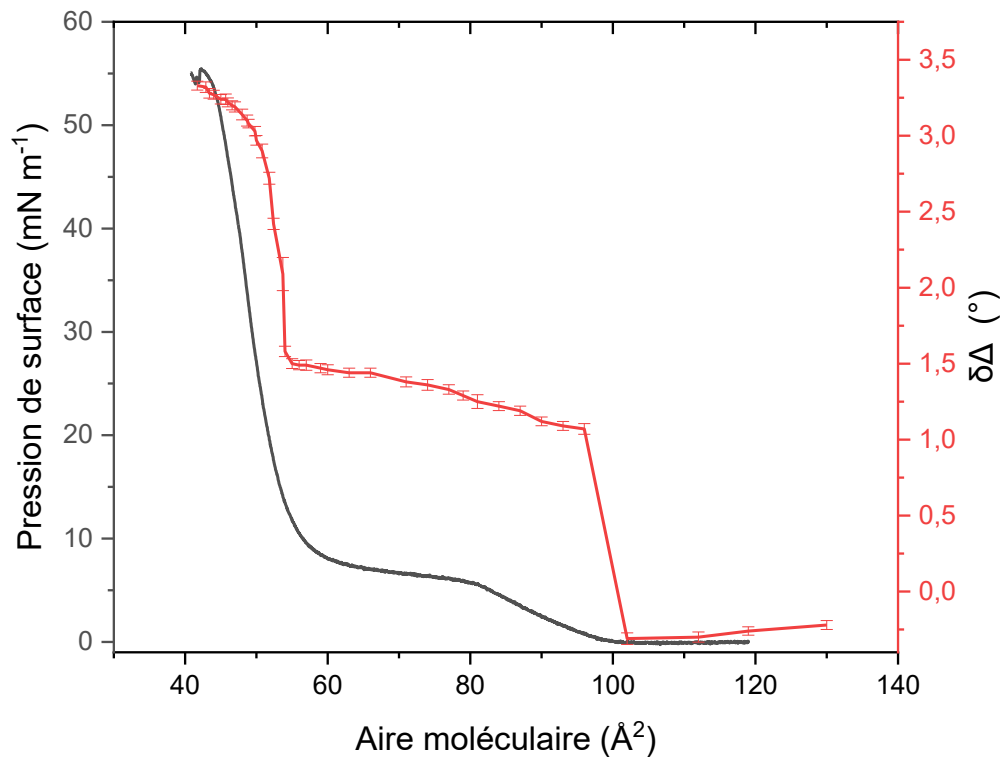
où  $\Psi$  représente le rapport d'amplitude,  $\Delta$  la différence de phase et A, P et C les angles de l'analyseur, du polariseur et du compensateur respectivement.<sup>14-16</sup> Ainsi, en *nulling ellipsometry*,

l'échantillon possède ses valeurs uniques d'angle de A, P et C pour atteindre le *nulling point* (combinaisons des angles offrant un minimum d'intensité), permettant de déterminer les valeurs de  $\Delta$  et de  $\Psi$  associés au film selon l'équation (3). Une mesure en ellipsométrie ne demande pas de référence, mais dépend simplement du changement entre l'état de polarisation des rayons incident et réfléchi.

Ces angles ellipsométriques ( $\Delta$ ,  $\Psi$ ) permettent de déterminer les constantes optiques et l'épaisseur du film. Pour ce faire, il faut analyser les angles expérimentaux à l'aide d'un modèle basé par exemple sur les coefficients de réflexion de Fresnel.<sup>9</sup> Cependant, il est très complexe de modéliser avec l'eau comme substrat. De plus, pour les films très minces ( $d \ll 10$  nm),  $\Psi$  est négligeable.<sup>7, 17</sup> Ainsi, pour les monocouches à l'interface eau-air, seul  $\Delta$ , qui dépend de l'épaisseur du film ainsi que de l'indice de réfraction, est mesuré. En prenant la valeur de l'angle  $\Delta$  de la sous-phase (i.e. l'eau) et en la soustrayant à la valeur de l'angle  $\Delta$  du film à différentes pressions de surface, on obtient des valeurs en  $\delta\Delta$  ( $=\Delta_{\text{film}} - \Delta_{\text{sous-phase}}$ ).<sup>13-14, 17-19</sup> Ce terme permet de caractériser la variation de l'indice de réfraction et de l'épaisseur de la monocouche lors de la compression à l'aide d'un isotherme ellipsométrique.

Prenons l'exemple simple du DPPC (**Figure 2.6**). La courbe noire représente l'isotherme de la pression de surface en fonction de l'aire moléculaire où les différentes phases présentées à la **Figure 2.2** sont bien visibles. La courbe en rouge représente l'isotherme ellipsométrique du  $\delta\Delta$  en fonction de l'aire moléculaire. Pour le DPPC, l'indice de réfraction ne varie pas lors de la compression du film. Une variation de l'angle ellipsométrique  $\Delta$  signifie donc un changement de l'épaisseur moyenne du film, ce qui explique pourquoi le  $\delta\Delta$  varie avec la compression du film. À l'aire de commencement, il y a une augmentation du  $\delta\Delta$  se traduisant par la transition de la phase gazeuse à la phase liquide étendue, soit par l'augmentation de l'épaisseur due au redressement des chaînes alkyles. Lors de la coexistence des phases liquide étendue et condensée, les deux isothermes possèdent un plateau. Il y a tout de même une légère augmentation du  $\Delta\delta$  puisque les molécules de DPPC passent de la phase LE à la phase LC. L'augmentation observée après le plateau est causée par la condensation de la phase fluide résiduelle, ce qui augmente l'épaisseur moyenne du film. Finalement, l'angle ellipsométrique varie très peu lorsque la monocouche est peu compressible à haute pression de surface.





**Figure 2.6.** Isotherme ellipsométrique du DPPC sur une sous-phase contenant 150 mM de NaCl, 50 mM de Tris, et 2,5 mM de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  à pH de 7,4

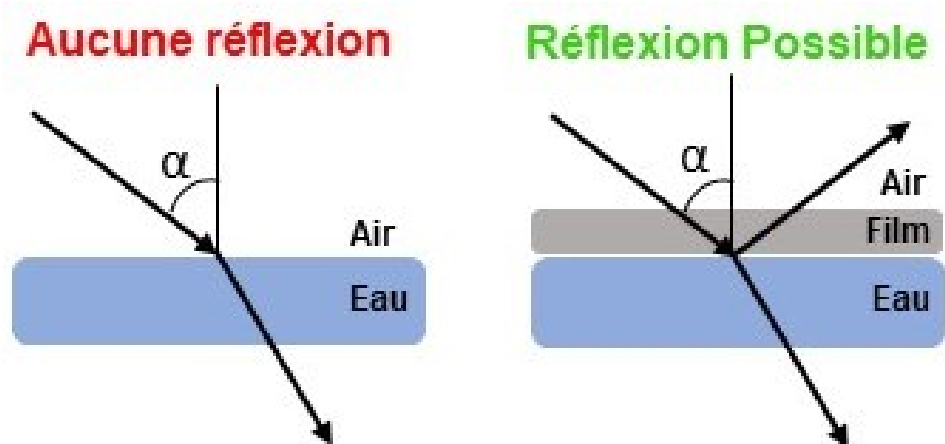
Dans le cadre de ce projet, l'ellipsométrie à l'interface eau-air permettra de déterminer si les nanoparticules se lient à la monocouche. L'étude de l'épaisseur de la monocouche en fonction de la compression latérale permet de voir si la présence de nanoparticule induit une déviation de cette caractéristique. L'épaississement du surfactant pulmonaire peut mener à la fermeture des voies respiratoires alors qu'un amincissement peut mener à leur rupture.<sup>16</sup>

### 2.2.3 Microscopie à l'angle de Brewster (BAM)

La microscopie à l'angle de Brewster permet la visualisation en temps réel de l'évolution de la morphologie d'une monocouche directement à l'interface eau-air, et ce, sans l'incorporation d'une sonde fluorescente. C'est ainsi une technique moins invasive que la microscopie

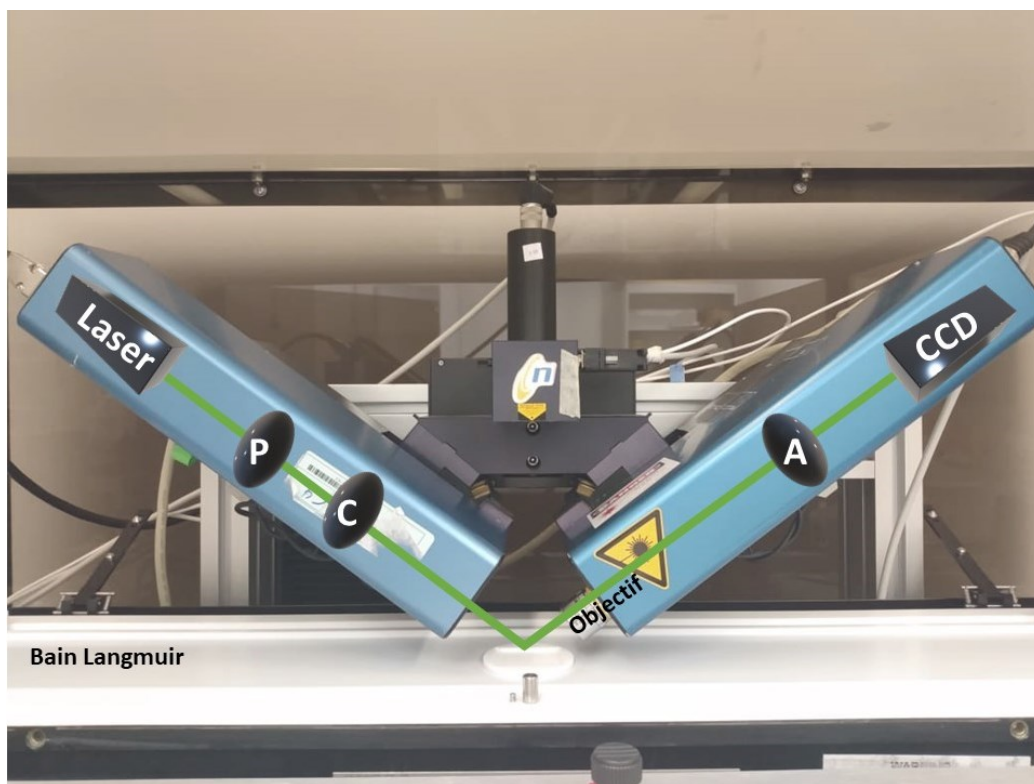
fluorescente qui permet aussi la visualisation de la phase condensée, mais requiert l'ajout d'un fluorophore pouvant changer la morphologie des domaines.<sup>20-21</sup> Avec l'imagerie BAM, il est possible d'analyser la forme et la taille des domaines condensés de phospholipides en fonction de la compression de la monocouche ainsi qu'en fonction de différents paramètres externes (e.g. la présence de nanoparticules dans la sous-phase). Les domaines condensés de DPPC peuvent être considérés comme un liquide-cristallin étant donné la présence de différentes orientations moléculaires dans un même domaine.<sup>22</sup> Il est ainsi possible d'obtenir de l'information sur l'orientation moléculaire grâce à l'imagerie BAM. En effet, un changement dans l'angle azimutal d'une molécule donne lieu à un changement d'intensité<sup>20</sup>, soit l'anisotropie moléculaire.<sup>23-25</sup>

Cette technique se base sur la réflexion d'un faisceau lumineux polarisée p. Lorsque celui-ci passe de l'air à la sous-phase du bain Langmuir (d'un milieu à bas indice de réfraction vers un milieu à plus haut indice de réfraction), une partie du faisceau sera réfléchi et une autre réfractée dû à la disparité d'indice de réfraction entre les deux milieux. En revanche, lorsque le faisceau est envoyé à la surface de l'eau à son angle de Brewster, le faisceau est complètement réfracté (**Figure 2.7**). On peut calculer cet angle ( $\alpha_B$ ) à l'aide de l'équation suivante :  $\tan \alpha_B = \frac{n_2}{n_1}$ .<sup>20, 26</sup> Ainsi, pour un faisceau d'une longueur d'onde de 532 nm, on obtient un angle de Brewster de 53,12° lorsque celui-ci passe de l'air ( $n_1= 1,000$ )<sup>27</sup> à l'eau ( $n_2= 1,333$ )<sup>28</sup>. Lorsqu'une monocouche recouvre la surface de l'eau, l'indice de réfraction de ce milieu change et le faisceau peut maintenant être réfléchi, permettant d'être détecté par une caméra CCD (**Figure 2.7**). C'est cette réflexion qui permet la visualisation du surfactant pulmonaire.



**Figure 2.7.** Principe de la microscopie à angle de Brewster

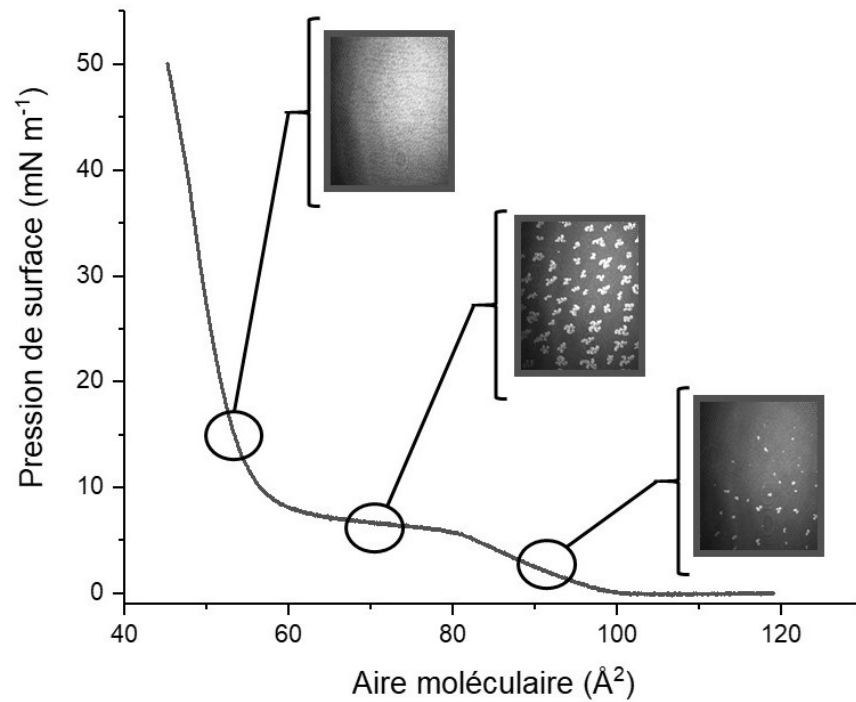
Pour la microscopie à l'angle de Brewster, le même montage que pour l'ellipsométrie à l'interface eau-air est utilisé, d'où la présence d'un objectif et d'une caméra CCD comme détecteur (**Figure 2.8**). Cependant, le polariseur, l'analyseur ainsi que le compensateur sont fixés à un angle de  $0^\circ$  et le tout est positionné à l'angle de Brewster. Au fond du bain Langmuir est placée une plaque en verre noire absorbant toute lumière diffusée par le bain afin de s'assurer de n'avoir que la lumière réfléchie par l'interface au détecteur.



**Figure 2.8.** Montage BAM au-dessus d'un bain Langmuir où P est le polariseur, C le compensateur, A l'analyseur et CCD la caméra/détecteur

Les différentes phases dans une monocouche possèdent différentes propriétés, ce qui permet l'observation de régions transitionnelles, où les domaines condensés ont une intensité lumineuse plus élevée que la phase fluide qui les entoure. Cette différence en intensité est due à l'épaisseur qui varie entre les deux phases (la phase LC étant plus épaisse que la phase LE).<sup>1-2, 29-30</sup> Prenons l'exemple du DPPC présenté à la **Figure 2.9**. À basse pression de surface, la monocouche est dans la phase liquide étendue. Le film n'est donc pas assez dense pour influencer l'indice de réfraction de l'eau et ne permet pas de réflexion. Une image foncée avec très peu d'intensité est ainsi obtenue. En comprimant la monocouche, la région de coexistence entre la phase liquide étendue et condensée est atteinte. Les domaines condensés formés à la surface de l'eau changent l'indice de réfraction et permettent la réflexion de la lumière. C'est ainsi la différence d'épaisseur entre les deux phases et la différence d'indice de réfraction entre l'eau et

un film phospholipidique qui permettent la visualisation des domaines condensés de DPPC. Lorsque la monocouche est comprimée davantage, toutes les molécules de DPPC sont dans la phase condensée et occupent tout l'espace disponible entre les deux barrières. Il n'y a donc plus de contraste et seul un film homogène de haute intensité est observé.



