

Université de Montréal

Réponse sélective de nanoparticules fonctionnelles à des stimuli endogènes

par

Huu Trong Phan

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de

Philosophiæ Doctor (Ph.D.)

en Sciences pharmaceutiques
option technologie pharmaceutique

Mai 2022

© Huu Trong Phan, 2022

Université de Montréal

Faculté de Pharmacie

Cette thèse intitulée

Réponse sélective de nanoparticules fonctionnelles à des stimuli endogènes

par

Huu Trong Phan

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Valérie Gaëlle Roullin

Président-rapporteur

Suzanne Giasson

Directeur de recherche

Jeanne Leblond Chain

Codirecteur

Davide Brambilla

Membre du jury

Nicolas Bertrand

Examineur externe

Résumé

L'un des principaux défis de la nanomédecine est la capacité à cibler sélectivement les sites pathologiques. Le ciblage repose généralement sur la réponse sélective à une ou certaines caractéristiques des tissus ciblés (stimuli endogènes). Cette thèse s'intéresse à l'étude de la réponse sélective des nanoparticules fonctionnelles à deux stimuli endogènes bien caractérisés : la densité surfacique élevée d'un récepteur biologique sur une membrane cellulaire et le milieu acide des endosomes.

Dans un premier temps, nous démontrons que les nanoparticules peuvent s'adsorber sélectivement sur les surfaces présentant une densité de récepteurs supérieure à un certain seuil, en fonctionnalisant leur surface avec une monocouche de polymères bimodaux (un poly (éthylène glycol) non-fonctionnel et un PEG portant un ligand). Les paramètres de conception de la monocouche comme la longueur relative des chaînes, la densité surfacique globale de la monocouche ou la densité surfacique de ligands peuvent être modulées pour améliorer la sélectivité des nanoparticules.

Dans un second temps, nous rapportons des nanoparticules lipidiques capables de déstabiliser des membranes lipidiques à pH acide grâce à un lipide bascule pH-sensible. Nous montrons que le changement de conformation du lipide bascule augmente son aire interfaciale et provoque une dynamique membranaire qui peut se traduire macroscopiquement par des changements morphologiques et relargage du contenu des nanoparticules lipidiques.

En améliorant le ciblage sélectif pour les membranes cellulaires, d'une part, et la livraison intracellulaire, d'autre part, ce travail servira à concevoir des nanoparticules multifonctionnelles

sélectives et ciblées, pour une meilleure efficacité de vectorisation de médicaments ou d'acides nucléiques.

Mots-clés : ciblage sélectif, sélectivité à la densité surfacique de récepteur, échappement endosomal, déstabilisation membranaire, nanoparticules fonctionnelles, fonctionnalisation, pH-sensible, lipide bascule, interaction nanoparticule-cellule

Abstract

One of the main challenges of nanomedicine is the ability to selectively target disease sites. Targeting efficiency is generally based on a selective response to characteristics (endogenous stimuli) of the targeted tissues. This thesis focuses on the selective response of functional nanoparticles to two endogenous stimuli: the cell surface over-expressing a specific receptor and the acid medium of endosome.

First, we report that nanoparticles surface-functionalized with a bimodal monolayer of polymers containing nonfunctional polyethylene glycol (1) and ligand-functionalized PEG exhibit selective adsorption to receptor surface with a surface density of receptor above a certain threshold. We show that design parameters of the bimodal monolayer, including the relative length of two chains, the total surface density of the monolayer or the surface density of ligand can be modulated to enhance the selectivity of the nanoparticle adsorption.

Secondly, we report lipid nanoparticles that induce membrane destabilization under acidic condition thanks to a pH-switchable lipid. We show that the conformational change of the pH-switchable lipid increases the area occupied at the interface, causing membrane dynamics phenomena, that result in morphological changes and release of the cargo from lipid nanoparticles.

By improving the ability of nanoparticles to selectively target cell surfaces and escape endosomal membrane, the selective responses of functional nanoparticles reported in this thesis will potentially serve to design multifunctional nanoparticles for selective targeting and efficient delivery of drugs and genetic materials

Keywords: selective targeting, receptor surface density selectivity, endosomal escape, membrane destabilization, functional nanoparticles, functionalization, pH-sensitivity, switchable lipid, nanoparticle-cell interaction

TABLE DES MATIERES

Résumé	ii
Abstract	iv
Liste des tables	xi
Liste des figures	xii
Remerciements	xx
Contribution des auteurs.....	xxii
Chapitre 1 Introduction	1
1.1 Ciblage thérapeutique et nanoparticules	1
1.2 Barrière biologique	4
1.2.1 Barrière intravasculaire	5
1.2.2 Barrière endothéliale	6
1.2.3 Barrière extracellulaire (stroma tumoral).....	9
1.2.4 Barrière cellulaire et intracellulaire	10
1.2.4.1 Voies d'endocytose.....	11
1.2.4.2 Pénétration directe dans le cytoplasme	13
1.2.5 Barrière et transport intracellulaire	14
1.3 Ciblage actif cellulaire	16
1.3.1 Nanoparticules intelligentes.....	18
1.3.2 Effet multivalent	22
1.4 Échappement endosomal	25
Chapitre 2 Objectifs et Hypothèses de recherche	32
2.1 Mise en contexte	32

2.2	Objectifs généraux	33
2.3	Hypothèses de recherche et Objectifs spécifiques	34
2.3.1	Impact de la monocouche bimodale sur la sélectivité des nanoparticules à la densité surfacique de récepteur pour un ciblage cellulaire efficace	34
2.3.2	Impact de lipides pH-sensibles sur les propriétés physico-chimiques des nanoparticules pour un échappement efficace à l'endosome	34
2.3.3	Structure de la thèse	35
Chapitre 3 Adsorption sélective à la densité surfacique de récepteur		37
	Abstract	38
	Significance Statement.....	39
3.1	Introduction.....	39
3.2	Results and Discussion	42
3.3	Conclusion	54
3.4	Materials and Methods.....	55
3.4.1	Theoretical model of GNPs adsorption.....	55
3.4.2	Experimental section.....	62
Acknowledgements		63
3.5	Supporting Information.....	64
3.5.1	Materials	64
3.5.2	Methods.....	65
3.5.2.1	DW4 and thiol PEG-DW4 synthesis.....	65
3.5.2.2	Preparation and characterization of GNPs and bimodal functionalized GNPs.	66
3.5.2.3	Surface manipulations.....	69
3.5.2.4	Surface characterization.....	71
3.5.2.5	GNPs counting on AFM height images	71

3.5.2.6	Numbers of unfunctional PEG and ligated PEG chains grafted on GNPs surface, N_{PEG} and $N_{\text{PEG-DW4}}$	72
3.5.2.7	The surface density of transferrin receptor Γ_{TfR}	74
3.5.2.8	The surface density of adsorbed GNPs Γ_{NP}	76
3.5.2.9	Determination of TfR volume V_{R}	76
3.5.2.10	The reversibility of individual ligand-receptor bond	77
3.5.2.11	The binding region of DW4	79
Chapitre 4 Monocouche bimodale stimuable pour le ciblage sélectif.....		101
4.1	Introduction.....	101
4.2	Résultats et discussion	102
4.2.1	Préparation et caractérisation des GNPs fonctionnalisées	102
4.2.2	Thermosensibilité des GNPs fonctionnalisées.....	105
4.2.3	Préparation des surfaces de streptavidine	108
4.2.4	Adsorption des GNPs fonctionnalisées sur les surfaces de streptavidine.....	108
4.2.5	Conclusion	111
4.3	Matériels et Méthodes.....	112
4.3.1	Matériels	112
4.3.2	Méthodes.....	112
4.3.3	Annexes.....	114
Chapitre 5 Déstabilisation membranaire des nanoparticules lipidiques pH-sensibles.....		117
5.1	Introduction.....	119
5.2	Results.....	122
5.2.1	Influence of pH on the ζ -potential and the morphology of pH-responsive LNPs ..	122
5.2.2	Phase behavior of lipid membranes	130
5.2.3	Mobility of lipids in the lipid membranes containing the CSL3 lipid switch.....	135

5.3	Discussion	137
5.4	Experimental section.....	140
5.4.1	Materials	140
5.4.2	LNPs preparation	140
5.4.3	Dynamic Light Scattering (DLS).....	141
5.4.4	siRNA encapsulation efficiency	142
5.4.5	Surface topography (AFM).....	142
5.4.6	Cryogenic Transmission Electron Microscopy (Cryo-TEM)	143
5.4.7	Free-Fracture Electron Microscopy (FF-SEM)	143
5.4.8	Analysis of particle from AFM, TEM, SEM and Confocal micrographs.....	144
5.4.9	Confocal imaging.....	144
5.4.10	Thermal analysis (DSC).....	146
5.4.11	Langmuir-Blodgett.....	146
5.4.12	Solid state NMR.....	147
5.5	Supporting information.....	151
Chapitre 6 Discussion générale.....		167
6.1	Adsorption sélective à la densité surfacique de récepteur	167
6.1.1	Considérations lors du développement des BiNPs pour la super-sélectivité.....	175
6.2	Déstabilisation membranaire sélective au pH acide	178
Chapitre 7 Conclusions		185
Chapitre 8 Bibliographie.....		i

Liste des tables

Table 3.1. Characterization of GNPs functionalized with PEG/PEG-DW4 monolayers. Hydrodynamic diameter (D_h), Polydispersity index (PDI), plasmon adsorption band (λ_{SPR}). The error (\pm) is the standard deviation from free independent experiments.....	44
Table 4.1. Préparation des GNPs fonctionnalisées avec une monocouche mixte PEG _{1K} -Biotin : pNIPAM _{10K}	104
Table 5.1. Limiting area of SL2 and CSL3 at the Air/Water Interface at 22 °C at two pHs	133

Liste des tables supplémentaires

Table S3.1. Stability of Au-S bond of PEG-functionalized GNPs stored at 4°C in the dark under air or under Argon.....	95
Table S3.2. SPR response and Estimation of TfR surface grafting density. Error bars represent the standard deviation of the mean of SPR measurements of three sensing areas on three independent samples.	96
Table S3.3. AFM height images of TfR surfaces incubated in functionalized GNPs.....	97
Table S4.1. Caractérisation quantitative des GNPs fonctionnalisées utilisées dans l'étude de thermosensibilité.	116
Table S5.1. Physicochemical properties of SL2-LNPs, CSL3-LNPs and CSL3-siRNA lipoplexes. <i>Error bars represent</i> the standard deviation of the mean of three measurements. ..	165
Table S5.2. Morphological changes of GUV upon HCl or NaCl treatment	166

Liste des figures

Figure 1.1. Schéma présentant les diverses barrières biologiques rencontrées par les nanoparticules, avec permission de (21).....	5
Figure 1.2. Schéma représentant les voies d'endocytose actives, et les voies de pénétration non-endocytaire, avec permission de (73).....	11
Figure 1.3. Schéma représentant les voies de pénétration directe au cytoplasme, avec de permission de (73).....	14
Figure 1.4. Schéma représentant des principales voies et mécanismes du trafic intracellulaire de nanoparticules. (a) endocytose des nanoparticules, (b) endosome précoce, (ci) un endosome tardif, (cii) échappement endosomal, (ciii) recyclage à travers un endosome de recyclage situé à proximité de la région périnucléaire, (d) lysosome, (e) dégradation lysosomale, (f) trajets des nanoparticules aux cibles intracellulaires, (g) exocytose des nanoparticules, avec de permission de (73).	16
Figure 1.5. (A) Le gonflement d'un polymère pH-sensible à un pH acide menant à l'exposition en surface d'un ligand, avec permission de (122); (B) Le rétrécissement d'un polymère thermosensible à une température au-dessus de la température de solution critique inférieure (Lower critical solution temperature, LCST) menant à l'exposition en surface d'un ligand, avec permission de (117).....	20
Figure 1.6. La couche de PEG est greffée sur la surface des nanoparticules par une liaison sensible à l'enzyme métalloprotéase matricielle 2 (MMP2), positivement régulée dans le micro-environnement tumoral, avec permission de (118).....	21
Figure 1.7. À pH neutre, le copolymère PEG-sulfonamide protège le ligand TAT par adsorption électrostatique; à pH acide, le copolymère PEG-sulfonamide est déionisé et détaché du ligand TAT, ainsi exposant TAT, avec permission de (119).....	22
Figure 1.8. Schéma représentant la liaison entre la nanoparticule multivalente avec le nombre de ligands $N_L = 3$ et la surface de récepteur. Le panneau de gauche montre une faible densité de récepteur (le nombre de récepteurs $N_R = 3$) et le panneau de droite montre une densité de récepteur deux fois plus élevée. Une augmentation de N_R de 3 à 6 augmente le nombre d'arrangements distincts de liaisons ligand-récepteur Ω d'un facteur de 20.	23

Figure 1.9. Schéma représentant le changement conformationnel induit par la protonation des lipides bascules pH-sensible. Les valeurs prédites de pK_a pour SL2 et CSL3 sont respectivement de 5.28 et 5.38 (Chemstation). 27

Figure 1.10. (A) Structure chimique de lipide bascule non-cationique SL2 et son homologue non-méthoxy 4 incapable de changer sa conformation lors de la protonation. (B) Relargage de sulforhodamine B à partir de LNPs incorporant SL2 (0–75 mol %), ou le lipide 4 (50 mol %) après incubation pendant 15 min dans à pH 5 et 7.4, avec permission de (157) 28

Figure 1.11. (A) Structure chimique de lipides bascules cationiques et le contrôle négatif lipide CSL4 (incapable de changer sa conformation lors de la protonation). (B) Réduction de l'expression de GFP (barres) et la viabilité (points) des cellules Hela-GFP traitées par les LNPs encapsulant siRNA ciblant GFP (CSL, DSPC, cholestérol et DSPE-PEG2000 à un rapport molaire de 50 : 10 : 37,5 : 2,5 respectivement). RNAiMAX (réactif Lipofectamine® RNAiMAX - 60 nM), siRNA libre (60 nM) et cellules non traitées ont été utilisés comme expériences de contrôle. L'inactivation du gène a été dosée par cytométrie en flux après 72 h d'incubation (n = 3), avec permission de (156). 29

Figure 3.1. (A) Schematic illustration of the main hypothesis of this work. Protective PEG chains offer steric repulsion (↔) to modulate the ligand-receptor binding. Proper tuning of this repulsion enables the selective adsorption of nanoparticles to surface density of receptors. To model multivalent nanoparticle-cell surface interaction, we designed (B) bimodal brush-functionalized gold nanoparticles (GNPs) through thiolated-gold covalent bond and (C) receptor surfaces via peptide coupling. 42

Figure 3.2. Characterization of transferrin receptor (TfR) -functionalized surfaces. (A) Receptor surface density (Γ_{TfR}) at different coupling reaction times. The receptor density (Γ_{TfR}) was then calculated from λ_{SPR} shift ($\Delta\lambda_{SPR}$) using the Jung et al.'s Equation (191) (Section 3.5.2.7). The dash black line is a guide for the eyes, the SPR raw data is present in Table S2. (B) Determination of the dissociation equilibrium constant (K_d) between TfR and DW4 aptamer ligand using SPR binding analysis. λ_{SPR} shifts (nm) at equilibrium are plotted versus DW4 (■) or DW4-PEG3K (●) concentration. Fitting curves (solid and dashed lines) and K_d values were obtained from fitting the experimental data to binding saturation (one site – specific binding) model using Graphpad prism software. Error bars represent the standard deviation of the means of SPR measurements of three sensing areas on three independent samples. SPR sensorgrams of

TfR60 surface exposed to increasing concentrations of DW4 or DW4-PEG3K are reported in **Figure S3.2.** (C) SPR sensorgrams of PEG functionalized surfaces exposed to GNPs-2K-3KDW4 (red), to GNPs-5K-3KDW4 (blue) (i); TfR60 surfaces exposed to GNPs-2K (green), to GNPs-5K (violet) (ii) and TfR60 surfaces exposed to GNPs-2K-3KDW4 (black) (iii)..... 46

Figure 3.3. (A) GNPs adsorption Γ_{NP} , measured by SPR (see section 3.5.2.8 for details on Γ_{NP} determination from SPR results and see Figure S3.4 for SPR sensorgrams), as a function of Γ_{TfR} for GNPs-2K₄-3KDW4 (-■·) and GNPs-5K₄-3KDW4 (-●·), error bars represent the standard deviation of the means of SPR measurements of three sensing areas on three independent samples. The fitting curves of experimental data is a four-parameter dose-response curve obtained by using Graphpad prism (R^2 are 0.99 and 0.95 respectively). The fitted theoretical curves of GNPs-2K₄-3KDW4 (—) and GNPs-5K₄-3KDW4 (—) are generated by the theory, as described in Materials and Methods. The value of the two fitting constants are $C = 5/2$ and $\beta\Delta G_{conf} = 13.5$, $R^2 = 0.96$. (B) Calculated selectivity parameter α using Equation 1, from the fitting and theoretical curves from A. Horizontal and vertical lines intersect the ordinate axis at α_{max} and the abscissa axes at Γ_{onset} , respectively..... 49

Figure 3.4. Effect of the number of protective PEG chains on GNPs surface N_{PEG} (A), the number of ethylene glycol units in protective PEG n_{PEG} (B) and the repulsion βF_{rep} (C) (see Table 1) on the parameter $\alpha_{TfR60-TfR5}$. The number of adsorbed GNPs was measured by AFM (see Table S3 for AFM height images). GNPs adsorption for PEG_{3K}-DW4 and PEG_{1K}-DW4 system are presented in **Figure S3.5.** Error bars represent the standard deviation of the means of AFM measurements of three different areas on three independent samples. A comparison between SPR and AFM data shows no significant difference (**Figure S3.6**). 53

Figure 3.5. Schematic representation of a modified version of the bimodal brush blob model of Komura and Safran (205). The green squares represent the ligands, here attached to the longer (red) chains but can also be attached to the shorter (blue) chains, depending on the bimodal brush system. The brush is formed by two sets of chemically equivalent chains, but with different lengths, and thus comprise two distinct regions. The first region is for $R_{NP} < r < R_{NP} + h_1$, where all chains contribute to the brush, the lower brush. The second region is for $r > R_{NP} + h_1$, where only long chains are present, the upper brush. Circles correspond to so-called polymer “blobs”, introduced by De Gennes, and have a position dependent size ξ 58

Figure 4.1. Schéma des nanoparticules d’or fonctionnalisées avec une couche bimodale mixte	102
Figure 4.2. Diamètre hydrodynamique (DLS) des GNPs (A) et spectres UV-vis (B) des GNPs fonctionnalisées par le PEG-Biotin, pNIPAM ou un mélange des deux (Ratio initial PEG _{1K} -Biotine : pNIPAM _{10K} 1:10).....	103
Figure 4.3. Diamètre hydrodynamique de GNPs fonctionnalisées en suspension dans l’eau en fonction de la température. Nombre de répétition = 1	106
Figure 4.4. Diamètre hydrodynamique (A) et Absorbance à 700 nm (B) de GNPs fonctionnalisées en suspension dans PBS en fonction de la température. Nombre de répétition = 1.....	106
Figure 4.5. Spectre UV-vis de GNPs-pNIPAM en suspension dans PBS à 25°C et 41°C et photo ci-jointe présentant un changement de couleur (rouge vers bleu) lors de l’agrégation	107
Figure 4.6. Potentiel Zêta des GNPs fonctionnalisées dans l’eau MiliQ et dans PBS.....	107
Figure 4.7. Densité surfacique de streptavidine, mesuré par SPR (voir la section 3.5.2.7). Les conditions de couplage sont décrites dans la section 3.5.2.3. Les barres d’erreur représentent l’écart-type de la moyenne d’une mesure de SPR sur trois zones de détection différentes.....	108
Figure 4.8. Quantification des GNPs adsorbées sur les substrats de Streptavidine aux différentes densités surfaciques de Streptavidine, par AFM.....	110
Figure 4.9. Images d’AFM des surfaces d’or fonctionnalisées avec PEG _{1K} -Biotin, pNIPAM et les mélanges PEG _{1K} -Biotin/pNIPAM. Des polymères sont greffés sur la surface plane d’or par immersion la surface dans la solution de polymère dans la DMF. Les concentrations des solutions sont PEG _{1K} -Biotin (10 µM), pNIPAM _{10K} (10 µM), Mixture 1:1 (PEG _{1K} -Biotin 10 µM et pNIPAM _{10K} 20 µM), Mixture 1:10 (PEG _{1K} -Biotin 10 µM et pNIPAM _{10K} 100 µM).....	111
Figure 5.1. Schematic representation of protonation-induced conformational change of the pH-sensitive switchable lipids. The predicted pK _a values of SL2 and CSL3 are 5.28 and 5.39, respectively (Chemstation software).....	121
Figure 5.2. Effect of pH on D _H (grey bar) and ζ-potential (black square) of SL2-LNPs(A), CSL3-LNPs(B) and CSL3-siRNA lipoplexes (C). Error bars represent the standard deviation of the mean of three measurements. D _H by Dynamic Light Scattering (DLS) and ζ-potential by Electrophoretic Light Scattering (ELS). The ζ-potential pH-titration curves were fitted to extended Henderson–Hasselbalch equation (where the effect of degree of ionization and ionic	

strength on the shape of pH titration curve was considered) to obtain pK _a of 5.4, 5.3 and 5.7 for SL2, CSL3 et CSL3-siRNA, respectively.....	124
Figure 5.3. Photographs of SL2-LNPs at pH 7.4 and 5 by AFM, FF-SEM and Cryo-TEM.	125
Figure 5.4. Photographs of CSL3 LNPs at pH 7.4 and 5 by AFM, FF-SEM and Cryo-TEM...	126
Figure 5.5. Photographs of CSL3-siRNA lipoplexes at pH 7.4 and 5 by AFM, FF-SEM and Cryo-TEM.....	127
Figure 5.6. (A) Representative confocal photographs of GUV-SL2 containing Rho-PE. (B) Overall calcein fluorescence intensity in GUV-SL2 before (black line) and after HCl treatment (red line) or NaCl treatment (blue line), reported as the percentage of particles exhibiting a specific fluorescence intensity. Arrows indicate positive membrane curvature (Protruding tubes). Scale bar: 10 μm.	128
Figure 5.7. (A) The chain order parameter (<i>2SCDchain</i>) vs temperature for DSPC(² H ₇₀), Cholesterol, DSPE-PEG (60:37.5:2.5 mole%, 250 mM total lipids, pH=7.0) (253), CSL3, DSPC(² H ₇₀), Cholesterol, DSPE-PEG (50:10:37.5:2.5 mole%, 250 mM, pH=4.5) (253), CSL3, DSPC(² H ₇₀), Cholesterol, DSPE-PEG (50:10:37.5:2.5 mole%, 250 mM, pH=7.0) (253). Accuracy in calculation is 5. (B) Thermograms (by DSC) of mixture (i) (CSL3:DSPC:Cholesterol 50:10:40 %mol) and mixture (ii) (CSL3:DSPC:Cholesterol:DSPE-PEG 50:10:37.5:2.5 %mol) at different pHs.....	131
Figure 5.8. Magic Angle Sample Spinning ¹³ C-NMR spectra of CSL3, DSPC(² H ₇₀), Cholesterol, DSPE-PEG (50:10:37.5:2.5 mole%, 250 mM, pH = 4.5, T= 20°C). a) schematic representation of the CSL3 molecule with carbon atoms numbering. b) schematic representation of the cholesterol molecule with carbon atoms numbering. c) INEPT-MAS spectrum and expansion. d) CP-MAS spectrum and expansion. The numbering blue for cholesterol and black for CSL3 and other lipids. The peak assignment was based on 1D and 2D experiments performed on individual cholesterol or CSL3 molecules dissolved in chloroform solution (Figure S5.13).....	136
Figure 5.9. The proposed mechanism of membrane destabilization of LNPs containing 50% pH-switchable lipid CSL3.....	139
Figure 6.1. Changement morphologique des LNPs contenant un lipide bascule sensible à l'ATP (304).....	183
Figure 6.2. Schéma représentant une rotation à grande angle de l'unité de basculement permettant un changement considéré de conformation moléculaire.....	184

Liste des figures supplémentaires

- Figure S3.1.** (A) TEM image and (B) Size distribution histogram of citrate-capped GNPs (B) (analyzed by Image J, $n = 11$). (C) GNPs hydrodynamic diameter and (D) UV-vis Spectra (the inset shows a red shift associated with the surface functionalization) of citrate-capped GNPs (bare GNPs, black dash), GNPs-5K (blue line), GNPs-3KDW4 (red line) and GNPs-5K-3KDW4 (molar ratio 4:1) (purple line). 80
- Figure S3.2.** Typical SPR sensorgrams of TfR60 surface exposed to increasing concentrations of DW4 (red line) and DW4-PEG3K (blue line). 82
- Figure S3.3.** AFM images of PEG functionalized surfaces exposed to GNPs-PEG_{2K}/PEG_{3K}-DW4 (A), to GNPs-PEG_{5K}/PEG_{3K}-DW4 (B), TfR60 surfaces exposed to GNPs-PEG_{2K} (C), to GNPs-PEG_{5K} (D) and to GNPs-PEG_{2K}/PEG_{3K}-DW4 (E). 83
- Figure S3.4.** Typical SPR sensorgrams of TfR surfaces at various receptor surface density Γ_{TfR} exposing to GNPs-2K₄-3KDW4 (A) and GNPs-5K₄-3KDW4 (B) at GNPs concentration of 100 pM. 84
- Figure S3.5.** (A) GNPs adsorption Γ_{NP} , measured by AFM on TfR5 ($\Gamma_{\text{TfR}} = 3.52 \times 10^3$ molecule/nm²) and on TfR60 ($\Gamma_{\text{TfR}} = 7.98 \times 10^3$ molecule/nm²) and the calculated selectivity parameter α using Eq. 1 for PEG_{1K}-DW4 systems (A) and for PEG_{3K}-DW4 systems (B), error bars represent the standard deviation of the means of AFM measurements of three different areas on three independent samples. The fitting curves of experimental data is a four-parameter dose-response curve obtained by using Graphpad prism, $R^2 > 0.85$. (B) Calculated selectivity parameter α using Eq. (1), from the fitting curves from A. Dash vertical lines are at Γ_{onset} . (C) the effect of βF_{rep} on Γ_{onset} 85
- Figure S3.6.** Comparison of Γ_{NP} by AFM and SPR for GNPs-2K₄-3KDW4 and GNPs-5K₄-3KDW4 at two surfaces TfR5 and TfR60. The data was analyzed using two-way Anova ($p > 0.7$). 87
- Figure S3.7.** Calculated value (by the theory described in Materials and Methods of βF_{rep} (per-receptor quantity) as a function of number of protective PEG (A) and as a function of protective PEG molecular weight M_w (B), using the Eq. set (10-18). The nanoparticle size, number of PEG-DW4, the TfR size, are fixed at $R_{\text{NPs}} = 7.5$ nm, $N_{\text{PEG-DW4}} = 40$ number/particle, $V_{\text{TfR}} = 89$ nm³. The dimensionless scaling factor $C = 2.5$. For Figure A, the GNPs are functionalized with PEG_{5K}

($M_w = 5000$ Da) et PEG _{3K} -DW4 ($M_{w(PEG)} = 3000$ Da). For Figure B, the number of unfunctional PEG is fixed at $N_{PEG} = 40$.	88
Figure S3.8. Schema presenting the binding region (red circle) of PEG-DW4 (225). The 2-D conformation of DW4 is predicted by RNDWebserver (226), in agreement with Ref. (186) (see Figure 2A, Table 1 therein).	89
Figure S3.9. Interacting areas of nanoparticles and receptor surfaces, <i>Aintlig</i> and <i>Aintrep</i> , respectively. Nanoparticles are assumed to bind at a distance $d = L$ from the receptor surfaces.	90
Figure S3.10. GNPs clustering when using the GNPs concentration of 500 pM.	91
Figure S3.11. AFM height images of GNPs-positive/negative surfaces and an example of GNPs counting.	92
Figure S3.12. (A) AFM and SEM images of surfaces with high and low surface density of adsorbed GNPs (Γ_{NP}); (B) Comparison of Γ_{GNPs} measured by AFM and SEM for GNPs-positive surfaces. The data was analyzed using two-way Anova ($p^* = 0.86$; $p^{**} = 0.98$) in triplicate.	93
Figure S3.13. Representative calibration curves for PEG and PEG-DW4, measured by qNMR- ¹ H spectroscopy (A) and Fluorescence spectroscopy (B).	94
Figure S4.1. Le spectre ¹ H-RMN enregistré dans DMSO-D6 de l'échantillons préparé à partir de solution GNPs-PEG/pNIPAM purifiée.	114
Figure S4.2. Courbes de calibration pour pNIPAM (A) et PEG (B) (¹ H-RMN, DMSO-D6), basée sur les protons caractéristiques a pour pNIPAM et b pour PEG (Figure S4.1)	115
Figure S5.1. Hydrodynamic diameter histogram of SL2-LNPs (A), CSL3-LNPs (B) and CSL3-siRNA (C) at pH 7.4 (solid black line) and pH 5 (dashed red line).	152
Figure S5.2. siRNA Encapsulation Efficiency of CSL3-LNPs and other ionizables LNPs at different pHs. The curves were fitted using the sigmoidal model by Graphpad Prism.	153
Figure S5.3. Photographs of SL2-LNPs by AFM, FF-SEM and Cryo-TEM. See Method for particle analysis by ImageJ.	154
Figure S5.4. Photographs of CSL3-LNPs by AFM, FF-SEM and Cryo-TEM. See Method for particle analysis by ImageJ	155
Figure S5.5. Photographs of CSL3-siRNA lipoplexes by AFM, FF-SEM and Cryo-TEM. See Method for particle analysis by ImageJ.	156
Figure S5.6. Morphological changes of GUVs upon HCl or NaCl treatment. Arrow indicates vesicles with outward projections. Scale bar: 20 μ m.	157

Figure S5.7. Deuterium-NMR spectra of DSPC(²H₇₀), Cholesterol, DSPE-PEG (60:37.5:2.5 mole%) multilamellar liposomes at pH 4.5 and 7.0. Acquisition and processing were performed with the following parameters: time domain of 2K points, Fourier transformation on 4K points from the echo maximum, number of scans 500, noise filtering with an exponential line broadening of 300Hz, 20 min stabilization between each temperature. Sequence parameters as in materials and methods..... 158

Figure S5.8. Deuterium-NMR spectra of CSL3, DSPC(²H₇₀), Cholesterol, DSPE-PEG (50:10:37.5:2.5 mole%) multilamellar liposomes at pH 4.5 and 7.0. Acquisition and processing were performed with the following parameters: time domain of 4096 points, Fourier transformation on 8K points from the echo maximum, number of scans 4096 for pH=7.0 and 5120 for pH=4.5, noise filtering with an exponential line broadening of 500 Hz, 20 min stabilization between each temperature. Sequence parameters as in materials and methods. 159

Figure S5.9. Thermogram of pure SL2 and pure CSL3 at pH 5 and 7.4. 160

Figure S5.10. (A) Thermograms of SL2/DSPC mixtures at pH 7.4 and pH 5, (B) Thermograms of mixture containing SL2/DSPC 60:40 %mol at different pHs 161

Figure S5.11. Representative compression isotherms of (A) CSL3 and SL2 monolayers; (B) CSL3/DSPC mixture (50:50) and SL2/DSPC mixture (50:50) monolayer measured at aqueous subphase pH values 7.4 and 5.0. For clarity, only the most relevant reproducible isotherms are illustrated. All isotherms exhibit four different regimes: gas phase, liquid expanded (L_e) to liquid condensed phase (L_c) transition, L_c phase liquid, and collapsed phase. The standard deviation in surface pressure among triplicate experiments was smaller than 0.5 mN/m..... 162

Figure S5.12. Compression isotherms of DSPC monolayer measured at aqueous subphase pH values 7.4 (solid line) and 5.0 (dash line). 163

Figure S5.13. ¹³C-NMR spectra of CSL3 (d), Cholesterol (c), dissolved in CDCl₃, with respective carbon numbering (a) and (b). Acquisition and processing were performed with the following parameters: sequence details, carbon detection with proton decoupling during acquisition, time domain of 32 k points, ns=256 for CSL3 and 64 for cholesterol, spectral window 250 ppm, Fourier transformation on 32 k points, noise filtering with an exponential line broadening of 3 Hz..... 164

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier chaleureusement mes deux directrices de recherche, la Pr Suzanne Giasson et la Pr Jeanne Leblond Chain, sans qui cette thèse n'aurait pas été possible. Je tiens à leur exprimer ma profonde gratitude pour m'avoir accueilli avec enthousiasme dans leur laboratoire et pour m'avoir supervisé tout au long de cette thèse. Merci pour leur disponibilité permanente, leur gentillesse et pour les nombreux encouragements prodigués. Je les remercie pour leurs conseils, les suggestions judicieuses, et les discussions enrichissantes. J'ai énormément appris des différents aspects de la science, tels que l'esprit critique, la méthodologie, la présentation et l'interprétation des résultats. Merci mille fois Suzanne et Jeanne!