**Figure 2.9.** Isotherme  $\pi$  vs  $A$  et images BAM d'une monocouche de DPPC sur une sous-phase d'eau

## Références Chapitre 2

1. Blume, A., Lipids at the Air–Water Interface. *ChemTexts* **2018**, *4*, 3-28.
2. Barnes, G.; Gentle, I., *Interfacial Science: An Introduction*. OUP Oxford: 2011.
3. Wüstneck, R.; Perez-Gil, J.; Wüstneck, N.; Cruz, A.; Fainerman, V. B.; Pison, U., Interfacial Properties of Pulmonary Surfactant Layers. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2005**, *117*, 33-58.
4. Parra, E.; Pérez-Gil, J., Composition, Structure and Mechanical Properties Define Performance of Pulmonary Surfactant Membranes and Films. *Chem. Phys. Lipids* **2015**, *185*, 153-175.
5. Kaganer, V. M.; Möhwald, H.; Dutta, P., Structure and Phase Transitions in Langmuir Monolayers. *Rev. Mod. Phys.* **1999**, *71*, 779-819.
6. Keating, E.; Zuo, Y. Y.; Tadayyon, S. M.; Petersen, N. O.; Possmayer, F.; Veldhuizen, R. A. W., A Modified Squeeze-Out Mechanism for Generating High Surface Pressures with Pulmonary Surfactant. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2012**, *1818*, 1225-1234.
7. Thoma, M.; Schwendler, M.; Baltes, H.; Helm, C. A.; Pfohl, T.; Riegler, H.; Möhwald, H., Ellipsometry and X-ray Reflectivity Studies on Monolayers of Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylcholine in Contact with n-Dodecane, n-Hexadecane, and Bicyclohexyl. *Langmuir* **1996**, *12*, 1722-1728.
8. Veldhuizen, E. J. A.; Haagsman, H. P., Role of Pulmonary Surfactant Components in Surface Film Formation and Dynamics. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2000**, *1467*, 255-270.
9. Losurdo, M.; Hingerl, K., *Ellipsometry at the Nanoscale*. Springer Berlin Heidelberg: 2013.
10. Tompkins, H. G., *A User's Guide to Ellipsometry*. Dover Publications: 2006.
11. Podraza, N. J.; Jellison, G. E., Ellipsometry. In *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition)*, Lindon, J. C.; Tranter, G. E.; Koppenaal, D. W., Eds. Academic Press: Oxford, 2017; pp 482-489.
12. Born, M.; Wolf, E., *Principles of Optics: Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light*. Elsevier Science: 2013.
13. De Feijter, J. A.; Benjamins, J.; Veer, F. A., Ellipsometry as a Tool to Study the Adsorption Behavior of Synthetic and Biopolymers at the Air–Water Interface. *Biopolymers* **1978**, *17*, 1759-1772.
14. Ducharme, D.; Tessier, A.; Leblanc, R. M., Null Ellipsometer for the Studies of Thin Films at Gas–Water Interface. *Rev. Sci. Instrum.* **1987**, *58*, 571-578.
15. Grainger, D. W.; Castner, D. G., Surface Analysis and Biointerfaces: Vacuum and Ambient In Situ Techniques. In *Comprehensive Biomaterials*, Ducheyne, P., Ed. Elsevier: Oxford, 2017; Vol. 3, pp 1-22.
16. Tatur, S.; Badia, A., Influence of Hydrophobic Alkylated Gold Nanoparticles on the Phase Behavior of Monolayers of DPPC and Clinical Lung Surfactant. *Langmuir* **2012**, *28*, 628-639.
17. Kim, M. W.; Sauer, B. B.; Yu, H.; Yazdanian, M.; Zograf, G., Ionic Interactions of Fatty Acid Monolayers Studied by Ellipsometry. *Langmuir* **1990**, *6*, 236-240.
18. Schmidt, R.; DeWolf, C. E., Monolayer Behavior of 1,2-dipalmitoylglycerol, a Synthetic Lipid with Strong Cohesive Properties. *Langmuir* **2004**, *20*, 3284-3288.
19. Pérez-Morales, M.; Pedrosa, J. M.; Muñoz, E.; Martín-Romero, M. T.; Möbius, D.; Camacho, L., Ellipsometric Study of a Phospholipid Monolayer at the Air–Water Interface in Presence of Large Organic Counter Ions. *Thin Solid Films* **2005**, *488*, 247-253.

20. Warriner, H.; Zasadzinski, J., Nanostructure and Dynamics of Biocompatible Surfactant Monolayers and Bilayers. In *Handbook of Nanostructured Biomaterials and Their Applications in Nanobiotechnology*, American Scientific Publishers: 2004; Vol. 1.
21. Shieh, I. C.; Zasadzinski, J. A., Visualizing Monolayers with a Water-Soluble Fluorophore to Quantify Adsorption, Desorption, and the Double Layer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, E826-E835.
22. Veldhuizen, R.; Nag, K.; Orgeig, S.; Possmayer, F., The Role of Lipids in Pulmonary Surfactant. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1998**, *1408*, 90-108.
23. Vollhardt, D., Brewster Angle Microscopy: A Preferential Method for Mesoscopic Characterization of Monolayers at the Air/Water Interface. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2014**, *19*, 183-197.
24. Weidemann, G.; Vollhardt, D., Long-Range Tilt Orientational Order in Phospholipid Monolayers: A Comparative Study. *Biophys. J.* **1996**, *70*, 2758-2766.
25. Sanchez, J.; Badia, A., Spatial Variation in the Molecular Tilt Orientational Order Within the Solid Domains of Phase-Separated, Mixed Dialkylphosphatidylcholine Monolayers. *Chem. Phys. Lipids* **2008**, *152*, 24-37.
26. Hénon, S.; Meunier, J., Microscope at the Brewster Angle: Direct Observation of First-Order Phase Transitions in Monolayers. *Rev. Sci. Instrum.* **1991**, *62*, 936-939.
27. Barksy, M. The Physics Factbook- An Encyclopedia of Scientific Essays. <https://hypertextbook.com/facts/2005/MayaBarsky.shtml> (accessed July 28th 2021).
28. Pierscionek, B. K.; Belaidi, A.; Bruun, H. H., Refractive Index Distribution in the Porcine Eye Lens for 532 nm and 633 nm Light. *Eye* **2005**, *19*, 375-381.
29. Daear, W.; Mahadeo, M.; Prenner, E. J., Applications of Brewster Angle Microscopy From Biological Materials to Biological Systems. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2017**, *1859*, 1749-1766.
30. Hoenig, D.; Moebius, D., Direct Visualization of Monolayers at the Air-Water Interface by Brewster Angle Microscopy. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 4590-4592.

## **Chapitre 3 – Are Plant-Based Carbohydrate Nanoparticles Safe for Inhalation? Investigating Their Interactions with Pulmonary Surfactant using Langmuir Monolayers**

La présente recherche propose une étude des effets du nanophytoglycogène de différentes charges sur l'activité de surface, la morphologie, la réversibilité ainsi que l'épaisseur du film du surfactant pulmonaire. Les travaux pour l'élaboration de cet article consistaient à la prise d'isothermes  $\pi$ -A (une compression ou plusieurs cycles) à l'aide du bain Langmuir, à caractériser la morphologie du film à l'aide d'images obtenues par BAM et à caractériser l'épaisseur du film en ellipsométrie à l'interface eau-air. Ces différentes mesures ont été prises pour deux systèmes (DPPC/POPG et DPPC/POPG + super mini-B) sur 4 sous-phases différentes (une solution tampon ainsi que des solutions tampons contenant le nanophytoglycogène natif, anionique et cationique séparément). Cette étude a permis de démontrer l'importance de la charge des nanoparticules lors de leur interaction avec le surfactant pulmonaire.

Ma contribution à cette recherche inclut l'élaboration des plans d'expériences, la prise des différentes mesures mentionnées plus haut, l'analyse des données, la réalisation des graphiques/figures et tableau ainsi que la rédaction du premier brouillon de l'article et la correction de celui-ci. Antonella Badia et Christine DeWolf (Université Concordia) m'ont guidée tout au long des expériences. Elles ont révisé le texte et ont analysé les résultats.

Ce chapitre a été publié comme article le 13 octobre 2021 dans le journal *Langmuir* (DOI:10.1021/acs.langmuir.1c01906).



# Are Plant-Based Carbohydrate Nanoparticles Safe for Inhalation? Investigating Their Interactions with Pulmonary Surfactant using Langmuir Monolayers

*Laurianne Gravel-Tatta<sup>1,3</sup>, Christine DeWolf<sup>2,3\*</sup>, and Antonella Badia<sup>1,3\*</sup>*

<sup>1</sup>Département de chimie, Université de Montréal, Complexe des sciences, C.P. 6128, succursale Centre-ville, Montréal, QC H3C 3J7, Canada

<sup>2</sup>Department of Chemistry and Biochemistry and Centre for NanoScience Research, 7141 Sherbrooke St. West, Montréal, QC H4B 1R6, Canada

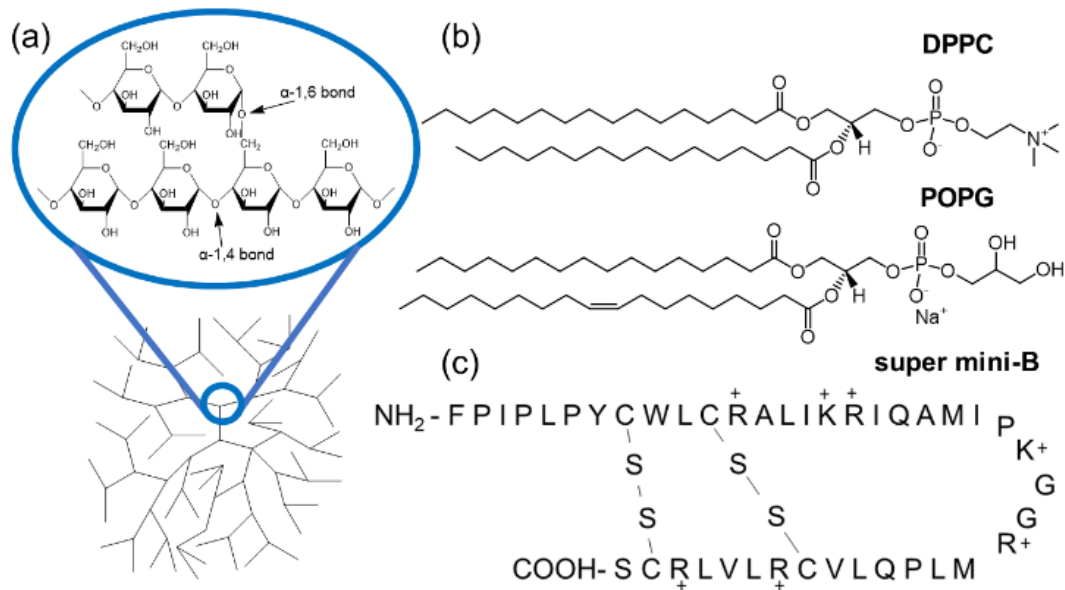
<sup>3</sup>FRQNT Quebec Centre for Advanced Materials, McGill University, 845 Sherbrooke St. W. Montréal, QC H3A 0G4, Canada

### 3.1 Abstract

Nanoparticle carriers show promise for drug delivery, including by inhalation, where the first barrier for uptake in the lungs is the monolayer pulmonary surfactant membrane that coats the air/alveoli interface and is critical to breathing. It is imperative to establish the fate of potential nanocarriers and their effects on the biophysical properties of the pulmonary surfactant. To this end, the impact of the nanoparticle surface charge on the lateral organization, thickness, and recompressibility of Langmuir monolayers of model phospholipid-only and phospholipid–protein mixtures was investigated using native and modified forms of nanophytoglycogen, a carbohydrate-based dendritic polymer extracted from corn as monodisperse nanoparticles. We show that the native (quasi-neutral) and anionic nanophytoglycogens have little impact on the phase behavior and film properties. By contrast, cationic nanophytoglycogen alters the film morphology and increases the hysteresis associated with the work of breathing due to its electrostatic interaction with the anionic phospholipids in the model systems. These findings specifically highlight the importance of surface charge as a selection criterion for inhaled nanoformulations.

## 3.2 Introduction

Plant-based macromolecular nanoparticles are promising for drug delivery, imaging or diagnostics.<sup>1-6</sup> One such material is phytyloglycogen extracted from corn as monodisperse nanoparticles of ~35 nm diameter (non-hydrated).<sup>7</sup> Each nanophytyloglycogen particle is a single, highly-branched glucose macromolecule (**Figure 3.1a**). It is notably hydrophilic, biodegradable (degraded to glucose), nonbiopersistent, non-toxic to cells, non-immunogenic, and hypoallergenic.<sup>8</sup> With such a safety profile, nanophytyloglycogen has been certified generally recognized as safe (GRAS) by the FDA and is currently used in personal care products, nutraceuticals, and specialty foods.<sup>8</sup> Nanophytyloglycogen has also been chemically modified for potential applications in drug delivery, anti-infectives, and immunomodulation.<sup>9</sup> The similarity in size between nanoparticles and various biomolecules causes unique interactions with cells, tissues, and organs, for example, enhanced permeability and retention, that can lead to higher efficacy, reduced dose/cost, and fewer side-effects.<sup>10-12</sup>



**Figure 3.1.** Structures of (a) native nanophytyloglycogen and (b) phospholipids. (c) Amino acid sequence of super mini-B.

The human lungs present many advantages as a delivery route: a large surface area (~70-100 m<sup>2</sup>)<sup>13-15</sup> for the adsorption of molecules and particles, a thin epithelial barrier, abundant underlying vasculature, and low acidity.<sup>16</sup> Particles in the nanophytoglycogen size range are easily inhaled without resistance, reach the alveoli and small bronchioles with 0.2–0.6 probability, where they can cross to the bloodstream through the epithelial barrier, providing an effective means to deliver high local concentrations of therapeutics while reducing the systemic concentrations associated with oral and intravenous treatments.<sup>14-17</sup> However, prior to developing drug delivery nanoformulations, it is essential to verify that the nanoparticles do not induce severe adverse effects in both healthy and impaired lungs.

In the alveoli, the nanoparticles interact with the pulmonary (or lung) surfactant, a lipid–protein mixture that lines the alveolar air/fluid interface and serves as the primary barrier to uptake.<sup>18</sup> The main role of the pulmonary surfactant is to prevent alveolar collapse at the end of expiration and reduce the work of breathing.<sup>14, 18-20</sup> The physicochemical characteristics of the nanoparticles (i.e., surface charge, hydrophobicity, size) dictate their interactions with the pulmonary surfactant.<sup>13, 21-23</sup> These interactions can alter the surface tension lowering capability of the surfactant membrane, its phase structure, reservoir formation, and mechanical properties,<sup>24-30</sup> all critical to breathing. Hydrophobic nanoparticles are known to irreversibly embed within the monolayer membrane,<sup>31-34</sup> while hydrophilic ones are more likely to translocate across the monolayer to reach the lung lining fluid.<sup>14, 21, 31</sup> Charged nanoparticles are of interest for the electrostatic binding of biomolecules (e.g., oligonucleotides, peptides, viruses, small molecule therapeutics) to their surface.<sup>35-39</sup>

Although nanophytoglycogen is edible, this does not mean that its inhalation is harmless for the act of breathing. Consequently, we investigate herein the effects of nanophytoglycogen on the lateral organization, thickness, and recompressibility of Langmuir monolayers composed of lipid only and lipid–protein model mixtures on aqueous subphases containing functionalized nanophytoglycogens of different surface charge. Langmuir monolayers and Langmuir-Blodgett films are well-established platforms for in-vitro investigations of the physicochemical and

functional properties of the pulmonary surfactant,<sup>20, 40</sup> the effects of nanoparticles on the surface activity and lateral film structure of the pulmonary surfactant and nanoparticle translocation across the monolayer membrane.<sup>41</sup> Langmuir monolayers permit simulation of the membrane compression-expansion during breathing and associated changes in the morphology and surface activity.<sup>42</sup> The advantage of Langmuir monolayers is that they can be coupled to a range of high resolution, in-situ structural, spectroscopic and imaging techniques.<sup>43</sup>

The model systems investigated are binary mixtures of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and palmitoyloleoylphosphatidylglycerol (POPG) and DPPC/POPG with added super mini-B (**Figure 3.1b,c**). A 7:3 molar ratio of the zwitterionic DPPC and anionic POPG is typically employed to reproduce the proportion of saturated to unsaturated lipid, charge balance, and condensed/fluid phase coexistence of natural pulmonary surfactant.<sup>42, 44-45</sup> Super mini-B, a truncated synthetic analogue (41 amino acids) of the cationic surfactant-specific protein SP-B (79 amino acids),<sup>46-47</sup> has been added to DPPC/POPG at 3 wt% (relative to the total phospholipid mass) to produce a functional synthetic pulmonary surfactant formulation.<sup>47-49</sup> Of the four surfactant-specific proteins, SP-B is critical to breathing as a deficiency is lethal to humans.<sup>50</sup>

We show that while native (quasi-neutral) and carboxymethylated (anionic) nanophytoglycogens in the aqueous subphase have relatively little to no effect on the phase properties and film morphology of the model Langmuir monolayer systems, the amine-modified (cationic) nanophytoglycogen impacts the monolayers from the onset of lateral phase separation and condensation. These findings highlight the role of surface charge on physicochemical interactions at the nano-bio interface and the selection of nanocarrier candidates with low pulmonary toxicity for drug delivery studies.

## 3.3 Experimental Section

### 3.3.1 Materials

1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) (>99%) and 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (POPG) (>99%) were obtained as dry powders from Avanti Polar Lipids (via Millipore Sigma, Darmstadt, Germany) and used without further purification. The surfactant protein analogue super mini-B was generously gifted by A.J. Waring (UCLA) and J.A. Zasadzinski (University of Minnesota). Ultrapure water with a resistivity of 18.2 M $\Omega$  cm and total organic content of  $\leq 5$  ppb was obtained from a Milli-Q gradient purification system. Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Trizma base, >99.8%, Sigma-Aldrich), sodium chloride (>99%, Anachemia Canada), and calcium chloride dihydrate (99%, Riedel-de-Haën) were used as received.

The Tris buffered saline solution comprised 150 mM NaCl, 50 mM Tris, and 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O. It was pH adjusted to 7.4 using hydrochloric acid.

Spreading solutions of DPPC/POPG (7:3 mol/mol) were prepared in chloroform (HPLC-grade, 0.5-1.0% ethanol stabilizer, Sigma-Aldrich) at a total phospholipid concentration of 1.0 mM. The stock solution of super mini-B was prepared in a 1:1 (v/v) mixture of chloroform and methanol at a concentration of  $1.4 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> and added to the DPPC/POPG (7:3 mol/mol) solution at 3.0 wt% of peptide relative to the total weight of phospholipids.

The phytoglycogen nanoparticles were received from Mirexus Inc. (Guelph, ON) in powder form (R&D grade). The hydrodynamic diameter and charge of each nanoparticle type were measured using dynamic light scattering and  $\zeta$ -potential on freshly prepared Tris-buffered saline dispersions of the nanophytoglycogens. The data is provided in **Table 3.1**. The nanophytoglycogens were dispersed in Tris-buffered saline to achieve a nanoparticle/phospholipid (subphase/surface) molar ratio of 1:100, based on previous studies.<sup>24-25</sup> No changes in colloidal stability (i.e., observable flocculation and significant changes in size and  $\zeta$ ) of aqueous dispersions of the native

and anionic nanophytoglycogens were observed over periods of months stored at 4°C.

**Table 3.1.** Hydrodynamic Diameters and  $\zeta$ -Potentials of the Nanophytoglycogens

Nanoparticle type	Diameter (nm)	$\zeta$ (mV)
Native/unmodified	68.8 $\pm$ 0.4	-1.5 $\pm$ 0.4
Carboxymethyl-modified	52.0 $\pm$ 0.1	-16 $\pm$ 2
Amine-modified	53.8 $\pm$ 0.4	+17 $\pm$ 1

### 3.3.2 Surface Pressure-Area Isotherms

Model monolayers were formed by spreading 90  $\mu$ L of the DPPC/POPG or DPPC/POPG/super mini-B solution on the surface of Tris-buffered saline aqueous subphases, with or without nanophytoglycogen, in a Langmuir trough (702 BAM, Nima Technology Ltd., Coventry, England) thermostatted at 22.0  $\pm$  0.5 °C. The surface area and subphase volume of the trough are 700 cm<sup>2</sup> and 370 mL, respectively. After a solvent evaporation time of 20 min, the monolayer was symmetrically compressed at a rate of 8 cm<sup>2</sup> min<sup>-1</sup> (1.5 Å<sup>2</sup> molecule<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>) using two Delrin barriers (compression time of 67 min). The surface pressure ( $\pi$ ) was measured using a Wilhelmy balance and a roughened platinum plate. At least three reproducible isotherms were obtained for each different system. Between experiments conducted on buffered saline or for the same nanoparticle type, the trough was rinsed twice with ultrapure water, cleaned thrice with chloroform, cleaned thrice with ethanol (95%) and rinsed twice with ultrapure water. When changing the nanoparticle type, the trough was cleaned thrice using ethanol/chloroform (1:1 v/v) solution heated to boiling prior to following the same steps given above.

### 3.3.3 Brewster Angle Microscopy (BAM) Imaging

BAM images were acquired at the air/water interface using an imaging ellipsometer (I-

Elli2000, Nanofilm Technologie GmbH, Goettingen, Germany) equipped with a 50 mW Nd:YAG laser ( $\lambda=532$  nm). The Langmuir trough and experimental conditions were the same as described for the surface pressure–area isotherms. Images were captured using a 10× magnification objective. The incident angle was kept at 53.15° (Brewster angle), while the analyzer, compensator, and polarizer angles remained at 0°.

### 3.3.4 Ellipsometry Measurements

The ellipsometric angles  $\Psi$  and  $\Delta$  were measured with the imaging ellipsometer and under the same experimental conditions employed for BAM imaging. Measurements were carried out at an incident angle of 50°, a laser output of 100%, and a compensator angle of 20°. For nulling ellipsometry conditions, the analyzer and polarizer angles were initially set to 14° and 20°, respectively, and adjusted to extinguish the reflection of the incident polarized beam. Ellipsometric isotherms are reported in terms of  $\Delta\delta$ , which is defined as the difference between the ellipsometric angle  $\Delta$  of the film on the subphase and the subphase alone ( $\delta\Delta = \Delta_{\text{film}} - \Delta_{\text{subphase}}$ ). Each  $\Delta$  is the average of 10 measurements taken at a different location on the same film at a given surface pressure. For very thin films (thickness  $\ll 10$  nm), only a shift in  $\Delta$  is measurable, whereas the shift in  $\Psi$  is negligible.<sup>51</sup> Because  $\delta\Delta$  is affected by two independent film properties, thickness and refractive index, an unambiguous determination of the film thickness is impossible. For the present study, only  $\delta\Delta$  is reported, which represents the change in monolayer thickness upon compression, given the relative constancy of the film refractive index.

### 3.3.5 Monolayer Compression–Expansion Cycles

Monolayer compression–expansion cycles were performed by spreading 34  $\mu\text{L}$  of the 1.0 mM phospholipid solution on the surface (area of 244  $\text{cm}^2$ ) of the different subphases (volume of 160 mL) of a Langmuir mini-trough (KSV instruments Ltd., Helsinki, Finland), which enables higher molecular compression rates, thermostatted at  $22.0 \pm 0.5$  °C. After a solvent evaporation time 10 min, the monolayer was symmetrically compressed and expanded at a rate of 75  $\text{cm}^2 \text{min}^{-1}$  (36.6  $\text{\AA}^2 \text{molecule}^{-1} \text{min}^{-1}$ ), the fastest rate that could be achieved without causing surface pressure instabilities. The monolayer was successively compressed and expanded between 25 and 50  $\text{mN m}^{-1}$  over 20 cycles (total cycling time of 20 min). All measurements were performed in



quadruplicate on independently prepared monolayers. All other experimental details are the same as those used in the surface pressure–area isotherms.

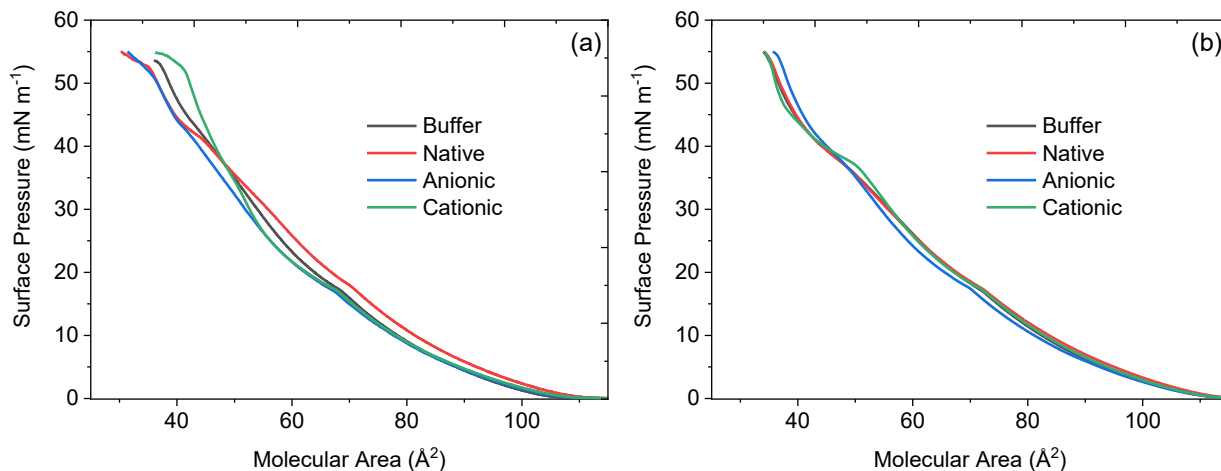
## 3.4 Results and Discussion

### 3.4.1 Monolayer Compression Isotherms

The surface pressure–area ( $\pi$ – $A$ ) isotherms of DPPC/POPG (7:3 mol/mol) and DPPC/POPG (7:3 mol/mol) with 3.0 wt% super mini-B on a Tris buffered saline subphase (150 mM NaCl, 50 mM Tris, and 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH = 7.4) to mimic the lung lining fluid<sup>52</sup> and on Tris-buffered saline dispersions of the different nanophytoglycogens are shown in **Figure 3.2**. The DPPC/POPG isotherm on Tris buffered saline agrees with those reported in the literature,<sup>40, 53-55</sup> exhibiting a shoulder at around 15–20 mN m<sup>-1</sup> corresponding to the onset of the condensation of a DPPC-rich phase. The kink at 37–42 mN m<sup>-1</sup> is normally attributed to the loss of some POPG-rich liquid-expanded phase.<sup>44</sup> The remaining DPPC-rich condensed phase collapses at  $\pi > \sim 55$  mN m<sup>-1</sup>.<sup>25, 44</sup> The addition of super mini-B to the phospholipid mixture shifts the onset area by approximately 5 Å<sup>2</sup> molecule<sup>-1</sup> (to a larger area) and accentuates the high pressure kink (see **Figure S1** of Supporting Information for a direct isotherm comparison). Chakraborty et al.<sup>56</sup> also found a comparable shift to a higher area with the addition of 5 wt % of mini-B (a truncated form of super mini-B)<sup>47</sup> to a DPPC/POPG 7:3 (mol/mol) monolayer on a water subphase.

It is difficult to estimate a priori a relevant nanoparticle-to-phospholipid ratio as this will be determined by the particle size-dependent probability of alveolar uptake,<sup>16</sup> homogeneity of the uptake, and the release characteristics of the loaded therapeutic. Nanophytoglycogen was added to the Tris-buffered saline subphase at a 1:100 nanoparticle-to-phospholipid (subphase/surface) ratio, chosen because it was the lowest ratio that produced any changes in the  $\pi$ – $A$  isotherms of pulmonary surfactant-mimetic monolayers on water subphases of silica nanoparticles.<sup>24-25</sup> At this nanoparticle-to-phospholipid ratio, there are no changes in the monolayer film collapse pressure and only minor changes in the compression isotherms, i.e., small shifts in molecular area and subtle changes in the definition of the aforementioned phase

transitions (**Figure 3.2**). Moreover, the magnitude of these changes is decreased in the presence of super mini-B.

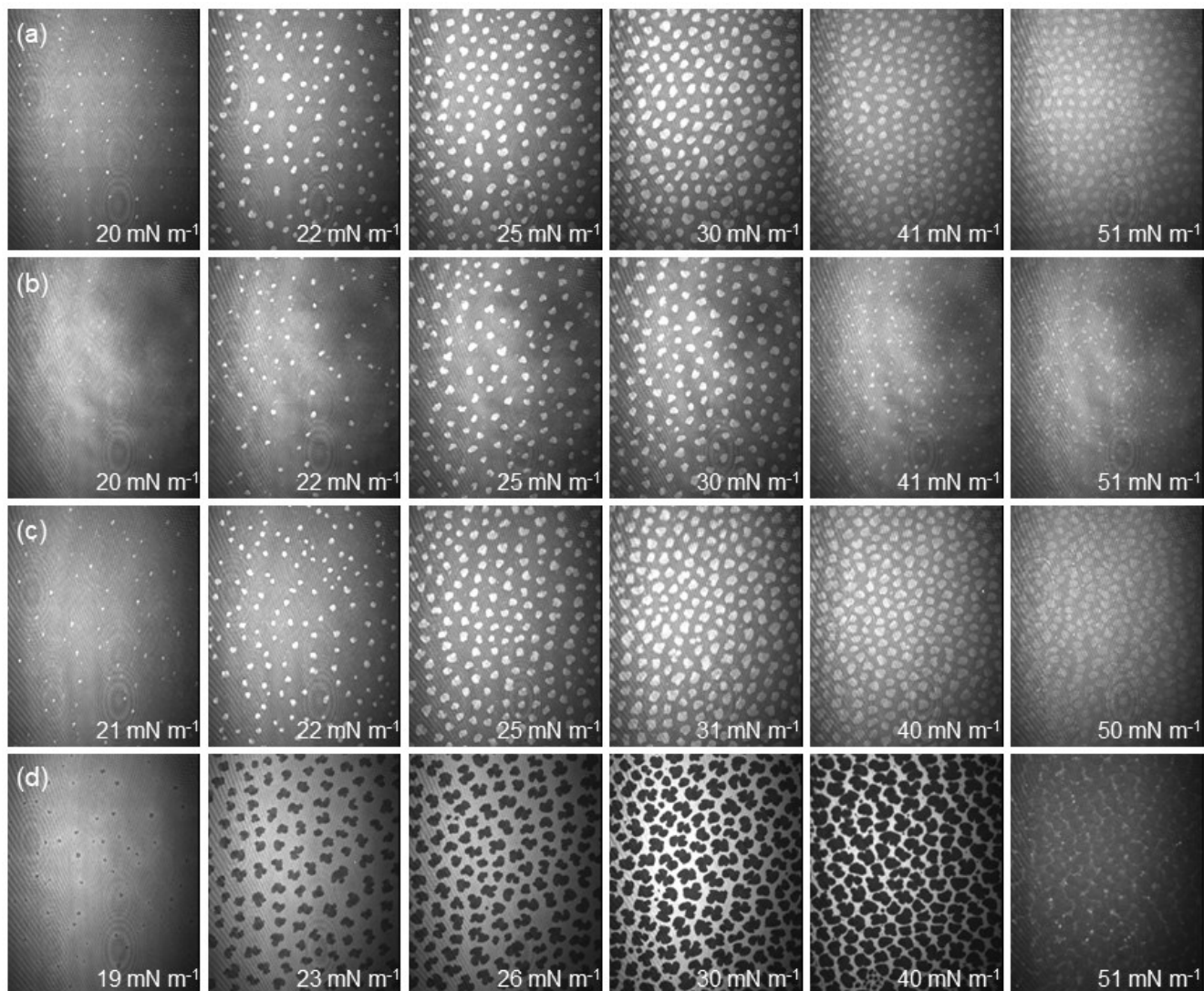


**Figure 3.2.** Surface pressure–molecular area ( $\pi$ – $A$ ) isotherms of (a) DPPC/POPG (7:3 mol/mol) and (b) DPPC/POPG (7:3 mol/mol) with 3.0 wt% super mini-B at 22 °C on Tris-buffered saline in the absence and presence of nanophytoglycogen at a 1:100 molar ratio of nanoparticles in the subphase to phospholipid at the surface. Note that the molecular area represents the average molecular area of phospholipid.

### 3.4.2 Film Morphology and Thickness

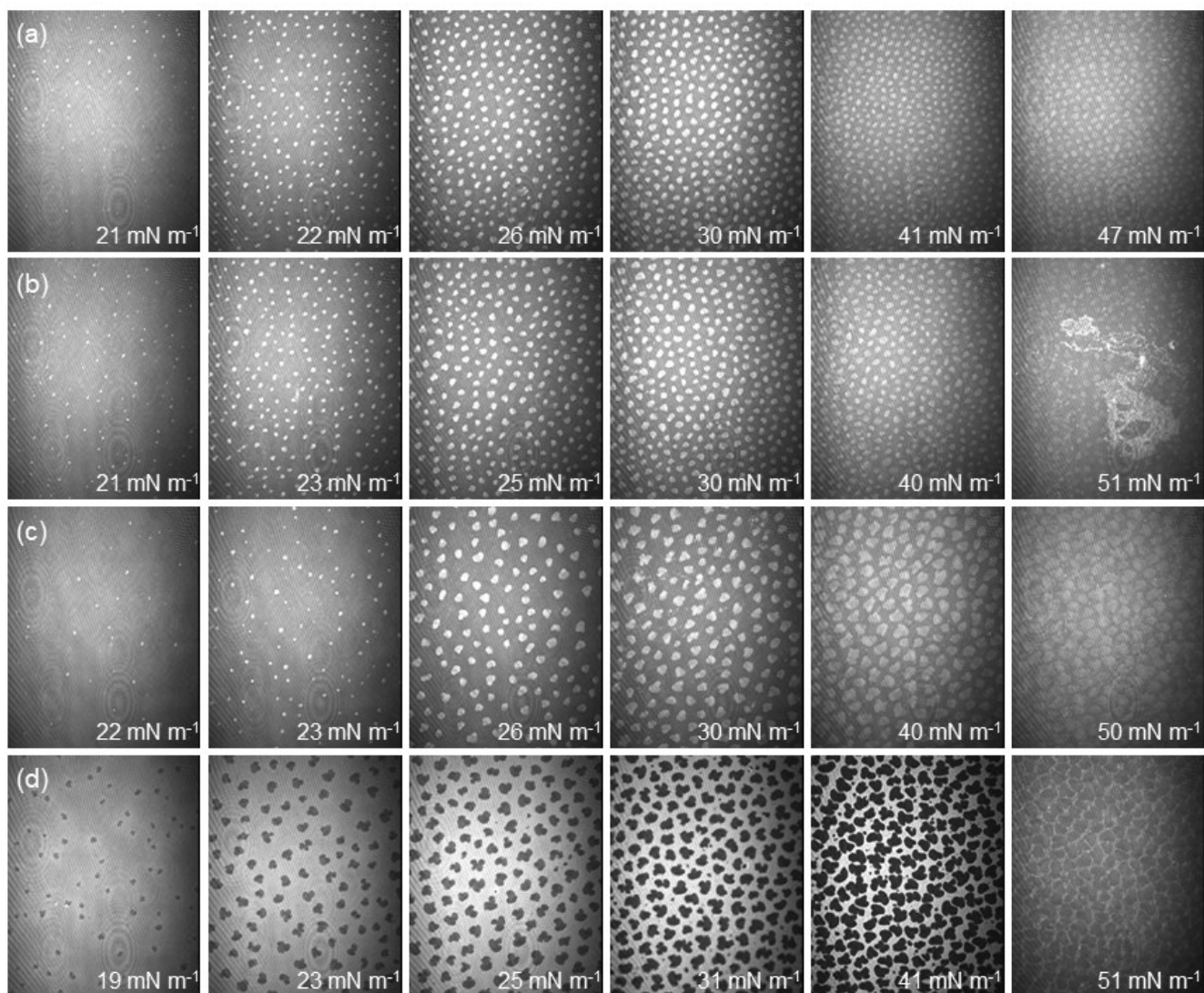
In BAM, the contrast between the fluid-like liquid-expanded and solid-like condensed phospholipid phases derives primarily from differences in the thicknesses of these phases given their similar refractive indices,<sup>57-60</sup> where darker and lighter regions correspond to thinner and thicker areas of film, respectively. BAM images of DPPC/POPG (7:3 mol/mol) without (**Figure 3.3a**) or with 3.0 wt% super mini-B (**Figure 3.4a**) show the expected formation of thicker DPPC-rich condensed domains surrounded by a thinner POPG-rich fluid phase. The average domain size is larger in the absence of the peptide, but the percent surface area coverage by the condensed phase is comparable between 30 and 50  $\text{mNm}^{-1}$  (i.e.  $28 \pm 4\%$  for DPPC/POPG versus  $26 \pm 2\%$  for DPPC/POPG/super mini-B), indicative of peptide modulation of the line tension as previously reported for mini-B.<sup>56</sup> The observable onset of domain formation occurs at  $19 \pm 1 \text{ mNm}^{-1}$ , the

surface pressure where the phase transition appears in the compression isotherms. Upon compression of the monolayers to surface pressures past the second phase transition ( $\pi > \sim 40 \text{ mN m}^{-1}$ ), the contrast between the two phases is attenuated. This phenomenon was previously attributed to the appearance in the fluid phase of submicron condensed domains that are not resolvable by BAM ( $1\text{--}2 \mu\text{m}$  lateral resolution) but nonetheless contribute to the optical signal.<sup>25</sup>



**Figure 3.3.** BAM images ( $430 \mu\text{m} \times 538 \mu\text{m}$ ) of DPPC/POPG (7:3 mol/mol) as a function of the surface pressure on (a) Tris-buffered saline. Tris-buffered saline containing (b) native nanophytoglycogen, (c) anionic nanophytoglycogen, and (d) cationic nanophytoglycogen. For (a-c), the lighter regions are the condensed phase and the darker regions are the liquid-expanded or

fluid phase, while the opposite contrast is observed for (d).