J'aimerais également exprimer ma gratitude à mon comité de parrainage, la Pr Valérie Gaëlle Roullin et le Pr Maxime Ranger. Ils ont pris le temps de m'écouter et de discuter avec moi. Leurs remarques m'ont permis d'enrichir la qualité de mon travail. Merci Gaëlle pour vos encouragements et votre soutien inconditionnel.

Je suis reconnaissant envers le Pr Jean François Masson, le Pr Michel Lafleur, le Pr Alexis Vallée-Bélisle, et le Pr Julian Zhu pour m'avoir permis d'utiliser les instruments de leur laboratoire. Merci également au Pr Jean François Masson et au Pr Michel Lafleur pour les discussions fructueuses que nous avons eues.

Je remercie les contributions précieuses de tous les coauteurs des deux publications présentées dans cette thèse. Un grand merci à Dominic pour sa disponibilité et son efficacité. Je tiens à remercier le Dr Stefano Angioletti-Uberti pour son implication et son professionnalisme.

Un merci à tous mes collègues de laboratoire et à mes amis pour leurs soutiens moral et technique. En particulier, je remercie Changsheng pour les discussions sur la science et sur la vie, et pour les

soupers exceptionnels avec sa famille. Ce sont des souvenirs inoubliables. Merci également à Alberto, Charly, Victor, Anaëlle, Hu, Mouna, et Laurence qui ont fait partie de ma vie durant ces années. Merci beaucoup Alberto pour tes encouragements vis-à-vis de la rédaction de la thèse. Je remercie Guillaume pour son aide concernant l'immigration au Canada et pour être passé me voir à la faculté lors de ses visites impromptues sur Montréal. J'apprécie beaucoup tes encouragements aux moments où les résultats étaient moins probants. Merci pour la révision du français de cette thèse.

Ma gratitude s'étend surtout à ma famille et en particulier à mes parents pour leur appui moral, pour leur amour inconditionnel et pour avoir toujours soutenu. Enfin je finis en remerciant mon épouse pour son amour et pour ses encouragements. Merci d'avoir cru en moi et d'avoir toujours été présente à mes côtés durant ce parcours instructif.

Contribution des auteurs

Cette thèse se base sur deux manuscrits: un soumis et un en cours de révision.

La contribution de chaque auteur est présentée ci-dessous :

Chapitre 3: Adsorption sélective à la densité surfacique de récepteur

Huu Trong Phan, Dominic Lauzon, Alexis Vallée-Bélisle, Stefano Angioletti-Uberti, Jeanne Leblond Chain, Suzanne Giasson**

Huu Trong Phan a préparé et caractérisé les surfaces de récepteur et les nanoparticules fonctionnalisées. Il a également évalué l'adsorption des nanoparticules sur des surfaces de récepteur. Dominic Lauzon (sous la supervision de Pr. Alexis Vallée-Bélisle) a synthétisé et caractérisé les ligands d'aptamères (DW4 et d'autres pour l'étude préliminaires). Dr. Stefano Angioletti-Uberti a développé le modèle théorique et rédigé la description du modèle. Le manuscrit a été préparé par Huu Trong Phan, Pr. Suzanne Giasson, Pr. Jeanne Leblond Chain et avec l'aide de Dr. Stefano Angioletti-Uberti, Pr. Alexis Vallée-Bélisle et Dominic Lauzon.

Chapitre 5: Déstabilisation membranaire des nanoparticules lipidiques pH-sensibles

Huu Trong Phan, Victor Passos Gibson, Aurore Guédin, Emmanuel Ibarboure, Nadia El Mammeri, Axelle Grélard, Jean-François Le Meins, Erick J. Dufourc, Antoine Loquet, Suzanne Giasson, Jeanne Leblond Chain

Huu Trong Phan a préparé et caractérisé les nanoparticules lipidiques par les techniques : DLS, DSC, Cryo-TEM, AFM et a réalisé les expériences d'isotherme Langmuir. Victor Passos Gibson (sous la supervision de Pr. Jeanne Leblond Chain et Pr. Jean-François Le Meins) a préparé les vésicules lipidiques géantes et effectué les expériences de microscopie confocale avec Emmanuel

Ibarboure. Aurore Guédin (sous la supervision de Pr. Jeanne Leblond Chain) a préparé les nanoparticules lipidiques et a réalisé des mesures DLS. Pr. Jeanne Leblond Chain a réalisé les expériences de SEM. Nadia El Mammeri et Axelle Grélard, (sous la direction de Erick J. Dufourc et Antoine Loquet) ont réalisé les mesures de RMN. Le manuscrit a été préparé par Huu Trong Phan, Pr. Suzanne Giasson, Pr. Jeanne Leblond Chain avec l'aide des autres auteurs.

Chapitre 1

Introduction

1.1 Ciblage thérapeutique et nanoparticules

Le cancer est une des maladies les plus meurtrières dans le monde. Selon le rapport *Statistiques canadiennes sur le cancer 2021*, deux Canadiens sur cinq recevront un diagnostic de cancer au cours de leur vie, et environ un sur quatre décèdera du cancer (2). Actuellement, les principaux traitements du cancer comprennent la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Parmi eux, la chimiothérapie semble largement pratiquée en clinique, particulièrement dans les cancers hématologiques et les tumeurs métastatiques (3). Toutefois, de nombreux agents de chimiothérapie ont une efficacité limitée et posent des problèmes de toxicité, car l'administration à long terme de ces molécules (une pratique souvent utilisée pour gérer les tumeurs solides) entraîne des dommages fatals aux organes sains. Ceci est attribuable à plusieurs facteurs. En premier lieu, les médicaments administrés par voie systémique se distribuent dans tout l'organisme plutôt que spécifiquement au site pathologique, ce qui entraîne une accumulation de ces molécules

sur les tissus sains (toxicité) et une faible quantité sur les tissus tumoraux (efficacité suboptimale) (4). D'autre part, un phénomène de résistance peut apparaître pendant le traitement, par exemple la résistance multiple aux anti-cancéreux (Multi Drug Resistance - MDR) due à la surexpression d'un transporteur membranaire Glycoprotéine-P (P-gp) et limiter l'efficacité d'une chimiothérapie (5). Enfin, la pénétration des médicaments au centre d'une tumeur solide est limitée par des barrières physiques et biochimiques (6). Le ciblage thérapeutique a le potentiel de remédier à ces limitations. Il consiste à vectoriser les principes actifs au site d'action tout en évitant les organes sains (4). Ce concept a été inspiré par l'hypothèse du « magic bullet » de Paul Ehrlich : une chimiothérapie qui serait capable de cibler et éliminer les cellules pathogènes tout en évitant les cellules saines (7). Un tel système permettrait d'augmenter l'efficacité de la chimiothérapie ainsi que l'observance thérapeutique (8). Le ciblage thérapeutique peut être effectué par la voie d'administration locale ou systémique.

Par voie locale : Les médicaments sont directement appliqués et libérés au site d'action en utilisant les formulations topiques (9). Les formulations anti-cancéreuses topiques comprennent des gels, des implants métalliques fonctionnalisés, des nanofibres (10). Elles sont généralement conçues pour être implantées immédiatement après une résection chirurgicale d'une tumeur, dans la cavité (10). Cette approche peut donner une libération prolongée des anti-cancéreux localement afin d'éliminer complètement les cellules résiduelles et de réduire le risque de récurrence du cancer après la chirurgie. Le ciblage par voie locale est l'approche la plus simple et directe, cependant, il exige souvent la chirurgie, et il n'est pas possible pour certains cancers métastatiques.

Par voie systémique : Les médicaments sont encapsulés et protégés par un vecteur, qui a pour but de les transporter à travers l'organisme au tissu cible. Les nanoparticules, définies ici comme des colloïdes à l'échelle nanométrique, sont souvent utilisées comme vecteurs, telles que

les nanoparticules polymériques, les liposomes, les nanoparticules lipidiques, les nanoparticules métalliques etc. (11), et sont rassemblés sous le terme « nanomédecine ». Les nanomédecines peuvent s'accumuler au site thérapeutique grâce à différents mécanismes (8, 11): (a) le ciblage passif, après injection intraveineuse, grâce à l'effet de perméabilité et de rétention améliorée (EPR, Enhanced Permeability And Retention) dans certaines tumeurs; (b) le ciblage actif, en fonctionnalisant le nanovecteur avec un ligand, *i.e.* une molécule (à savoir un anticorps ou un fragment d'anticorps, des vitamines, des sucres, des protéines ou des aptamères) capable de reconnaître spécifiquement des récepteurs membranaires des cellules cancéreuses pour favoriser son internalisation; (c) le ciblage actif, en modifiant le relargage en fonction des conditions physiologiques (température, pH, enzymes) ou d'un stimulus externe (photon, ultrason).

Les objectifs principaux de l'utilisation des nanomédecines sont (8, 11-13): l'amélioration de la biodistribution et du profil pharmacocinétique de l'agent de chimiothérapie, entraînant une amélioration de la biodisponibilité et de l'efficacité; l'amélioration de la solubilité et de la stabilité de l'agent de chimiothérapie; le ciblage sélectif et la libération contrôlée des agents de chimiothérapie; la possibilité de transporter simultanément plusieurs principes actifs pour une thérapie combinée ou pour la théranostique (combinaison de la thérapie et du diagnostique); la diminution de la toxicité grâce à une faible accumulation non-spécifique aux organes sains.

L'utilisation des nanoparticules pour le ciblage thérapeutique a permis d'améliorer le traitement de nombreuses maladies, en particulier des cancers. En effet, depuis l'approbation du premier produit de nanomédecine (à base de liposomes) Doxil[®] en 1995, plus de 70 nanomédecines ont été approuvées par la FDA (14) (13, 15). Toutefois, ce chiffre ne représente qu'une poignée des milliers d'articles scientifiques publiés sur les nanomédecines, dont la translation clinique reste limitée, en partie à cause des écarts entre les modèles *in vitro*, *in vivo* et les études cliniques (16,

17). En effet, les différences de pathologie et de physiologie entre les espèces animales et humaines influencent considérablement le comportement des nanoparticules (17). En outre, après injection dans le système sanguin, les nanoparticules sont reconnues comme éléments étrangers et doivent faire face à une série de barrières biologiques complexes qui limitent considérablement leur accès au site d'action, ce qui n'est pas toujours le cas pour les modèles expérimentaux *in vitro* (17, 18). L'interaction entre les nanoparticules et les barrières biologiques dépend de nombreux paramètres, comme la composition, la morphologie, la chimie et la charge de surface, les propriétés stimuli-sensibles, la déformabilité, l'élasticité (18). Au cours des dernières années, les avancées fondamentales des connaissances sur la pathologie du cancer ainsi que sur la chimie de synthèse ont permis de concevoir des nanoparticules avec des architectures et des fonctionnalités complexes afin de franchir certaines barrières biologiques (18-20). Les particularités de ces barrières et les stratégies pour les surmonter sont discutées dans la section suivante.

1.2 Barrière biologique

Les nanomédecines administrées par voie intraveineuse doivent affronter diverses barrières biologiques: intravasculaires, endothéliales, extracellulaires, cellulaires et intracellulaires (**Figure 1.1**).

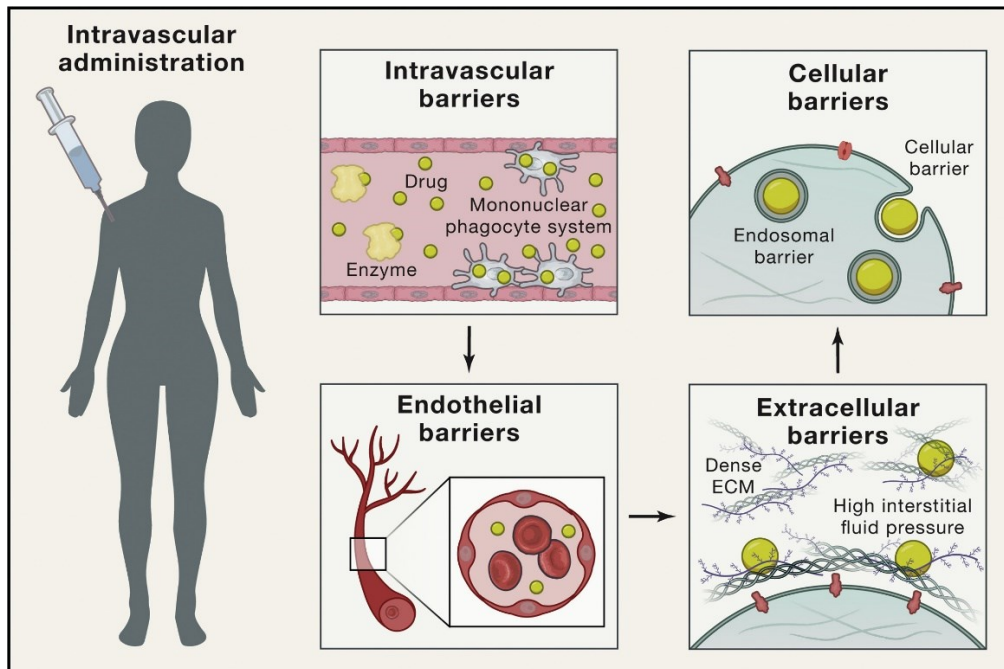


Figure 1.1. Schéma présentant les diverses barrières biologiques rencontrées par les nanoparticules, avec permission de (21).

1.2.1 Barrière intravasculaire

Après administration intraveineuse, les nanomédecines sont exposées à plusieurs obstacles intravasculaires. En premier, elles peuvent interagir avec de nombreuses biomolécules plasmatiques (protéases, nucléases, protéines, lipides), qui causent la dégradation des nanoparticules et de leur cargo (18, 21, 22). De plus, les petites nanoparticules (< 6 nm) sont éliminées par filtration rénale (23). Plus important encore, les nanoparticules peuvent être séquestrées par le système réticulo-endothélial (ou phagocytaire mononucléé, mononuclear phagocyte system, MPS), composé principalement des macrophages présents dans la rate, les ganglions lymphatiques et le foie (cellules de Kupffer) (24). La séquestration commence par

l'adsorption des protéines opsonines sur la surface des nanoparticules (25). Puis, les nanoparticules opsonisées sont reconnues et phagocytées par le système MPS via un attachement spécifique entre un récepteur des cellules MPS et les protéines opsonines (26). Ces phénomènes raccourcissent la demi-vie des nanoparticules dans le sang (27).

La stratégie la plus répandue pour augmenter le temps de circulation plasmatique consiste à décorer les nanoparticules avec des polymères hydrophiles et flexibles tels que le poly(éthylène glycol) (1), pour obtenir les nanoparticules dites « furtives ». Les liaisons hydrogène entre les unités EG et les molécules d'eau entraînent la formation d'une couche hydratée inerte, qui limite l'adsorption des protéines et la capture par les cellules du MPS (28, 29). Le PEG reste aujourd'hui le matériau le plus efficace et le plus utilisé pour améliorer la furtivité des nanomédecines (30), mais il est de plus en plus décrié à cause des réactions immunologiques anti-PEG ainsi que son manque de biodégradabilité (29). Certains polymères peuvent être utilisés comme alternative, comme les polymères zwitterioniques (poly(carboxybétaïne), poly(sulfobétaïne)) (31), le polyglycérol, le poly 2-oxazoline, le polyacrylamide, le polyvinylpyrrolidone et les polysaccharides (29). D'autres stratégies biomimétiques, comme recouvrir les nanoparticules avec la membrane des cellules sanguines, ont réduit l'adsorption des protéines (32) ou prolongé la circulation sanguine jusqu'à 72 heures (33). Il est également possible d'empêcher la phagocytose en fonctionnalisant les nanoparticules avec le peptide du « soi » (« self peptide ») CD47 (34). CD47 est capable d'interagir avec le récepteur SIRP α (*signal regulatory protein- α*) des macrophages, inhibant la phagocytose des nanoparticules portant CD47 (34).

1.2.2 Barrière endothéliale

Les nanoparticules furtives qui ont échappé au MPS doivent traverser la barrière endothéliale pour atteindre les tissus cibles (22). Les cellules endothéliales forment une paroi interne (endothélium) qui tapisse les vaisseaux sanguins et lymphatiques et adhère étroitement au tissu conjonctif sous-jacent grâce à la lame basale (35). En condition physiologique, l'endothélium forme une barrière semi-perméable contrôlant le passage des macromolécules, des cellules et des fluides entre le sang et l'espace interstitiel (35). La perméabilité de la barrière endothéliale varie en fonction des tissus et de leur condition pathologique. Par exemple, les cellules endothéliales au niveau des capillaires cérébraux (barrière hémato-encéphalique, BHE) sont unies par les jonctions serrées sans fenestration et reposent sur une lame basale riche en collagène, ce qui empêche le passage des molécules entre les cellules endothéliales. Ces caractéristiques permettent d'isoler le cerveau des substances pathogènes, toutefois elles représentent une véritable barrière pour le ciblage des médicaments au cerveau (36). Contrairement à la BHE, les microvaisseaux du foie et de la rate présentent des fenestrations plus larges (50-300 nm de diamètre) favorisant le transport passif de macromolécules (37). Les conditions pathologiques, telles que les tumeurs, l'inflammation, les lésions tissulaires, peuvent aussi augmenter la perméabilité de l'endothélium. Cette anomalie est particulièrement importante dans l'état tumoral, où la néovascularisation est rapide et désorganisée à cause de la nature angiogénique agressive des tumeurs (38). Les cavités ou les fenestrations dans les vaisseaux tumoraux varient de 0.1 à 3 μm de diamètre (39). Cette imperfection des vaisseaux a été exploitée dans la stratégie du ciblage passif.

Matsumura et Maeda (40) ont démontré, pour la première fois en 1986, l'accumulation sélective de macromolécules ou de nanoparticules dans les tissus tumoraux. Ce phénomène est attribué à une haute densité de réseaux vasculaires, à une perméabilité accrue et à un faible drainage lymphatique (39). Il porte le nom d'effet EPR pour « enhanced permeability and retention

effect ». Depuis, la majorité des nanomédecines anti-cancéreuses exploitent cet effet et certaines ont été approuvées en clinique (Doxil™, Abraxane™, DaunoXome™, Marqibo™, et Onivyde™ aux États-Unis; Genexol-PM™ en Corée ; SMANCS™ au Japon; Myocet™ et Mepact™ en Europe) (15). Toutefois, l'efficacité thérapeutique de ciblage passif est encore limitée et controversée (41). En effet, l'effet EPR est généralement modéré, permettant moins de 2 fois plus d'accumulation des médicaments au tissu tumoral par rapport aux organes sains critiques (rein, foie) (40). La faible efficacité du ciblage passif peut être associée à des raisons suivantes: (i) *hétérogénéité de l'effet EPR*: Le niveau et la taille des fenestrations varient au sein des tumeurs, entre les types ou le stade des tumeurs (42, 43). Par exemple, la périphérie de la tumeur est plus vascularisée que le noyau, qui présente un réseau vasculaire dendrimérique (44), ce qui limite l'extravasation des nanoparticules au centre de la tumeur. Pour un traitement personnalisé, la théranostique, qui consiste à intégrer des agents thérapeutiques et d'imagerie dans une seule formulation nanoparticulaire a été proposée (45, 46). Les agents d'imagerie permettent d'observer la bio-distribution des nanoparticules et de déterminer l'hétérogénéité de l'effet EPR au cas par cas. De plus, l'intégrité de l'endothélium peut être altérée à l'aide des stimulations physiques telles que les ultrasons (47), les radiations (48, 49) ou des agents perturbateurs comme l'oxide nitrique (NO) (50). Par exemple, le dispositif à ultrason pulsé SonoCloud™ est conçu pour être implanté dans la boîte crânienne. La barrière BHE peut être temporairement perméabilisée en activant le dispositif grâce à un contrôle externe, ce qui permet d'augmenter l'accumulation cérébrale et l'efficacité des médicaments. Ce dispositif fait actuellement l'objet d'essais cliniques pour le glioblastome, les métastases cérébrales et la maladie d'Alzheimer (47, 51-53). Dans une autre étude, Park *et al.* (50) ont formulé des nanoparticules capables de générer du NO en présence de glutathion. Ce système a permis de perméabiliser l'endothélium tumoral et d'accumuler la

doxorubicine de façon significative. Enfin, la pénétration à travers la barrière endothéliale tumorale peut être améliorée grâce à un biomarqueur surexprimé spécifiquement dans l'endothélium tumoral (54, 55). Comme le peptide iRGD présente une affinité pour l'intégrine α_v et la neuropiline-1 (56), son greffage à la surface des nanoparticules a permis d'améliorer l'accumulation des nanoparticules dans les tumeurs (56-58); (ii) l'anormalité de la barrière extracellulaire (voir la section **1.2.3**); (iii) *le stress solide lié à la croissance anormale des cellules tumorales*: la prolifération rapide et incontrôlée des tissus tumoraux entraîne une compression solide des vaisseaux sanguins adjacents (59), empêchant la pénétration des nanoparticules (60) ainsi que la diffusion des agents thérapeutiques profondément dans le tissu tumoral (61); (iv) *Hémorhéologie et l'écoulement des nanoparticules dans les vaisseaux*: Afin de s'extravaser des vaisseaux sanguins au niveau de la tumeur, les nanoparticules doivent tout d'abord se déplacer vers les parois endothéliales et se trouver dans la périphérie de l'écoulement sanguin. La majorité des nanomédecines disponibles en clinique possèdent une géométrie sphérique. Cependant, il est rapporté que les nanoparticules sphériques s'écoulent au centre du vaisseau, parallèlement à la paroi (62). Ce phénomène pourrait défavoriser l'extravasation des nanomédecines par l'effet EPR (63). Il est suggéré que les particules ellipsoïdales présentent un déplacement latéral très dynamique (oscillation d'une paroi à la paroi opposée du vaisseau sanguin) (62), favorisant l'effet EPR et la liaison nanoparticule-cellule (via l'interaction spécifique ligand-récepteur) dans le ciblage actif (63).

1.2.3 Barrière extracellulaire (stroma tumoral)

Après l'extravasation endothéliale, les nanoparticules doivent pénétrer à travers le microenvironnement extracellulaire composé d'une matrice extracellulaire (ECM), la lame basale, les fibroblastes et les cellules immunitaires (64). La ECM tumorale est très dense et riche en fibres

de collagène et d'autres composants, à savoir des microfibrilles d'élastine, des protéoglycans, des glycosaminoglycans, des polysaccharides (65). Tous ces composants forment un gel réticulé et visqueux avec les pores inférieures à 40 nm de diamètre (66), défavorisant la diffusion et la convection des nanoparticules (67). En outre, la densité de la matrice ECM et le mauvais drainage lymphatique augmentent la pression du liquide interstitiel tumoral (18), réduisant l'extravasation des nanoparticules à travers la paroi du vaisseau (18). La pression interstitielle peut être diminuée en normalisant les vaisseaux. Vikash *et al.* (68) a suggéré de réparer les vaisseaux tumoraux en bloquant le récepteur du facteur de croissance endothéliale vasculaire-2 (VEGF-2). Cela a amélioré l'extravasation de petites nanoparticules (diamètre 12 nm), au détriment des plus grandes (diamètre 125 nm). Quant à la matrice extracellulaire, il est possible d'inhiber la production de collagène avec un agent antifibrotique. Cette approche améliore l'accumulation et l'efficacité des liposomes encapsulant la doxorubicine (69).

1.2.4 Barrière cellulaire et intracellulaire

Après leur extravasation dans le tissu cible, les nanoparticules doivent traverser la membrane cellulaire et les composants thérapeutiques (agents anti-cancéreux, protéines, acides nucléiques) doivent être libérés pour interagir avec leur cible thérapeutique intracellulaire. La membrane cellulaire est une enveloppe semi-perméable formée d'une bicouche de phospholipides et de cholestérol jonchée de protéines membranaires, présentant une charge globale négative. La majorité des nanoparticules empruntent une voie d'endocytose active telle que la pinocytose médiée par clathrine ou par les cavéoles (**Figure 1.2**) (70-72). Les nanoparticules sont internalisées dans des vésicules endocytaires avant d'être transférées dans le cytosol. Cependant, la pénétration directe dans le cytoplasme a été rapportée et peut être utilisée comme une voie alternative, puisqu'elle permet d'éviter la dégradation lysosomale (71) (**Figure 1.3**).

1.2.4.1 Voies d'endocytose

Les mécanismes par lesquels les cellules endocytent les nanoparticules sont nombreux et peuvent être divisés en 3 groupes : phagocytose, macropinocytose et pinocytose (**Figure 1.2**).

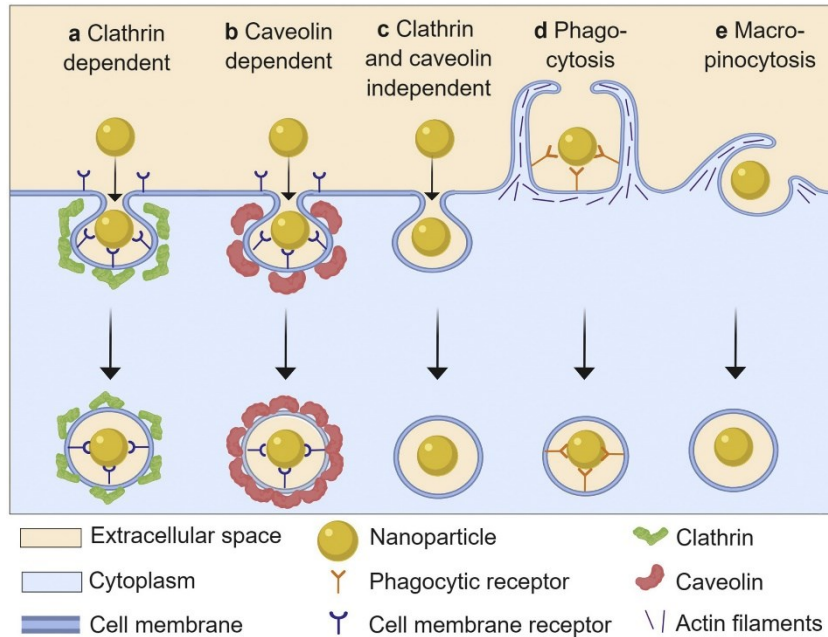


Figure 1.2. Schéma représentant les voies d'endocytose actives, et les voies de pénétration non-endocyttaire, avec permission de (73).

Phagocytose (**Figure 1.2**) : Cette voie est couramment utilisée par les cellules phagocytaires (macrophages/monocytes, neutrophiles et cellules dendritiques) pour l'élimination de pathogènes (71, 74). La phagocytose est généralement initiée par une liaison spécifique aux récepteurs membranaires des phagocytes tels que les récepteurs Fc (protéines transmembranaires exprimées chez certaines cellules immunitaires), les récepteurs de mannose, les récepteurs du complément. Comme discuté dans la section **1.2.1**, les cellules phagocytaires sont principalement responsables de la courte demi-vie des nanoparticules (75).

Macropinocytose (Figure 1.2): Cette voie est un processus endocytaire non-spécifique qui est caractérisé par la capture de fluides et de solutés extracellulaires à travers des extensions de membrane plasmique initiés par l'actine. Les particules de taille micrométrique sont généralement capturées par cette voie (76) et se retrouvent dans de grosses vésicules (diamètre de 0.2 à 5 μm) appelées macropinosomes (77). Les macropinosomes sont plus perméables que les autres vésicules endocytaires (78), ce qui permet l'échappement des nanoparticules (79).

Pinocytose (Figure 1.2): Cette voie, réalisée par tous les types cellulaires, est responsable de la capture des fluides, des molécules et des nanoparticules. La pinocytose est divisée en trois sous-groupes, selon le mécanisme de formation de ces vésicules: endocytose médiée par la clathrine (CLA), endocytose médiée par la cavéoline (80), endocytose indépendante de la clathrine et de la cavéoline (IC).

- La voie CLA est une voie majeure pour la pénétration cellulaire des nanoparticules à ciblage actif (71, 72, 81). Le processus est habituellement initié par l'interaction spécifique entre des ligands à la surface des nanoparticules et les récepteurs membranaires (récepteurs de transferrine, récepteur de l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), etc.), ce qui entraîne des invaginations membranaires tapissées d'un manteau de clathrine (**Figure 1.2**). Les nanoparticules se retrouvent dans les endosomes qui soit sont recyclés, soit fusionnent avec les lysosomes contenant de nombreuses enzymes digestives et un milieu très acide. Ces dernières provoquent la dégradation rapide des nanoparticules et leur cargo (82, 83).

- La voie CAV est également une voie importante pour l'internalisation des nanoparticules, qui implique des invaginations membranaires en forme de bulbe recouverte de cavéoline (cavéoles) (**Figure 1.2**) (72, 84). Les destinations typiques des

vésicules endocytaires CAV sont l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique (85), qui peut être exploité pour la vectorisation des médicaments agissant dans ces organelles. Les nanoparticules présentant du folate, de l'albumine et du cholestérol peuvent être endocytées par cette voie (18, 26). Par ailleurs, il a également été rapporté que dans les cellules endothéliales, les cavéoles sont capables d'effectuer un transport transmembranaire appelé transcytose (entrée et sortie à travers une cellule). Cette propriété a été exploitée pour le ciblage des tissus sous-endothéliaux (86).

- La voie IC : Il s'agit d'un ensemble de plusieurs voies endocytaires liées à la présence de microdomaines lipidiques riches en cholestérol (40 à 50 nm de diamètre) dans la membrane cellulaire appelés « radeaux lipidiques » (87) (**Figure 1.2**). Les nanoparticules fonctionnalisées avec folate peuvent être également internalisées par cette voie. Et ces nanoparticules internalisées sont directement libérées dans le cytoplasme (88).

1.2.4.2 Pénétration directe dans le cytoplasme

Les nanoparticules peuvent être directement délivrées au cytoplasme en appliquant des approches biochimiques ou physiques. Les stratégies principales comprennent : la translocation directe, la fusion lipidique, l'électroporation et la micro-injection (**Figure 1.3**). Toutes ces approches permettent aux nanoparticules de pénétrer directement dans le cytoplasme. La translocation directe et la fusion lipidique dépendent des propriétés physicochimiques des nanoparticules. Pour la micro-injection, une aiguille microscopique est utilisée pour injecter des nanoparticules directement dans le cytoplasme alors que pour l'électroporation, la membrane cellulaire est perméabilisée par des impulsions électriques. Cependant, l'application clinique de ces stratégies est encore limitée (71). A titre d'exemple, les nanoparticules lipidiques ont délivré

un siARN dans le cytoplasme des cellules dendritiques par l'électroporation avec une bonne efficacité de transfection et une faible toxicité (89).