**Figure 3.4.** BAM images ( $430 \mu\text{m} \times 538 \mu\text{m}$ ) of DPPC/POPG (7:3 mol/mol) with 3.0 wt% super mini-B as a function of the surface pressure on (a) Tris-buffered saline. Tris-buffered saline containing (b) native nanophytoglycogen, (c) anionic nanophytoglycogen, and (d) cationic nanophytoglycogen.

The presence of nanophytoglycogen in the subphase induces a small shift in the surface pressure associated with the observable onset of domain formation in DPPC/POPG (**Figure 3.3**): native (quasi-neutral)  $2 \pm 1 \text{ mN m}^{-1}$  ( $n = 3$ ), anionic  $3 \pm 1 \text{ mN m}^{-1}$  ( $n = 4$ ), and cationic  $-1 \pm 1 \text{ mN m}^{-1}$  ( $n = 4$ ). The presence of anionic nanophytoglycogen in the subphase (**Figure 3.3c**) does not alter the film morphology. In the case of native nanophytoglycogen (**Figure 3.3b**), a distinction occurs only at high surface pressures ( $\pi > \sim 40 \text{ mN m}^{-1}$ ), where the loss of optical contrast coincides with a more prominent kink in the isotherm and a noticeable decrease in the domain size. The cationic nanophytoglycogen alters the condensed DPPC-rich domain shape from the onset of phase condensation; the domains appear lobed, indicative of an altered line tension between the two lipid phases (**Figure 3.3d**). Additionally at higher surface pressure ( $\pi = 50\text{-}51 \text{ mN m}^{-1}$ ), the amount of fluid phase observed is reduced. More importantly, from the onset of domain formation, a striking *reverse* phase contrast is observed, signifying that the DPPC-rich condensed domains are surrounded by a thicker fluid phase. To ensure that this effect is not due to the presence of divalent calcium ions or a specific interaction of the phospholipids with the Tris base, a control experiment was performed on an aqueous subphase containing cationic nanophytoglycogen and 150 mM NaCl (**Figure S2**). A reverse phase contrast was also observed from the onset of domain formation. We and others previously observed an *inversion* in the BAM contrast of pulmonary surfactant-mimetic monolayers, but only at high surface pressures, well beyond the completion of phase separation.<sup>25, 61-62</sup> In these latter cases, the inversion of contrast was attributed to a thickening of the fluid phase due to the compression-induced formation of three-dimensional (non-monolayer) structures. If the reverse contrast observed herein from the initial stages of phase separation and condensed domain formation was attributable to multilayer formation, the compression isotherm should be shifted to significantly smaller molecular areas. On the other hand, Daear et al.<sup>29</sup> reported an inversion of contrast at high surface pressures when cospreading cationic gelatin nanoparticles within a dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG) monolayer. If the cationic nanophytoglycogen embeds in the POPG-rich fluid phase, a large film expansion and shift in the isotherm to greater molecular areas should be observed. Neither of these two isotherm shift effects occur (**Figure 3.2a**) and the compression isotherm of pure POPG presents only a small shift (**Figure S3**). The origin of this reverse phase contrast will be addressed below.

The presence of nanophytoglycogen in the subphase produces analogous shifts in the onset of phase condensation for DPPC/POPG/super mini-B (**Figure 3.4**): native  $2 \pm 1 \text{ mN m}^{-1}$  ( $n = 4$ ), anionic  $1 \pm 1 \text{ mN m}^{-1}$  ( $n = 4$ ), and cationic  $-1 \pm 1 \text{ mN m}^{-1}$  ( $n = 4$ ). For this phospholipid–protein system, the anionic nanophytoglycogen causes an increase in the condensed domain size due to changes in line tension likely because of an interaction with the cationic super mini-B in the fluid phase (**Figure 3.4c**). The DPPC-rich domains again adopt a lobed shape on the cationic nanophytoglycogen subphase and the same reverse phase contrast is observed throughout film compression (**Figure 3.4d**). At high surface pressure (i.e., 50–51  $\text{mN m}^{-1}$ ), the difference in contrast between the condensed and fluid phases is significantly reduced but remains reversed (like in **Figure 3.3d**).

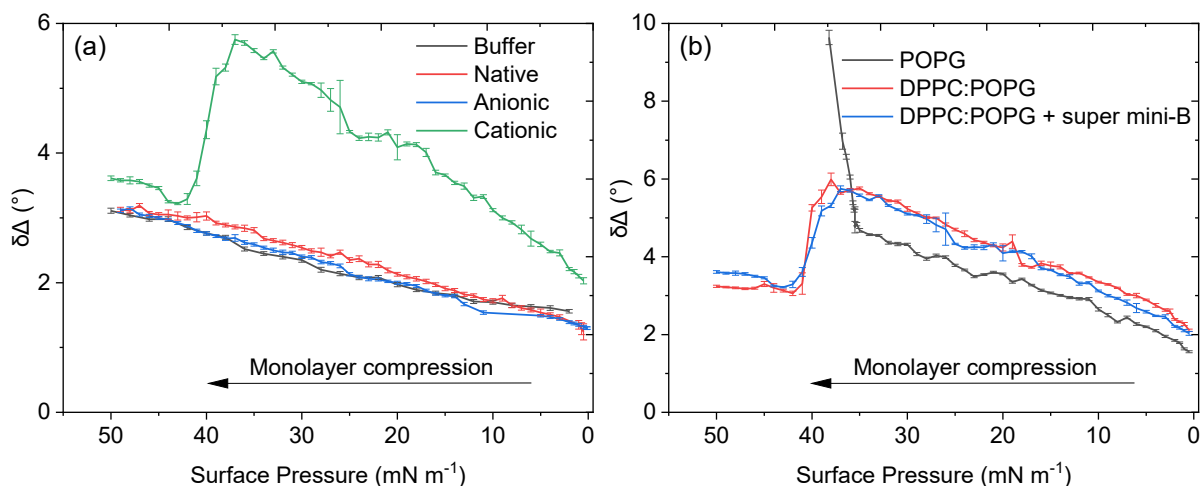
We hypothesize that the reverse phase contrast and increased thickness of the fluid phase observed by BAM for both DPPC/POPG and DPPC/POPG/super mini-B on the cationic nanophytoglycogen subphase arises from a layer of nanoparticles electrostatically adsorbed to the negatively-charged phosphatidylglycerol headgroups. This hypothesis correlates well with an observed net increase in the reflected intensity at low surface pressures prior to lateral phase separation and condensed domain formation in which the phosphatidylglycerol is distributed throughout the entire film. The BAM images in **Figure 3.3a–c** and **Figure 3.4a–c** were obtained using 70–90% of the full incident laser intensity, while **Figure 3.3d** and **Figure 3.4d** were acquired using 30%. Considering that nanophytoglycogen is glucose based, its refractive index at high aqueous concentration (i.e., the refractive index of 60 wt% glucose solution is 1.43 at  $\lambda = 532 \text{ nm}$ )<sup>63</sup> is comparable to that of the phospholipid alkyl chains (i.e., a refraction index of 1.46 at  $\lambda = 532 \text{ nm}$ ).<sup>64</sup> BAM imaging therefore reports on the combined POPG–nanoparticle thicknesses. Based simply on the areal footprint of the cationic nanoparticle (hydrodynamic diameter  $\cong 54 \text{ nm}$ , **Table 3.1**), one nanoparticle spans the monolayer area occupied by approximately 3800 POPG molecules ( $A \cong 0.6 \text{ nm}^2$ ). Thus, with a nanoparticle-to-phospholipid (subphase/surface) ratio of 1:100, full particle coverage of the fluid phase at the interface is plausible. Notably, the incident laser intensity needed to be decreased further to as low as 10% as phospholipid lateral phase separation and domain condensation ensued. Even with this reduced laser intensity, the

contrast between the condensed and fluid phases is amplified. This extreme phase contrast suggests that little or no nanoparticles are interacting with the zwitterionic DPPC-rich domains.

To confirm our hypothesis, ellipsometry measurements were performed at the air/water interface. The evolution of the ellipsometric angle, reported as  $\delta\Delta$ , with film compression is shown in **Figure 3.5a** as a function of the surface pressure. The same data is plotted as function of the molecular area in **Figure S4a**. There is no experimentally significant difference in the  $\delta\Delta$  of DPPC/POPG/super mini-B on Tris-buffered saline, native, and anionic nanophytoglycogen subphases.  $\delta\Delta$  continually increases as the film is compressed. From the isotherm onset, the film on the cationic nanophytoglycogen subphase exhibits a large increase in  $\delta\Delta$ , which is proportional to the film thickness. The slope of  $\delta\Delta$ - $\pi$  is steeper than that measured over the other nanophytoglycogen-containing subphases and, at its maximum, reaches a value approximately double that of the other films, confirming that the cationic nanoparticles are adsorbed to the film. Moreover, a distinct decrease occurs after the high-pressure transition at around  $40 \text{ mN m}^{-1}$  that returns  $\delta\Delta$  close to that of the film on buffered saline, suggesting a loss of nanoparticles at high film compression. This decrease in  $\delta\Delta$  correlates with the reduced phase contrast at high surface pressure in BAM (**Figure 3.4d**). After the drop in  $\delta\Delta$ , further monolayer compression induces a thickening of the film that is evident from the increase in  $\delta\Delta$ . A similar evolution in  $\delta\Delta$  is observed in the absence of super mini-B on the cationic nanophytoglycogen subphase (**Figure 3.5b**, **Figure S4b**, and **Figure S5**) demonstrating that the observed film thickness changes are induced by strong phospholipid-nanoparticle interactions that are not modulated by the presence of a positively-charged protein.

To verify that the cationic nanophytoglycogen is interacting with the POPG in the mixed monolayers, its interaction with pure POPG (**Figure 3.5b**, **Figure S4b**, and **Figure S6**) and DPPC (**Figure S7**) monolayers was also investigated. The DPPC film shows no significant increase in  $\delta\Delta$  on the cationic nanophytoglycogen subphase compared to buffered saline. On the other hand, the POPG monolayer in the presence of cationic nanophytoglycogen exhibits the same increase in  $\delta\Delta$  observed with DPPC/POPG and DPPC/POPG/super mini-B. However, in the former case,  $\delta\Delta$

continues to increase even after film collapse ( $\pi > \sim 37 \text{ mN m}^{-1}$ ), suggesting that as long as a POPG monolayer covers the interface, the nanoparticles remain bound. The combined BAM and ellipsometry data of the mixed monolayers indicate that the high-pressure phase transition corresponds to a loss of particles from the interface. These changes appear to correlate with the reduction in the proportion of the fluid phase observed by BAM (**Figure 3.3d** and **Figure 3.4d**).

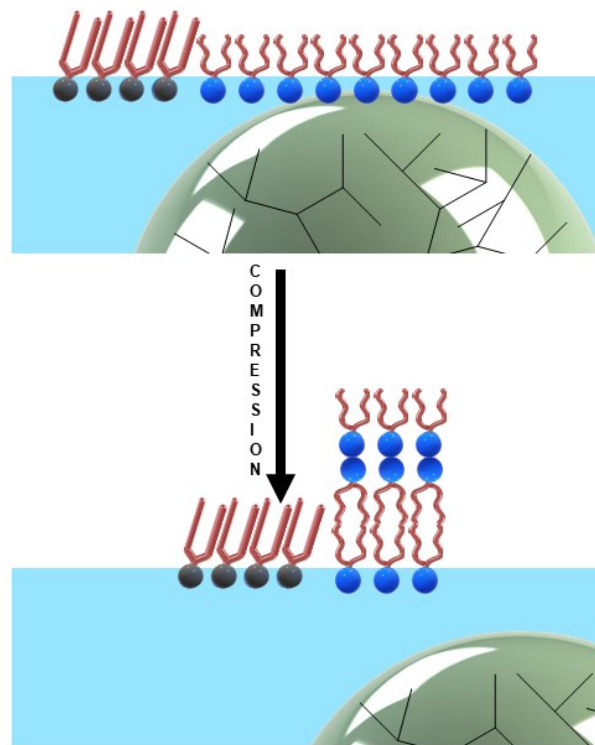


**Figure 3.5.** Change in the ellipsometric angle ( $\delta\Delta$ ) as a function of the surface pressure. (a) DPPC/POPG (7:3 mol/mol) and 3.0 wt% super mini-B at 22 °C on Tris-buffered saline in the absence and presence of nanophytoglycogen. (b) POPG, DPPC/POPG (7:3 mol/mol), and DPPC/POPG (7:3 mol/mol) with 3.0 wt% super mini-B at 22 °C on Tris-buffered saline in the presence of cationic nanophytoglycogen.

While ellipsometry shows that nanoparticles leave the interface, the reverse phase contrast persists, albeit with reduced intensity difference. DPPC/POPG monolayers compressed on aqueous suspensions of cationic silica nanoparticles (in the absence of added salt) showed an inversion of the phase contrast as the surface pressure approached  $\sim 35 \text{ mN m}^{-1}$ , wherein the light-colored condensed domains and darker surrounding fluid phase invert to dark condensed phase and lighter fluid phase.<sup>25</sup> This compression-induced contrast inversion was shown to derive



from the formation of thicker multilayer protrusions in the fluid phase. Analogous experiments with cationic nanophytoglycogen subphases in the absence of added salt show the same phase progression from normal to inverted phase contrast (**Figure S8**). We thus propose that at the high compression states on the Tris buffered saline-containing subphase, the cationic phytoglycogen nanoparticles leave the interface due to interparticle electrostatic repulsion and reduction in the proportion of fluid phase (**Figure 3.6**). Any remaining particles induce thicker protrusions that lead to the continued reverse but lower contrast in BAM and increase in  $\Delta\delta$  after the large decrease at  $\sim 40 \text{ mN m}^{-1}$ .



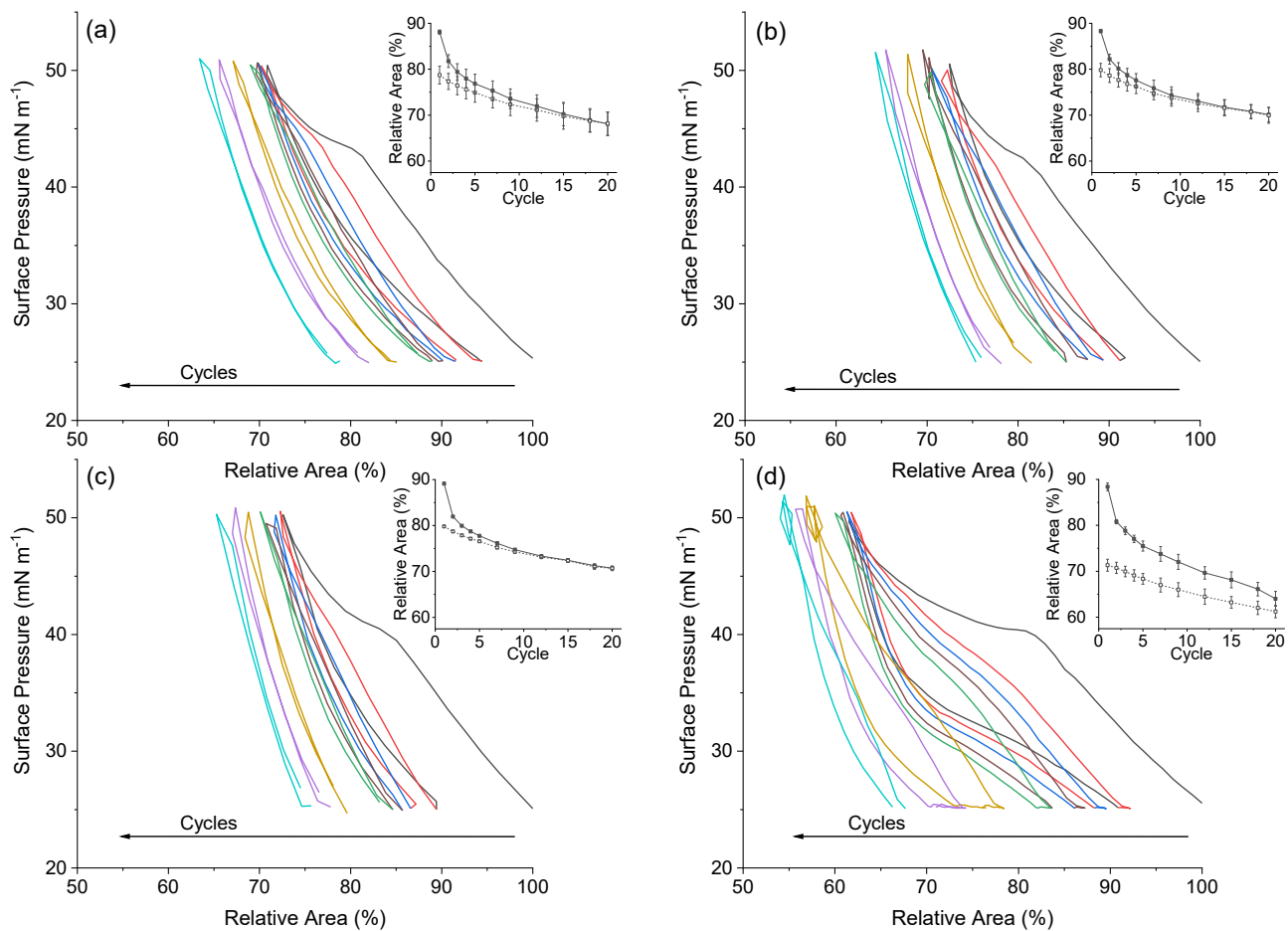
**Figure 3.6.** Schematic of proposed interaction of cationic nanophytoglycogen with the model membranes formed at the air/water interface. At low compression, the cationic nanoparticles are preferentially bound to the anionic, POPG-rich fluid phase of the monolayer leading to the reversed contrast observed in BAM and increased thickness changes in ellipsometry. At high compression, there is the formation of multilayer structures in the fluid phase and loss of nanoparticles from the interface.

### 3.4.3 Monolayer Compression–Expansion Cycles

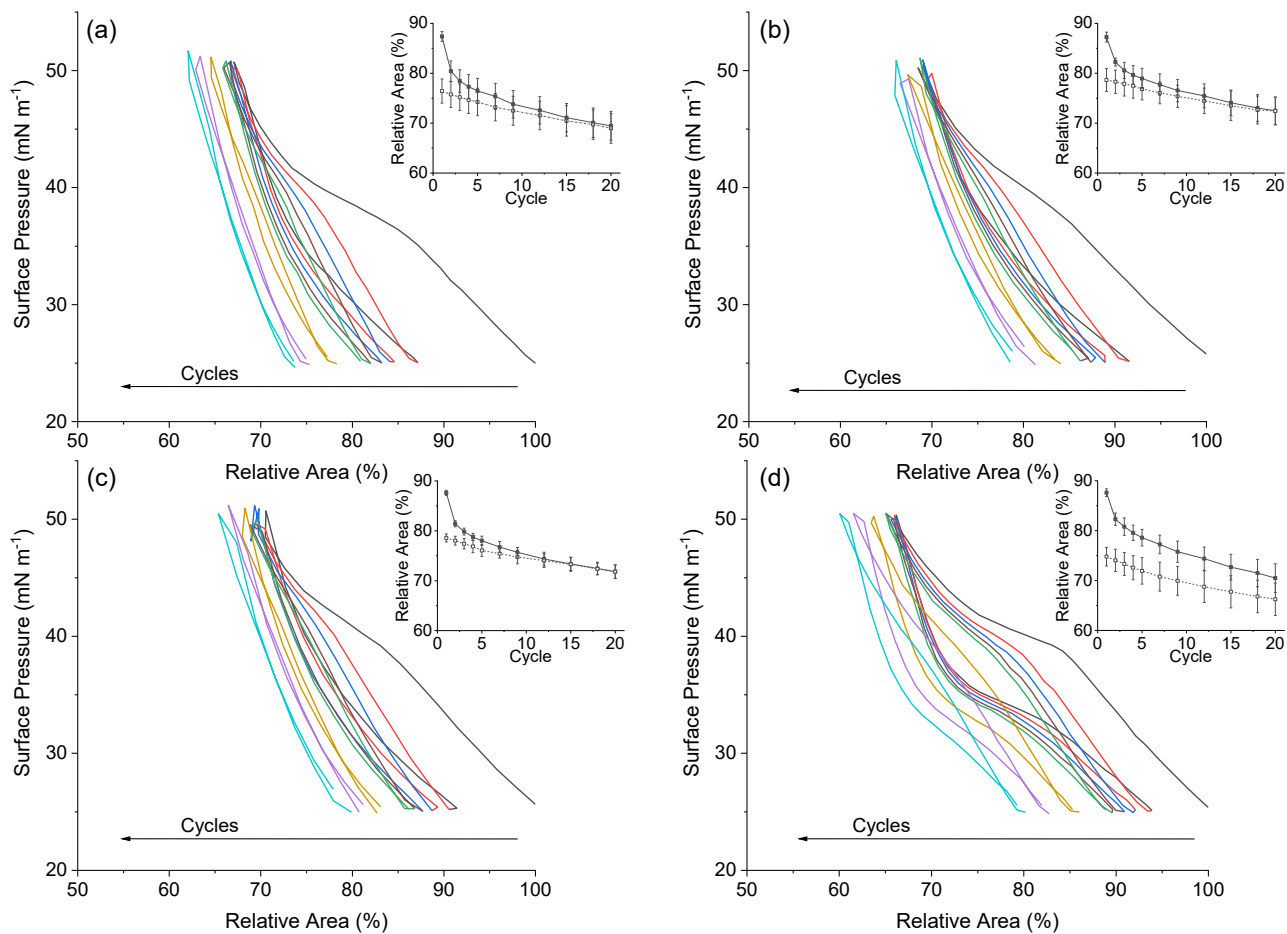
The monolayers were compressed and expanded through multiple recompression cycles at a rate corresponding to a breathing cycle of approximately 30 s. Although slower than the average human breathing rate of 3–4 s,<sup>65-67</sup> it is the fastest speed that can be reasonably obtained with our Langmuir trough without causing instabilities at the interface. The monolayers were successively compressed and expanded between 25 and 50 mN m<sup>-1</sup>, selected to be representative of physiological surface tensions, oscillating around a reference state of 35 mN m<sup>-1</sup>,<sup>68</sup> and representing a lung area variation of 30-35%.<sup>69</sup> The upper surface pressure limit was selected to avoid overcompression and collapse of the film that is frequently observed when cycling between fixed areas.<sup>70</sup> For comparison purposes, the isotherms are reported in terms of the % area relative to the initial molecular area at 25 mN m<sup>-1</sup> of the first compression.

**Figure 3.7** and **3.8** show the DPPC/POPG and DPPC/POPG/super mini-B compression–expansion isotherms, respectively, as a function of the number of cycles and the insets indicate the relative areas of the compression and expansion segments of the hysteresis loop as a function of cycle number for 35 mN m<sup>-1</sup>. Data for additional pressures is given in **Figure S9** and **Figure S10**. The differences in the relative areas of the hysteresis loop (i.e.,  $\Delta$ Relative area (%) = compression relative area – expansion relative area) as a function of cycle number are also summarized in **Figure S11** and **Figure S12**. The area enclosed by the hysteresis loop has been inferred to represent the additional work of breathing.<sup>71</sup> The monolayers on the Tris-buffered saline, native, and anionic nanoparticle subphases show a larger hysteresis loop (approximately 10% difference at 35 mN m<sup>-1</sup>) on the first or priming cycle, as has been reported previously.<sup>66</sup> This hysteresis decreases markedly with increasing cycle number, reaching a near-zero hysteresis by cycle 15. However, in the presence of cationic nanophytoglycogen, the hysteresis in the priming cycle is larger than that on the other subphases, and more importantly, persists even after 20 cycles, which is a sign of film instability and inhibition of the surfactant activity.<sup>65, 70</sup> Notably, the phase transition plateau at around 40 mN m<sup>-1</sup> is much more evident in both compression and expansion, a feature that has also been associated with damage to pulmonary surfactant caused by inhibitory agents.<sup>72</sup> Given that one nanoparticle spans 3800 phospholipid molecules, we hypothesize that

this interaction significantly hinders the mobility and flow properties of the anionic fluid phase, and consequently its collapse and respreadability, leading to the larger observed hysteresis. While there are subtle differences between the phospholipid-only and phospholipid–protein mixtures on the cationic nanophytoglycogen subphase, such as the relative area to which the expansion curve returns and the surface pressures of the plateaus for both compression and expansion, it appears that the cationic super mini-B is insufficient to electrostatically repel the cationic nanoparticles and mitigate its inhibition of surfactant activity. These findings using the model phospholipid–protein mixture suggest that pulmonary surfactant could be damaged by cationic nanophytoglycogen even in the presence of the critical-to-breathing surfactant protein B.



**Figure 3.7.** Compression–expansion cycles for DPPC/POPG (7:3 mol/mol) on (a) Tris buffered saline. Tris buffered saline containing (b) native nanophytoglycogen, (c) anionic nanophytoglycogen, and (d) cationic nanophytoglycogen. The x-axis is given as the area relative to the area at  $25 \text{ mN m}^{-1}$  of the compression segment of cycle 1. The insets represent the relative area at  $35 \text{ mN m}^{-1}$  of the compression (solid line and closed symbol) and expansion (dashed line and open symbol) segments as a function of the number of cycles. The data points and error bars represent the mean and standard deviation of four independent measurements. Cycle 1 black, cycle 2 red, cycle 3 blue, cycle 4 brown, cycle 5 green, cycle 10 yellow, cycle 15 purple, and cycle 20 light blue.



**Figure 3.8.** Compression–expansion cycles for DPPC/POPG (7:3 mol/mol) with 3.0 wt% super mini-B on (a) Tris buffered saline. Tris buffered saline containing (b) native nanophytoglycogen, (c) anionic nanophytoglycogen, and (d) cationic nanophytoglycogen. The x-axis is given as the area relative to the area at  $25 \text{ mN m}^{-1}$  of the compression segment of cycle 1. The insets represent the relative area at  $35 \text{ mN m}^{-1}$  of the compression (solid line and closed symbol) and expansion (dashed line and open symbol) segments as a function of the number of cycles. The data points and error bars represent the mean and standard deviation of four independent measurements. Cycle 1 black, cycle 2 red, cycle 3 blue, cycle 4 brown, cycle 5 green, cycle 10 yellow, cycle 15 purple, and cycle 20 light blue.

### 3.5 Conclusions

Returning to the question of whether plant-based carbohydrate nanoparticles are safe for inhalation, we conclude that the major determinant is the surface charge. Native (quasi-neutral) and anionic nanophytoglycogens minimally impact the condensed phase morphology, surfactant activity, and cyclability of monolayer model membranes comprised of DPPC/POPG and DPPC/POPG/super mini-B at a nanoparticle:phospholipid (subphase/surface) ratio of 1:100. This does not however preclude their interaction with the films. We have demonstrated that cationic nanophytoglycogen electrostatically binds to the anionic POPG-rich fluid phase of the monolayer model membranes (ellipsometry). This interaction alters the film morphology (BAM), despite the similarity of the first compression isotherm with those of the buffered saline and other nanoparticle-laden subphases. The bound cationic nanoparticles significantly alter the monolayer cyclability. An increased hysteresis signals a potential increase in the work of breathing. It is clear that the presence of super mini-B does not alter the adsorption of the cationic nanophytoglycogen to the POPG-rich fluid phase nor prevent the increased hysteresis of the compression-expansion cycles that this adsorption induces. The similar influence exerted by cationic silica and phytoglycogen nanoparticles highlight the dominance of the surface charge rather than material type on nanoparticle-induced effects on pulmonary surfactant. In light of the findings presented here for pristine materials, native and anionic nanophytoglycogens are the material types to pursue as nanocarriers for pulmonary drug delivery applications. Since nanoparticles can acquire a lipoprotein corona in-vivo that modifies their surface properties, including charge, future studies must include more complex lung lining mimetics.<sup>21, 73-75</sup>

### 3.6 Acknowledgment

This research was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada through grant numbers RGPIN-2019-04883 (A.B.) and RGPIN-2019-07043 (C.D.) and Collaborative Projects grant from the Quebec Centre for Advanced Materials of the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologie. The development and synthesis of super mini-B was made possible through grants from the National Heart, Lung and Blood Institute (grant no

NIH HL-51177, Zasadinski) and the Frans Walther's Grand Challenges Explorations (GCE) phase II Award of the Bill & Melinda Gates Foundation (OPP1112090, Waring). The authors thank Dalia Ali (Concordia) for the dynamic light scattering and zeta potential measurements and Mirexus Inc. for the donation of the nanophytoglycogens and sharing characterization data.

## Références Chapitre 3

1. Xue, J.; Luo, Y., Properties and Applications of Natural Dendritic Nanostructures: Phytoglycogen and its Derivatives. *Trends Food Sci. Tech.* **2021**, *107*, 432-444.
2. Lin, N.; Dufresne, A., Nanocellulose in Biomedicine: Current Status and Future Prospect. *Eur. Polym. J.* **2014**, *59*, 302-325.
3. Engelberth, S. A.; Hempel, N.; Bergkvist, M., Chemically Modified Dendritic Starch: A Novel Nanomaterial for siRNA Delivery. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 1766-1774.
4. Lu, F.; Mosley, Y.-Y. C.; Rodriguez Rosales, R. J.; Carmichael, B. E.; Elesela, S.; Yao, Y.; HogenEsch, H., Alpha-D-Glucan Nanoparticulate Adjuvant Induces a Transient Inflammatory Response at the Injection Site and Targets Antigen to Migratory Dendritic Cells. *NPJ Vaccines* **2017**, *2*, 1-9.
5. Trache, D.; Tarchoun, A. F.; Derradji, M.; Hamidon, T. S.; Masruchin, N.; Brosse, N.; Hussin, M. H., Nanocellulose: From Fundamentals to Advanced Applications. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 1-33.
6. Gim, S.; Zhu, Y.; Seeberger, P. H.; Delbianco, M., Carbohydrate-Based Nanomaterials for Biomedical Applications. *WIREs Nanomed. Nanobi.* **2019**, *11*, 1-29.
7. Nickels, J. D.; Atkinson, J.; Papp-Szabo, E.; Stanley, C.; Diallo, S. O.; Perticaroli, S.; Baylis, B.; Mahon, P.; Ehlers, G.; Katsaras, J.; Dutcher, J. R., Structure and Hydration of Highly-Branched, Monodisperse Phytoglycogen Nanoparticles. *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 735-743.
8. Whiting, P. Mirexus Inc. <http://mirexusbiotech.com/mirexus-inc/> (accessed July 16, 2021).
9. Whiting, P. Glysantis - NanoDendrix. <http://mirexusbiotech.com/glysantis/> (accessed July 16, 2021).
10. Villanueva-Flores, F.; Castro-Lugo, A.; Ramírez, O. T.; Palomares, L. A., Understanding Cellular Interactions with Nanomaterials: Towards a Rational Design of Medical Nanodevices. *Nanotechnology* **2020**, *31*, 132002.
11. Liu, X.-Q.; Tang, R.-Z., Biological Responses to Nanomaterials: Understanding Nano-Bio Effects on Cell Behaviors. *Drug Deliv.* **2017**, *24*, 1-15.
12. Cheng, L.-C.; Jiang, X.; Wang, J.; Chen, C.; Liu, R.-S., Nano-Bio Effects: Interaction of Nanomaterials with Cells. *Nanoscale* **2013**, *5*, 3547-3569.
13. Hidalgo, A.; Cruz, A.; Pérez-Gil, J., Pulmonary Surfactant and Nanocarriers: Toxicity Versus Combined Nanomedical Applications. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2017**, *1859*, 1740-1748.
14. Arick, D. Q.; Choi, Y. H.; Kim, H. C.; Won, Y.-Y., Effects of Nanoparticles on the Mechanical Functioning of the Lung. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, *225*, 218-228.
15. Hidalgo, A.; Cruz, A.; Pérez-Gil, J., Barrier or Carrier? Pulmonary Surfactant and Drug Delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *95*, 117-127.
16. Patton, J. S.; Byron, P. R., Inhaling Medicines: Delivering Drugs to the Body Through the Lungs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 67-74.

17. Anderson, C. F.; Grimmer, M. E.; Domalewski, C. J.; Cui, H., Inhalable Nanotherapeutics to Improve Treatment Efficacy for Common Lung Diseases. *WIREs Nanomed. Nanobi.* **2020**, *12*, 1-29.
18. Blanco, O.; Pérez-Gil, J., Biochemical and Pharmacological Differences Between Preparations of Exogenous Natural Surfactant Used to Treat Respiratory Distress Syndrome: Role of the Different Components in an Efficient Pulmonary Surfactant. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *568*, 1-15.
19. Alonso, C.; Alig, T.; Yoon, J.; Bringezu, F.; Warriner, H.; Zasadzinski, J. A., More Than a Monolayer: Relating Lung Surfactant Structure and Mechanics to Composition. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 4188-4202.
20. Zhang, H.; Wang, Y. E.; Fan, Q.; Zuo, Y. Y., On the Low Surface Tension of Lung Surfactant. *Langmuir* **2011**, *27*, 8351-8358.
21. Hu, G.; Jiao, B.; Shi, X.; Valle, R. P.; Fan, Q.; Zuo, Y. Y., Physicochemical Properties of Nanoparticles Regulate Translocation across Pulmonary Surfactant Monolayer and Formation of Lipoprotein Corona. *ACS Nano* **2013**, *7*, 10525-10533.
22. Ramazani, A.; Mandal, T.; Larson, R. G., Modeling the Hydrophobicity of Nanoparticles and Their Interaction with Lipids and Proteins. *Langmuir* **2016**, *32*, 13084-13094.
23. Mu, Q.; Jiang, G.; Chen, L.; Zhou, H.; Fourches, D.; Tropsha, A.; Yan, B., Chemical Basis of Interactions Between Engineered Nanoparticles and Biological Systems. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 7740-7781.
24. Behyan, S.; Borozenko, O.; Khan, A.; Faral, M.; Badia, A.; DeWolf, C., Nanoparticle-Induced Structural Changes in Lung Surfactant Membranes: An X-ray Scattering Study. *Environ. Sci.: Nano* **2018**, *5*, 1218-1230.
25. Borozenko, O.; Faral, M.; Behyan, S.; Khan, A.; Coulombe, J.; DeWolf, C.; Badia, A., Silica Nanoparticle-Induced Structural Reorganizations in Pulmonary Surfactant Films: What Monolayer Compression Isotherms Do Not Say. *ACS Appl. Nano Mater.* **2018**, *1*, 5268-5278.
26. Stenger, P. C.; Alonso, C.; Zasadzinski, J. A.; Waring, A. J.; Jung, C.-L.; Pinkerton, K. E., Environmental Tobacco Smoke Effects on Lung Surfactant Film Organization. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2009**, *1788*, 358-370.
27. Hane, F.; Drolle, E.; Leonenko, Z., Effect of Cholesterol and Amyloid- $\beta$  Peptide on Structure and Function of Mixed-Lipid Films and Pulmonary Surfactant BLES: An Atomic Force Microscopy Study. *Nanomedicine* **2010**, *6*, 808-814.
28. Schüer, J. J.; Arndt, A.; Wölk, C.; Pinnapireddy, S. R.; Bakowsky, U., Establishment of a Synthetic In Vitro Lung Surfactant Model for Particle Interaction Studies on a Langmuir Film Balance. *Langmuir* **2020**, *36*, 4808-4819.
29. Daear, W.; Lai, P.; Anikovskiy, M.; Prenner, E. J., Differential Interactions of Gelatin Nanoparticles with the Major Lipids of Model Lung Surfactant: Changes in the Lateral Membrane Organization. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 5356-5366.
30. Al-Saiedy, M.; Pratt, R.; Lai, P.; Kerek, E.; Joyce, H.; Prenner, E.; Green, F.; Ling, C.-C.; Veldhuizen, R.; Ghandorah, S.; Amrein, M., Dysfunction of Pulmonary Surfactant Mediated by Phospholipid Oxidation Is Cholesterol-Dependent. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2018**, *1862*, 1040-1049.