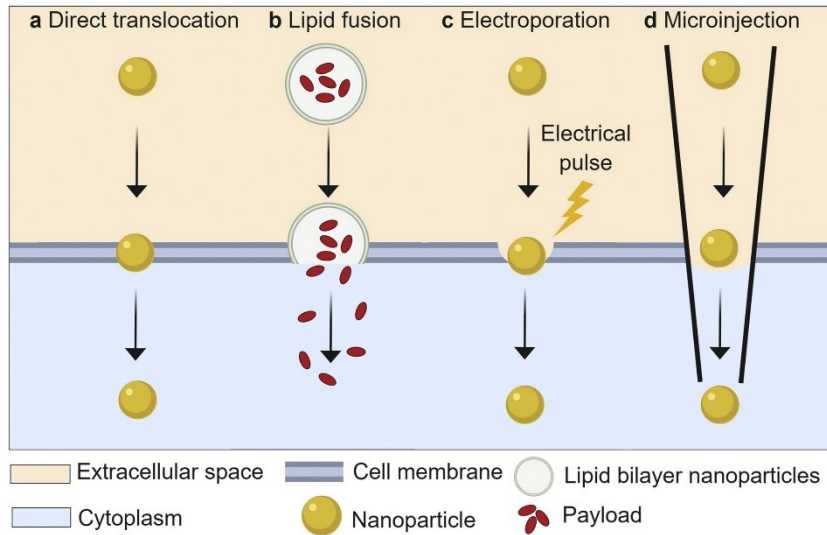


Figure 1.3. Schéma représentant les voies de pénétration directe au cytoplasme, avec de permission de (73).

Les stratégies pour contourner les barrières cellulaires sont décrites dans la section **1.3**.

1.2.5 Barrière et transport intracellulaire

À la suite de la pénétration cellulaire, les nanoparticules interagissent avec les composants intracellulaires, ce qui détermine leur trajet et leur destination finale dans les compartiments cellulaires. Les barrières intracellulaires simplifiées des nanovecteurs sont présentées à la **Figure 1.4**.

Après l'endocytose, les nanoparticules sont confinées dans des vésicules endocytaires appelées endosomes précoces. Une partie des endosomes précoces sont recyclés vers la membrane plasmique. L'autre partie parvient à maturité (endosomes tardifs) par acidification. Les endosomes

tardifs peuvent soit fusionner avec la membrane plasmique (libérant leur contenu à l'extérieur de la cellule sous forme d'exosomes), soit fusionner avec des lysosomes, dont le contenu est exposé à diverses enzymes de dégradation telles que les hydrolases lysosomales (83, 90). Ces dernières contribuent à la dégradation des nanoparticules et leurs contenu (91). Une autre barrière intracellulaire qui joue un rôle important dans la dégradation intracellulaire des nanoparticules est le processus d'autophagie (92, 93). Dans ce processus, certains constituants cytoplasmiques sont piégés par les autophagosomes, puis délivrés au lysosome pour y être décomposés. Les nanoparticules s'étant échappées de l'endosome et qui se trouvent dans le cytoplasme risquent d'être recapturées et dégradées par ce processus (94). Dans la plupart des cas, les nanoparticules sont conçues pour libérer des agents thérapeutiques dans le cytoplasme afin que ceux-ci puissent atteindre le noyau (85). Le noyau est isolé du cytoplasme par une double membrane percée de trous appelés les pores nucléaires (NPC) permettant le transport passif des molécules dans et hors du noyau. Il faut noter que le passage passif de la membrane nucléaire est seulement possible pour les molécules de diamètre inférieur à 9 nm (95). Les agents thérapeutiques basés sur d'ADN de grande taille comme les plasmides dépassent généralement la limite de taille pour le passage passif (95), ils se rendent donc au noyau souvent par une diffusion passive pendant la mitose (96) (la membrane nucléaire se décompose temporairement pendant la mitose) ou par un transport actif (95), par exemple, via des protéines d'import nucléaire (importines) (97).

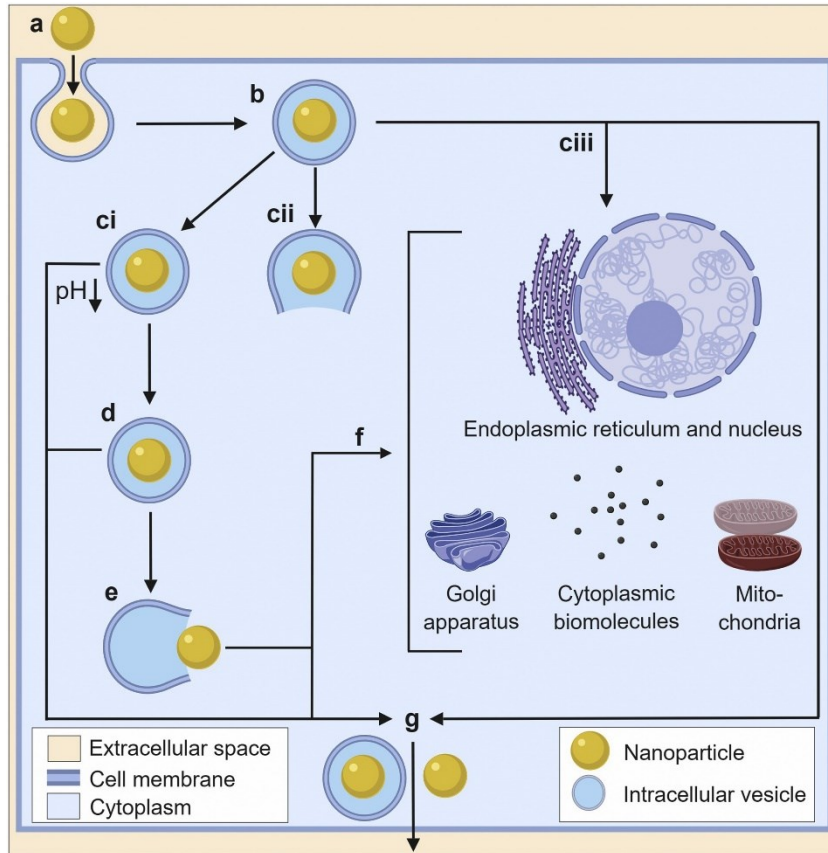


Figure 1.4. Schéma représentant des principales voies et mécanismes du trafic intracellulaire de nanoparticules. (a) endocytose des nanoparticules, (b) endosome précoce, (ci) un endosome tardif, (cii) échappement endosomal, (ciii) recyclage à travers un endosome de recyclage situé à proximité de la région périnucléaire, (d) lysosome, (e) dégradation lysosomale, (f) trajets des nanoparticules aux cibles intracellulaires, (g) exocytose des nanoparticules, avec de permission de (73).

Les stratégies pour contourner les barrières intracellulaires sont décrites dans la section 1.4.

1.3 Ciblage actif cellulaire

La croissance tumorale entraîne de nombreuses modifications physiologiques telles que des altérations de la composition tissulaire (densité cellulaire, vascularisation et stroma), une augmentation de la température et/ou une diminution du pH dans le milieu extracellulaire tumoral

(98, 99). En particulier, les cellules tumorales surexpriment souvent certains types de récepteurs associés à la croissance et au métabolisme cellulaire, tels que le récepteur de la transferrine (TfR), le récepteur du folate (FR), le récepteur de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et le récepteur du facteur de croissance épidermique (100) (99, 101). Des ligands tels que des anticorps et leurs fragments, des vitamines, des sucres, des protéines ou des aptamères, ont été développés pour présenter une affinité spécifique pour ces récepteurs (99, 102). Fonctionnaliser la surface des nanoparticules avec ces ligands permet une liaison spécifique des nanoparticules aux récepteurs membranaires des cellules tumorales et une pénétration cellulaire facilitée via les voies de pinocytose (102-104). Il s'agit d'une stratégie de ciblage actif (« active targeting » en anglais) (105). Au cours des dernières années, le ciblage actif a été largement exploité pour améliorer l'internalisation des nanoparticules par les cellules cibles et ultérieurement augmenter l'efficacité des nanomédecines (101, 103, 104, 106). L'utilisation des ligands naturels (par exemple, transferrine, acide folique, biotine, etc.) présente certains avantages tels qu'une spécificité et une affinité bien caractérisées, mais il faut être conscient que l'abondance de ligands endogènes pourrait concurrencer le ciblage aux récepteurs des nanoparticules. Par exemple, le prétraitement des cellules de Hela (surexprimant le récepteur de biotine) avec un excès de biotines a considérablement réduit l'absorption cellulaire des nanoparticules fonctionnalisées avec la biotine ($p < 0.001$) (107). Pour résoudre ce problème, l'utilisation des ligands synthétiques comme aptamère peut être nécessaire. Chen et al. (108) ont développé des aptamères de nature d'ADN et d'ARN qui reconnaissent sélectivement le domaine extracellulaire du récepteur de la transferrine de souris sans compétition avec la transferrine, apparemment grâce à un site de liaison distinct de celui de transferrine. Wilner et al. (109) ont montré que l'utilisation d'un aptamère ciblant le récepteur de la transferrine (TfR) permet une excellente pénétration aux cellules Jurkat T (surexprimant TfR) des nanoparticules lipidiques

même en présence de transferrine (à une concentration similaire à celle trouvée dans le sérum). Concernant des récepteurs ciblés, de nombreux récepteurs ne sont pas spécifiques aux cellules malades, mais plutôt surexprimés (110). Par exemple, les récepteurs du facteur de croissance épidermique et de la transferrine (TfR) sont retrouvés dans plusieurs tissus comme la peau ou les hépatocytes, tout en étant surexprimés dans certains cancers (110-112). Par conséquent, lors de la conception des nanoparticules à ciblage actif, il est nécessaire de développer une stratégie pour cibler sélectivement les cellules avec une forte densité surfacique de récepteur, tout en évitant celles avec une faible densité. Cette propriété peut être obtenue en utilisant *les nanoparticules dites « intelligentes »* à base de polymères stimuli-sensibles (113, 114) ou par *l'effet de multivalence* (115). Ces stratégies sont décrites en détail dans la section **1.3.1** et **1.3.2**, respectivement.

1.3.1 Nanoparticules intelligentes

Les nanoparticules intelligentes ou stimuli-sensibles sont conçues en utilisant des composants stimuli-sensibles. Ces matériaux sont capables de modifier leurs propriétés physicochimiques (solubilité, conformation, charge, etc.) face à de petites variations des conditions de leur environnement (température, pH, enzymes, radiation, champ magnétique, force ionique) (116). Les systèmes stimulables peuvent reposer sur des stimuli endogènes spécifiques à la tumeur tels que le pH interstitiel abaissé, une concentration élevée de glutathion, un niveau accru d'activité enzymatique, une température légèrement élevée (99). Des stimuli exogènes, à savoir des irradiations, des ultrasons, un champ magnétique, peuvent aussi être appliqués. La surface de ces nanoparticules est habituellement décorée de deux polymères: un portant un agent de ciblage au bout de chaîne; l'autre étant un agent de furtivité. L'un d'entre eux est sensible à un stimulus, ce qui permet de dissimuler le ligand lors de la circulation des nanoparticules dans les tissus sains et

d'exposer sous l'effet d'un stimulus à l'endroit ciblé. Grâce à cette propriété, ces nanoparticules « intelligentes » peuvent présenter une adsorption préférentielle aux cellules cible tout en évitant d'autres cellules saines, même en présence du récepteur membranaire (sans stimulus) (117-125). La **Figure 1.5A** illustre des nanoparticules décorées d'une chaîne de PEG et d'une chaîne de poly(histidine) portant un ligand biotine ou peptide de pénétration cellulaire TAT. À pH 7,4, les chaînes de poly(histidine) adoptent une conformation repliée permettant d'enfourer le ligand dans la couche de PEG. À pH < 6,5, les chaînes Poly(histidine) se déploient et exposent le ligand (120, 122, 124, 125). Si le ligand est à l'extrémité de la chaîne de PEG, les chaînes polymériques stimuli-sensibles servent à le camoufler à pH 7,4 ou à la température corporelle, en adoptant une conformation déployée et se replie à pH < 7,4 ou à une température supérieure à 37°C pour exposer le ligand (114, 117, 123, 126) (**Figure 1.5B**).

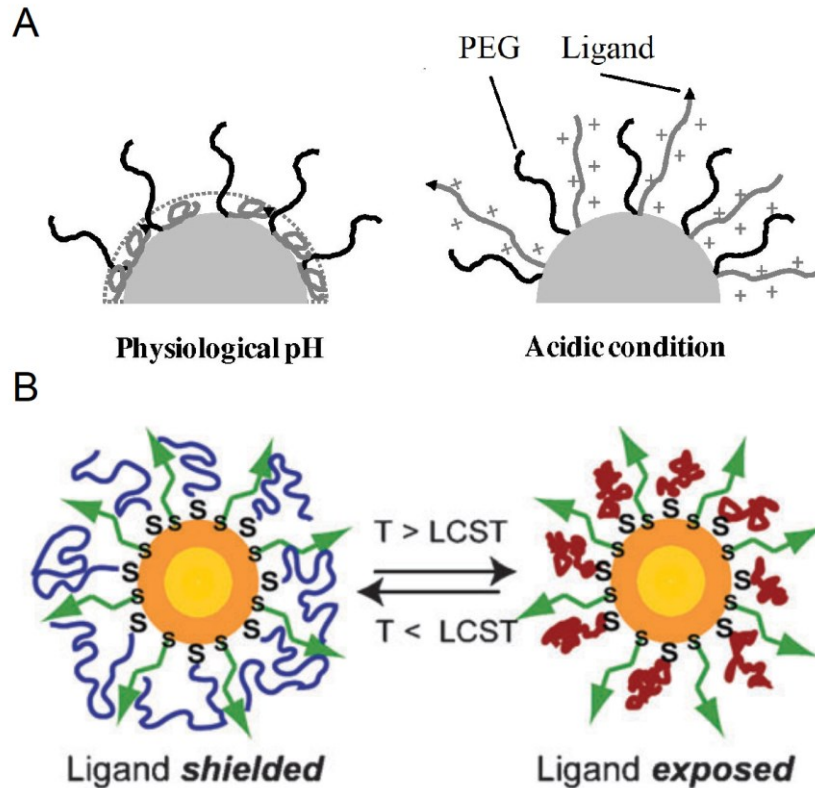


Figure 1.5. (A) Le gonflement d'un polymère pH-sensible à un pH acide menant à l'exposition en surface d'un ligand, avec permission de (122); (B) Le rétrécissement d'un polymère thermosensible à une température au-dessus de la température de solution critique inférieure (Lower critical solution temperature, LCST) menant à l'exposition en surface d'un ligand, avec permission de (117).

La **Figure 1.6** illustre des chaînes de PEG attachées sur la surface des nanoparticules soit par une liaison clivable, qui est sensible au pH ou à une enzyme, soit par adsorption électrostatique. Au changement de pH ou en présence de l'enzyme, les chaînes de PEG vont se détacher de nanoparticules, menant à une meilleure exposition de ligand (118, 121, 127)

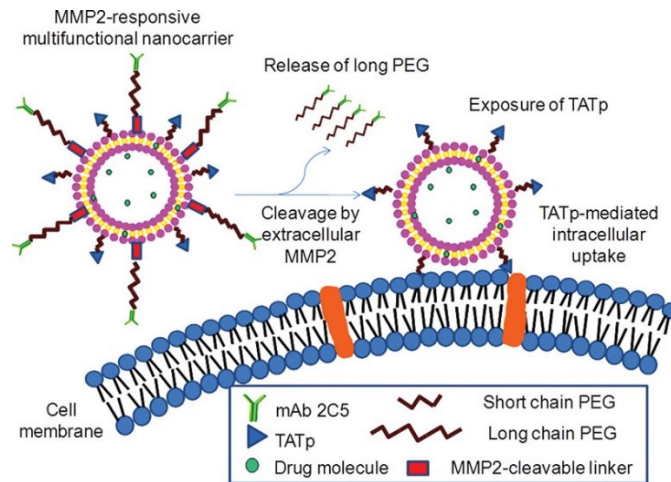


Figure 1.6. La couche de PEG est greffée sur la surface des nanoparticules par une liaison sensible à l'enzyme métalloprotéase matricielle 2 (MMP2), positivement régulée dans le micro-environnement tumoral, avec permission de (118).

Dans une autre étude, des nanoparticules ont été fonctionnalisées avec une couche de PEG portant le ligand peptidique TAT et un copolymère PEG-poly (méthacryloyl sulfadiméthoxine) (PSD) (**Figure 1.7**). PSD est négativement chargé à pH 7,4 et s'adsorbe sur le ligand TAT par attraction électrostatique. Dans le milieu légèrement acide des tumeurs, le PSD perd sa charge et se détache de ligand, permettant l'exposition de cette molécule (119).

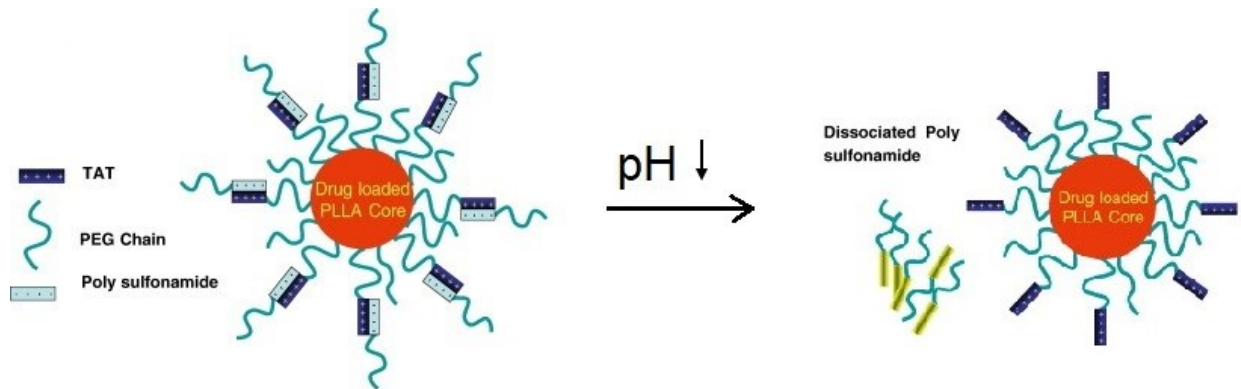


Figure 1.7. À pH neutre, le copolymère PEG-sulfonamide protège le ligand TAT par adsorption électrostatique; à pH acide, le copolymère PEG-sulfonamide est déionisé et détaché du ligand TAT, ainsi exposant TAT, avec permission de (119)

1.3.2 Effet multivalent

Un des principaux avantages des nanoparticules est la possibilité de les fonctionnaliser avec un certain nombre de ligands. Les ligands utilisés peuvent être de même nature ou de différents types. Les nanoparticules qui sont fonctionnalisées en surface avec plusieurs ligands identiques attachés à des attaches flexibles et inertes sont appelées les nanoparticules multivalentes (128). L'interaction entre les nanoparticules multivalentes et les surfaces cellulaires surexprimant un type de récepteurs spécifiques est médiée par la liaison simultanée de plusieurs ligands (de même type) à plusieurs récepteurs (de même type); elle est appelée l'interaction multivalente (129). Une telle interaction assure le fonctionnement de nombreux processus biologiques, grâce à une propriété unique, la sélectivité (129-131). La *sélectivité* fait référence à la capacité d'une construction multivalente à différencier les surfaces de récepteurs en fonction de la densité surfacique de

récepteurs (132).. Elle peut être utilisée pour cibler sélectivement les surfaces affichant un récepteur au-dessus d'un seuil donné (133-135).

Afin de modéliser théoriquement la sélectivité des nanoparticules multivalentes, Martinez-Veracoechea et Frenkel (128) ont développé un modèle de mécanique statistique décrivant l'interaction entre les nanoparticules multivalentes et les surfaces de récepteurs et en y introduisant un paramètre α pour mesurer la sélectivité (détails dans le chapitre 2). Une valeur de α supérieure à 1, qui correspond à la croissance supra-linéaire de la quantité de nanoparticules adsorbées en fonction de la densité surfacique de récepteurs, indique la super-sélectivité. Le modèle montre que la super-sélectivité est due au fait que le nombre d'arrangements distincts de liaisons ligand-récepteur augmente de manière supra-linéaire avec la densité surfacique de récepteurs (115, 128) (Figure 1.8).

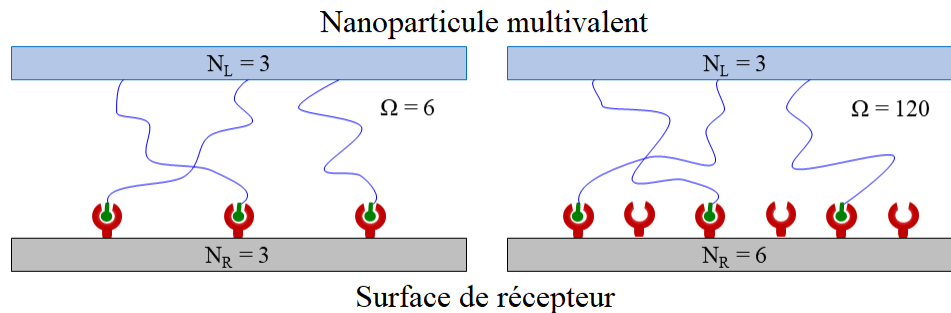


Figure 1.8. Schéma représentant la liaison entre la nanoparticule multivalente avec le nombre de ligands $N_L = 3$ et la surface de récepteur. Le panneau de gauche montre une faible densité de récepteur (le nombre de récepteurs $N_R = 3$) et le panneau de droite montre une densité de récepteur deux fois plus élevée. Une augmentation de N_R de 3 à 6 augmente le nombre d'arrangements distincts de liaisons ligand-récepteur Ω d'un facteur de 20.

Une condition nécessaire pour la super-sélectivité est que l'affinité ligand-récepteur doit être faible, correspondant à des constants de dissociation K_D entre 10^{-15} et 10^{-6} M. Cependant, les valeurs de K_D des interactions ligand-récepteur sont beaucoup plus faibles que celles requises pour la super-sélectivité, qui souvent varie entre 10^{-15} et 10^{-6} M (136, 137). Pour contourner ce problème, des études théoriques récentes ont suggéré de moduler l'affinité apparente en fonctionnalisant des nanoparticules avec une monocouche de polymère bimodale (138). BM comprend une fraction des chaînes portant un ligand pour le ciblage (chaîne de ciblage) et une fraction des chaînes non-fonctionnelles servant de revêtement furtif (chaîne de furtivité) (11, 139). Des travaux théoriques récents ont démontré que, lorsque les chaînes de furtivité sont plus longues que les chaînes de ciblage, un potentiel répulsif de nature stérique (entre les chaînes de furtivité et les récepteurs) doit être surmonté pour permettre l'adsorption des nanoparticules sur la surface de récepteurs. Cette répulsion peut être utilisée pour réduire l'affinité apparente nanoparticules/cellules et atteindre une affinité propice à la super-sélectivité (139-141). Selon le modèle théorique, plusieurs paramètres de conception des BM, à savoir la taille des particules, la densité surfacique de ligand, l'affinité ligand-récepteur, l'exposition de ligand, peuvent être ajustés pour obtenir la super-sélectivité souhaitée (139). Cependant, les preuves expérimentales sur la sélectivité de BM sont encore limitées. Contrairement aux modèles théoriques ou aux études de simulation, le contrôle expérimental et indépendant de différents paramètres tels que la spécificité de l'interaction nanoparticules-cellules, la densité surfacique de la chaîne de ciblage et de la chaîne de furtivité ainsi que celle du récepteur sur les surfaces du modèle cellulaire est relativement difficile à atteindre.

1.4 Échappement endosomal

Comme décrit dans la section 1.2.5, quelles que soient les voies d'endocytose, les nanoparticules sont souvent confinées dans les vésicules endosomales et subissent une dégradation lysosomale, ce qui peut inhiber leurs fonctions biologiques et thérapeutiques. En conséquence, l'échappement endosomal est une étape déterminant l'efficacité de délivrance des nanoparticules (142). Les nanoparticules synthétiques ne possèdent pas de capacité naturelle d'échappement endosomal comme les vecteurs viraux ou les toxines bactériennes (143). À ce titre, il est important d'équiper les nanomédecines d'une fonctionnalité d'échappement endosomal. Au cours des dernières décennies, de nombreuses stratégies ont été rapportées pour améliorer l'échappement endosomal des nanoparticules (142, 144, 145). Les plus prometteuses sont l'effet « éponge à protons » des polymères cationiques (146), la fusion avec la membrane endosomale provoquée par les liposomes cationiques (147) et la déstabilisation membranaire par les nanoparticules pH-sensibles (148). Parmi eux, les nanoparticules lipidiques (LNPs) pH-sensibles se sont avérées très efficaces et bien avancées en clinique (149). En effet, il existe actuellement trois médicaments à base de nanoparticules lipidiques ionisables et d'ARN cliniquement approuvés (Onpattro® (150), COMIRNATY®(151), SPIKEVAX® (152)). De nombreuses autres formulations à base de nanoparticules lipidiques ionisables et d'ARN sont en cours d'évaluation clinique pour la prévention et le traitement des infections virales, du cancer et des maladies génétiques (149). Les LNPs pH-sensibles comprennent diverses structures, mais sont souvent constituées de lipides ionisables et de co-lipides (souvent DSPC, cholestérol, DMG-PEG ou DSG-PEG). Le composant « clé » des LNPs est les lipides ionisables pH-sensibles. Ils sont neutres à pH physiologique, ce qui permet de réduire les effets toxiques potentiels par rapport aux lipides cationiques. À pH acide, les lipides ionisables sont chargés positivement, responsable de la complexation de l'ARN lors de

la fabrication et de l'échappement endosomal pour une libération cytosolique (149, 153). Par exemple, les lipides ionisables DLin-MC3-DMA, ALC-0315, SM-102 sont les composants « clés » dans les formulations Onpattro[®], BNT162b2[®], mRNA-1237[®], respectivement (154, 155).

Dans des efforts connexes mais distincts, le groupe de Dr. Leblond Chain a rapporté l'utilisation de nouveaux lipides bascules pH-sensibles pour la délivrance cytosolique de principes actifs et d'acides nucléiques (156, 157). Ces lipides ont été conçus sur une unité de basculement di(méthoxyphényl)-pyridine capable de changer de conformation à pH acide. L'acidification favorise la liaison hydrogène entre les deux fonctions méthoxy et le noyau pyridine. Il en résulte un basculement de la molécule (**Figure 1.9**), qui, selon l'hypothèse, provoque la déstabilisation ou le réarrangement de la bicouche lipidique et déclenche finalement la libération du contenu des LNPs.

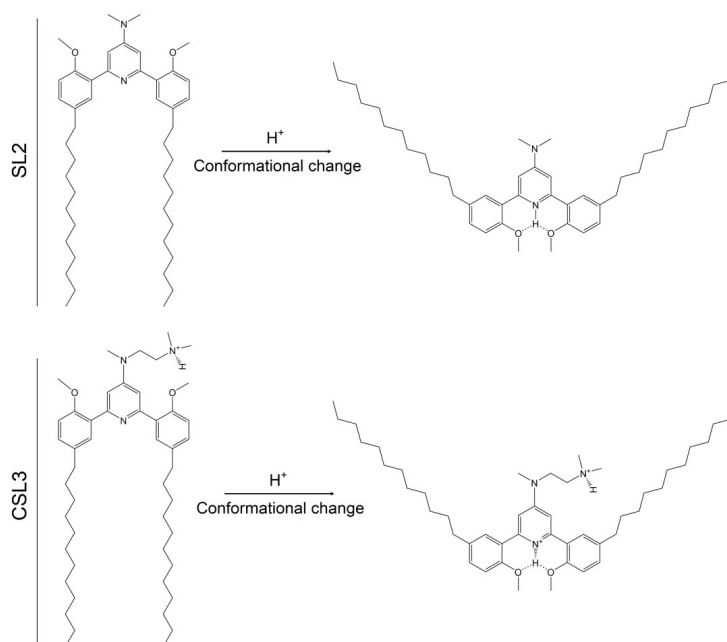


Figure 1.9. Schéma représentant le changement conformationnel induit par la protonation des lipides bascules pH-sensible. Les valeurs prédites de pK_a pour SL2 et CSL3 sont respectivement de 5.28 et 5.38 (Chemstation).

Initialement, des versions non-cationiques des lipides bascules ont été synthétisées pour la délivrance cytosolique des molécules imperméables aux cellules. Parmi celles-ci, SL2 (**Figure 1.10A**) s'est révélé le plus efficace en termes d'échappement endosomal et de délivrance cytosolique. Les LNPs formulées avec 50 ou 75 mol% de SL2 ont montré un relargage respectif de 75 ou 88 % de sulforhodamine B lorsque le pH a été ajusté de 7.4 à 5 (**Figure 1.10B**) alors que les LNPs formulées avec le contrôle négatif le lipide 4 (homologue non-méthoxy de SL4, incapable de changer sa conformation lors de la protonation, voir **Figure 1.10A**) a abolit le relargage de sulforhodamine B. Une fois de plus, la délivrance cytosolique est observée malgré l'incorporation de 5 mol% de DSPE-PEG₂₀₀₀ dans la formulation de LNPs (157).

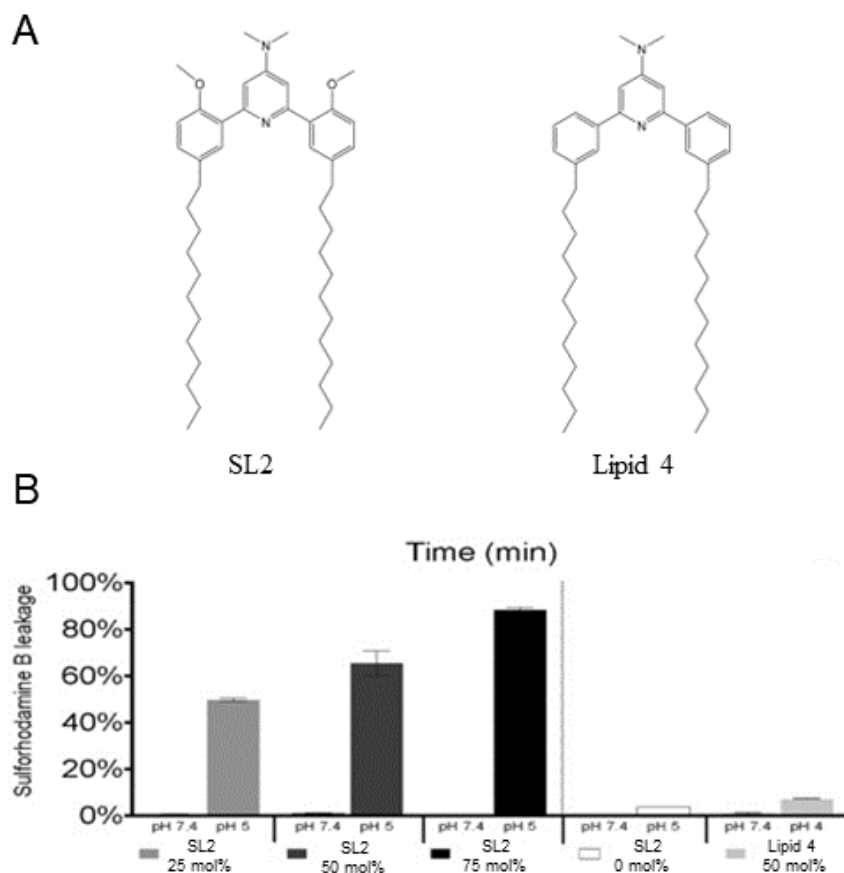


Figure 1.10. (A) Structure chimique de lipide bascule non-cationique SL2 et son homologue non-méthoxy 4 incapable de changer sa conformation lors de la protonation. (B) Relargage de sulforhodamine B à partir de LNPs incorporant SL2 (0–75 mol %), ou le lipide 4 (50 mol %) après incubation pendant 15 min dans à pH 5 et 7.4, avec permission de (157)

Pour la délivrance de siARN, les versions cationiques de SL2 ont été conçues en ajoutant une tête cationique (**Figure 1.11A**). La tête cationique permet de complexer les acides nucléiques par interactions électrostatiques. Les études de transfection de siARN *in vitro* ont identifié le lipide le plus efficace, CSL3. Une formulation de LNPs contenant CSL3 50 mol% (CSL, DSPC, cholestérol et DSPE-PEG₂₀₀₀ au ratio molaire de 50 : 10 : 37.5 : 2.5, respectivement) a permis d’une efficacité de silençage génique comparable à celle du réactif commercial Lipofectamine[®] RNAiMAX

sachant que les LNPs avec le contrôle négatif CSL4 (homologue non-méthoxy de CSL3, incapable de changer sa conformation lors de la protonation, voir **Figure 1.11A**) n'a montré aucune efficacité de transfection significative (**Figure 1.11B**).