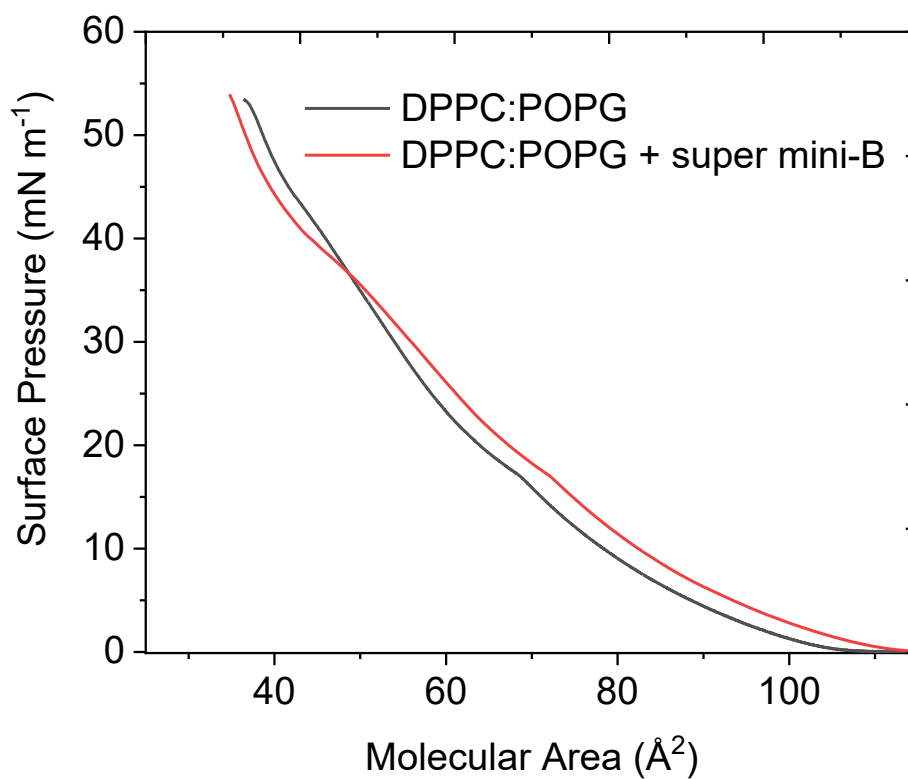


31. Guzmán, E.; Liggieri, L.; Santini, E.; Ferrari, M.; Ravera, F., Effect of Hydrophilic and Hydrophobic Nanoparticles on the Surface Pressure Response of DPPC Monolayers. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 21715-21722.
32. Nisoh, N.; Karttunen, M.; Monticelli, L.; Wong-ekkabut, J., Lipid Monolayer Disruption Caused by Aggregated Carbon Nanoparticles. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 11676-11685.
33. Choe, S.; Chang, R.; Jeon, J.; Violi, A., Molecular Dynamics Simulation Study of a Pulmonary Surfactant Film Interacting with a Carbonaceous Nanoparticle. *Biophys. J.* **2008**, *95*, 4102-4114.
34. Beck-Broichsitter, M.; Ruppert, C.; Schmehl, T.; Günther, A.; Seeger, W., Biophysical Inhibition of Synthetic vs. Naturally-Derived Pulmonary Surfactant Preparations by Polymeric Nanoparticles. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2014**, *1838*, 474-481.
35. Cagno, V.; Andreozzi, P.; D'Alicarnasso, M.; Jacob Silva, P.; Mueller, M.; Galloux, M.; Le Goffic, R.; Jones, S. T.; Vallino, M.; Hodek, J.; Weber, J.; Sen, S.; Janeček, E.-R.; Bekdemir, A.; Sanavio, B.; Martinelli, C.; Donalizio, M.; Rameix Welti, M.-A.; Eleouet, J.-F.; Han, Y.; Kaiser, L.; Vukovic, L.; Tapparel, C.; Král, P.; Krol, S.; Lembo, D.; Stellacci, F., Broad-Spectrum Non-Toxic Antiviral Nanoparticles with a Virucidal Inhibition Mechanism. *Nat. Mater.* **2018**, *17*, 195-203.
36. Mahato, M.; Sharma, A. K.; Kumar, P., 4 - Nanoparticles for DNA Delivery. In *Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids*, Nimesh, S.; Chandra, R.; Gupta, N., Eds. Woodhead Publishing: 2017; pp 59-81.
37. Verma, A.; Stellacci, F., Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions. *Small* **2010**, *6*, 12-21.
38. Mitchell, M. J.; Billingsley, M. M.; Haley, R. M.; Wechsler, M. E.; Peppas, N. A.; Langer, R., Engineering Precision Nanoparticles for Drug Delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20*, 101-124.
39. Nel, A. E.; Mädler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M. V.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M., Understanding Biophysicochemical Interactions at the Nano–Bio Interface. *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 543.
40. Selladurai, S. L.; Miclette Lamarche, R.; Schmidt, R.; DeWolf, C. E., Model Lung Surfactant Films: Why Composition Matters. *Langmuir* **2016**, *32*, 10767-10775.
41. Fan, Q.; Wang, Y. E.; Zhao, X.; Loo, J. S. C.; Zuo, Y. Y., Adverse Biophysical Effects of Hydroxyapatite Nanoparticles on Natural Pulmonary Surfactant. *ACS Nano* **2011**, *5*, 6410-6416.
42. Bakshi, M. S.; Zhao, L.; Smith, R.; Possmayer, F.; Petersen, N. O., Metal Nanoparticle Pollutants Interfere with Pulmonary Surfactant Function in Vitro. *Biophys. J.* **2008**, *94*, 855-868.
43. Stefaniu, C.; Brezesinski, G.; Möhwald, H., Langmuir Monolayers as Models to Study Processes at Membrane Surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2014**, *208*, 197-213.
44. Zhang, H.; Fan, Q.; Wang, Y. E.; Neal, C. R.; Zuo, Y. Y., Comparative Study of Clinical Pulmonary Surfactants Using Atomic Force Microscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1808*, 1832-1842.
45. Seuryneck-Servoss, S. L.; Brown, N. J.; Dohm, M. T.; Wu, C. W.; Barron, A. E., Lipid Composition Greatly Affects the in Vitro Surface Activity of Lung Surfactant Protein Mimics. *Colloids Surf. B* **2007**, *57*, 37-55.
46. Walther, F. J.; Waring, A. J.; Sherman, M. A.; Zasadzinski, J. A.; Gordon, L. M., Hydrophobic Surfactant Proteins and Their Analogues. *Neonatology* **2007**, *91*, 303-310.
47. Walther, F. J.; Gordon, L. M.; Waring, A. J., Design of Surfactant Protein B Peptide Mimics Based on the Saposin Fold for Synthetic Lung Surfactants. *Biomed. Hub* **2016**, *1*, 1-21.

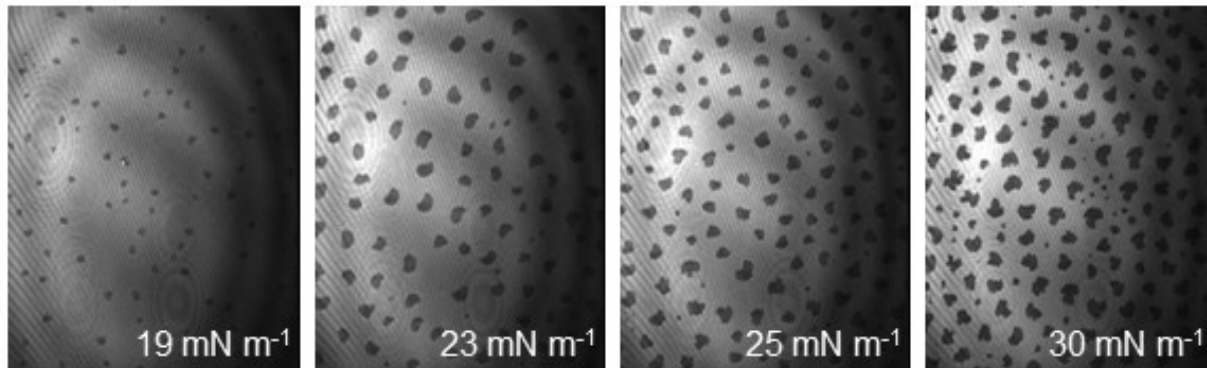
48. Walther, F. J.; Gordon, L. M.; Zasadzinski, J. A.; Sherman, M. A.; Waring, A. J., Surfactant Protein B and C Analogues. *Mol. Genet. Metab.* **2000**, *71*, 342-351.
49. Waring, A. J.; Walther, F. J.; Gordon, L. M.; Hernandez-Juviel, J. M.; Hong, T.; Sherman, M. A.; Alonso, C.; Alig, T.; Braun, A.; Bacon, D.; Zasadzinski, J. A., The Role of Charged Amphipathic Helices in the Structure and Function of Surfactant Protein B. *J. Pept. Res.* **2005**, *66*, 364-374.
50. Bringezu, F.; Ding, J.; Brezesinski, G.; Waring, A. J.; Zasadzinski, J. A., Influence of Pulmonary Surfactant Protein B on Model Lung Surfactant Monolayers. *Langmuir* **2002**, *18*, 2319-2325.
51. Thoma, M.; Schwendler, M.; Baltes, H.; Helm, C. A.; Pfohl, T.; Riegler, H.; Möhwald, H., Ellipsometry and X-ray Reflectivity Studies on Monolayers of Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylcholine in Contact with n-Dodecane, n-Hexadecane, and Bicyclohexyl. *Langmuir* **1996**, *12*, 1722-1728.
52. Kalkwarf, D. R. *Solubility Classification of Airborne Products From Uranium Ores and Tailings Piles.*; NUREG/CR-0530; PNL-2870; Battelle Pacific Northwest Labs., Richland, WA (USA): 1979; p 70.
53. Diamant, H.; Witten, T. A.; Ege, C.; Gopal, A.; Lee, K. Y. C., Topography and Instability of Monolayers Near Domain Boundaries. *Phys. Rev. E* **2001**, *63*, 061602.
54. Cañadas, O.; Guerrero, R.; García-Cañero, R.; Orellana, G.; Menéndez, M.; Casals, C., Characterization of Liposomal Tacrolimus in Lung Surfactant-like Phospholipids and Evaluation of Its Immunosuppressive Activity. *Biochem.* **2004**, *43*, 9926-9938.
55. Cañadas, O.; García-García, A.; Prieto, M. A.; Pérez-Gil, J., Polyhydroxyalkanoate Nanoparticles for Pulmonary Drug Delivery: Interaction with Lung Surfactant. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 1482.
56. Chakraborty, A.; Hui, E.; Waring, A. J.; Dhar, P., Combined Effect of Synthetic Protein, Mini-B, and Cholesterol on a Model Lung Surfactant Mixture at the Air–Water Interface. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2016**, *1858*, 904-912.
57. Ducharme, D.; Max, J. J.; Salesse, C.; Leblanc, R. M., Ellipsometric Study of the Physical States of Phosphatidylcholines at the Air-Water Interface. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 1925-1932.
58. Winsel, K.; Hönig, D.; Lunkenheimer, K.; Geggel, K.; Witt, C., Quantitative Brewster Angle Microscopy of the Surface Film of Human Broncho-Alveolar Lavage Fluid. *Eur. Biophys. J.* **2003**, *32*, 544-552.
59. Daear, W.; Mahadeo, M.; Prenner, E. J., Applications of Brewster Angle Microscopy From Biological Materials to Biological Systems. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2017**, *1859*, 1749-1766.
60. Finot, E.; Markey, L.; Hane, F.; Amrein, M.; Leonenko, Z., Combined Atomic Force Microscopy and Spectroscopic Ellipsometry Applied to the Analysis of Lipid–Protein Thin Films. *Colloids Surf. B* **2013**, *104*, 289-293.
61. Ding, J.; Takamoto, D. Y.; von Nahmen, A.; Lipp, M. M.; Lee, K. Y. C.; Waring, A. J.; Zasadzinski, J. A., Effects of Lung Surfactant Proteins, SP-B and SP-C, and Palmitic Acid on Monolayer Stability. *Biophys. J.* **2001**, *80*, 2262-2272.
62. Ding, J.; Doudevski, I.; Warriner, H. E.; Alig, T.; Zasadzinski, J. A.; Waring, A. J.; Sherman, M. A., Nanostructure Changes in Lung Surfactant Monolayers Induced by Interactions between Palmitoyloleoylphosphatidylglycerol and Surfactant Protein B. *Langmuir* **2003**, *19*, 1539-1550.

63. Belay, A.; Assefa, G., Concentration, Wavelength and Temperature Dependent Refractive Index of Sugar Solutions and Methods of Determination Contents of Sugar in Soft Drink Beverages Using Laser Lights. *J. Lasers, Opt. Photonics* **2018**, *05*, 1-5.
64. Sanchez, J.; Badia, A., Spatial Variation in the Molecular Tilt Orientational Order Within the Solid Domains of Phase-Separated, Mixed Dialkylphosphatidylcholine Monolayers. *Chem. Phys. Lipids* **2008**, *152*, 24-37.
65. Valle, R. P.; Huang, C. L.; Loo, J. S. C.; Zuo, Y. Y., Increasing Hydrophobicity of Nanoparticles Intensifies Lung Surfactant Film Inhibition and Particle Retention. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2014**, *2*, 1574-1580.
66. Parra, E.; Pérez-Gil, J., Composition, Structure and Mechanical Properties Define Performance of Pulmonary Surfactant Membranes and Films. *Chem. Phys. Lipids* **2015**, *185*, 153-175.
67. Heyder, J., Deposition of Inhaled Particles in the Human Respiratory Tract and Consequences for Regional Targeting in Respiratory Drug Delivery. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2004**, *1*, 315-20.
68. Guzmán, E.; Liggieri, L.; Santini, E.; Ferrari, M.; Ravera, F., DPPC–DOPC Langmuir Monolayers Modified by Hydrophilic Silica Nanoparticles: Phase Behaviour, Structure and Rheology. *Colloids Surf. A, Physicochem. Eng. Asp.* **2012**, *413*, 174-183.
69. Wüstneck, R.; Perez-Gil, J.; Wüstneck, N.; Cruz, A.; Fainerman, V. B.; Pison, U., Interfacial Properties of Pulmonary Surfactant Layers. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2005**, *117*, 33-58.
70. Schürch, S.; Green, F. H. Y.; Bachofen, H., Formation and Structure of Surface Films: Captive Bubble Surfactometry. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.* **1998**, *1408*, 180-202.
71. Schürch, S.; Bachofen, H.; Goerke, J.; Green, F., Surface Properties of Rat Pulmonary Surfactant Studied with the Captive Bubble Method: Adsorption, Hysteresis, Atability. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1992**, *1103*, 127-136.
72. Gunasekara, L.; Schoel, W. M.; Schürch, S.; Amrein, M. W., A Comparative Study of Mechanisms of Surfactant Inhibition. *Biochim. Biophys. Acta Biochim Biophys Acta* **2008**, *1778*, 433-444.
73. Hu, Q.; Bai, X.; Hu, G.; Zuo, Y. Y., Unveiling the Molecular Structure of Pulmonary Surfactant Corona on Nanoparticles. *ACS Nano* **2017**, *11*, 6832-6842.
74. Bai, X.; Xu, M.; Liu, S.; Hu, G., Computational Investigations of the Interaction between the Cell Membrane and Nanoparticles Coated with a Pulmonary Surfactant. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 20368-20376.
75. Röcker, C.; Pötzl, M.; Zhang, F.; Parak, W. J.; Nienhaus, G. U., A Quantitative Fluorescence Study of Protein Monolayer Formation on Colloidal Nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 577-580.