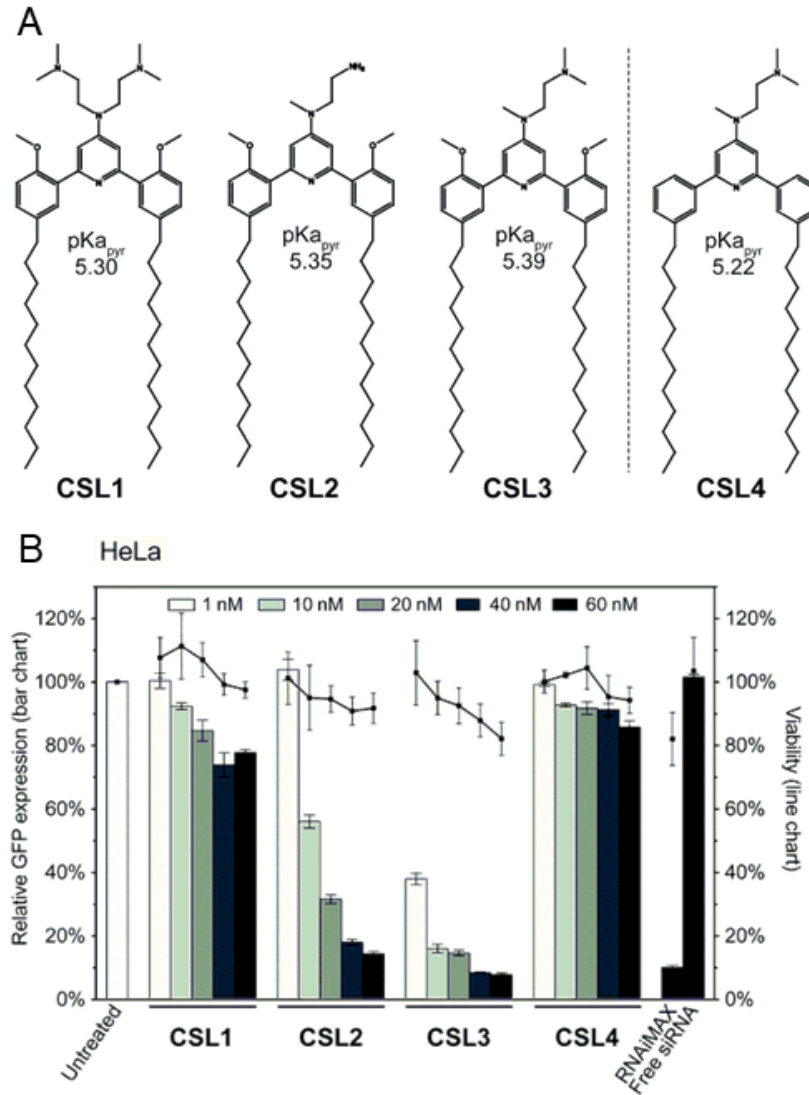


Figure 1.11. (A) Structure chimique de lipides bascules cationiques et le contrôle négatif lipide CSL4 (incapable de changer sa conformation lors de la protonation). (B) Réduction de l'expression de GFP (barres) et la viabilité (points) des cellules Hela-GFP traitées par les LNPs encapsulant siRNA ciblant GFP (CSL, DSPC, cholestérol et DSPE-PEG2000 à un rapport molaire de

50 : 10 : 37,5 : 2,5 respectivement). RNAiMAX (réactif Lipofectamine® RNAiMAX - 60 nM), siRNA libre (60 nM) et cellules non traitées ont été utilisés comme expériences de contrôle. L'inactivation du gène a été dosée par cytométrie en flux après 72 h d'incubation (n = 3), avec permission de (156).

En plus, les études *in vivo* ont démontré une efficacité de de silençage de 50% (réduction de 50% de la sécrétion d'une protéine hépatique chez les souris C57BL/6) après une seule injection intraveineuse à une dose de 1mg.kg^{-1} de siRNA. À la même dose, les LNPs avec CSL4 étaient incapables de médier l'activité de silençage. Dans des travaux récents, les LNPs de CSL3 ont été utilisées pour la délivrance cytosolique simultanée des agents chimiothérapeutiques et des acides nucléiques (miARN ou siARN), améliorant le traitement du rétinoblastome dans un modèle de rat et dans des cellules humaines primaires (158, 159). Malgré les performances exceptionnelles des LNPs bascules pH-sensibles, le processus par lequel les LNPs facilitent l'échappement endosomal et la délivrance intracellulaire reste à l'étude. La compréhension de ce processus pourrait être bénéfique pour l'optimisation de la conception et de l'utilisation de ces lipides parce que certains défauts des LNPs bascules pH-sensibles restent à améliorer. En premier, l'efficacité d'encapsulation (par l'encapsulation passive) pour les LNPs à base de SL2 reste faible (inférieure à 10 % pour une molécule de modèle des principes actifs hydrophiles, sulforhodamine B) (160). Il faut noter qu'il n'est pas approprié d'utiliser une méthode d'encapsulation active telle qu'un gradient transmembranaire de pH pour les LNPs bascules pH-sensibles en raison de leur caractère pH-sensible (tel que décrit au-dessus, LNPs avec 75 mol% SL2 a subi un relargage de 88% à pH 5). En deuxième, les études de la stabilité *in vitro* ont montré l'instabilité (agrégation après 1 heure d'incubation avec le FBS 50 mol%) des LNPs de CSL3 (50 mol%) encapsulant siRNA (voir Figure S9 dans Réf. (156)). Cette instabilité fut proposée comme étant à l'origine de l'accumulation de

siRNA dans le rein dans l'étude *in vivo* chez des souris (voir Figure 5D dans Réf. (156)). Au dernier, le pourcentage actuel de lipide bascule incorporé dans la formulation de LNPs est assez élevé (50 mol%).

L'hypothèse la plus acceptée sur mécanisme d'échappement endosomal pour les LNPs ionisables pH-sensibles est la perturbation membranaire due à la formation d'assemblages lipidiques non lamellaires lors de l'acidification (149, 161). Cependant, les analyses d'imagerie récentes ont montré que seule une faible partie des acides nucléiques étaient libérés à cause de la perturbation/la fusion de la membrane endosomale (162-164). Il est possible que plusieurs mécanismes soient en jeu, en fonction des différences de composition et de propriétés de LNPs. Par exemple, les études récentes ont rapporté qu'une fraction de LNPs reste confinée dans l'endosome tardif et est ensuite sécrétées à l'extérieur de la cellule sous forme d'exosomes (165, 166). Les résultats d'une autre étude ont démontré que la fusion directe entre la membrane de LNPs et la membrane plasmique est partiellement responsable de la délivrance de siARN (167). Pour les lipides bascules pH-sensibles (SL2 et CSL3), il y a à la fois une ionisation et un basculement moléculaire lors de l'acidification. Par conséquent, le mécanisme par lequel l'acidification entraîne la déstabilisation des LNPs et déclenche la libération de leur contenu pourrait être différent de celui mentionné ci-dessus et devrait être lié au changement de conformation de ces lipides. En effet, les études *in vitro* sur les cellules Hela par la microscopie à fluorescence ont suggéré que la localisation cytosolique de cargo des LNPs est liée au changement conformationnel de SL2 ou CSL3 lors de l'acidification (156, 157).

Chapitre 2

Objectifs et Hypothèses de recherche

2.1 Mise en contexte

Le ciblage des nanoparticules repose sur la réponse sélective à une ou certaines caractéristiques des sites thérapeutiques (à savoir la densité surfacique élevée d'un récepteur spécifique chez certaines cellules tumorales ou le milieu acide de l'endosome). Dans ce projet, nous voulons optimiser le franchissement de plusieurs barrières, *i.e.* cellulaire et intracellulaire (la membrane endosomale) pour améliorer l'efficacité de ciblage des nanomédecines.

En basant sur une simulation de Monte Carlos, Wang *et al.* (140) a démontré qu'il est possible d'améliorer l'adsorption sélective à la densité surfacique de récepteurs des nanoparticules multivalentes en utilisant les chaînes furtives plus longues que les chaînes de ciblage. Pour une application potentielle en vectorisation pharmaceutique de ce concept, il serait important d'évaluer leur efficacité par un modèle expérimental. Par rapport à la modélisation théorique ou à la simulation, l'approche expérimentale est assez complexe et nécessite un contrôle rigoureux de plusieurs facteurs tels que l'interférence des interactions non-spécifiques avec l'adsorption spécifique des nanoparticules multivalentes (médié par la liaison ligand-récepteur) (168), la densité surfacique de ligands et de chaînes polymériques sur les nanoparticules (169) ou la densité surfacique de récepteurs sur des modèles cellulaires (170). De plus, la conception de nanoparticules multivalentes demande une solide connaissance sur l'influence des paramètres de

conception (densité surfacique/longueur relative des chaînes polymériques, densité surfacique de ligands) sur l'adsorption sélective.

Tel que décrit dans le chapitre 1, les lipides bascules ont été récemment introduits pour améliorer la délivrance cytosolique des nanoparticules lipidiques (171). L'utilisation des lipides bascules pH-sensibles a permis la délivrance cytosolique efficace de molécule imperméable aux membranes cellulaires (157), de siARN (156) ou la délivrance simultanée des agents chimiothérapeutiques (melphalan, carboplatin) et des acides nucléiques (miARN ou siARN) (158, 159). Ces molécules ont été conçues en basant sur le principe de l'auto-assemblage moléculaire des molécules amphiphiles où seuls les lipides de formes approximativement cylindriques s'assemblent efficacement dans la bicouche lipidique (172). En conséquence, un changement conformationnel des lipides est attendu à entraîner des défauts dans la membrane, ainsi provoquant un réarrangement de la bicouche lipidique et déclenchant la libération du cargo des LNPs (171). Une preuve expérimentale de cette hypothèse est nécessaire pour l'optimisation de leur utilisation ainsi que la conception de nouveaux lipides bascules.

2.2 Objectifs généraux

L'objectif général de cette thèse est *l'étude expérimentale de la réponse sélective à des stimuli endogènes des nanoparticules fonctionnelles*. Le projet a consisté à étudier les interactions entre de différentes nanoparticules fonctionnelles et des modèles biologiques (surfaces de récepteur à différentes densités surfaciques, milieux aqueux à différents pHs). L'influence de certains paramètres de conception sur le comportement sélectif en réponse à des stimuli endogènes tels que la surface à haute densité surfacique de récepteurs, le milieu acide a été étudiée. L'élaboration de telles corrélations permettra d'identifier les facteurs « clés » contrôlant la sélectivité des

interactions entre les nanoparticules fonctionnelles et les composants biologiques (membrane cellulaire, milieu endosomal), ce qui permettra de concevoir des nanoparticules plus efficaces. Deux paramètres ont été examinés : (i) Impact de la monocouche bimodale sur la sélectivité des nanoparticules à la densité surfacique de récepteur pour un ciblage cellulaire efficace; (ii) Impact des lipides pH-sensibles sur les propriétés physico-chimiques des nanoparticules pour un échappement efficace de l'endosome.

2.3 Hypothèses de recherche et Objectifs spécifiques

2.3.1 Impact de la monocouche bimodale sur la sélectivité des nanoparticules à la densité surfacique de récepteur pour un ciblage cellulaire efficace

L'hypothèse de ce projet est qu'il est possible d'améliorer l'adsorption sélective à la densité surfacique de récepteur des nanoparticules en fonctionnalisant la surface des nanoparticules avec une monocouche bimodale. Cette hypothèse sera prouvée en se basant sur un modèle biomimétique de l'interface nanoparticule-cellule. Pour cela, les objectifs spécifiques de ce projet consistent à: (i) préparer et caractériser les nanoparticules d'or fonctionnalisées avec une monocouche bimodale de polyéthylène glycol (PEG) comprenant un portant le ligand et l'autre n'étant pas fonctionnalisée; (ii) concevoir une série de surfaces de récepteur de la transferrine (TfR) à différentes densités surfaciques; (iii) évaluer l'adsorption d'une série de nanoparticules fonctionnalisées sur des surfaces de TfR à différentes densités surfaciques; (iv) déterminer l'impact de la longueur relative des chaînes de PEG et de la densité surfacique relative des chaînes de PEG sur la sélectivité des nanoparticules.

2.3.2 Impact de lipides pH-sensibles sur les propriétés physico-chimiques des nanoparticules pour un échappement efficace à l'endosome

L'hypothèse de ce projet est qu'il est possible de mieux comprendre le processus par lequel les LNPs bascules pH-sensibles déstabilisent les membranes lipidiques. Cette hypothèse sera vérifiée en étudiant l'influence des lipides bascules et du pH sur les propriétés physico-chimiques des nanoparticules lipidiques et des mélanges lipidiques. Pour cela, les objectifs spécifiques de ce projet consistent à: (i) préparer des nanoparticules lipidiques et des mélanges lipidiques en incorporant les lipides bascules pH-sensibles; (ii) évaluer les propriétés physico-chimiques (à savoir le comportement de phase/thermique/thermodynamique, la morphologie, la taille, la charge surfacique, la perméabilité membranaire) de ces systèmes dans différentes conditions de pH; (iii) déterminer l'impact de lipides bascules pH-sensibles et du pH sur ces propriétés; (iv) proposer un mécanisme de déstabilisation membranaire des LNPs bascules pH-sensible.

2.3.3 Structure de la thèse

La thèse est constituée de deux manuscrits dont un a été soumis et le deuxième est en préparation au moment de rédaction de cette thèse. Cette thèse est structurée en sept chapitres :

Le chapitre 1 présente une revue de littérature sur le ciblage sélectif à base de nanoparticules.

Le chapitre 2 présente l'objectifs, l'hypothèse de recherche et la structure de la thèse.

Le chapitre 3 présente l'étude de l'efficacité de la monocouche bimodale dans l'amélioration de la sélectivité en densité surfacique de récepteurs des nanoparticules en utilisant un modèle biomimétique de l'interface nanovecteur-cellule. Cette étude a fait l'objet d'un article qui a été soumis sous le titre « *To Bind or Not to Bind: Bimodal Tether-Functionalized Nanoparticles Selective to Receptor Surface Density* » à Proceedings of the National Academy of Sciences (le 15 mai 2022).

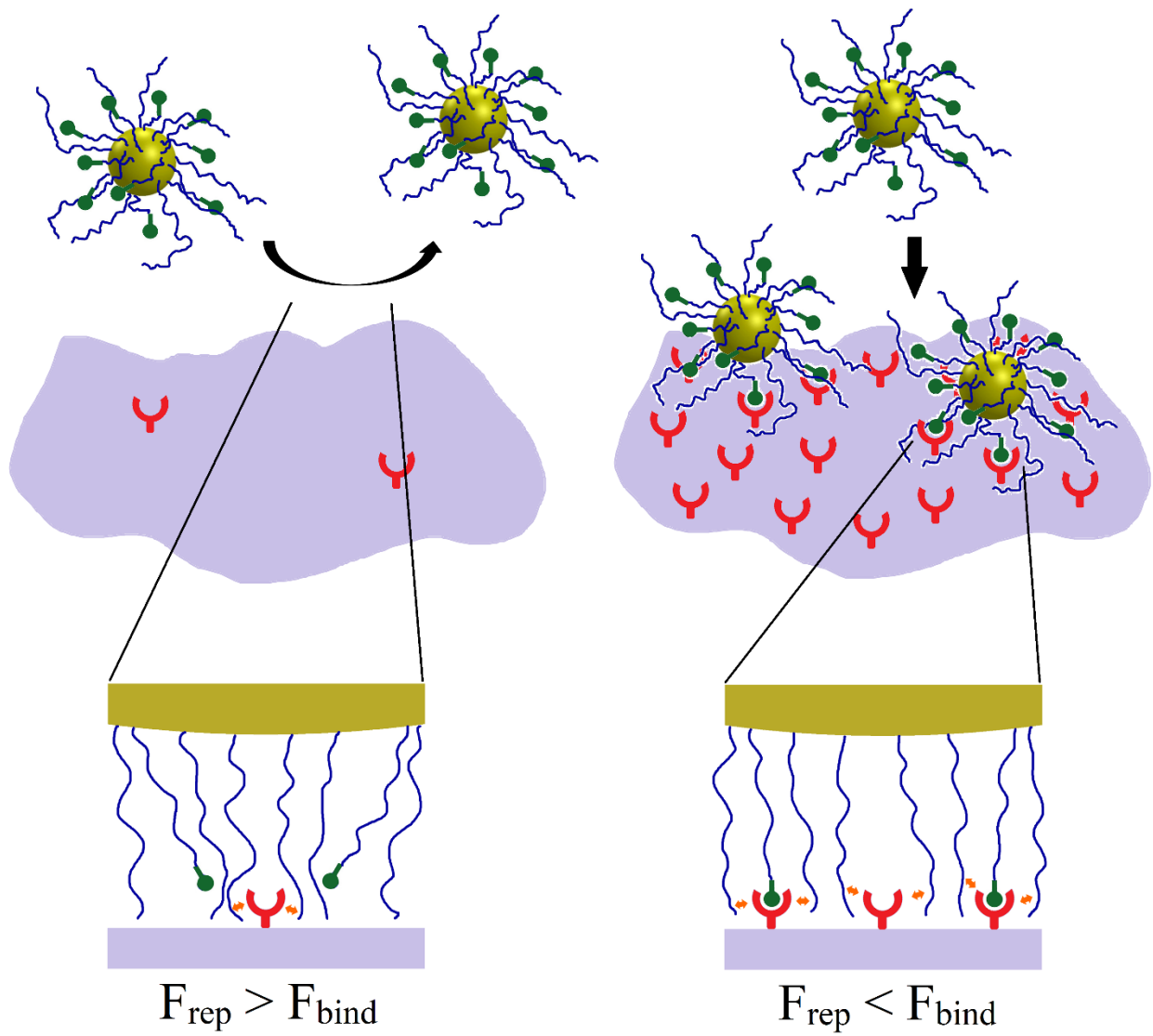
Le chapitre 4 présente l'étude de l'efficacité de la monocouche bimodale stimulable dans l'amélioration de la sélectivité en densité surfacique de récepteur.

Le chapitre 5 présente l'étude de l'influence des lipides bascules et du pH sur les propriétés physico-chimiques des nanoparticules lipidiques contenant un lipide innovant pH-sensible. Cette étude a fait l'objet d'un article en préparation sous le titre « *pH-Switchable lipids : from molecular switch to macroscopic changes in lipid vesicles* ».

Les chapitres 6 et 7 discutent de la portée générale des résultats obtenus de cette thèse pour le développement et la conception des nanoparticules à ciblage sélectif. Il présente plusieurs voies de recherche possibles.

Chapitre 3

Adsorption sélective à la densité surfacique de récepteur



To Bind or Not to Bind: Bimodal Brush-Functionalized Nanoparticles Selective to Receptor Surface Density

Huu Trong Phan^a, Dominic Lauzon^b, Alexis Vallée-Bélisle^b, Stefano Angioletti-Uberti^c, Jeanne Leblond Chain^{a,d,*}, Suzanne Giasson^{a,b,*}

^aFaculty of Pharmacy, University of Montréal, Montréal, H3C 3J7, Canada; ^bDepartment of Chemistry, University of Montréal, Montréal, H3C 3J7, Canada; ^cDepartment of Materials, Imperial College London, London, UK; ^dUniversity of Bordeaux, CNRS, INSERM, ARNA, UMR 5320, U1212, F-33000 Bordeaux, France.

Abstract

Nanoparticles or drug carriers which can selectively bind to cells expressing receptors above a certain threshold surface density are very promising for targeting cells overexpressing specific receptors under pathological conditions. Simulations and theoretical studies have suggested that such selectivity can be enhanced by functionalizing nanoparticles with a bimodal polymer monolayer (BM) containing shorter ligated chains and longer inert protective chains. However, a systematic study of the effect of these parameters under tightly controlled conditions is still missing. Here, we develop well-defined and highly specific platforms mimicking particle-cell interface using surface chemistry to provide a definitive answer. Using Surface Plasmon Resonance and Atomic Force Microscopy, we report the selective adsorption of BM-functionalized nanoparticles and especially, the selective behavior is considerably enhanced by using a BM with longer protective chains. Furthermore, a model is also developed to describe the repulsive contribution of the protective brush to nanoparticle adsorption. This model is combined with super-selectivity theory to support experimental findings and shows that the observed

selectivity is due to the steric energy barrier which requires a high number of ligand-receptor bond to allow nanoparticle adsorption. Finally, the results show how the relative length and molar ratio of two chains can be tuned to target a threshold surface density of receptors and thus lay the foundation for the rational design of BM-functionalized nanoparticles for selective targeting.

Significance Statement

This work provides the first detailed experimental evidence of recent simulations showing that the selectivity of nanoparticle-cell interactions can be improved by introducing an extra steric repulsion provided by a protective polymer brush shielding ligands. The repulsion contribution is experimentally tuned by adjusting the surface density and molecular weight of the protective polymer. This repulsion makes the nanoparticle adsorption more selective to the variation in receptor surface density. Our study suggests a way to facilitate the design of supramolecular constructs that exhibit desired super-selectivity at a programmable surface density of receptors.

3.1 Introduction

Engineering of drug delivery vehicles that selectively target affected cells while ignoring healthy ones has been a primary goal and remains a challenging task in nanomedicine (11). Multivalent nanoparticles, nanoparticles being surface-functionalized with several identical ligands attached to flexible and inert linkers (called ligated chains), are engineered to target cell surfaces overexpressing a specific receptor (133). The multivalent interactions between such functionalized nanoparticles and cell surfaces expressing a specific type of receptor are mediated by the simultaneous binding of several ligands (of the same type) to several receptors (of the same type) (129). Such multivalent interactions play a critical role in numerous biological processes (129, 173) and in the fate of nanomedicines in biological media (133, 174) thanks to their super-

selectivity (129, 130). Super-selectivity is defined as the supra-linear growth in nanoparticle adsorption as a function of receptor surface density (128). Such dependence to receptor surface density is indeed highly beneficial to selective targeting of cells surfaces expressing receptors above a given threshold surface density. The theoretical rationale for the super-selectivity of multivalent nanoparticles is that the number of possible ligand-receptor binding arrangements increases in a highly nonlinear manner with the receptor surface density due to combinatorial entropy (115, 128). Interestingly, a previously reported statistical mechanical description of this phenomenon shows that the super-selectivity is enhanced when the ligand-receptor affinity decreases (128, 140, 175, 176). The results have been validated by experimental data (134, 139, 176-178), Monte Carlo simulations (140, 179, 180) and other theoretical studies (115, 175, 178, 179, 181-183), which fostered multivalent nanoparticles for the development of targeted drug delivery (133, 184).

Recent theoretical works have demonstrated that the super-selectivity can be enhanced by coating multivalent nanoparticles with a bimodal polymer monolayer (BM) with shorter ligated chains and longer protective chains. In this scenario, a repulsive potential of a steric nature (between the protective chains and the receptors) must be overcome to allow the adsorption of the nanoparticles on the receptor surface. This repulsion can be used to reduce the apparent ligand/receptor affinity and achieve an affinity conducive to super-selectivity (139-141). However, experimental evidence on the binding selectivity of BM is somehow limited.

In this work, a combination of experiments and analytical modelling are used to assess the efficiency of bimodal brush-functionalized nanoparticles (GNPs) in improving the adsorption selectivity (**Figure 3.1A**). To this end, well-defined experimental systems biomimicking multivalent nanoparticle-cell surface adsorption are developed based on ligand-receptor

interactions (**Figure 3.1B, C**). The extracellular domain of the mouse transferrin receptor (TfR, monomer, $M_w = 78.3$ KDa) is used as receptor since TfR is extensively studied for cancer targeting due to its overexpression on several cancer cells and its ability to trigger internalization of nanoparticles (185). The aptamer DW4 serves as a ligand to bind TfR, with moderate affinity ($K_d = 190$ nM) and specificity in TfR recognition (186). To quantify the GNPs adsorption on TfR surfaces, surface plasmon resonance technique (SPR) and atomic force microscopy (AFM) imaging were used. Furthermore, a analytical model describing GNPs adsorption from a solution to receptor-functionalized surfaces is built by adapting a previously reported model. Finally, the effect of the repulsive potential provided by the protective chains on the selectivity toward the receptor surface density is elucidated.

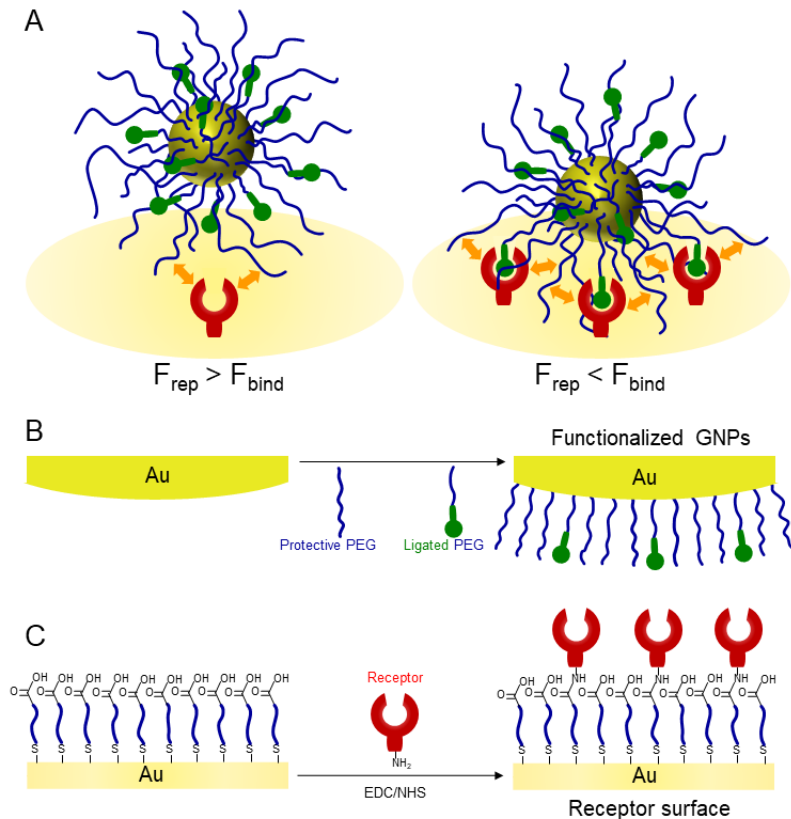


Figure 3.1. (A) Schematic illustration of the main hypothesis of this work. Protective PEG chains offer steric repulsion (\leftrightarrow) to modulate the ligand-receptor binding. Proper tuning of this repulsion enables the selective adsorption of nanoparticles to surface density of receptors. To model multivalent nanoparticle-cell surface interaction, we designed (B) bimodal brush-functionalized gold nanoparticles (GNPs) through thiolated-gold covalent bond and (C) receptor surfaces via peptide coupling.

3.2 Results and Discussion

To model nanoparticle surfaces, spherical gold nanoparticles (GNPs) were surface-functionalized with a bimodal brush of protective polyethylene glycol (PEG) and ligand-bearing (ligated) PEG. The GNPs were selected because of the relative ease of surface functionalization (187) as well as their relevance to simulations using hard spheres (140). Citrate-capped gold

nanoparticles (bare GNPs) were first synthesized and characterized by TEM. The GNPs exhibited a spherical shape (circularity 0.9 ± 0.02) of 14.7 ± 0.8 nm diameter with a narrow size distribution (**Figure S3.1A, B**). GNPs were then surface-functionalized with two end-functionalized polymers (SH-PEG and SH-PEG-DW4) through thiolated-gold bond (Au-S). The protective PEG is chosen to provide shielding properties and the PEG-DW4 to target the transferrin receptors (186). Since Au-S bond can undergo oxidation when exposed to light, air or at elevated temperature (188), the stability of grafted PEG_{2K} on GNP was investigated in typical storage conditions. 67% of PEG_{2K} chains dissociated from GNPs surface after 20 days when stored at 4°C in dark air atmosphere; while the number of PEG_{2K} chains was maintained for at least 20 days when stored at 4°C in dark and under argon (**Table S3.1**). Therefore, the functionalized GNPs were systematically stored in the latter conditions.

The extent of surface-functionalization of the GNPs was indirectly assessed by measuring the particle size variation upon polymer grafting and through absorbance in UV-Vis. The size of all polymer-functionalized GNPs is significantly larger than that of the bare GNPs (**Figure S3.1C** and **Table S3.1**). Importantly, the polydispersity index (PDI) remained low ($PDI < 0.25$) in all samples, suggesting a relatively homogeneous functionalization. In addition, the polymer-coated GNPs induced a red shift (~ 4 -7 nm) in the plasmon adsorption band due to the change in the dielectric constant at the nanoparticle surface (**Figure S3.1D** and **Table S3.1**).

Table 3.1. Characterization of GNPs functionalized with PEG/PEG-DW4 monolayers. Hydrodynamic diameter (D_h), Polydispersity index (PDI), plasmon adsorption band (λ_{SPR}). The error (\pm) is the standard deviation from free independent experiments.

Functionalized gold nanoparticles Abbreviation ^{a)}	PEG Mw (g/mol)	$\Phi_{PEG/GNPs}^b$ (chain/ particle)	$N_{PEG-DW4}^c$ (chain/ particle)	N_{PEG}^c (chain/ particle)	βF_{rep}^d (per-receptor quantity)	DLS		λ_{SPR} UV-Vis (nm)
						D_h (nm)	PDI	
Bare GNPs		-	-	-		21 ± 2	0.11 ± 0.03	518.0
GNPs-5K	PEG: 5000	-	-	-		45 ± 2	0.12 ± 0.02	523.0
GNPs-3KDW4	PEG-DW4: 3000	-	-	-		43 ± 1	0.13 ± 0.02	522.4
GNPs-2K ₁ -3KDW4	PEG: 2000 PEG-DW4: 3000	58	37 ± 4	41 ± 2	0	38 ± 1	0.15 ± 0.02	523.5
GNPs-2K ₂ -3KDW4		116	38 ± 1	95 ± 12		40 ± 1	0.14 ± 0.03	524.0
GNPs-2K ₄ -3KDW4		232	36 ± 3	153 ± 2		39 ± 3	0.13 ± 0.02	524.0
GNPs-5K ₁ -3KDW4	PEG: 5000 PEG-DW4: 3000	58	39 ± 4	36 ± 2	0.052 ± 0.005	48 ± 1	0.18 ± 0.03	523.5
GNPs-5K ₂ -3KDW4		116	36 ± 3	69 ± 1	0.167 ± 0.003	52 ± 1	0.11 ± 0.02	524.5
GNPs-5K ₄ -3KDW4		232	40 ± 3	149 ± 8	0.608 ± 0.05	48 ± 2	0.12 ± 0.02	525.0
GNPs-2K ₁ -1KDW4	PEG: 2000 PEG-DW4: 1000	58	40 ± 2	41 ± 5	0.065 ± 0.015	31 ± 1	0.11 ± 0.02	522.0
GNPs-2K ₂ -1KDW4		116	43 ± 6	87 ± 2	0.279 ± 0.017	30 ± 1	0.09 ± 0.02	523.0
GNPs-2K ₄ -1KDW4		232	40 ± 4	165 ± 3	0.916 ± 0.035	32 ± 1	0.14 ± 0.03	522.0
GNPs-5K ₁ -1KDW4	PEG: 5000 PEG-DW4: 1000	58	38 ± 2	44 ± 1	0.759 ± 0.025	46 ± 3	0.17 ± 0.03	523.5
GNPs-5K ₂ -1KDW4		116	41 ± 1	80 ± 8	2.125 ± 0.350	43 ± 2	0.23 ± 0.02	523.5
GNPs-5K ₄ -1KDW4		232	40 ± 3	137 ± 7	5.179 ± 0.451	48 ± 2	0.23 ± 0.04	524.0

^{a)} e.g., GNPs-2K₁-3KDW4 indicates GNP functionalized with PEG_{2K} and PEG_{3K}-DW4, with $\Phi_{PEG/GNPs} = 58$ and $\Phi_{PEG-DW4/GNPs} = 58$;

^{b)} $\Phi_{PEG/GNPs}$ is the PEG-to-GNPs feeding ratio, the PEG-DW4-to-GNPs feeding ratio $\Phi_{PEG-DW4/GNPs}$ is fixed at 58 chain/particle;

^{c)} $N_{PEG-DW4}$ and N_{PEG} are calculated from NMR, Fluorimetry and UV-vis results (see sections 3.5.2.2, 3.5.2.6 and Figure S3.13);

^{d)} βF_{rep} (per-receptor quantity) is calculated using set of Equations (10-18) with $N_R = 1$ (Theoretical model of GNPs adsorption).

As expressed in set of Eq. (10-18) (theoretical model), the magnitude of the steric repulsion (βF_{rep}) is related to four main parameters of GNPs: the numbers of protective PEG and ligated PEG chains grafted on GNPs surface, N_{PEG} and $N_{PEG-DW4}$, respectively; the numbers of ethylene glycol units in protective PEG and ligated PEG chains, n_{PEG} and $n_{PEG-DW4}$, respectively. In the present study, the magnitude of βF_{rep} was tuned by three parameters N_{PEG} , n_{PEG} and $n_{PEG-DW4}$ keeping $N_{PEG-DW4}$ constant. PEG of different M_w (2 and 5 KDa) and PEG-DW4 of different M_w (1 and 3 KDa) were

used to modulate n_{PEG} and $n_{\text{PEG-DW4}}$. To keep $N_{\text{PEG-DW4}}$ constant while modulating N_{PEG} , the GNPs were functionalized with a fixed PEG-DW4-to-GNPs feeding ratio ($\Phi_{\text{PEG-DW4/GNPs}}$) of 58 chains/particle and an increasing PEG-to-GNPs feeding ratio ($\Phi_{\text{PEG/GNPs}}$) from 58 to 232 chains/particle. The total of $\Phi_{\text{PEG-DW4/GNPs}}$ and $\Phi_{\text{PEG/GNPs}}$ is much lower than that required for fully covering the surface (experimentally determined at ~ 2500 chains/particle for GNPs diameter of 15 nm (189)). Note that the composition of mixed thiol monolayer grafted on the surface of metal nanoparticles is expected to match their composition in the feeding solution when the total amount of both polymers in the feeding solution is **lower than one monolayer coverage** (190). As expected, GNPs were successfully functionalized with PEG and PEG-DW4 of various M_w and the parameter N_{PEG} was finely controlled by adjusting $\Phi_{\text{PEG/GNPs}}$ during functionalization. Increasing $\Phi_{\text{PEG/GNPs}}$ led to an increase in N_{PEG} . In addition, $N_{\text{PEG-DW4}}$ was nearly constant (~ 40 PEG-DW4 chains per particle) (**Table 3.1**). In summary, a library of polymer functionalized-GNPs with comparable physical characteristics (core size, PDI, λ_{SPR} , hydrodynamic diameter, $N_{\text{PEG-DW4}}$) was prepared, exhibiting a range of βF_{rep} values (0.05 to 5.17) (**Table 3.1**).

To mimic cell membranes expressing various receptor surface densities, a set of self-assembled polymer monolayers (SAMs) functionalized with various amounts of transferrin receptors (TfR) were prepared. SAMs of SH-PEG_{2K}-COOH were first formed on flat gold surfaces through S-Au bonds providing an available functional group (-COOH) for immobilizing TfR via peptide coupling (with the primary amine of lysine residues). The surface density of receptors (Γ_{TfR}) was tuned by the reaction time (between 1 and 60 min), and monitored in real time using SPR. Using this approach, Γ_{TfR} varies from 0.86 to 7.97×10^3 molecules/ μm^2 , depending on the coupling reaction time (**Figure 3.2A** and **Table S3.2**).

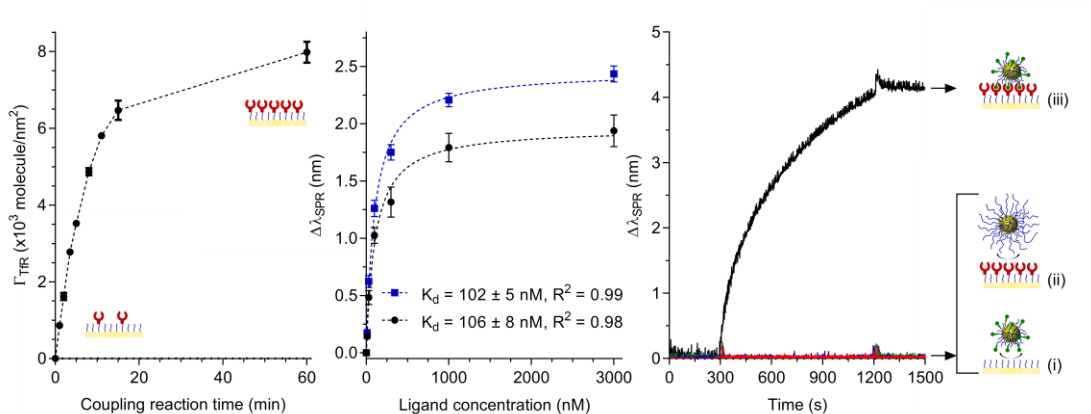


Figure 3.2. Characterization of transferrin receptor (TfR) -functionalized surfaces. (A) Receptor surface density (Γ_{TfR}) at different coupling reaction times. The receptor density (Γ_{TfR}) was then calculated from λ_{SPR} shift ($\Delta\lambda_{SPR}$) using the Jung et al.’s Equation (191) (Section 3.5.2.7). The dash black line is a guide for the eyes, the SPR raw data is present in Table S2. (B) Determination of the dissociation equilibrium constant (K_d) between TfR and DW4 aptamer ligand using SPR binding analysis. λ_{SPR} shifts (nm) at equilibrium are plotted versus DW4 (■) or DW4-PEG3K (●) concentration. Fitting curves (solid and dashed lines) and K_d values were obtained from fitting the experimental data to binding saturation (one site – specific binding) model using Graphpad prism software. Error bars represent the standard deviation of the means of SPR measurements of three sensing areas on three independent samples. SPR sensorgrams of TfR60 surface exposed to increasing concentrations of DW4 or DW4-PEG3K are reported in Figure S3.2. (C) SPR sensorgrams of PEG functionalized surfaces exposed to GNPs-2K-3KDW4 (red), to GNPs-5K-3KDW4 (blue) (i); TfR60 surfaces exposed to GNPs-2K (green), to GNPs-5K (violet) (ii) and TfR60 surfaces exposed to GNPs-2K-3KDW4 (black) (iii). #

To assess the binding interaction between DW4 free in solution and the surface-immobilized TfR, the dissociation constants (K_d^{sol}) of TfR60 surface with either DW4 or with PEG_{3K}-DW4 were determined in aqueous solutions (PBS pH 7.4 buffer containing MgCl₂ 1 mM, PBS-M) using SPR.

Both DW4 and PEG_{3K}-DW4 exhibited similar K_d^{sol} values (106 ± 8 and 102 ± 5 nM respectively, **Figure 3.2B**) suggesting that tethering DW4 on a PEG chain does not affect the DW4/TfR interaction. These values are also consistent with the K_d reported in the literature for the same DW4/TfR couple in solution (190 nM) (186), confirming that immobilizing TfR on a substrate does not significantly impact the TfR/ligand binding. It is worth mentioning that when DW4 is tethered via a PEG chain, its interaction with TfR is expected to be more reversible due to the configuration entropy (section 3.5.2.10). The theoretical dissociation constant when DW4 is grafted on GNPs surface k_{off}^{graft} is 7.4×10^4 s⁻¹, corresponding to a bond lifetime of 14 microseconds. This lifetime is much shorter than the experimental timescale (15 min). Therefore, we infer that bonds can re-arrange and are in equilibrium under our experimental conditions, in which superselectivity has been shown to be possible.

To assess the specificity of DW4-bearing GNPs toward TfR surfaces, a series of controls was conducted using SPR to monitor the GNPs adsorption. Binding tests of GNPs/surfaces of different configurations in absence of TfR/DW4 couple (negative control) were compared with similar tests in the presence of TfR/DW4 couple (positive control) (**Figure 3.2C**). As expected, a noticeable adsorption ($\Delta\lambda_{SPR}$ of 4.2 nm) was observed only when TfR-functionalized surfaces (TfR60) were exposed to DW4-bearing GNPs. Importantly, no adsorption (no $\Delta\lambda_{SPR}$) was detected when PEG-functionalized surfaces were exposed to DW4-free or DW4-bearing GNPs, neither when TfR-functionalized surfaces were exposed to DW4-free GNPs, confirming the absence of GNPs adsorption in the absence of the TfR/DW4 couple. Moreover, Ref. (192) showed that nanoparticles functionalized with a negative control sequence of DW4 (GS24mt) are unable to recognize TfR. It is therefore relevant to conclude that the adsorption of DW4-bearing GNPs on the TfR surfaces

is driven solely by the specific TfR/DW4 interactions. Similar experiments performed using AFM imaging to detect the adsorbed GNPs support this conclusion (**Figure S3.3**).

To quantify the selectivity of nanoparticles toward the receptor surface density, the selectivity parameter α introduced by Martinez-Veracoechea and Frenkel (128) was used :

$$\alpha \equiv \frac{d \ln \Gamma_{\text{NP}}}{d \ln \Gamma_{\text{TfR}}} \quad (1)$$

The parameter α refers to the relative change in the number of adsorbed nanoparticles (Γ_{NP} , number of particles per μm^2 ($\text{NP}/\mu\text{m}^2$)) in response to the variation in the number of receptors on a cell (Γ_{TfR} , molecule/ μm^2). A system is considered as highly selective or super-selective when $\alpha > 1$ (128). When the parameter α reaches at maximum value (α_{max}), the corresponding receptor density is defined as the onset density (Γ_{onset}). It is worth mentioning that around Γ_{onset} , a slight variation in Γ_{TfR} leads to a supralinear change in Γ_{NP} (139). The adsorption of GNPs in response to the variation in Γ_{TfR} was investigated using SPR for two formulations: GNPs-5K4-3KDW4 and GNPs-2K4-3KDW4 as representative for bimodal monolayers with unfunctional PEG that are longer and shorter, respectively, than the ligated PEG. The GNPs adsorption (Γ_{NP}) and the corresponding selectivity (α) as a function of Γ_{TfR} are illustrated in **Figure 3.3**.

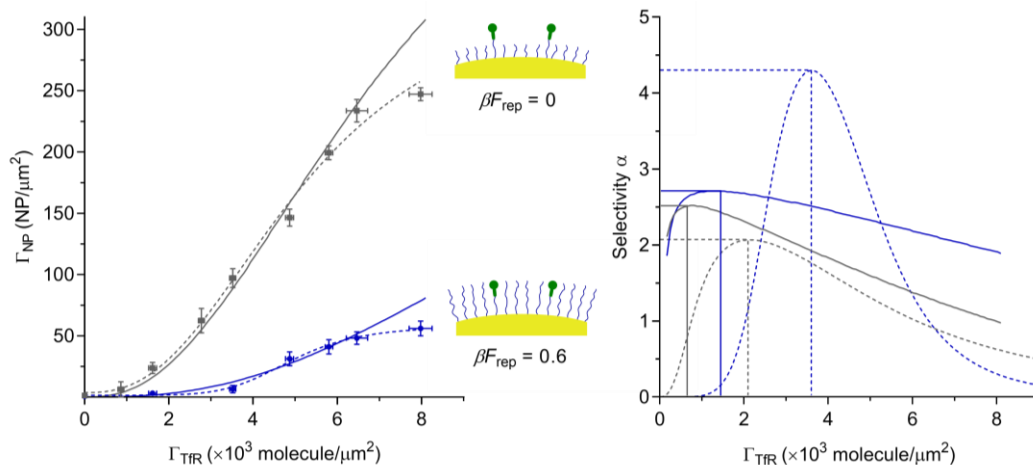


Figure 3.3. (A) GNPs adsorption Γ_{NP} , measured by SPR (see section 3.5.2.8 for details on Γ_{NP} determination from SPR results and see Figure S3.4 for SPR sensorgrams), as a function of Γ_{TIR} for GNP-2K₄-3KDW4 (-■-) and GNP-5K₄-3KDW4 (-●-), error bars represent the standard deviation of the means of SPR measurements of three sensing areas on three independent samples. The fitting curves of experimental data is a four-parameter dose-response curve obtained by using Graphpad prism (R^2 are 0.99 and 0.95 respectively). The fitted theoretical curves of GNP-2K₄-3KDW4 (—) and GNP-5K₄-3KDW4 (—) are generated by the theory, as described in Materials and Methods. The value of the two fitting constants are $C = 5/2$ and $\beta\Delta G_{conf} = 13.5$, $R^2 = 0.96$. (B) Calculated selectivity parameter α using Equation 1, from the fitting and theoretical curves from A. Horizontal and vertical lines intersect the ordinate axis at α_{max} and the abscissa axes at Γ_{onset} , respectively.

Γ_{NP} of both GNPs formulations is responsive to Γ_{TIR} and two regimes can be identified. At $\Gamma_{TIR} < \Gamma_{onset}$, the Γ_{NP} is negligible and does not vary with Γ_{TIR} . However, it increases greater than linearly (supralinearly) above Γ_{onset} . This observed behavior demonstrates that both bimodal systems exhibit a certain degree of super-selectivity, thanks to the multivalency effect (115, 128). The GNP-5K₄-3KDW4 exhibits a lower adsorption but a higher selectivity (higher Γ_{onset} and α_{max})

compared to GNPs-2K₄-3KDW₄. The only variable between these two GNPs formulations is the M_w (length) of protective PEG (5 kDa versus 2 kDa). Hence, the enhanced selectivity is likely due to the presence of longer protective PEG, in a good agreement with Monte Carlo simulation (140, 141) and recent theoretical prediction (139). The “near-plateau” region observed for both systems is likely due to the fact that at some point once the maximum number of adsorbed particles is reached, no one else can because of the excluded volume effect. From **Figure 3.3**, we also notice that the adsorption curve for GNPs-5K₄-3KDW₄ saturates lower level than that for GNPs-2K₄-3KDW₄. Firstly, the excluded volume of PEG brush on GNPs-5K₄-3KDW₄ is expected to be larger than that on GNPs-2K₄-3KDW₄ because of the larger shell of protective PEG chains (PEG_{5K} versus PEG_{3K}) (193), leading to a lower maximum number of particles adsorbed. Secondly, considering the adsorption of multivalent nanoparticles covered with a protective polymer brush (as our GNPs), there is always a maximum (sometimes mistaken for a plateau) that can be reached, afterward, the adsorption is expected to decrease with increasing receptor surface densities due to the steric repulsion. When the protective polymer is longer (in our case, PEG_{5K} versus PEG_{3K}), the repulsion is stronger and subsequently, the maximum adsorption is observed at a lower level and arises at lower surface density of receptor (182). The SPR sensorgrams of GNPs adsorption are shown in **Figure S3.4**. Adsorbed GNPs do virtually not desorb after rinsing with buffer. The observed phenomenon is likely due to the multivalent nature of GNPs adsorption. In multivalent systems, the probability that all bonds are broken at the same time decays exponentially with the number of bonds as $p^{(N_L)}$ (p being the probability to be unbound and N_L being the number of ligands that can form bond with the receptor surface, which is ~ 10 for our systems (see Eq. 21)) (194), and thus can be small for multivalent constructs where $N_L > 1$, leading to irreversibility even when the single bonds are instead reversible. This is a fact that has been

experimentally confirmed for other multivalent systems, *e.g.*, the work of Dubacheva et al (178, 181) where irreversible multivalent adsorption is reported at timescales where the single bond was reversible.

To rationalize the experimental selectivity of GNPs, a predictive model for the adsorption behavior of the nanoparticles was developed by adapting a model previously described (139, 182), which is an extension of Martinez-Veracoechea and Frenkel model (128). This model is described in detail in **Materials and Methods**. The solid lines in **Figure 3.3A** are the result of a fit to the experimental data (the adsorption curves of GNPs-5K₄-3KDW4 and GNPs-2K₄-3KDW4) with the model using two adjustable parameters: the dimensionless scaling factor C and the configurational bond penalty $\beta\Delta G_{conf}$. This analytical model is based on a simplified coarse-grained description and is not expected to capture all details of the experimental systems, however, semi-quantitative, or at least qualitative agreement can be expected. For example, the model ignores allosteric cooperative effects (195) by assuming that individual ligand-receptor bonds form independently. It also excludes the effect of ligand size on the repulsion of the polymer brush. Nevertheless, **Figure 3.3** shows a good agreement between the experimental results and the modelling predictions. In particular, the theoretical model quantitatively reproduces the drop in GNPs adsorption of GNPs-5K₄-3KDW4, compared to GNPs-2K₄-3KDW4 and qualitatively captures the increase in selectivity of GNPs adsorption (higher Γ_{onset} and α_{max}) of GNPs-5K₄-3KDW4, compared to GNPs-2K₄-3KDW4. In addition, the obtained values of the two fitting parameters $C = 5/2$, and $\beta\Delta G_{conf} = 13.5$ are within the expected order of magnitude. For example, $\beta\Delta G_{conf}$ of ethylene glycol linker in DNA-coated colloids is found to be $\sim 12.6 - 15.7$ (196). The agreement between the experimental and theoretical results provides additional evidence on the selectivity enhancement of the longer protective PEG. The long protective chains provide a repulsive barrier that nanoparticles must

overcome to interact with receptor surfaces. A larger Γ_{onset} is required to provide a sufficient attraction between the GNPs and the receptor to overcompensate this steric barrier, hence favoring nanoparticle adsorption. Above the Γ_{onset} , the attraction generated by the formation of ligand-receptor bonds increases supralinearly with the receptor surface density Γ_{TfR} . Consequently, the nanoparticle adsorption is highly selective to receptor surface density.

To further investigate the effect of the repulsive potential (βF_{rep}) on the selectivity, the adsorption of various GNPs (exhibiting different βF_{rep} values) was measured for two representative TfR surfaces: one with low coverage (TfR5, $\Gamma_{\text{TfR}} = 3.52 \times 10^3$ molecules/nm²) and the other with high coverage (TfR60, $\Gamma_{\text{TfR}} = 7.98 \times 10^3$ molecules/nm²) (**Figure 3.2** and **Table S3.2**). The GNPs adsorption data and the fitting curves are shown in **Figure S3.5**. A selectivity parameter $\alpha_{\text{TfR60-TfR5}}$ was calculated based on Eq. (1) using two Γ_{TfR} values. $\alpha_{\text{TfR60-TfR5}}$ represents the ability of GNPs to selectively discriminate the TfR60 surface from the TfR5 one. The parameter $\alpha_{\text{TfR60-TfR5}}$ was plotted as a function of the number of protective PEG chains on GNPs surface N_{PEG} , the number of ethylene glycol units in protective PEG n_{PEG} and the repulsive potential βF_{rep} (**Figure 3.4**). Note that the magnitude of βF_{rep} increases with increasing N_{PEG} or n_{PEG} (see equation set (10-18) and **Figure S3.7**).

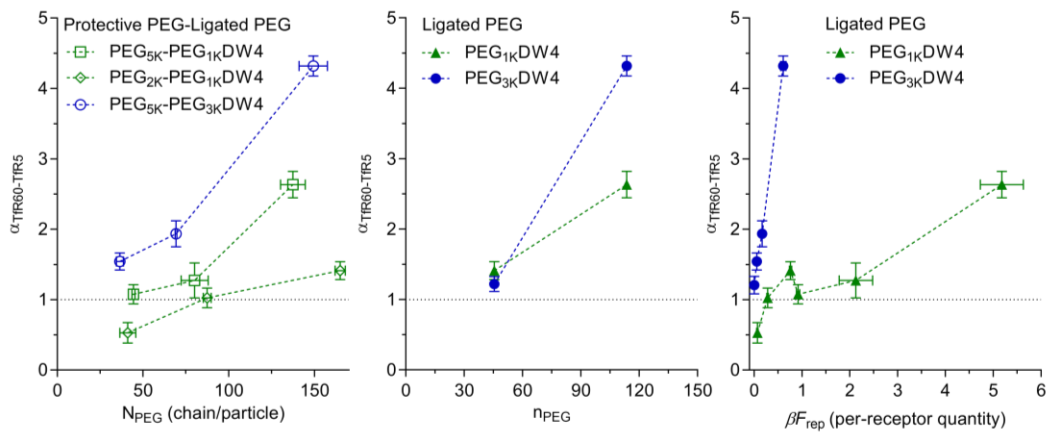


Figure 3.4. Effect of the number of protective PEG chains on GNPs surface N_{PEG} (A), the number of ethylene glycol units in protective PEG n_{PEG} (B) and the repulsion βF_{rep} (C) (see Table 1) on the parameter $\alpha_{\text{TfR60-TfR5}}$. The number of adsorbed GNPs was measured by AFM (see Table S3 for AFM height images). GNPs adsorption for PEG_{3K}-DW4 and PEG_{1K}-DW4 system are presented in **Figure S3.5**. Error bars represent the standard deviation of the means of AFM measurements of three different areas on three independent samples. A comparison between SPR and AFM data shows no significant difference (**Figure S3.6**).

Figure 3.4 shows that an increase in N_{PEG} or n_{PEG} or βF_{rep} leads to an increase in $\alpha_{\text{TfR60-TfR5}}$ and this effect is stronger for longer ligated chains (PEG_{3K}-DW4 versus PEG_{1K}-DW4). As described in the theoretical model, the length of ligated chains affects the adsorption energy, for a specific length of ligated tether, the longer the chain, the stronger the attraction. When the ligated chains are long, the growth of the combinatorial entropy with receptor surface density is strong enough to overcome βF_{rep} , ensuring adsorption to receptor-functionalized surfaces of high coverage. In summary, the results confirm that it is experimentally possible to tune the selectivity of GNPs (TfR60 over TfR5) by adjusting the ligated chain length and the magnitude of βF_{rep} (by changing N_{PEG} , n_{PEG}). The selectivity increases with an increase in βF_{rep} and the longer the ligated chains,

the stronger the βF_{rep} effect. The increase in βF_{rep} shifts Γ_{onset} to a higher value. As shown in **Figure S3.5**, the GNPs systems with $\beta F_{\text{rep}} < 0.76$ exhibit a Γ_{onset} value lower than 3.52×10^3 molecules/nm² while these with $\beta F_{\text{rep}} > 2.1$ exhibit a Γ_{onset} value larger than 3.52×10^3 molecules/nm² (**Figure S3.5**).

It is relevant to mention some limitations of the present experimental models. The cell membrane was modelled using TfR-immobilized SAMs of PEG whereas natural cell membranes are known to display on their surface not only receptors but also some other polymers such as glycocalyx (197). Like protective chains, the glycocalyx chains can provide additional repulsive forces between the nanoparticles and the cell surface (139, 182). In addition, the elasticity and the curvature effect of the cells (198) are not taken into account in the cell membrane model. For a deformable surface, the interface between the nanoparticles and the receptor-functionalized surfaces can be convex-on-concave or convex-on-convex, depending on the overall interactions between the nanoparticles and the receptor surfaces. For convex-on-concave contact, the numbers of interacting ligand and receptors (N_L and N_R) will be larger than that for convex-on-flat contact and the reverse scenario for convex-on-convex contact. Consequently, both attractive and repulsive contributions will change in the same direction as that for a change in N_L and/or N_R . To address this point, experimental measurements of nanoparticle adsorption on cells, receptor-functionalized giant synthetic lipid vesicles or detailed theoretical modelling (199) would be required.

3.3 Conclusion

In conclusion, we have developed highly specific and tunable experimental systems modelling multivalent nanoparticle-cell surface adsorption. Using these systems in combination

with theoretical modelling, an unprecedented detailed and systematic experimental evidence on the selectivity of bimodal monolayer-functionalized nanoparticles towards the receptor surface density is demonstrated. This study confirms that a bimodal monolayer with longer protective chains provides a better selectivity (by increasing both the adsorption onset and the selectivity parameter α), compared to the one with shorter protective chains. As previously reported using simulation and theoretical modeling. A relationship between the repulsion due to protective chains and the selectivity was established and provides a practical guide to design nanoparticles for targeting specific receptor surface density. The presented approach is useful for the development of nanoparticle-based drug delivery systems or other applications such as cell sorting, detection of receptor surface density, and selective purification devices.

3.4 Materials and Methods

3.4.1 Theoretical model of GNPs adsorption

To rationalize the experimental selectivity of GNPs, a predictive model for the adsorption behavior of the nanoparticles was developed by adapting a model previously described (139, 182), which is an extension of Martinez-Veracoechea and Frenkel model (128). In this model, the probability of nanoparticle adsorption (θ) at a surface adsorption site can be written in the form of Langmuir-like expression (128, 139, 182):

$$\theta = \left\langle \frac{\rho_{NP} v_0 \exp[-\beta(F_{ads})]}{1 + \rho_{NP} v_0 \exp[-\beta(F_{ads})]} \right\rangle_{N_L, N_R}, \quad (2)$$

where $\langle \rangle_{N_L, N_R}$ is an average over a truncated Poisson distribution of ligands and receptors on the adsorption sites, centered on the average values \bar{N}_L, \bar{N}_R , calculated by Eq. 21 and 23. Note that the truncation is used to ensure that the number of bound receptors can be at most the value achievable

N_{\max} . N_{\max} is calculated assuming that receptors are disk and perfectly pack on the surface. ρ_{NP} is the bulk concentration of nanoparticles in solution and $v_0 \approx A_{\text{site}}L$ is the so-called adsorption volume, *i.e.*, the volume within which a particle is considered as bound to the surface and L is the localization distance at which ligands can bind to receptors, A_{site} is the area of an adsorption site, which is calculated as:

$$A_{\text{site}} = \pi \eta_{\text{crit}}^{-1} (R_{\text{eff}})^2 \quad (3)$$

where $\eta_{\text{crit}} \approx 0.547$ is the packing fraction spheres adsorbing on a flat surface through a random adsorption process and R_{eff} is the hydrodynamic radius taken from experiments. βF_{ads} is the adsorption free energy of two contributions (139, 182): the binding free energy βF_{bind} and the free energy penalty βF_{rep} . βF_{bind} is due to the formation of (multiple) ligand-receptor bonds, which is calculated using the “valence-limited interaction theory (VLIT)” (200, 201). VLIT has been shown to accurately reproduce Monte Carlo calculations for multivalent systems (200), in particular when the number of binders is much larger than two (139, 182, 202, 203), as the present GNPs. The expressions for βF_{bind} are (139):

$$\beta F_{\text{bind}} = \sum_{i=R,L} N_i \left[\ln p_i + \frac{1}{2} (1 - p_i) \right] \quad (4)$$

$$p_L = \frac{(N_L - N_R)\chi - 1 + \sqrt{4N_L\chi + [1 + (N_L - N_R)\chi]^2}}{2N_L\chi} \quad (5)$$

$$p_R = \frac{(N_R - N_L)\chi - 1 + \sqrt{4N_R\chi + [1 + (N_R - N_L)\chi]^2}}{2N_R\chi} \quad (6)$$

where $N_{L,R}$ is the number of interacting ligands or receptors and $\beta = 1/k_B T$ is the inverse thermal energy, k_B and T being the Boltzmann's constant and the absolute temperature, respectively. In Eq. 5 and 6, χ measures the strength of the bond and can be thought of as an effective binding constant for attached ligand-receptor pairs. In fact, as explained in Reference (201), χ is related to the standard binding constant measured in solution (K_{bind}^{sol}) for free ligand-receptor pairs by the following equations:

$$\Delta G^0 = -k_B T \ln(K_{bind}^{sol} \rho^{std}) \quad (7)$$

$$\Delta G_{bond} = \Delta G^0 + \Delta G^{conf} \quad (8)$$

$$\chi = \exp(-\beta \Delta G_{bond}) \quad (9)$$

where $\rho^{std} = 1M$ is the standard concentration. ΔG^{conf} measures a configurational bond penalty and depends on some details of the molecular construct (the length and flexibility of the attachment chains, their relative positions on the two surfaces and the surface separation) (201). Because estimating ΔG^{conf} is rather complex, it is left as one of the two fitting parameters. As presented below, the second fitting parameter is the dimensionless scaling factor C in the estimation of the free-energy penalty βF_{rep} .

The free-energy penalty βF_{rep} arises from the excluded volume interaction between the polymer brush and the receptor, *i.e.*, when the ligand is buried inside a polymer brush, the receptor must penetrate the brush for the binding. Halperin's model (204), which describes the βF_{rep} required to insert a protein in a polymer brush on a plane surface, was adapted to calculate βF_{rep} required when a protein penetrates the polymer brush on the curved surface of nanoparticles. Komura and Safran's model (205) was used to describe the height and the surface density of the

bimodal brush on the nanoparticle surface (curved). The Komura and Safran's model describes a bimodal blob brush made of two chemically equivalent polymers but with different lengths. The brush comprises two distinct regions: the lower brush and the upper brush as illustrated in **Figure 3.5**.

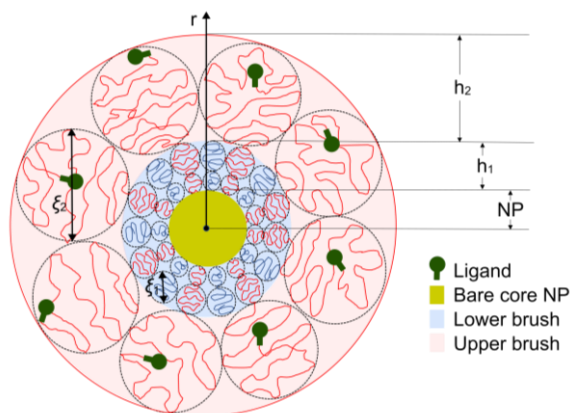


Figure 3.5. Schematic representation of a modified version of the bimodal brush blob model of Komura and Safran (205). The green squares represent the ligands, here attached to the longer (red) chains but can also be attached to the shorter (blue) chains, depending on the bimodal brush system. The brush is formed by two sets of chemically equivalent chains, but with different lengths, and thus comprise two distinct regions. The first region is for $R_{NP} < r < R_{NP} + h_1$, where all chains contribute to the brush, the lower brush. The second region is for $r > R_{NP} + h_1$, where only long chains are present, the upper brush. Circles correspond to so-called polymer “blobs”, introduced by De Gennes, and have a position dependent size ξ .