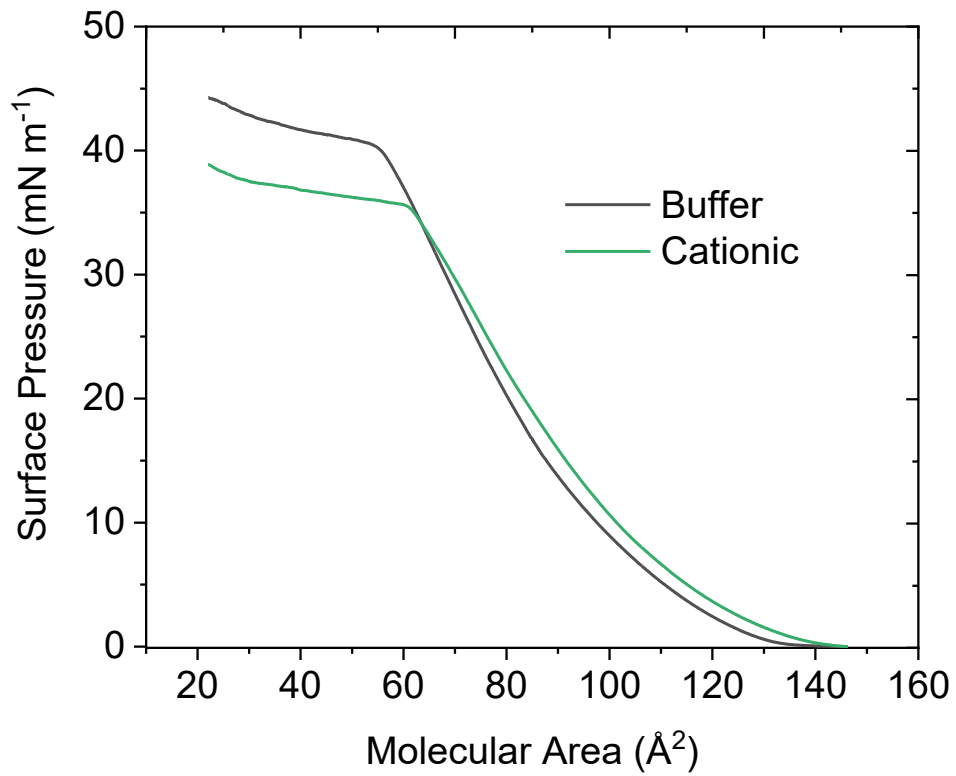
## Supporting Information



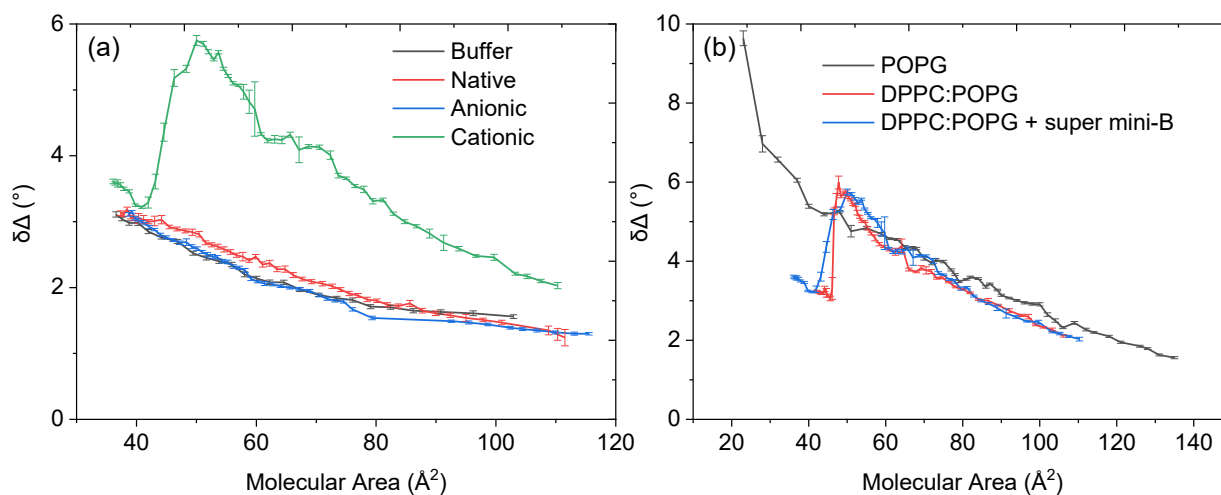
**Figure S1.** Surface pressure–molecular area ( $\pi$ – $A$ ) isotherms of DPPC/POPG (7:3 mol/mol) and DPPC/POPG (7:3 mol/mol) with 3.0 wt% super mini-B at 22 °C on Tris buffered saline. Note that the molecular area represents the average molecular area of phospholipid.



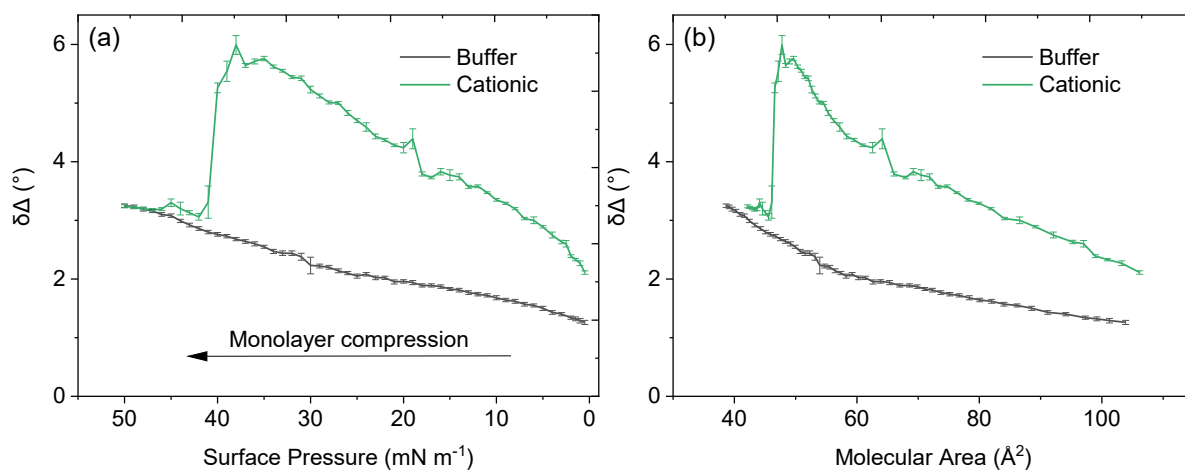
**Figure S2.** BAM images ( $430\ \mu\text{m} \times 538\ \mu\text{m}$ ) of DPPC/POPG (7:3 mol/mol) with 3.0 wt% super mini-B as a function of the surface pressure on an aqueous subphase containing 150 mM NaCl and cationic nanophytoglycogen at a 1:100 nanoparticle-to-phospholipid molar ratio.



**Figure S3.** Surface pressure–molecular area ( $\pi$ -A) isotherms of POPG at 22 °C on Tris buffered saline in the presence and absence of cationic nanophytoglycogen.

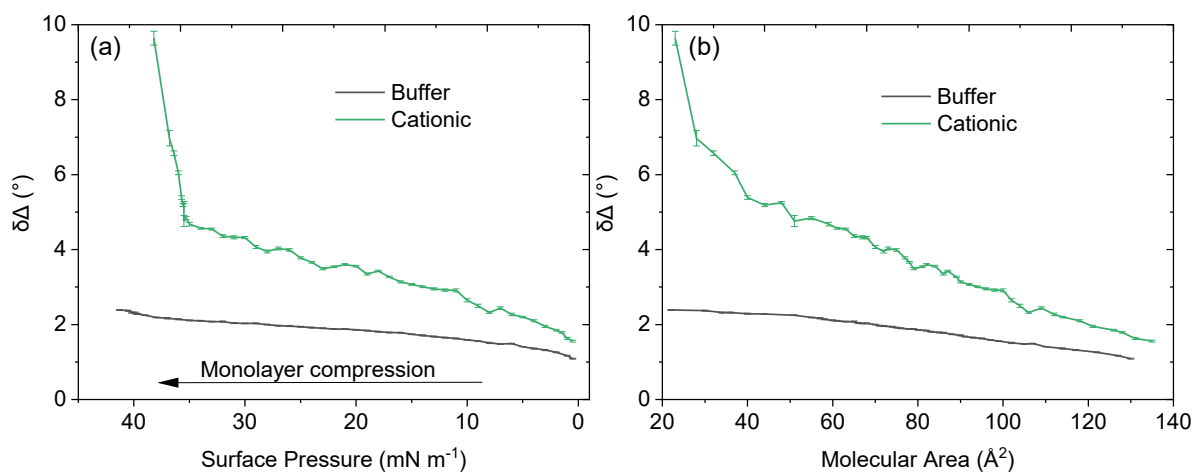


**Figure S4.** Change in the ellipsometric angle ( $\delta\Delta$ ) as a function of the molecular area. (a) DPPC/POPG (7:3 mol/mol) and 3.0 wt% super mini-B at 22 °C on Tris buffered saline in the absence and presence of nanophytoglycogen. (b) POPG, DPPC/POPG (7:3 mol/mol), and DPPC/POPG (7:3 mol/mol) with 3.0 wt% super mini-B at 22 °C on Tris buffered saline in the presence of cationic nanophytoglycogen.

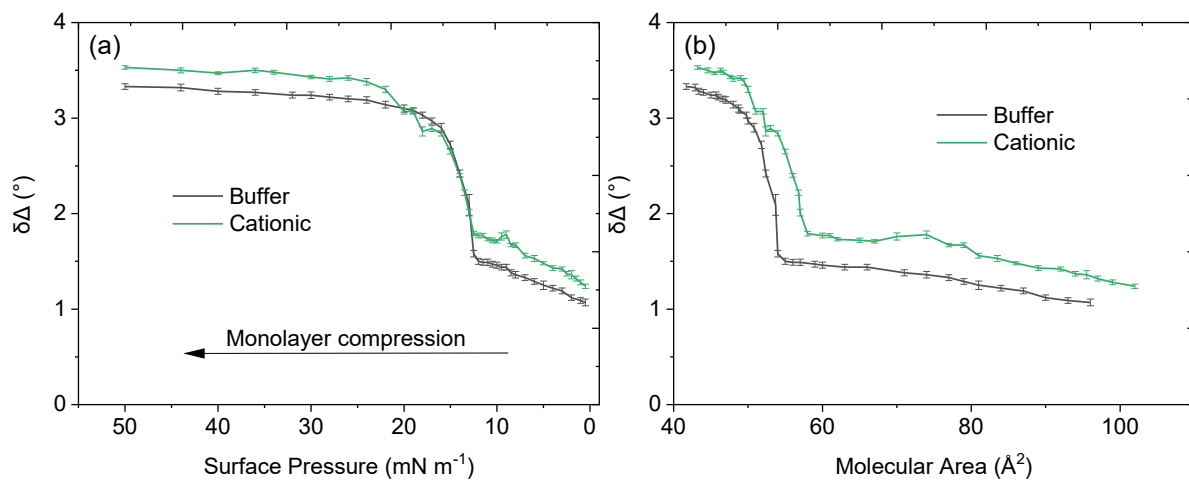


**Figure S5.** Change in the ellipsometric angle ( $\delta\Delta$ ) as a function of (a) surface pressure and (b) molecular area for DPPC/POPG (7:3 mol/mol) at 22 °C on Tris buffered saline in the absence and presence of cationic nanophytoglycogen.

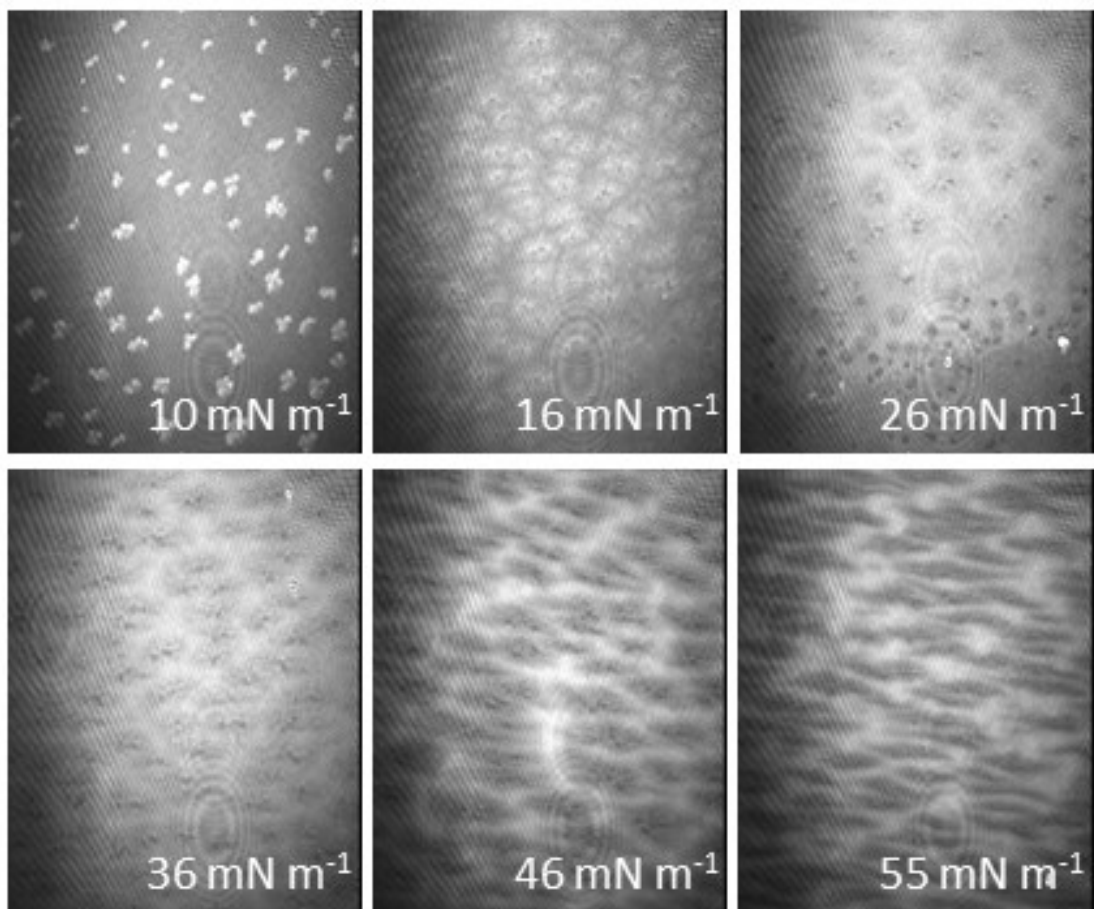




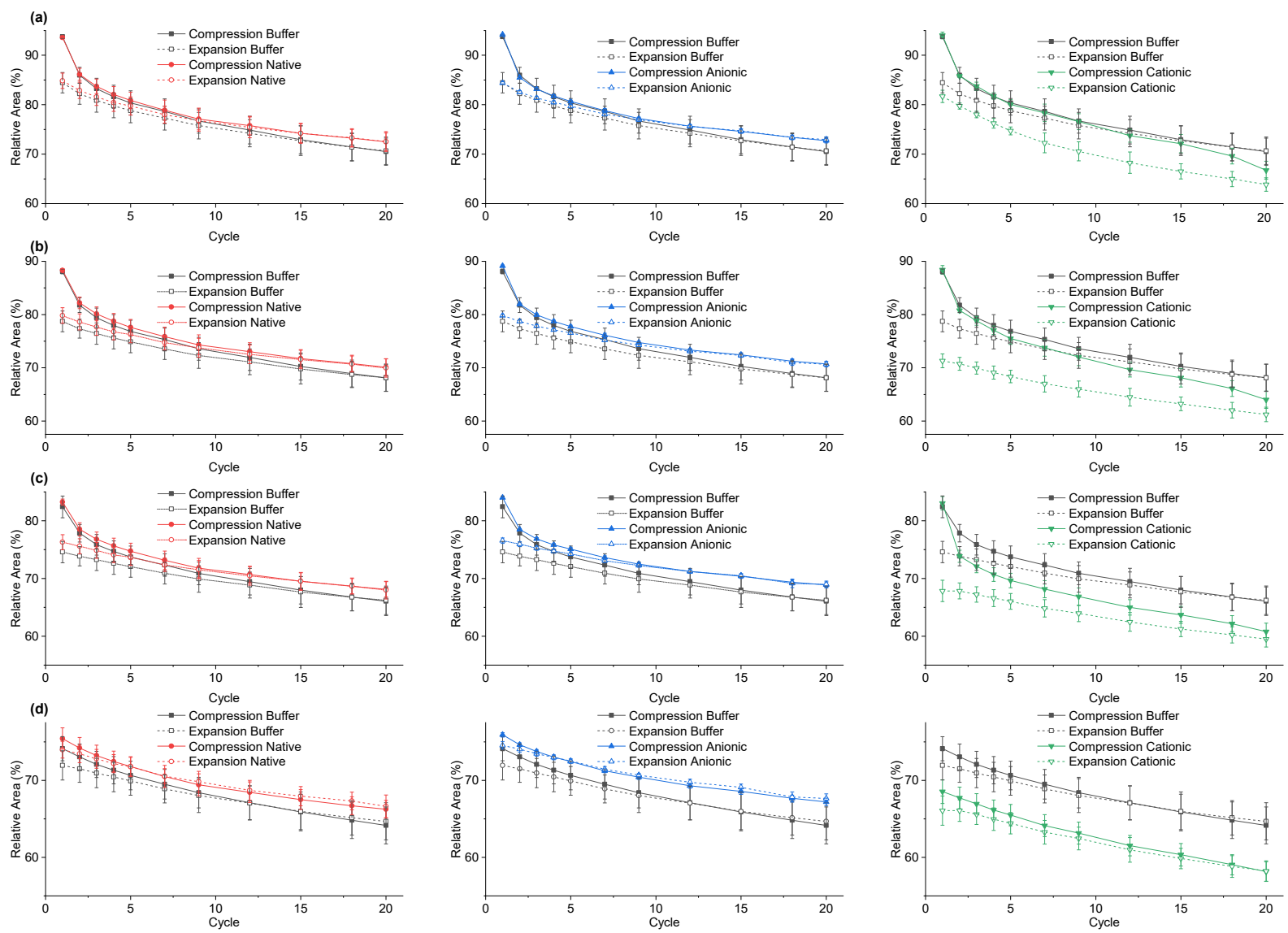
**Figure S6.** Change in the ellipsometric angle ( $\delta\Delta$ ) as a function of (a) surface pressure and (b) molecular area for POPG at 22 °C on Tris buffered saline in the absence and presence of cationic nanophytoglycogen.