The height and the blob size for the lower brush:

$$\xi_1(r) = r \sqrt{\frac{4\pi}{N_{chains}}} \quad (10)$$

$$h_{flat,1} = n_S a^{\frac{1}{v}} \xi_1(r = R_{NP})^{\frac{v-1}{v}} \quad (11)$$

$$h_1 = R_{NP} \left[\left(1 + \frac{h_{flat,1}}{v R_{NP}} \right)^v - 1 \right] \quad (12)$$

and similarly, for the upper brush (i.e., for $r > R_{NP} + h_1$):

$$\xi_2(r) = r \sqrt{\frac{4\pi}{N_{long}}} \quad (13)$$

$$h_{flat,2} = (n_L - n_S) a^{\frac{1}{v}} \xi_2(r = R_{NP} + h_1)^{\frac{v-1}{v}} \quad (14)$$

$$h_2 = (R_{NP} + h_1) \left[\left(1 + \frac{h_{flat,2}}{v(R_{NP} + h_1)} \right)^v - 1 \right] \quad (15)$$

In Eq. (10-15), n_S and n_L are the numbers of monomers in the shorter and longer chains, respectively, a is the size of a monomer, v the Flory exponent and $N_{chains} = N_{short} + N_{long}$, where N_{long} and N_{short} are the numbers of long and short polymer chains grafted on the nanoparticle, respectively. For PEG chains in an aqueous environment, $a = 0.35$ nm and $v = 3/5$, which corresponds to the approximate value for PEG in a good solvent (206, 207). The blob size and the brush height were estimated without considering the effect of the ligand size and, therefore, are only approximations. These approximations are close to the real value for ligands having small excluded volume. Note that the number of ligands on GNPs surface is similar for all systems (~ 40 ligands/particle, **Table 3.1**), so the effect of the size of the ligand would be similar for all systems.

Therefore, Komura and Safran's model is not expected to capture all details of our experimental systems, but to give a trend prediction between different GNPs. Combining the parameters described in equations (10-15) with the Halperin model (204) and assuming that receptors must reach the attachment point of DW4 with PEG for the binding (see section 3.5.2.11 and **Figure S3.8**), the repulsive free-energy of the brush βF_{rep} when compressed by the presence of receptors can be calculated:

$$\beta F_{rep} = N_R f_{rep} = N_R C V_R \xi_2 (r = R_{NP} + h_1)^{-3} g \quad (16)$$

Where C is a dimensionless scaling factor originating from the scaling description of polymer brush, which is left as the second and final fitting constant and $V_R \approx 89 \text{ nm}^3$, the volume of the receptor (section S.2.8, SI). In Eq. 16, $\xi_2^{-3} g$ is the average value of the osmotic pressure over the volume of the receptor and given by:

$$g = \frac{3}{4R_R^3} \int_0^{2R_R} f(z) [R^2 - (z - R)^2], \quad (17)$$

with

$$f(z) = \begin{cases} \left[1 - \left(\frac{z}{h_2} \right)^2 \right]^{\frac{9}{4}}, & z < h_2 \\ 0, & z \geq h_2 \end{cases} \quad (18)$$

where $R_R \approx 2.8 \text{ nm}$ is the average radius of the receptor (section 3.5.2.9). Eq. 16 was derived for flat brushes (204) and is only approximate for spherical ones, providing the upper limit for βF_{rep} which becomes closer to the real value for smaller receptors, i.e., when $\frac{R_R}{R_{NP}} \xrightarrow{yield} 0$. Eq. 17 is also derived within the same assumption of a flat brush. It is important to highlight that this adapted

brush model does not only affect the repulsive contribution to the adsorption energy, but also the attractive part. Within the so-called blob description used to derive the Komura and Safran model, the position of the ligand attached at the end of the polymer chain can be localized within a distance $L \approx \zeta(r)$, calculated as:

$$L \approx \xi_2(r = R + h_1 + h_2) \quad (19)$$

for ligands attached to the longer chains and

$$L \approx \xi_1(r = R + h_1) \quad (20)$$

for ligands attached to the shorter chains, ξ_1 and ξ_2 are given by Eq. 10 and 13, respectively. The value of L is related to the average number of ligands that can interact with the receptors on the surface within the binding distance, \bar{N}_L and \bar{N}_R , used to determine βF_{bind} , see Eq. (4-6). According to the geometrical consideration for interacting area developed in Reference (182), \bar{N}_L and \bar{N}_R are approximately all those residing within the interacting area $A_{\text{int}}^{\text{lig}}$ and $A_{\text{int}}^{\text{rec}}$, respectively (**Figure S3.9**) and can be approximated as:

$$\bar{N}_L = A_{\text{int}}^{\text{lig}} \sigma_L \quad (21)$$

$$A_{\text{int}}^{\text{lig}} = 2\pi(R_{\text{NP}} + h)L \quad (22)$$

$$\bar{N}_R = A_{\text{int}}^{\text{rec}} \sigma_R \quad (23)$$

$$A_{\text{int}}^{\text{rec}} = \pi[(R_{\text{NP}} + h)^2 - (R_{\text{NP}} + h - L)^2] \quad (24)$$

where $h = h_1$ for nanoparticles where the ligands are attached to the shorter of the two polymer chains in the brush and $h = h_1 + h_2$ otherwise. σ_R is the surface density of receptors at the

grafting surface, σ_L is the surface density of ligands at the position of the blob containing the ligand and is calculated as following:

$$\sigma_L = \begin{cases} \xi_1(r = R_{NP})^{-2}\phi, & \text{for ligands attached to the shorter chains} \\ \xi_2(r = R_{NP} + h_1)^{-2}\phi, & \text{for ligands attached to the longer chains} \end{cases} \quad (25)$$

where ϕ is the fraction of chains bearing ligands. Note that the factor ϕ is one for ligand attached to the longer chains as all chains in the upper brush carry a ligand.

Finally, the theoretical point in the **Figure 3.3** is the average surface density of adsorbed nanoparticles, Γ_{NP} , which is trivially obtained as:

$$\Gamma_{NP} = \theta A_{site} \quad (26)$$

3.4.2 Experimental section

A detailed description of materials, experimental methods is presented in SI. DNA syntheses were performed using standard phosphoramidite chemistry with a DNA/RNA synthesizer H-6 from K&A Laborgeraete. See SI or Reference (186) for DW4 sequence. Bare GNPs were synthesized by a modified Frens method (208). Flat gold surfaces for TFR surface preparation were prepared by gold coating on silicon wafer or SPR sensors (dove BK7 prisms) using a Cressington 308R sputter coater. All GNPs adsorption experiments were carried at the GNPs concentration of 100 pM since GNPs were shown to form clusters at a higher GNPs concentration (500 pM) (see **Figure S3.10** and section **3.5.2.3**). AFM imaging by a Multimode microscope equipped with a Nanoscope V extended controller (see section **3.5.2.5** and **Figure S3.11** for the identification of adsorbed GNPs on AFM height images). A comparison between AFM and Scanning Electron Microscopy

results showed no significant difference in GNPs adsorption (**Figure S3.12**). SPR analysis by a portable 4-channel SPR instrument (209).

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge Prof. Jean-Francois Masson for the Surface Plasmon Resonance experiments and useful discussions. Financial supports from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (FRQNT) are acknowledged for Discovery (RGPIN-2016-06766) and Research Tools and Instrument grants. Financial supports from the Université de Montréal and The Quebec Centre for Advanced Materials (QCAM) are also acknowledged. A.V.-B. is Canada Research Chair in Bioengineering and Bionanotechnology, Tier II and acknowledges a Discovery Grants (RGPIN-2020-06975) from NSERC. D. L. acknowledges a 3rd cycle scholarship from the FRQNT.

3.5 Supporting Information

To Bind or Not to Bind: Bimodal Brush-Functionalized Nanoparticles Selective to Receptor Surface Density

Huu Trong Phan^a, Dominic Lauzon^b, Alexis Vallée-Bélisle^b, Stefano Angioletti-Uberti^c, Jeanne Leblond Chain^{a,d,*}, Suzanne Giasson^{a,b,*}

^aFaculty of Pharmacy, University of Montréal, Montréal, H3C 3J7, Canada; ^bDepartment of Chemistry, University of Montréal, Montréal, H3C 3J7, Canada; ^cDepartment of Materials, Imperial College London, London, UK; ^dUniversity of Bordeaux, CNRS, INSERM, ARNA, UMR 5320, U1212, F-33000 Bordeaux, France.

3.5.1 Materials

Hydrogen tetrachloroaurat (III) trihydrate (99.9%) and sodium citrate used in the preparation of GNPs, *N*-(3-(Dimethylamino)propyl)-*N'*-ethyl-carbodiimide (EDC), *N*-hydroxysuccinimide (NHS), deuterium oxide (D₂O, 99%) and pyridine were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, Canada). Thiol PEG Acetic acid (SH-PEG_{2K}-COOH, MW 2000 g/mol) and Methoxy PEG Thiol (mPEG-SH, MW 5000 g/mol) were purchased from Jenkem Technology (Texas, USA). Recombinant mouse Transferrine Receptor (TFRC/CD71) was purchased from Sino Biological (Beijing, China). Milli-Q water was obtained from a Millipore Gradient A 10 purification system (resistance 18.2 MΩ·cm, TOC 4 ppb) (Oakville, Canada). The other solvents and chemicals were supplied by Fisher Scientific (Ottawa, Canada) unless specified. Silicon wafers (100 mm diameter, boron-doped, (100) orientation, one side polished) were obtained from University Wafer Co (Boston, USA). All surface manipulations were performed under an air flow cabinet. All glassware

for GNPs manipulation were carefully cleaned using freshly prepared aqua regia (3:1 ratio of concentrated HCl and HNO₃ by volume) and rinsed abundantly with Mili-Q water prior to use.

Materials for thiol PEG-DW4 synthesis: Oxidizer (0.1 M I₂ in H₂O/Pyridine/THF), anhydrous acetonitrile, Cap A (Ac₂O/Pyridine/THF), Cap B (16% methylimidazole in THF), deblock solution (3% trichloroacetic acid in dichloromethane), and activation reagents (0.25 M 5-ethylthio-1H-tetrazole in acetonitrile) were purchased from ChemGenes Corporation (Wilmington, USA). dC-CE phosphoramidite (n-bz), dA-CE phosphoramidite (n-bz), dT-CE phosphoramidite, and dG-CE phosphoramidite (n-ibu) were purchased from ChemGenes Corporation (Wilmington, USA). Pre-pack 1000Å CPG synthesis dG(DMF) columns and 5'-Thio C6 modifier were purchased from Biosearch Technologies (Novato, USA). Hexaethylene glycol phosphoramidite was purchased from ChemGenes Corporation (Wilmington, USA). MicroPure II columns for reversed-phase purification were purchased from Biosearch Technologies (Novato, USA). Acetic acid (ACS, ≥99.7%), ammonium hydroxide solution (ACS, 28.0-30.0%), and acetonitrile (HPLC plus, ≥99.9%) were purchased from Sigma Aldrich (Oakville, Canada). Triethylamine was purchased from Fisher Scientific (Ottawa, Canada). Trifluoroacetic acid (99%) was purchased from Alfa Aesar (Tewksbury, USA).

3.5.2 Methods

3.5.2.1 DW4 and thiol PEG-DW4 synthesis

DNA syntheses were performed using standard phosphoramidite chemistry with a DNA/RNA synthesizer H-6 from K&A Laborgeraete (Schaffheim, Germany). The cleavage of the DNA strand from the solid support and the deprotection of the bases were done overnight (16 h) at 60 °C in 28.0-30.0% aqueous ammonia. DNA were purified by solid-phase extraction using the P-8

purifier (K&A Laborgeraete, Schaafheim, Germany) following K&A Laborgeraete's method. DNA were dried using a GenevacTM miVac centrifugal concentrator and resuspended in milliQ water. A second purification step was performed by HPLC (1260 infinity, Agilent Technologies) with a reversed-phase column (XBridge[®] Oligonucleotide BEH C18 OBDTM Prep column, 130 Å, 2.5 µm, 10 x 50 mm) at 60°C. HPLC grade acetonitrile and 0.1 M TEAA were used as mobile phase with an elution gradient of 30% to 45% acetonitrile over 15 minutes. DNA strands were detected using a diode array detector by monitoring the absorbance at 260 nm. DNA were again dried and resuspended in MilliQ water prior to quantification by UV-Vis spectroscopy (NanoDropTM 2000c, Thermo ScientificTM). Absorption coefficients (ϵ) were estimated from the DNA sequence using the IDT OligoAnalyzer tool. The sequences of DW4 and thiol PEG-DW4 are the following (186):

DW4:

5'-GCGTGTGCACACGGTCACTTAGTATCGCGGCGTTCTTTGGTTCCGCCCCGG-3'

Thiol PEG-DW4: Thiol-PEG-5'-DW4-3'.

PEG: PEG_{1K}-DW4 and PEG_{3K}-DW4 have the number of EG units of 24 and 72, respectively. These three PEG spacers were synthesized from the conjugation of multiple hexaethylene glycol phosphoramidite (4 and 12, respectively).

3.5.2.2 Preparation and characterization of GNPs and bimodal functionalized GNPs

Citrate-capped GNPs synthesis: The ~ 15 nm GNPs were synthesized according to a modified Frens method (208) for monodispersity and size control. Briefly, a solution containing 100 mL of 1 mM HAuCl₄ and 200 µL of 1 M NaOH was heated while stirred to rolling boil and refluxed in a

250 mL flask. Then, 10 mL solution of Na₃Ctr 38.8 mM was rapidly added to the above solution, the heating un reflux was continued for 15 min until a wine-red color appeared (reaction completed). The solution was then allowed to cool to room temperature with continuous stirring and transferred to a clean glass bottle wrapped with aluminum foil and stored at 4 °C in the dark.

GNPs functionalization: The thiol PEG-DW4 solution (500 nM in Phosphate buffer (10 mM, pH 7.4)) was annealed using a thermocycler (Labnet Vortemp 56, 85 °C for 5 min, gradual cooling to 22 °C over 10 min, holding at 37 °C for 15 min). Thereafter, the annealed thiol PEG-DW4 (0.5 nmol) was mixed with thiol PEG solution (100 μM, in Mili-Q water) at predetermined PEG/PEG-DW4 molar ratio (4:1; 2:1; 1:1). Then, the mixture was gradually added to the bare GNPs solution 8.7 nM (8.7 pmol) upon stirring. The reaction was carried out at room temperature in the dark with gentle stirring for 24 h. At the end of the reaction, the nanoparticles were purified by centrifugation (19000 rpm, 30 min, 20°C) and resuspended in phosphate buffer (10 mM, pH 7.4). The initial supernatant containing unbound polymer was carefully collected (only 1 mL out of 20 mL at the upper part of the centrifuge tube was taken, its visible spectrum from 800 to 350 nm showing a flat line along the baseline confirms the absence of GNPs in the sample (Data not shown)) and kept for analysis. The centrifugation-resuspension cycle was repeated three times. After the last cycle, the functionalized GNPs pellet was resuspended in a small volume of phosphate buffer to yield a concentrated solution for storage. PEG molecular weight and PEG/PEG-DW4 molar ratios were varied to tune the relative chain length and molar ratio of both polymers on the GNPs surface.

The lability study of grafted PEG on GNPs: The purified solutions of PEG_{2K} functionalized-GNPs were stored at 4°C in the dark either in air or under argon (oxygen-free atmosphere). The number of PEG chains per particles was measured at designated time points using ¹H-qNMR and UV-vis (see below and details in Supporting Information, Experimental section).

Physical characterization of GNPs: The bare GNPs were visualized by transmission electron microscopy (JEOL JSM-7400F field-emission scanning electron microscope, JEOL operated at an acceleration voltage of 75 kV, Massachusetts, USA) and TEM images were analyzed using *ImageJ* software to acquire nanoparticle diameter and circularity ($= 4\pi(\text{area}/\text{perimeter}^2)$, a circularity value of 1.0 indicates a perfect circle). The hydrodynamic diameter (D_h) and size distribution of GNPs were determined by dynamic light scattering (DLS, ZEN5600 Zetasizer NANO-ZSP, Malvern, UK). Optical adsorption spectra of GNPs were acquired on a Cary 100 UV–vis spectrophotometer (800 – 350 nm range, 0.5 nm increment) (California, USA).

¹H-NMR analysis: All NMR measurements were performed on a Bruker AV400 spectrometer (Bruker, Germany) operating at 400 MHz (relaxation delay D1 of 5s, number of scans of 100). To prepare NMR samples, the concentrated solution of functionalized GNPs was lyophilized, followed by nanoparticle digestion with 1 drop (~ 5 μL) of concentrated aqua regia (24 h) (aqua regia does not affect the integrity of PEG (210)). The digested residue was dissolved and diluted to 690 μL with D_2O , followed by adding 5 μL of pyridine solution (0.21 % v/v; 15 μL of pyridine in 7000 μL of D_2O) as the internal integration standard. For calibration curves, a five-point series of polymer concentration standards (690 μL each) ranging from 5 to 50 μM were prepared in D_2O , followed by adding 1 drop of concentrated aqua regia and 5 μL of pyridine solution (0.21 % v/v). The integral of ethylene glycol unit peak (3.5-3.6 ppm) was divided by the integral of pyridine peak (8.5-6.6 ppm) and plotted against the known concentration of polymers. The unknown PEG concentrations were determined by comparison to its corresponding calibration curve (see **Figure S3.13**).

Fluorescence analysis for PEG-DW4 quantification: Fluorescence measurements were performed at room temperature using a Cary Eclipse fluorescence spectrofluorometer (Cary Eclipse Agilent,

USA) with a excitation/emission wavelengths of 498/520 nm. To prepare fluorescence samples, 10 μL Sybr Green solution (100X) and 40 μL of phosphate buffer solution (NaCl 4000 mM, Na_2HPO_4 500 mM, pH 7) were added to 1 mL of the collected supernatant (see section 3.5.2.2, *GNPs functionalization*). The mixture was stirred and incubated for 5 min at room temperature before fluorescence measurement. For calibration curves, a five-point series of PEG-DW4 concentration standards (1000 μL each) ranging from 50 to 500 nM were prepared in Mili-Q water, then 10 μL Sybr Green solution (100X) and 40 μL of phosphate buffer solution were added to. The unknown PEG-DW4 concentration in samples were determined by comparison to its corresponding calibration curve (**Figure S3.13B**). The obtained value of PEG-DW4 concentration in the supernatant was compared to the initial concentration of PEG-DW4 in the feeding mixture to estimate the concentration of PEG-DW4 grafted on GNPs.

3.5.2.3 Surface manipulations

Gold coated surface preparation: Prior to gold coating, surfaces (silicon wafer (10 x 15 mm² pieces) or SPR sensors (dove BK7 prisms of 20 × 12 × 3 mm)) were cleaned by sonication for 15 min in ethanol and dried under nitrogen. The cleaned surfaces were then treated with piranha solution (70% H_2SO_4 :30% H_2O_2) for 30 min at room temperature and thoroughly rinsed with Mili-Q water. Afterward, the activated surfaces were then coated with 1 nm Cr and 45 nm Au using a Cressington 308R sputter coater (Ted Pella Inc. Redding, CA).

SAM-PEG-functionalized surfaces: The gold-coated surfaces were immersed overnight in Thiol PEG carboxy solution (1 mM, in DMF) to form self assembled monolayer (SAM-PEG). The samples were then rinsed with ethanol to remove unbound molecules and dried with a stream of nitrogen.

TfR-functionalized surfaces: For AFM, TfR was immobilized onto SAM-PEG-functionalized surfaces through peptide coupling between (-NH₂) group of TfR and (-COOH) group of SAM-PEG. The (-COOH) group on SAM-PEG-functionalized surfaces was activated with coupling agents (EDC 350 mM, NHS 110 mM in MiliQ water) for 5 min. The activated surfaces were briefly rinsed with sodium acetate buffer (pH 5.5, 10 mM). The TfR solution (50 μg mL⁻¹, in sodium acetate buffer (pH 5.5, 10 mM)) was dropped onto the surfaces and incubated in the dark for a predetermined time. Afterward, the unbound TfR was washed away with PBS buffer containing NaCl 1M. After TfR immobilization, the non-reacted sites on SAM-PEG were blocked by incubating the surfaces in ethanolamine hydrochloride 1M at pH 8.5 for 10 min. Finally, the TfR-functionalized surfaces were rinsed with PBS pH 7.4 buffer containing MgCl₂ 1 mM (PBS-M) for 5 min and ready for use. For quantitative SPR measurements, the same TfR procedure was used for SPR sensors mounted into SPR system, except the system was returned to sodium acetate buffer after being rinsed with PBS buffer containing NaCl 1M. The SPR response is Δ_{SPR} shift between SAM-PEG and TfR-functionalized surfaces in the same buffer (sodium acetate buffer).

GNPs adsorptions onto TfR-functionalized surfaces: For AFM, the functionalized GNPs solution was diluted at the concentration of 100 pM (of GNPs) in PBS-M buffer. This concentration was used because our preliminary tests showed that the GNPs concentration of 500 pM leads to the formation of clusters which might adsorb on receptor surface simply due to gravity (see **Figure S3.10**). For a lower concentration of GNPs (< 100 pM), the specific GNPs adsorption might become too low to be reliably measured (under detection limit). The diluted GNPs solutions were carefully dropped onto the freshly prepared TfR-functionalized surfaces. The GNPs adsorption was carried out at room temperature in dark for 15 min. Afterward, the GNPs solutions were washed away, followed by three times of rinsing with PBS-M. After the last rinsing, the surfaces

were rinsed with Mili-Q water and dried with a stream of nitrogen. The dried surfaces were finally transferred into a cleaned multiwell plate. The plate was sealed with paraffin for storage to prevent dust deposition on the surfaces. For quantitative SPR measurements of GNPs adsorption, the same procedure was used for TfR-functionalized SPR sensors mounted into SPR system.

3.5.2.4 Surface characterization

AFM imaging: AFM imaging were performed with a Multimode microscope equipped with a Nanoscope V extended controller (Digital Instruments, Santa Barbara, CA) at room temperature and in ambient air. Images were acquired in the Peakforce QNM mode (at a scan rate of 1 Hz) using standard triangular cantilevers with sharpened Si₃N₄ tips (Digital Instruments, Santa Barbara, CA), then treated with Digital Nanoscope software.

SPR Analysis: SPR analyses were performed on a portable 4-channel SPR instrument based on a dove prism design previously reported (209, 211). The principles of the technique have been extensively described in the literature (212, 213). Briefly, the binding of analytes on the sensor surface results in a change in reflective index, which is measured as resonance wavelength shift ($\Delta\lambda_{\text{SPR}}$). Data was acquired in real-time with P4SPR control software. In all cases, the solution was injected using a 1 mL syringe and reacted in the PDMS fluidic cell under static flow condition. All SPR experiments were carried at room temperature.

3.5.2.5 GNPs counting on AFM height images

In AFM imaging, the tip size and geometry result in a broadening of the apparent dimension of nanoparticles, therefore, it is very delicate to estimate the NP size through their lateral dimension. In case the NPs are spherical and deposited on a flat and stiff substrate, NP diameter can be

accurately determined by measuring the apparent height. In the present study, GNPs were adsorbed on TfR functionalized surfaces (a relatively rough and soft substrate), the apparent height is supposed to be lower than NP diameter (as GNPs may be partly buried in TfR layer).

For these reasons, we established some criteria for GNPs identification on AFM height images based on empirical data. Briefly, GNPs-positive surfaces, GNPs-negative surfaces were prepared, imaged by AFM and compared. As shown in the **Figure S3.11**, the apparition of “relatively circular and bright spots” on the GNPs-surfaces, which are GNPs. More than 10 independently prepared GNPs-positive surfaces were observed to form the “key” criteria for an accurate GNPs identification as following: relatively spherical-like nanoparticle, measured lateral dimension of 15-50 nm, apparent height ≥ 5 nm.

To validate the GNPs quantification on surface using AFM topographic imaging, the number of GNPs on the same surfaces were measured by AFM and SEM. Both techniques resulted in similar GNPs number on surfaces, confirming our criteria for GNP counting on AFM images (**Figure S3.12**).

3.5.2.6 Numbers of unfunctional PEG and ligated PEG chains grafted on GNPs surface, N_{PEG} and $N_{PEG-DW4}$

Determination of GNPs concentration: GNPs concentration was determined by UV-vis according to Beer Lambert law: Absorbance = ϵbC , where ϵ^a is molar extinction coefficient ($M^{-1}.cm^{-1}$), b is the length of the light path (cm) and C is the concentration of GNPs. For the measurement, the solution is diluted so that the absorbance is between 0.2 and 1.2 (Absorbance unit).

a) ϵ_{GNPs} was calculated using the equation: $\ln \epsilon = 3.3211 \ln D + 10.80505$, D is the core diameter of nanoparticle by TEM, as previously reported from empirical data (214). The error associated with these extinction coefficient values is 1- 3%.

In this study, the diameter of GNPs is approximately 15 nm (**Figure S3.1A**), therefore, $\epsilon_{\text{GNPs}} = 4 \cdot 10^8 \text{ (M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}\text{)}$.

Determination of grafted PEG-DW4 concentration ($C_{\text{grafted PEG-DW4}}$): See section 3.5.2.2, Fluorescence analysis for PEG-DW4 quantification.

Determination of grafted PEG concentration:

$C_{\text{grafted PEG}}$ was calculated from $I_{\text{grafted PEG}}$ using qNMR- ^1H calibration curve (**Figure S3.13A**) for the corresponding PEG:

$$I_{\text{grafted PEG}} = I_{\text{total}} - I_{\text{grafted PEG-DW4}}$$

Where: $I_{\text{grafted PEG}}$ is the integral area of PEG peak induced by PEG

$I_{\text{grafted PEG-DW4}}$ is the integral area of PEG peak induced by PEG-DW4 (calculated from

$C_{\text{grafted PEG-DW4}}$ using qNMR- ^1H calibration curve (**Figure S3.13A**) for the corresponding PEG-DW4)

I_{total} is the integral area of PEG peak measured for a NMR sample

Calculation of number of polymer chain per nanoparticle

The number of PEG-DW4 per nanoparticle $N_{\text{PEG-DW4}}$ is $C_{\text{grafted PEG-DW4}}/C_{\text{GNPs}}$

The number of PEG per nanoparticle N_{PEG} is $C_{\text{grafted PEG}}/C_{\text{GNPs}}$

3.5.2.7 The surface density of transferrin receptor Γ_{TfR}

The surface density of receptor (Γ_{TfR}) was calculated from λ_{SPR} shift ($\Delta\lambda_{\text{SPR}}$) using the Jung et al.'s Equation (191) as reported by Bolduc et al. (215)

$$\Gamma_{\text{TfR}} = \rho \left(\frac{-l_d}{2} \right) \ln \left(1 - \frac{\Delta\lambda_{\text{SPR}}}{m(\eta_{\text{TfR}} - \eta_{\text{Acetate}})} \right) \times \frac{N_A}{M_w} \times 10^6 \quad (\text{S27})$$

Γ_{TfR} is expressed in molecules/ μm^2 . The sensitivity (m) of the current SPR biosensor was reported at 1765 ± 100 nm/RIU (215). The penetration depth of plasmons (l_d) is approximately 230 nm at the experimental SPR wavelength ($\lambda = 630$ nm) (215). The refractive index of sodium acetate buffer (η_{Acetate} , at $\lambda = 630$ nm) is calculated at 1.3334 RIU according to the reference (216). N_A is the Avogadro's number. The TfR molecular weight (M_w) is provided by the manufacturer at 78.3 kDa. The density (ρ) for TfR protein is 1.35×10^{-14} g/nm³ (217). The refractive index of TfR (η_{TfR} , at $\lambda = 630$ nm) is theoretically calculated at 1.6592 following McMeekin et al.'s work (218) (see the following).

Determination of refractive index of TfR η_{TfR} :

The refractive index of TfR (η_{TfR}) is calculated following the reference (218). Briefly, using the the expanded Lorentz-Lorenz formula:

$$R_p = \bar{v} \frac{\eta_{\text{TfR}}^2 - 1}{\eta_{\text{TfR}}^2 + 2} \quad (\text{S28})$$

The refractive index of the protein is:

$$\eta_{TfR} = \sqrt{\frac{2R_p + \bar{v}}{\bar{v} - R_p}} \quad (S29)$$

Where R_p is protein refractivity per gram, \bar{v} is protein partial specific volume. These parameters R_p and \bar{v} are calculated from the weight percentages of each amino acid (indexed i) as following:

$$R_p = \frac{\sum M_i R_i}{\sum M_i} \quad (S30)$$

$$\bar{v} = \frac{\sum M_i \bar{v}_i}{\sum M_i} \quad (S31)$$

Where R_i and \bar{v}_i are refractivity and specific volume of individual amino acids, respectively. The empirical values of R_i and \bar{v}_i at $\lambda_{589\text{nm}}$ are summed in Ref. (218). The amino acid sequence of TfR is following (219):

MMDQARSAFSNLFGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLAADDEENADNNMKASVR
 KPKRFNGRLCFAAIALVIFFLIGFMSGYLG YCKRVEQKEECVKLAETEETDKSETMETED
 VPTSSRLYWADLKTLLSEKLNSIEFADTIKQLSQNTYTPREAGSQKDESLAYYIENQFHEF
 KFSKVWRDEHYVKIQVKSSIGQNMVTIVQSNGNLDPVESPEGYVAFSKPTEVSGKLVHA
 NFGTKKDFEELSYSVNGSLVIVRAGEITFAEKVANAQSFNAIGVLIYMDKNKFPVVEAD
 LALFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGKMEGSCPA
 RWNIDSSCKLELSQNQNVKLIVKNV LKERRILNIFGVIKGYEEPDRYVVVGAQRDALGA
 GVAAKSSVGTGLLLKLAQVFS DMISKDGFPRPSRSIIFASWTAGDFGAVGATEWLEGYLS
 SLHLKAFTYINLDKVV LGTSNFKVSASPLLYTLMGKIMQDVKHPVDGKSLYRDSNWISK
 VEKLSFDNAAYPFLAYSGIPAVSFCFCEDADYPYLGTRLDTYEALTQKVPQLNQMVRTA
 AEVAGQLIIKLTHDVELNLDYEMYN SKLLSFMKDLNQFKTDIRDMGLSLQWLYSARGD

YFRATSRLTTDFHNAEKTNR FVMEINDRIMKVEYHFLSPYVSPRESPFRHIFWGS GSHTL
 SALVENLKLRLRQKNITAFNETLFRNQLALATWTIQGVANALSGDIWNIDNEF

The η_{TfR} at λ_{630nm} is calculated from η_{TfR} at λ_{630nm} based on the following equation as reported in Ref. (218)

$$\eta_{TfR}(\lambda_{630nm}) = \eta_{TfR}(\lambda_{630nm}) + \frac{9.6 + 1000}{630^2} \quad (S32)$$

3.5.2.8 The surface density of adsorbed GNPs Γ_{NP}

The surface density of adsorbed GNPs (Γ_{NP}) on SPR sensor is proportional to the SPR response ($\Delta\lambda_{SPR}$, nm) (220). Γ_{NP} on a TfR(t) surface is calculated as following:

$$\Gamma_{NP}(\text{on TfR}(t)) = \frac{\Delta\lambda_{SPR} \text{ at TfR}(t) \times \Gamma_{NP}(\text{on TfR60})}{\Delta\lambda_{SPR} \text{ at TfR60}} \quad (S33)$$

Where $\Delta\lambda_{SPR} \text{ at TfR}(t)$, $\Delta\lambda_{SPR} \text{ at TfR60}$ are the SPR response related to GNPs adsorption on TfR(t) surface and TfR60 surface, respectively. $\Gamma_{NP}(\text{on TfR60})$ is the average surface density of adsorbed GNPs on TfR60 surface and is determined by AFM results (see section 3.5.2.5). $\Gamma_{NP}(\text{on TfR60})$ for GNPs-2K₄-3KDW4 and GNPs-5K₄-3KDW4 are 247 and 51 (NP/ μm^2), respectively. For what concerns the consistency between Γ_{NP} measured by AFM (in dry state) and SPR response related to GNPs adsorption in wet state, a comparison between SPR and AFM shows no significant difference of GNPs adsorption (see **Figure S3.6**). It is important to highlight that in **Figure 3.3A** we converted $\Delta\lambda_{SPR}$ into Γ_{NP} for a better presentation of GNPs adsorption. The shape of the adsorption curves does not change if $\Delta\lambda_{SPR}$ is used instead of Γ_{NP} .

3.5.2.9 Determination of TfR volume V_R

The TfR volume V_R is calculated from its partial specific volume (\bar{v}) as the following equation:

$$V_R \text{ (nm}^3\text{)} = \frac{\bar{v} \left(\frac{\text{cm}^3}{\text{g}}\right) \times 10^{21} \left(\frac{\text{nm}^3}{\text{cm}^3}\right)}{6.023 \times 10^{23} \left(\frac{\text{Da}}{\text{g}}\right)} \times M_w \text{ (Da)} \quad (\text{S34})$$

Where M_w (Dalton) is TfR molecular weight 78300 Da (provided by the manufacturer). \bar{v} is theoretically estimated to be $0.68 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ (see Section 3.5.2.7). The calculated V_R (89 nm^3) is used to calculate the repulsive free-energy βF_{rep} (Eq. 16).

By assuming that TfR remains as a globule when being immobilized onto the surface, the TfR radius R_R is assumed to be $(3V_R/4\pi)^{1/3}$. The calculated R_R 2.7 (nm) is used to estimate the average value of βF_{rep} over the TfR volume (Eq. 17). It is worth mentioning that the assumption of the TfR shape does not affect the obtained average value of βF_{rep} because the peptide coupling (random immobilization) of an object with a volume of 89 nm^3 of any shape on the surface leads gives rise to different heights depending on its orientation, and the average height is equal to the diameter of a sphere with the same volume.

3.5.2.10 *The reversibility of individual ligand-receptor bond*

When a ligand is tethered to a surface through a grafting construct with a certain degree of conformational freedom, provided by PEG chain, the individual ligand-receptor bond becomes weaker (and thus more reversible) than that in solution. The difference is due to the configurational

entropy of the grafting construct ΔG^{conf} (221). This has been demonstrated by various experimental observations in model colloidal systems where interactions are mediated by ligand-receptor pairs formed by grafted constructs, e.g., in DNA-coated colloids (222) and references therein. The individual bond free-energy of ligand-receptor with a grafting construct ΔG_{bond} can be approximated as

$$\Delta G_{\text{bond}} = \Delta G^0 + \Delta G^{\text{conf}} \quad (\text{S9})$$

Where ΔG^0 is the individual bond free-energy of ligand-receptor free in solution. ΔG_{bond} and ΔG^0 are also related to the equilibrium binding constant (K_{bind}), the association rate (k_{on}) and the dissociation rate (k_{off}) by:

$$\exp(-\Delta G_{\text{bond}}) = \rho^{\text{std}} \times K_{\text{bind}}^{\text{graft}} = \rho^{\text{std}} \times \frac{k_{\text{off}}^{\text{graft}}}{k_{\text{on}}^{\text{graft}}} \quad (\text{S10})$$

$$\exp(-\Delta G^0) = \rho^{\text{std}} \times K_{\text{bind}}^{\text{sol}} = \rho^{\text{std}} \times \frac{k_{\text{off}}^{\text{sol}}}{k_{\text{on}}^{\text{sol}}} \quad (\text{S11})$$

Where $\rho^{\text{std}} = 1\text{M}$ is the standard molar concentration, the superscripts “sol” and “graft” are used to describe the respective quantities for pairs in solution and when grafted, respectively. Combining Eq. set (S9-S11), we have:

$$k_{\text{off}}^{\text{graft}} = K_{\text{bind}}^{\text{sol}} \times \exp(\Delta G^{\text{conf}}) \times k_{\text{on}}^{\text{graft}} \quad (\text{S12})$$

The experimentally measured dissociation constant $\frac{1}{K_{bind}^{sol}} = K_D = 102.5 \text{ nM}$ for the DW4/TfR pair in solution (**Figure 3.2**) and the fitting parameter $\Delta G^{\text{conf}} = 13.5 k_B T$ (**Figure 3.3A**). An estimate for k_{on}^{sol} from the value for arbitrary DNA sequence of similar size (50 bases), which is of the order of $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (223). The grafting construct PEG (~ 3.4 to 5 kDa) was shown to have no significant effect on the association rate of individual ligand-receptor bond (see Ref. (224) and references therein). Therefore, it is relevant to assume $k_{on}^{graft} = k_{on}^{sol} = 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. With these data, we obtain an estimate for k_{off}^{graft} of $7.4 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$.

3.5.2.11 *The binding region of DW4*

To provide an estimate of the steric repulsion βF_{rep} using Helparin model, one needs to know how deep the receptor TfR penetrates the PEG brush once binding to the ligand DW4. A recent work (225) has shown that the binding region (red circle in **Figure S3.8**) of DW4 is located near to its grafting point with PEG (5'-end). Therefore, it is relevant to assume that TfR needs to penetrate and reach the attachment point between PEG and DW4 to allow DW4-TfR binding. In this regard, we expect a certain level of repulsion as long as the protective PEG is longer than the ligated PEG (without DW4).

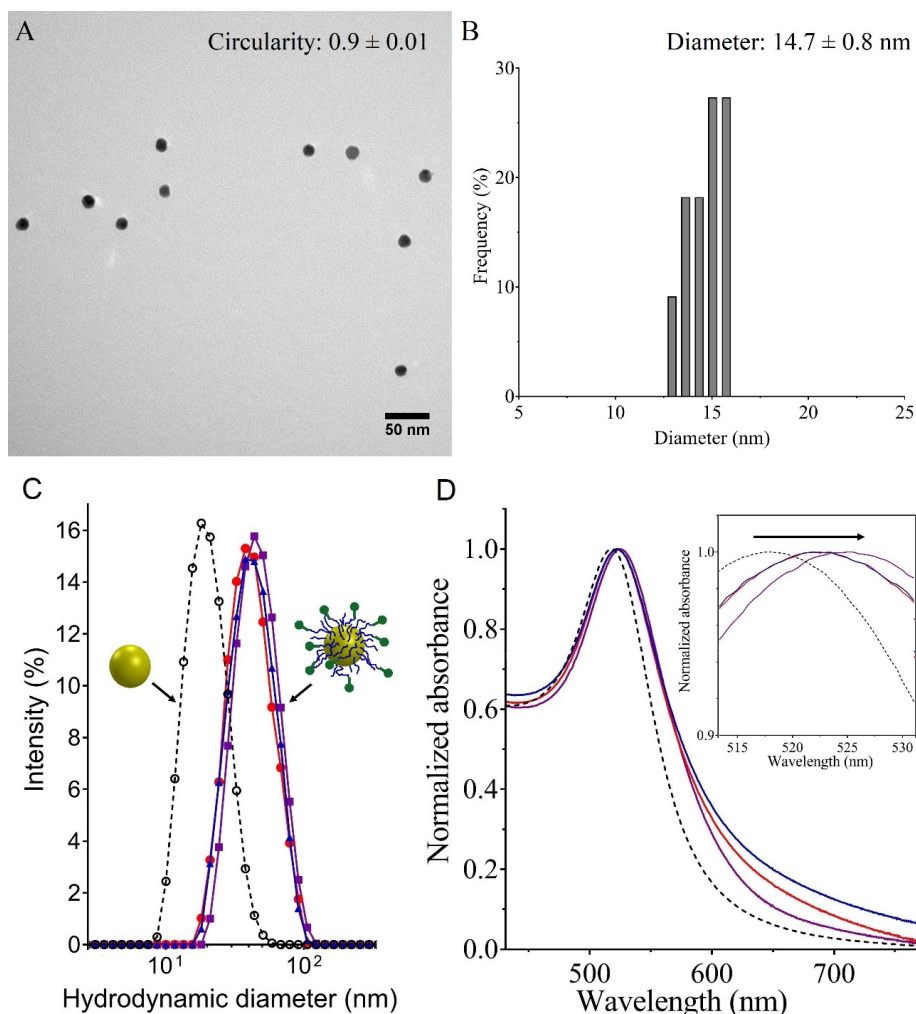


Figure S3.1. (A) TEM image and (B) Size distribution histogram of citrate-capped GNPs (B) (analyzed by Image J, $n = 11$). (C) GNPs hydrodynamic diameter and (D) UV-vis Spectra (the inset shows a red shift associated with the surface functionalization) of citrate-capped GNPs (bare GNPs, black dash), GNPs-5K (blue line), GNPs-3KDW4 (red line) and GNPs-5K-3KDW4 (molar ratio 4:1) (purple line).

These Figures show the characterization (by TEM, DLS and UV-vis spectroscopy) of GNPs before and after surface-functionalization with polymers. **Figure S3.1A, B** show that the citrate-capped GNPs prepared by a modified Frens method (208) exhibit a spherical shape (circularity 0.9 ± 0.02 ,

by ImageJ) of 14.7 ± 0.8 nm diameter with a narrow size distribution. **Figure S3.1C** shows an increase in the hydrodynamic diameter D_h and GNPs after surface-functionalization with polymer. **Figure S3.1D** shows a red shift ($\sim 4-7$ nm) in the plasmon adsorption band due to the change in the dielectric constant at the nanoparticle surface after surface-functionalization with polymer.

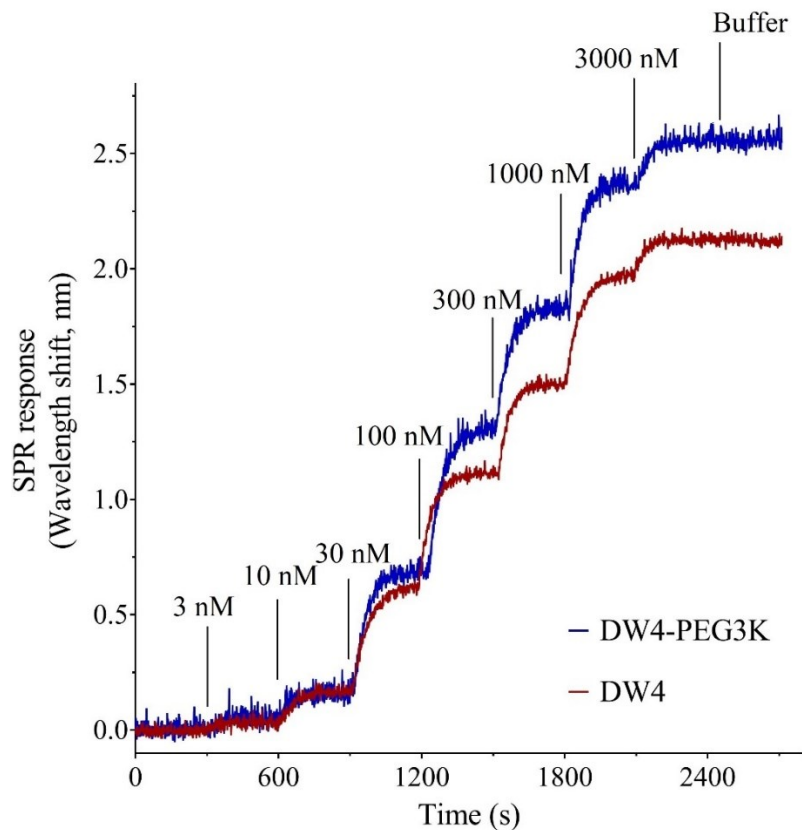


Figure S3.2. Typical SPR sensorgrams of TfR60 surface exposed to increasing concentrations of DW4 (red line) and DW4-PEG3K (blue line).

To determine the dissociation constant K_d between DW4 or DW4-PEG_{3K} (free in solution) with the TfR-immobilized surface, the TfR60 surface (see Table S3.2) was exposed to increasing concentration of DW4 or DW4-PEG_{3K}, the SPR sensorgrams were recorded. The SPR responses (nm) at equilibrium are plotted versus DW4 or DW4-PEG_{3K} concentration. K_d values were obtained from fitting the experimental data to binding saturation (one site – specific binding) model using Graphpad prism software (see Figure 3.2). Experiments were run in triplicate. SPR response in **Figure S3.2** is due to the adsorption of DW4 or DW4-PEG_{3K} onto the TfR60 surface.

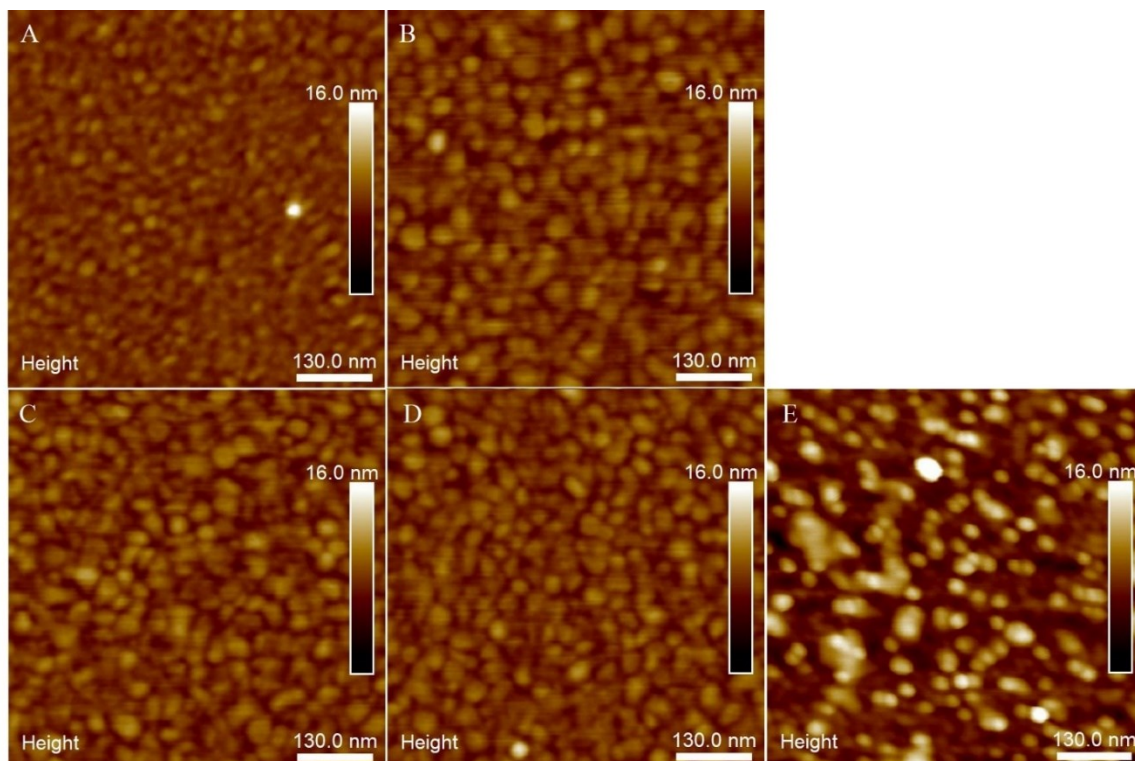


Figure S3.3. AFM images of PEG functionalized surfaces exposed to GNPs-PEG_{2K}/PEG_{3K}-DW4 (A), to GNPs-PEG_{5K}/PEG_{3K}-DW4 (B), TfR60 surfaces exposed to GNPs-PEG_{2K} (C), to GNPs-PEG_{5K} (D) and to GNPs-PEG_{2K}/PEG_{3K}-DW4 (E).

This Figure shows that GNPs adsorption (by AFM) was observed only when TfR-functionalized surfaces (TfR60) were exposed to DW4-bearing GNPs (E). Importantly, no adsorption was detected when PEG-functionalized surfaces were exposed to DW4-free or DW4-bearing GNPs, neither when TfR-functionalized surfaces were exposed to DW4-free GNPs, confirming the absence of GNPs adsorption in the absence of the TfR/DW4 couple. These observations are in line with SPR results (see **Figure 3.2C**), confirming the absence of GNPs adsorption in the absence of the TfR/DW4 couple.

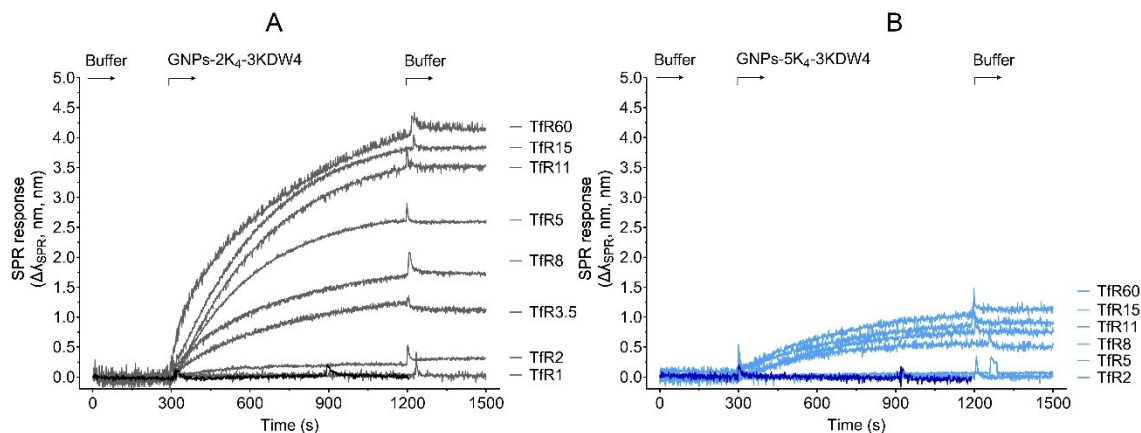


Figure S3.4. Typical SPR sensorgrams of TfR surfaces at various receptor surface density Γ_{TfR} exposing to GNPs-2K₄-3KDW4 (A) and GNPs-5K₄-3KDW4 (B) at GNPs concentration of 100 pM

This Figure shows GNPs adsorption (by SPR response) of GNPs-2K₄-3KDW4 (A) and GNPs-5K₄-3KDW4 (B) on TfR surface at various receptor surface densities. The GNPs adsorptions at equilibrium (5 min after rinsing the sensor with buffer) were plotted as function of receptor surface densities (see Figure 3.3).

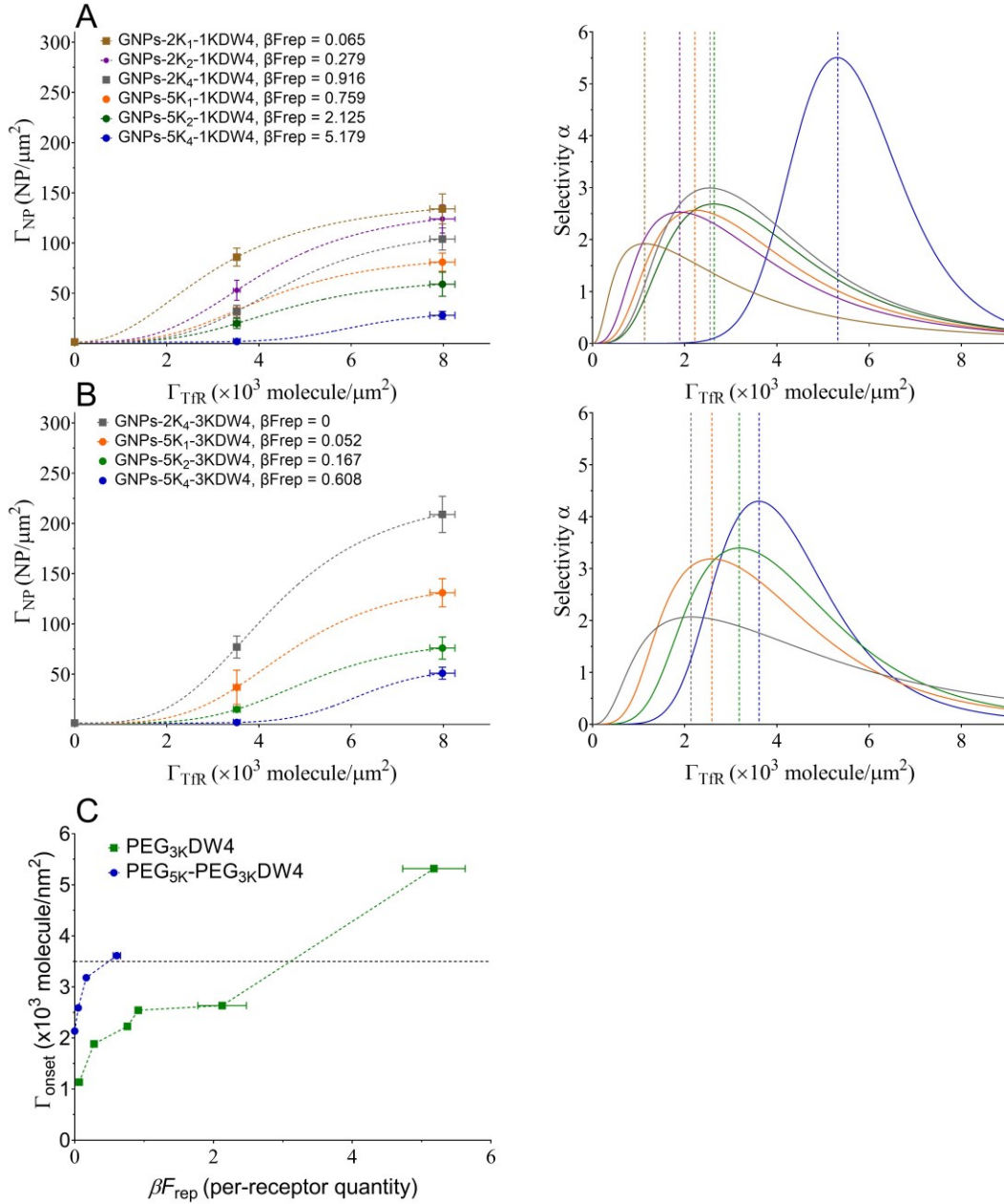


Figure S3.5. (A) GNPs adsorption Γ_{NP} , measured by AFM on Tfr5 ($\Gamma_{Tfr} = 3.52 \times 10^3$ molecule/nm²) and on Tfr60 ($\Gamma_{Tfr} = 7.98 \times 10^3$ molecule/nm²) and the calculated selectivity parameter α using Eq. 1 for PEG_{1K}-DW4 systems (A) and for PEG_{3K}-DW4 systems (B), error bars represent the standard deviation of the means of AFM measurements of three different areas on three independent samples. The fitting curves of experimental data is a four-parameter dose-

response curve obtained by using Graphpad prism, $R^2 > 0.85$. (B) Calculated selectivity parameter α using Eq. (1), from the fitting curves from A. Dash vertical lines are at Γ_{onset} . (C) the effect of βF_{rep} on Γ_{onset} .

This Figure shows that an increase in βF_{rep} shifts Γ_{onset} to a higher value. In particular, the GNPs systems with $\beta F_{\text{rep}} < 0.76$ exhibit a Γ_{onset} value lower than 3.52×10^3 molecules/nm² while these with $\beta F_{\text{rep}} > 2.1$ exhibit a Γ_{onset} value larger than 3.52×10^3 molecules/nm².

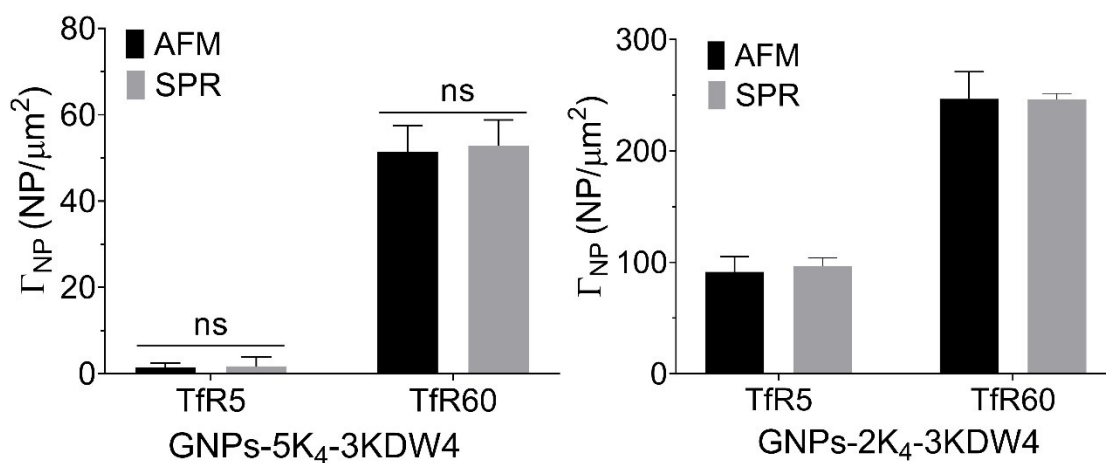


Figure S3.6. Comparison of Γ_{NP} by AFM and SPR for GNP-2K₄-3KDW₄ and GNP-5K₄-3KDW₄ at two surfaces TfR5 and TfR60. The data was analyzed using two-way Anova ($p > 0.7$).

The comparison of GNPs adsorption obtained by AFM and SPR shows no significant difference.

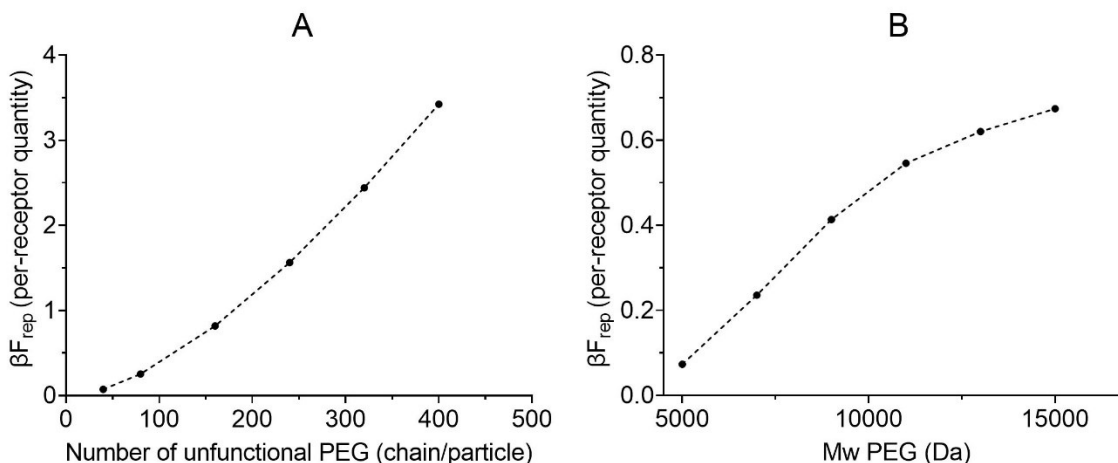


Figure S3.7. Calculated value (by the theory described in Materials and Methods of βF_{rep} (per-receptor quantity) as a function of number of protective PEG (A) and as a function of protective PEG molecular weight M_w (B), using the Eq. set (10-18). The nanoparticle size, number of PEG-DW4, the TfR size, are fixed at $R_{NPs} = 7.5$ nm, $N_{PEG-DW4} = 40$ number/particle, $V_{TfR} = 89$ nm³. The dimensionless scaling factor $C = 2.5$. For Figure A, the GNPs are functionalized with PEG_{5K} ($M_w = 5000$ Da) et PEG_{3K}-DW4 ($M_{w(PEG)} = 3000$ Da). For Figure B, the number of unfunctional PEG is fixed at $N_{PEG} = 40$.

This Figure shows how the steric repulsion βF_{rep} depends on the number of protective PEG chains and their length. The theoretical data were generated using the theoretical model described in section 3.4.1. The results show that βF_{rep} increases with an increase in the number or the length of the protective PEG chains.

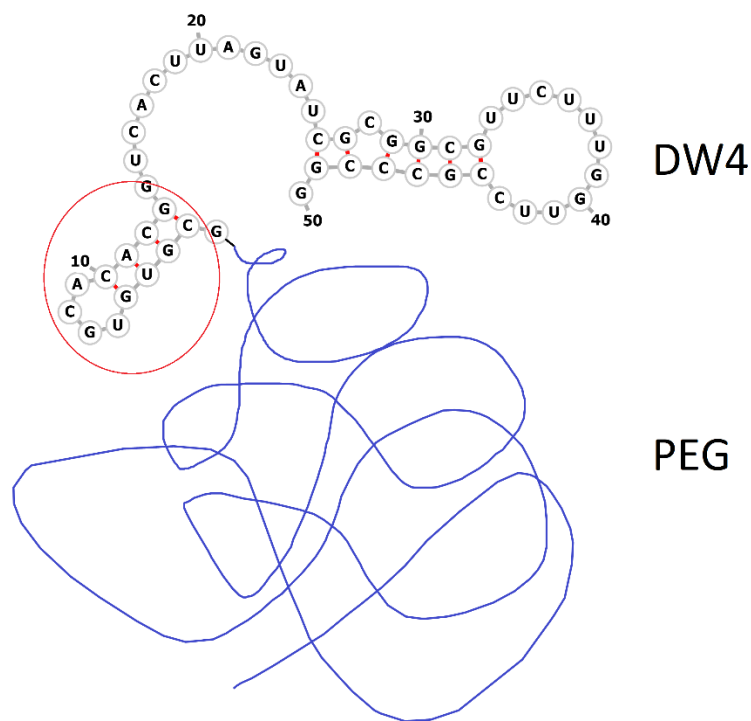


Figure S3.8. Schema presenting the binding region (red circle) of PEG-DW4 (225). The 2-D conformation of DW4 is predicted by RNDWebserver (226), in agreement with Ref. (186) (see Figure 2A, Table 1 therein).

This Figure shows the location of the binding region of DW4 on DW4-PEG chain. This allows us to estimate how deep the receptor penetrates when binding occurs. This estimate is used to calculate the steric repulsion (see section 3.4.1)

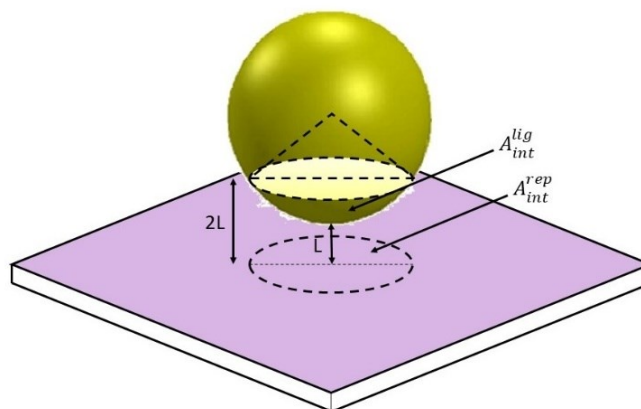


Figure S3.9. Interacting areas of nanoparticles and receptor surfaces, A_{int}^{lig} and A_{int}^{rep} , respectively.

Nanoparticles are assumed to bind at a distance $d = L$ from the receptor surfaces.

The Figure shows geometrical consideration of nanoparticle-receptor surface binding, allowing to provide an approximation of the number of receptors and ligands available for GNPs adsorption.

This is the result from Ref. (182).