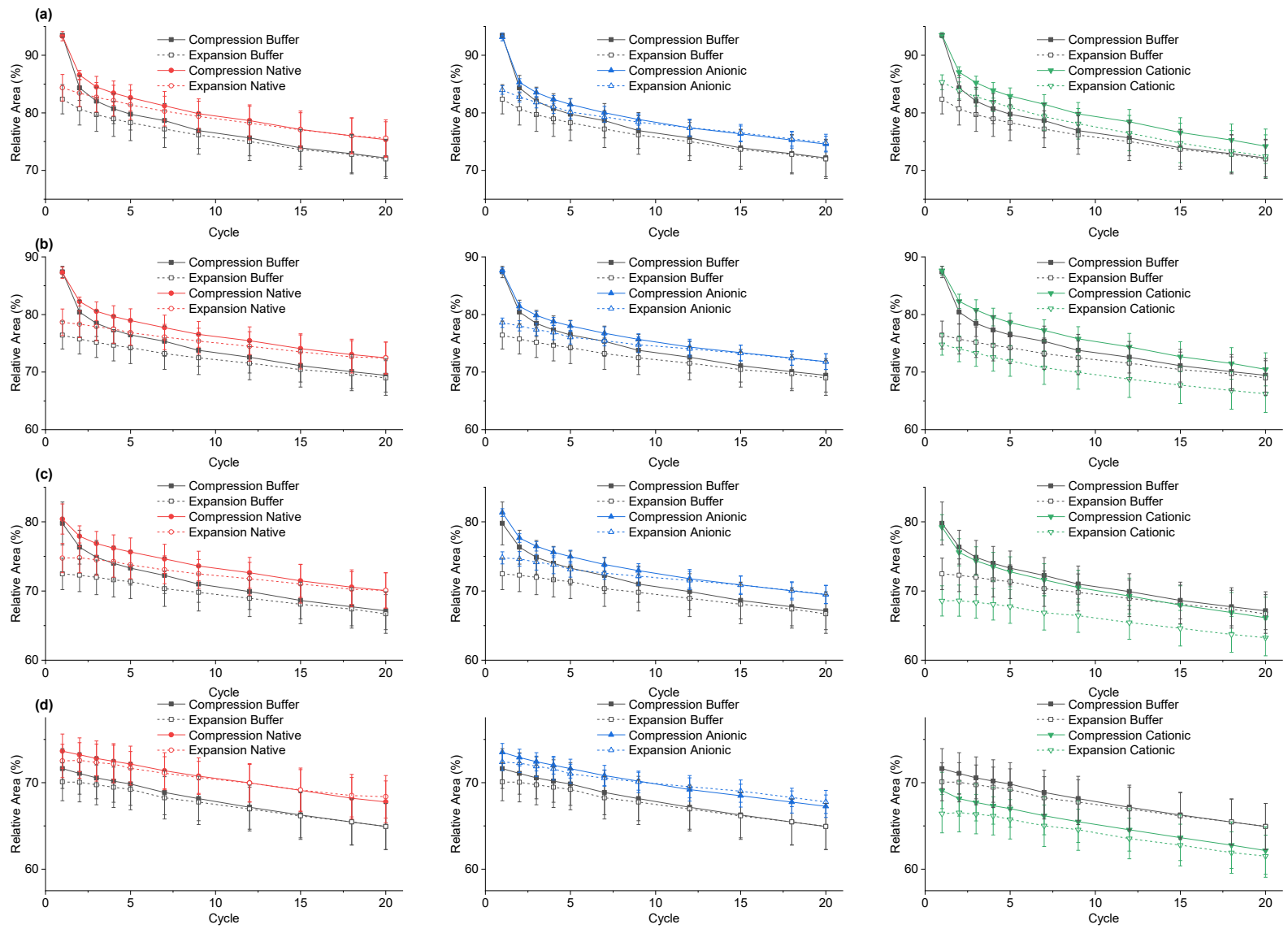
**Figure S7.** Change in the ellipsometric angle ( $\delta\Delta$ ) as a function of (a) surface pressure and (b) molecular area for DPPC at 22 °C on Tris buffered saline in the absence and presence of cationic nanophytoglycogen.



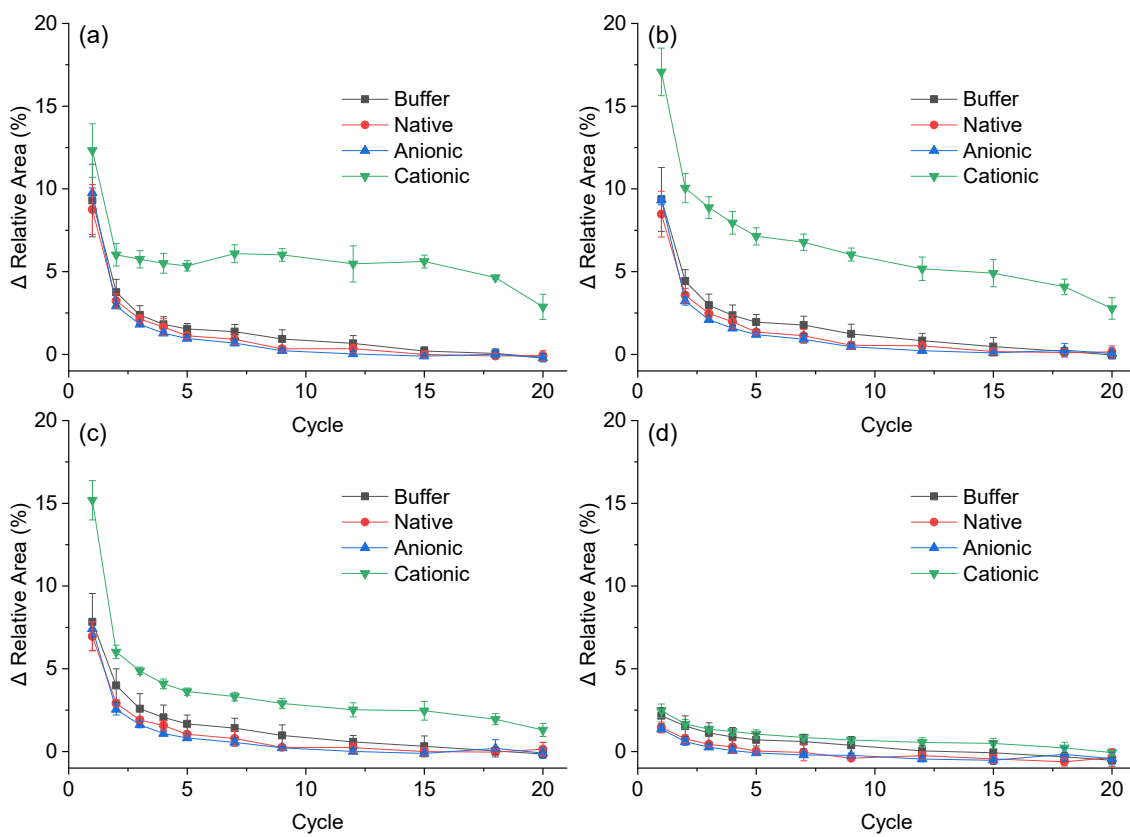
**Figure S8.** BAM images (430  $\mu\text{m}$  x 538  $\mu\text{m}$ ) of DPPC/POPG (7:3 mol/mol) as a function of the surface pressure on an ultrapure water subphase containing cationic nanophytoglycogen at a 1:100 nanoparticle-to-phospholipid molar ratio.



**Figure S9.** Relative areas of the compression (solid line and closed symbol) and expansion (dashed line and open symbol) segments as a function of the number of cycles for DPPC/POPG (7:3 mol/mol) at the following surface pressures: (a)  $30 \text{ mN m}^{-1}$ , (b)  $35 \text{ mN m}^{-1}$ , (c)  $40 \text{ mN m}^{-1}$ , and (d)  $45 \text{ mN m}^{-1}$ .

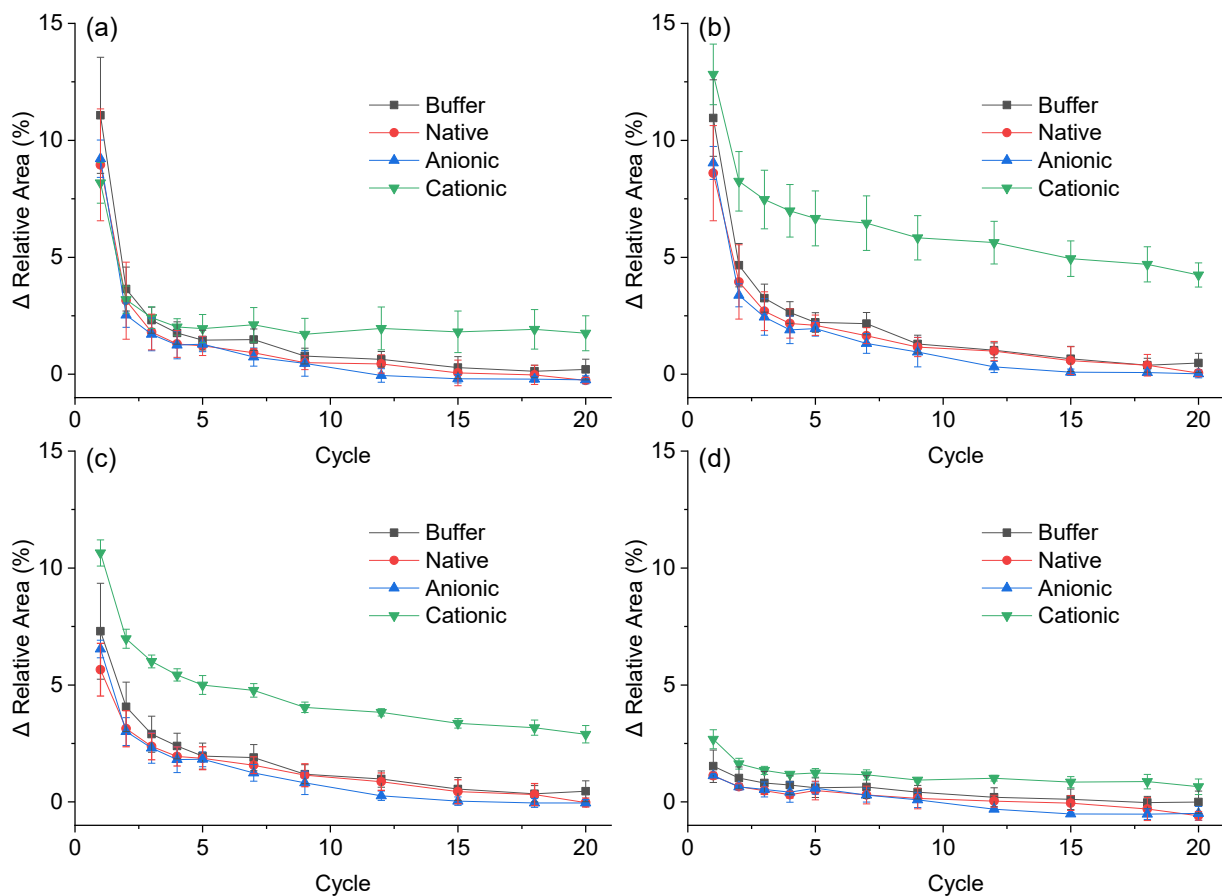


**Figure S10.** Relative areas of the compression (solid line and closed symbol) and expansion (dashed line and open symbol) segments as a function of the number of cycles for DPPC/POPG (7:3 mol/mol) with 3.0 wt% super mini-B at the following surface pressures: (a)  $30 \text{ mN m}^{-1}$ , (b)  $35 \text{ mN m}^{-1}$ , (c)  $40 \text{ mN m}^{-1}$ , and (d)  $45 \text{ mN m}^{-1}$ .



**Figure S11.** Change in the relative area (relative area of compression – relative area of expansion) as a function of the number of cycles for DPPC/POPG (7:3 mol/mol) at the following surface pressures: (a) 30 mN m<sup>-1</sup>, (b) 35 mN m<sup>-1</sup>, (c) 40 mN m<sup>-1</sup>, and (d) 45 mN m<sup>-1</sup>. The data points and error bars represent the mean and standard deviation of four independent measurements.





**Figure S12.** Change in the relative area (relative area of compression – relative area of expansion) as a function of the number of cycles for DPPC/POPG (7:3 mol/mol) with 3.0 wt% super mini-B at the following surface pressures: (a)  $30 \text{ mN m}^{-1}$ , (b)  $35 \text{ mN m}^{-1}$ , (c)  $40 \text{ mN m}^{-1}$ , and (d)  $45 \text{ mN m}^{-1}$ . The data points and error bars represent the mean and standard deviation of four independent measurements.

## Chapitre 4 – Conclusions et perspectives

Les effets de nanophytoglycogènes de différentes charges sur la monocouche Langmuir de surfactant pulmonaire ont été étudiés. Afin d'acquérir une meilleure compréhension de l'interaction du nanophytoglycogène avec les différentes composantes du surfactant pulmonaire, deux modèles ont été étudiés. Le premier comprenait un phospholipide saturé et zwitterionique (DPPC) ainsi qu'un phospholipide insaturé et anionique (POPG). Ce mélange représente la coexistence de la phase condensée et fluide ainsi que la présence de charges négatives dans le surfactant pulmonaire. Le deuxième modèle comprenait aussi ces deux phospholipides, mais avec l'ajout d'un analogue de la protéine pulmonaire B. Ce mélange se rapproche du surfactant pulmonaire physiologique. La technique du bain Langmuir, l'imagerie par BAM ainsi que l'ellipsométrie à l'interface eau-air ont permis d'étudier les effets de nanophytoglycogènes de différentes charges sur l'activité de surface, la morphologie, la réversibilité ainsi que l'épaisseur du film du surfactant pulmonaire.

Pour les deux modèles, le nanophytoglycogène cationique a très peu influencé les isothermes  $\pi$ -A alors que les images obtenues en BAM possèdent un contraste inversé. Ceci démontre l'importance de combiner plusieurs techniques avant de tirer des conclusions. Le contraste inversé dans les images BAM était présent tout au long de la compression, contrairement à d'autres études mentionnées précédemment où ce phénomène n'est présent qu'à hautes pressions de surface. L'ellipsométrie à l'interface eau-air sur les monocouches des deux phospholipides (DPPC et POPG) a permis de conclure que ce contraste inversé est dû à l'interaction des NPs cationiques avec le phospholipide anionique. Cette interaction engendre une augmentation de l'épaisseur du film et ainsi de l'intensité en imagerie BAM. Des cycles de compressions/expansions ont aussi permis de conclure que l'adsorption du nanophytoglycogène cationique à la monocouche influence le cycle respiratoire en augmentant le travail nécessaire pour l'effectuer. Afin de mieux comprendre l'origine du contraste inversé, il serait d'intérêt d'étudier les modèles en imagerie AFM puisque cette technique offre une meilleure résolution latérale que l'imagerie BAM.<sup>1</sup>

Les résultats de cette étude ont aussi permis de classer les nanophytoglycogènes quasi-neutre et anionique comme étant des vecteurs de médicaments potentiels. Ces deux nanoparticules n'ont pas, ou très peu, influencé l'activité de surface, la morphologie, la réversibilité du cycle de compression/expansion ainsi que l'épaisseur des deux modèles du surfactant pulmonaire. Le but ultime de ce projet étant le traitement du cancer et des infections des poumons par l'inhalation de peptides anticancéreux et antimicrobiens, il serait possible d'insérer dans le nanophytoglycogène anionique le peptide GL13K, possédant des propriétés anti-inflammatoires et antimicrobiennes, dû à sa charge nette positive.<sup>2</sup> Il serait ainsi d'intérêt d'investiguer davantage ces deux types de NPs en testant différentes concentrations pour s'assurer qu'elles ne causent pas d'effets néfastes lorsque présentes en plus grande quantité. Cette étude serait aussi pertinente pour le nanophytoglycogène cationique afin de trouver le seuil de son impact sur le cycle respiratoire.

Le fait saillant ressorti de cette étude est ainsi l'importance de la charge de la nanoparticule dans son interaction avec le surfactant pulmonaire. Des résultats similaires obtenus avec des nanoparticules de silice cationiques démontrent que la charge a plus d'importance que la composition chimique. Ainsi, malgré le fait que le nanophytoglycogène soit non-biopersistant, non-toxique, non-immunogène, hypoallergène et biodégradable, sa charge positive influence les propriétés biophysiques du surfactant pulmonaire.

La similarité entre les résultats obtenus pour le mélange sans protéine et le mélange avec protéines démontre que la super mini-B n'est pas présente en assez grande quantité pour altérer l'adsorption du nanophytoglycogène cationique. De plus, bien que cette protéine soit essentielle au cycle respiratoire, les cycles de compression-expansion du modèle protéiné sont similaires aux cycles du mélange phospholipidique. Il serait ainsi pertinent d'ajouter la SP-C à ce modèle puisqu'elle travaille avec la SP-B pour former le réservoir. Il serait ainsi possible d'effectuer des cyclages pour étudier l'importance de la présence des deux types de protéines. Walther, F. J. et al.<sup>3</sup> ont aussi développé un analogue de la SP-C pouvant être utilisé à cet effet.

Finalement, une lacune dans la méthodologie utilisée est l'introduction des nanoparticules par la sous-phase. Le nanophytoglycogène devrait être administré du côté air de l'interface afin

d'être plus réaliste. En intégrant directement les NPs dans la sous-phase, nous assumons qu'elles passent sans perturbation à travers la monocouche étant donné leur hydrophilicité. Le possible retrait de phospholipides ou de protéines dû aux passages des NPs n'est donc pas pris en compte. Afin d'administrer les NPs du côté des chaînes alkyles, un nébuliseur est nécessaire. Il faudrait ainsi optimiser l'instrumentation afin d'administrer de manière homogène et reproductible du côté air de l'interface. Ceci implique de concentrer la solution de NPs à la surface afin d'éviter toute perte et d'obtenir une concentration identique en surface d'expérience en expérience.

## Références Chapitre 4

1. Borozenko, O.; Faral, M.; Behyan, S.; Khan, A.; Coulombe, J.; DeWolf, C.; Badia, A., Silica Nanoparticle-Induced Structural Reorganizations in Pulmonary Surfactant Films: What Monolayer Compression Isotherms Do Not Say. *ACS Appl. Nano Mater.* **2018**, *1*, 5268-5278.
2. Balhara, V.; Schmidt, R.; Gorr, S. U.; Dewolf, C., Membrane Selectivity and Biophysical Studies of the Antimicrobial Peptide GL13K. *Biochim. Biophys. Acta.* **2013**, *1828* (9), 2193-203.
3. Walther, F. J.; Gordon, L. M.; Zasadzinski, J. A.; Sherman, M. A.; Waring, A. J., Surfactant Protein B and C Analogues. *Mol. Genet. Metab.* **2000**, *71*, 342-351.