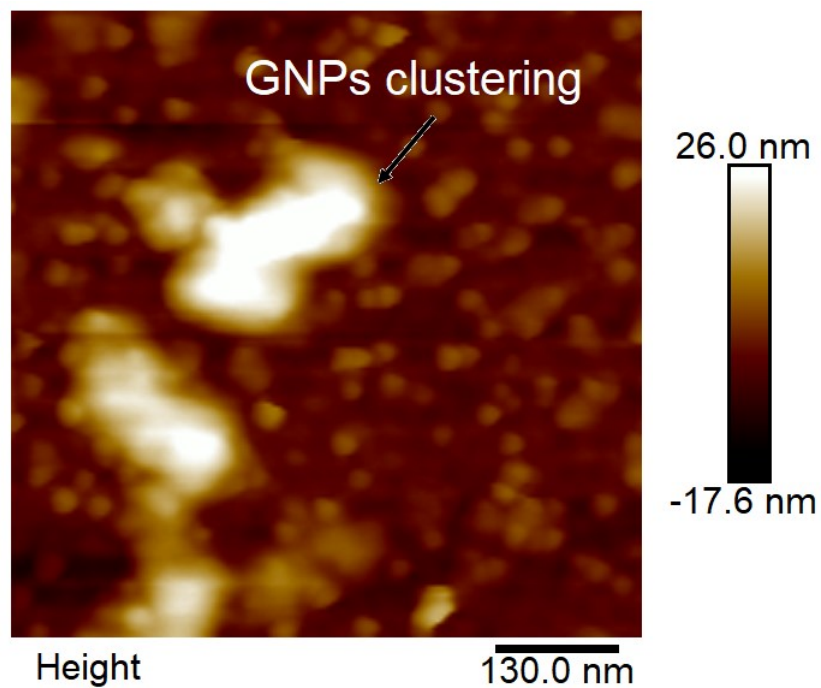


Figure S3.10. GNPs clustering when using the GNPs concentration of 500 pM.

This Figure shows the GNPs clusters when the GNPs concentration of 500 pM in a preliminary study. Therefore, all GNPs adsorption experiments in our work were carried out at the GNPs concentration of 100 pM.

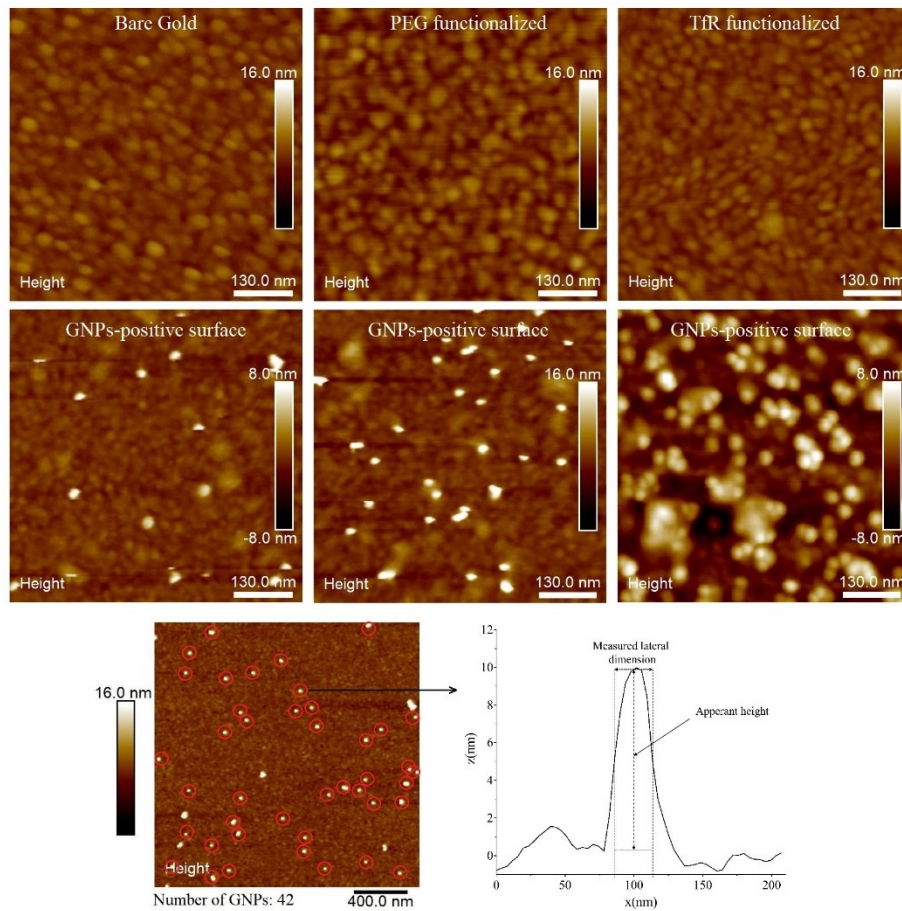


Figure S3.11. AFM height images of GNPs-positive/negative surfaces and an example of GNPs counting.

This Figure shows how the adsorbed GNPs on AFM images were detected and counted (see section 3.5.2.5)

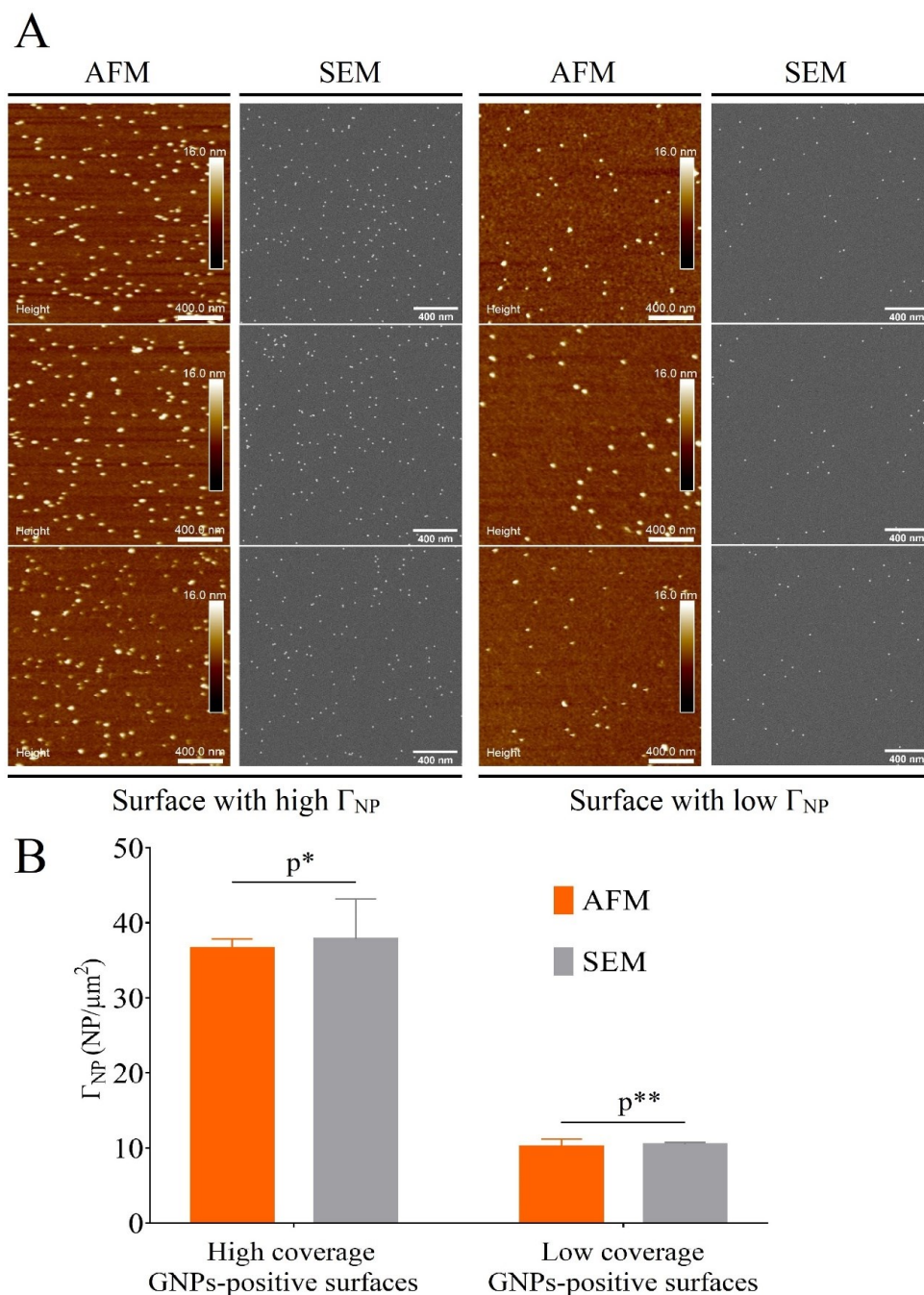


Figure S3.12. (A) AFM and SEM images of surfaces with high and low surface density of adsorbed GNPs (Γ_{NP}); (B) Comparison of Γ_{GNPs} measured by AFM and SEM for GNPs-positive surfaces. The data was analyzed using two-way Anova ($p^* = 0.86$; $p^{**} = 0.98$) in triplicate.

The comparison of GNPs adsorption obtained by AFM and SEM shows no significant difference.

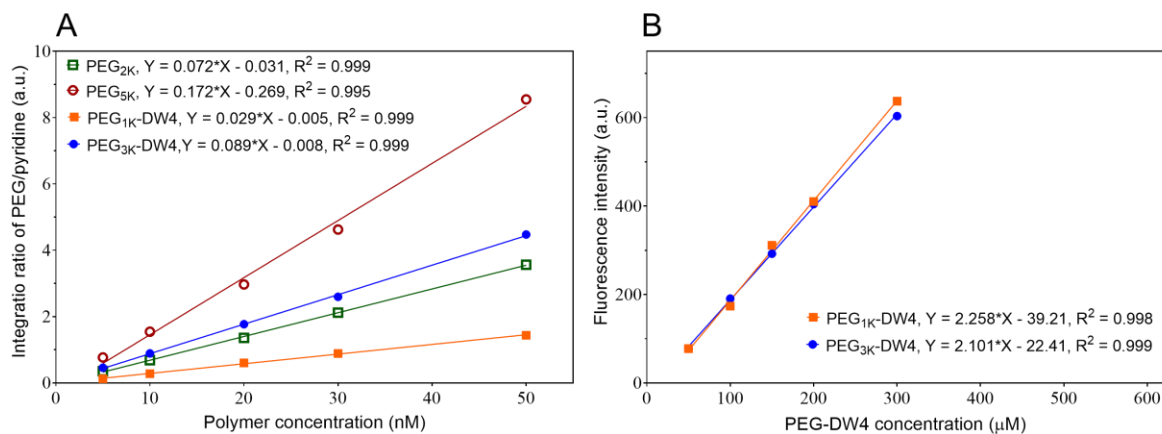


Figure S3.13. Representative calibration curves for PEG and PEG-DW4, measured by qNMR-¹H spectroscopy (A) and Fluorescence spectroscopy (B).

This Figure shows calibration curves for the quantification of the protective PEG and the ligated PEG (PEG-DW4) grafted on GNPs surface. The protective PEG is quantified by qNMR-¹H and the ligated PEG is quantified by Fluorescence spectroscopy. The obtained results were used to calculate the number of the protective PEG and the ligated PEG chains on GNPs (see section 3.5.2.6).

Table S3.1. Stability of Au-S bond of PEG-functionalized GNPs stored at 4°C in the dark under air or under Argon.

Time (day)	Under air	Under Argon
	PEG/GNP (chain/particle)	PEG/GNP (chain/particle)
0	724	724
2	643	718
4	604	747
6	560	741
8	478	717
12	-	679
14	314	773
20	236	750

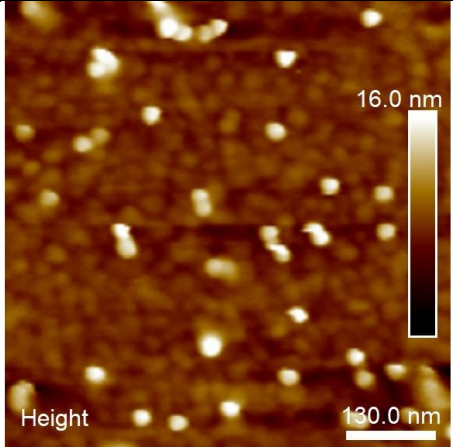
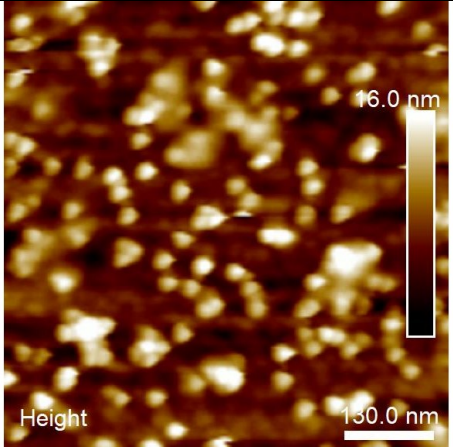
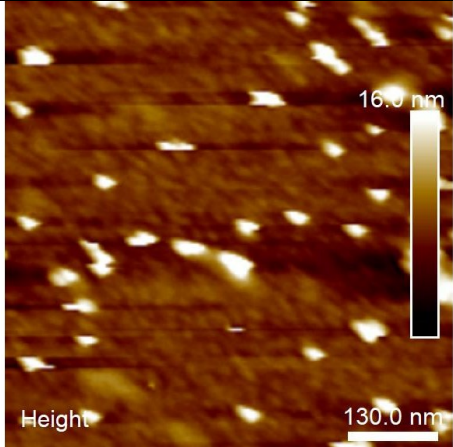
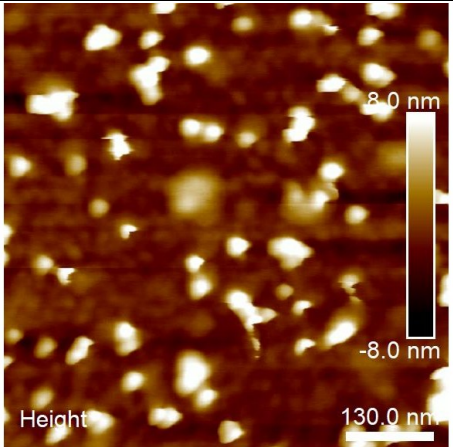
The polymers (PEG and PEG-DW4) were grafted on GNPs surface by Au-S covalent bond. Since Au-S bond can undergo oxidation when exposed to light, air or at elevated temperature (188), to determine an appropriate storage condition for the functionalized GNPs, the stability of grafted PEG2K on GNP was investigated in two storage conditions: at 4°C in dark under air or under argon. The results show that 67% of PEG2K chains dissociated from GNPs surface after 20 days when stored at 4oC in dark air; while the number of PEG2K chains was maintained for at least 20 days when stored at 4oC in dark and under argon. Therefore, the functionalized GNP were systematically stored in the latter conditions.

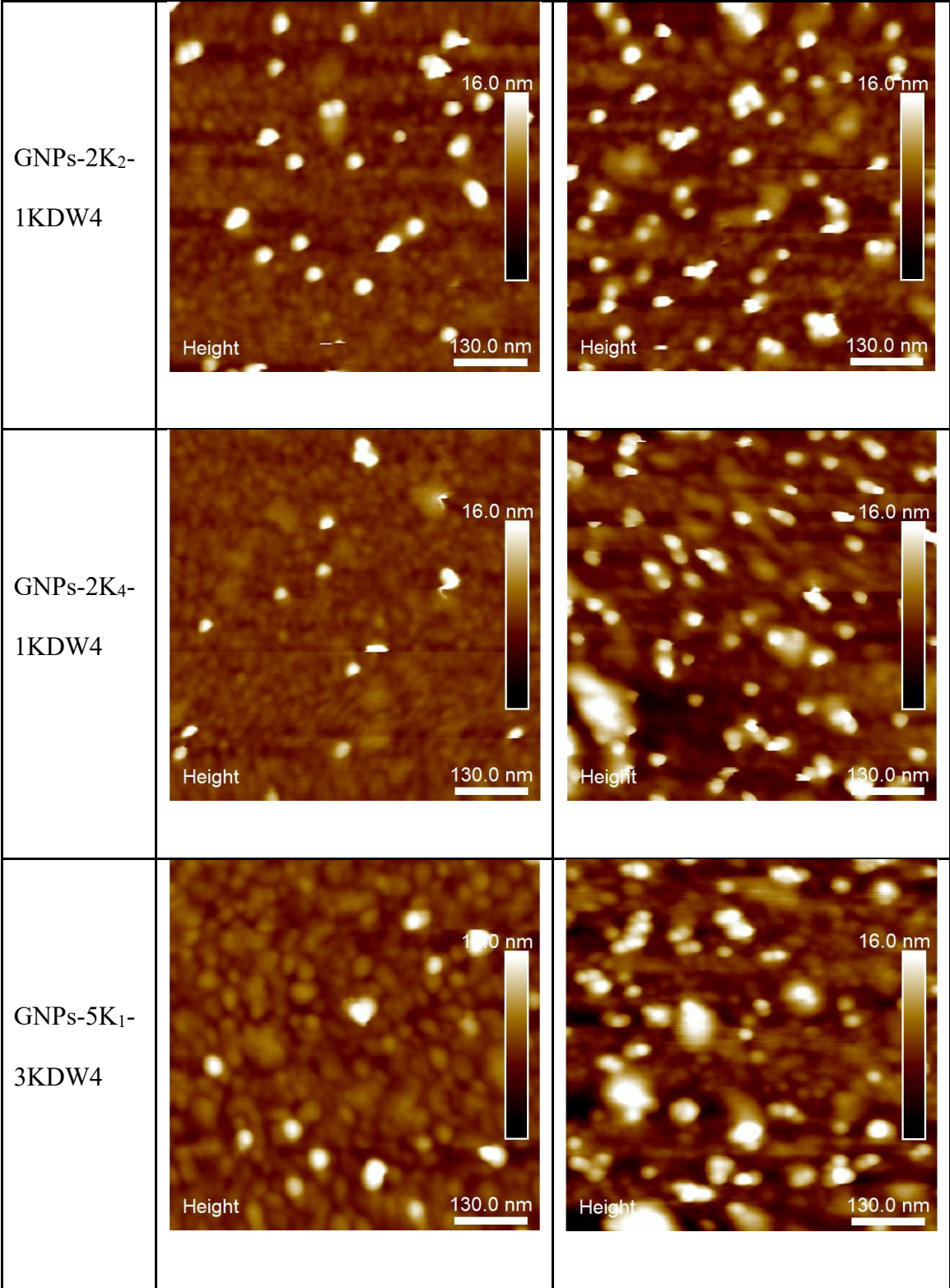
Table S3.2. SPR response and Estimation of TfR surface grafting density. Error bars represent the standard deviation of the mean of SPR measurements of three sensing areas on three independent samples.

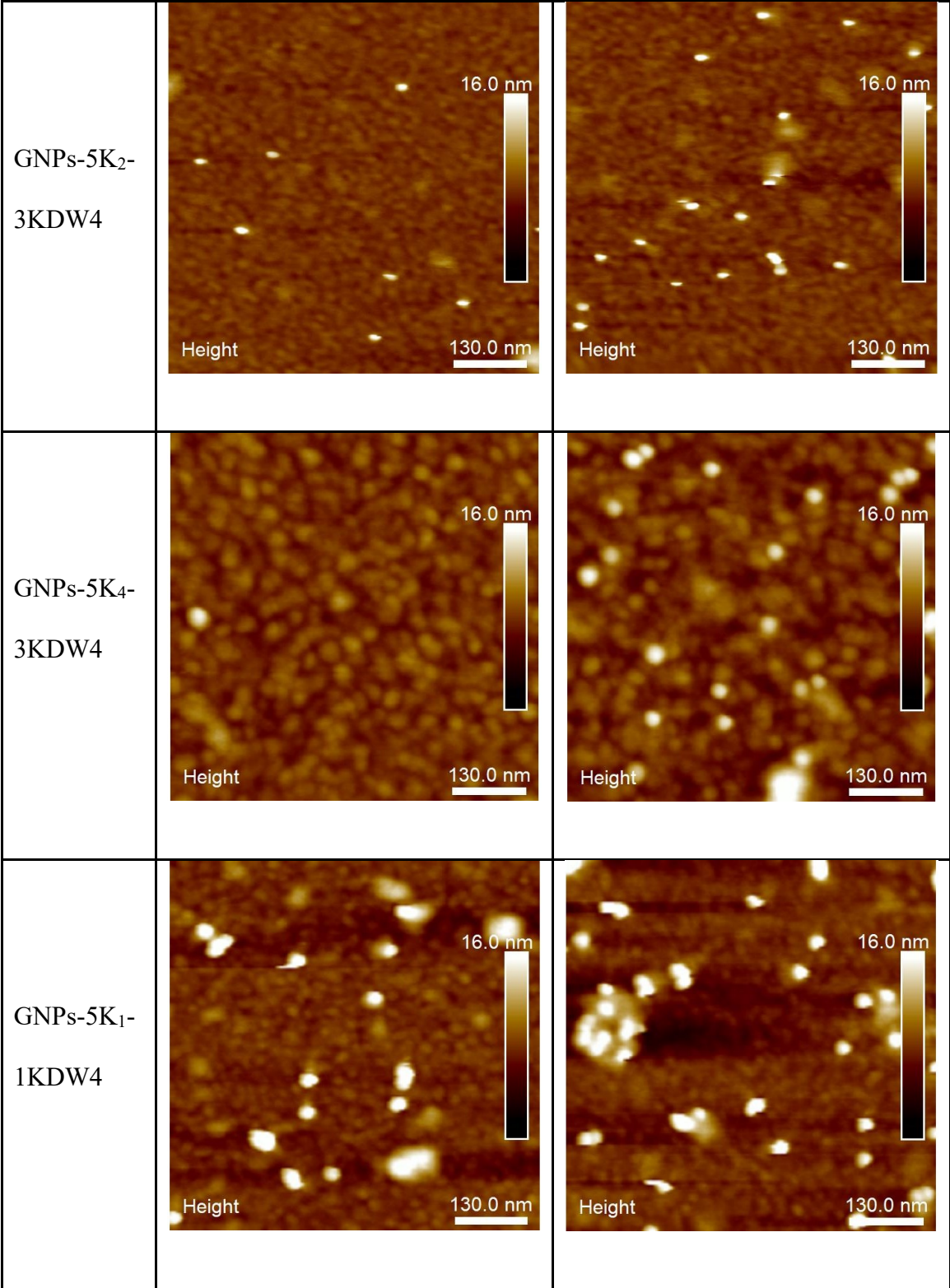
TfR surface	Coupling time (min)	SPR response ($\Delta\mathcal{L}_{\text{SPR}}$, nm)	TfR grafting density (Γ_{TfR}) (10^3 molecules/ μm^2)
TfR1	1	0.41 ± 0.04	0.86 ± 0.07
TfR2	2	0.78 ± 0.05	1.62 ± 0.10
TfR3.5	3.5	1.34 ± 0.03	2.78 ± 0.07
TfR5	5	1.69 ± 0.04	3.52 ± 0.07
TfR8	8	2.35 ± 0.05	4.87 ± 0.10
TfR11	11	2.79 ± 0.04	5.80 ± 0.09
TfR15	15	3.11 ± 0.12	6.47 ± 0.25
TfR60	60	3.84 ± 0.13	7.98 ± 0.27

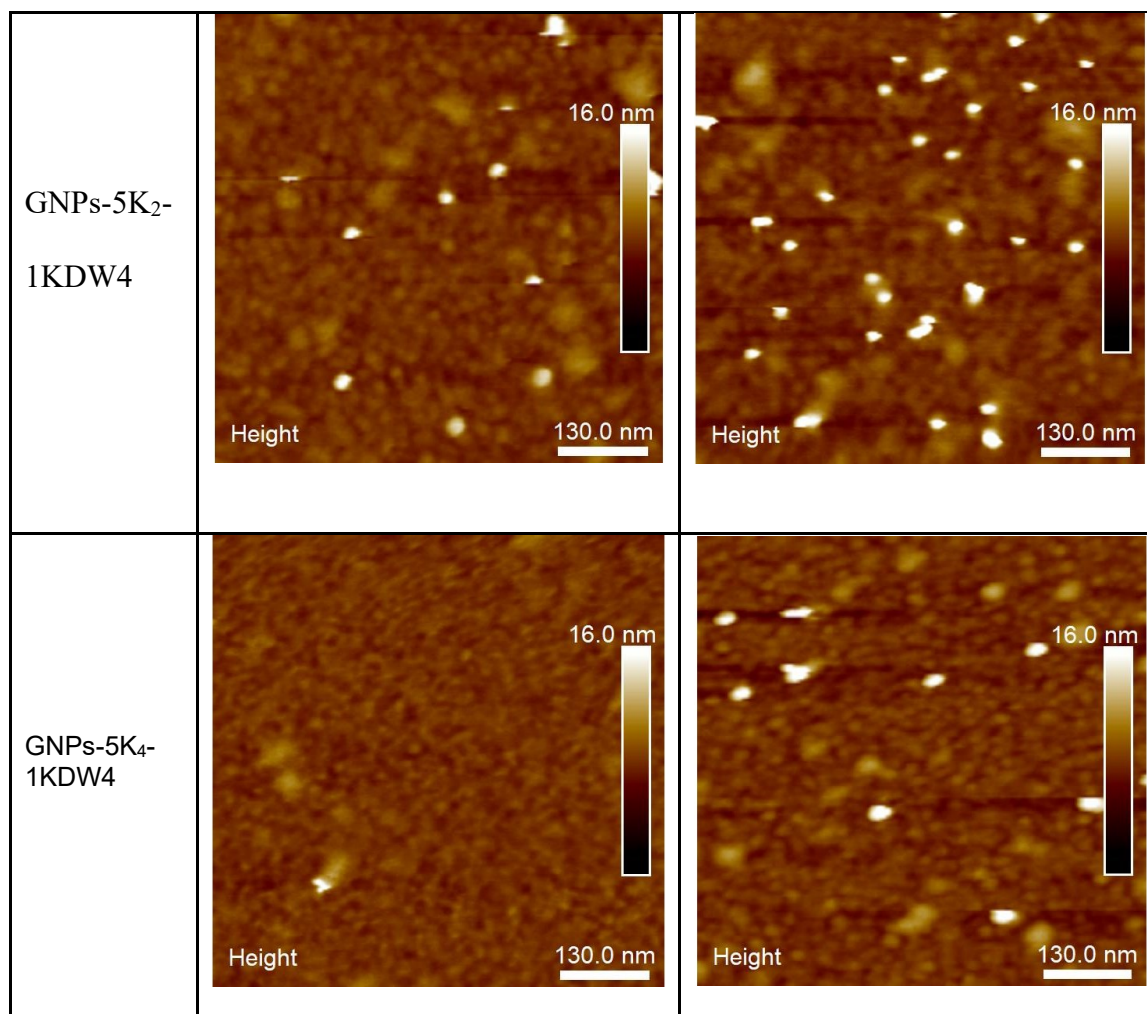
The receptor surface density was varied by modulating the time of coupling reaction. The result shows that an increase in coupling time leads to higher receptor surface densities. The 8 TfR surfaces at various receptor surface densities presented in **Table S3.2** were used for GNPs adsorption experiments.

Table S3.3. AFM height images of TfR surfaces incubated in functionalized GNPs.

Formulation	TfR5	TfR60
GNPs-2K ₄ - 3KDW4		
GNPs-2K ₁ - 1KDW4		







This Table presents the AFM images of TfR surfaces incubated with GNPs. The surface density of adsorbed GNPs reported in **Figure S3.5** is manually counted from the AFM images.

Chapitre 4

Monocouche bimodale stimuable pour le ciblage sélectif

4.1 Introduction

La vectorisation ciblée des médicaments à base de nanoparticules consiste à livrer préférentiellement des principes actifs aux tissus atteints, ce qui apporte deux bénéfices principaux: (i) réduire la dose administrée ainsi que le coût de la thérapie, (ii) minimiser des effets secondaires (4, 227). Le ciblage actif permet une reconnaissance spécifique ou une absorption sur la surface des cellules cibles. Pour cela, les nanoparticules peuvent être fonctionnalisées par un anticorps, un ligand ou un aptamère capable d'interagir avec un récepteur spécifique sur la surface cellulaire (228, 229). Cependant, *in vivo*, la présence de ligands à la surface des vecteurs peut favoriser la phagocytose, et ainsi raccourcir leur demi-vie. D'autre part, les vecteurs, dans le sang, peuvent se recouvrir de protéines sériques, ce qui peut perturber l'interaction avec les récepteurs. En outre, une interaction ligand-récepteur est insuffisante pour différencier les cellules saines des cellules atteintes, qui présentent souvent le même récepteur, mais se distinguent par leur concentration et distribution sur la surface cellulaire (230).

Tel que présenté dans le chapitre 1 (section 1.3.1), il a été démontré que les nanoparticules intelligentes, fonctionnalisées avec une monocouche bimodale stimuable, présentent une surface « dynamique » qui camoufle leur ligand dans les conditions saines (pH physiologique, température

corporelle) et expose leur ligand dans le microenvironnement pathologique (pH tumoral, température élevée). Cette propriété permettrait d'obtenir une adsorption préférentielle sur les cellules cibles.

Pour la preuve de concept, nous avons choisi un PEG portant la biotine (PEG-Biotin) et d'autre part, un poly(N-isopropylacrylamide) (pNIPAM) non fonctionnalisé (**Figure 4.1**). Le pNIPAM est un polymère thermosensible, qui est hydrophile et gonflé sous sa température de transition de solution critique (LCST, 32°C) et devient hydrophobe et se recroqueville au-delà (114, 231). Le couple biotine-streptavidine a été utilisé comme le couple modèle de ligand-récepteur en raison de l'interaction hautement sélective et stable entre la biotine et la streptavidine (232).

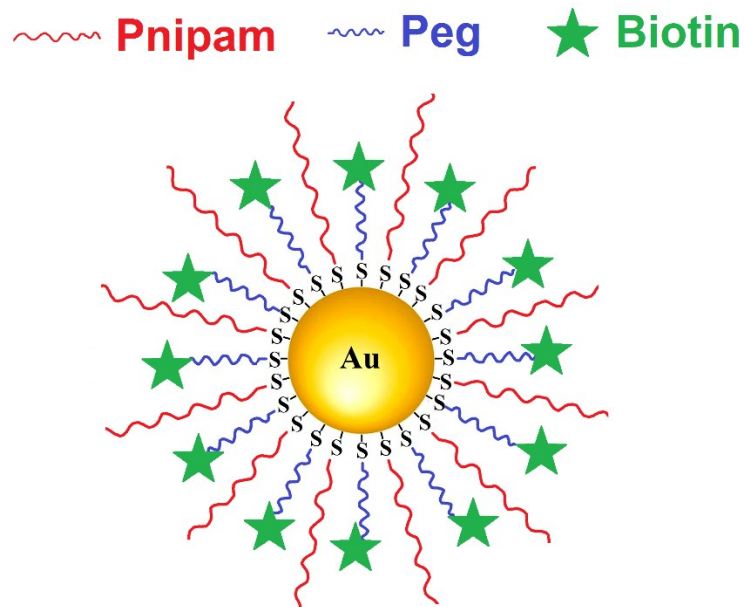


Figure 4.1. Schéma des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec une couche bimodale mixte

4.2 Résultats et discussion

4.2.1 Préparation et caractérisation des GNPs fonctionnalisées

La fonctionnalisation des GNPs a été évaluée indirectement par le diamètre hydrodynamique D_H (DLS) des GNPs et l'absorbance UV-vis avant et après la fonctionnalisation (**Figure 4.2**). La taille D_H de tous les GNPs fonctionnalisés avec PEG-Biotin, pNIPAM ou un mélange de PEG-Biotin et pNIPAM est significativement plus grande que celle des GNPs non-fonctionnalisés (**Figure 4.2A**). De plus, les bandes d'absorption des nanoparticules ont été également légèrement déplacées vers le rouge ($\sim 3-6$ nm) pour les GNPs fonctionnalisés (**Figure 4.2B**) en raison du changement de la constante diélectrique à la surface des nanoparticules. De nouveau, en observant les spectres 1H RMN de l'échantillon préparé à partir d'une solution GNPs-PEG-Biotin/pNIPAM (**Figure S4.1**), l'apparition des pics des protons caractéristiques des polymères confirment les résultats de DLS et de Spectroscopie UV-vis.

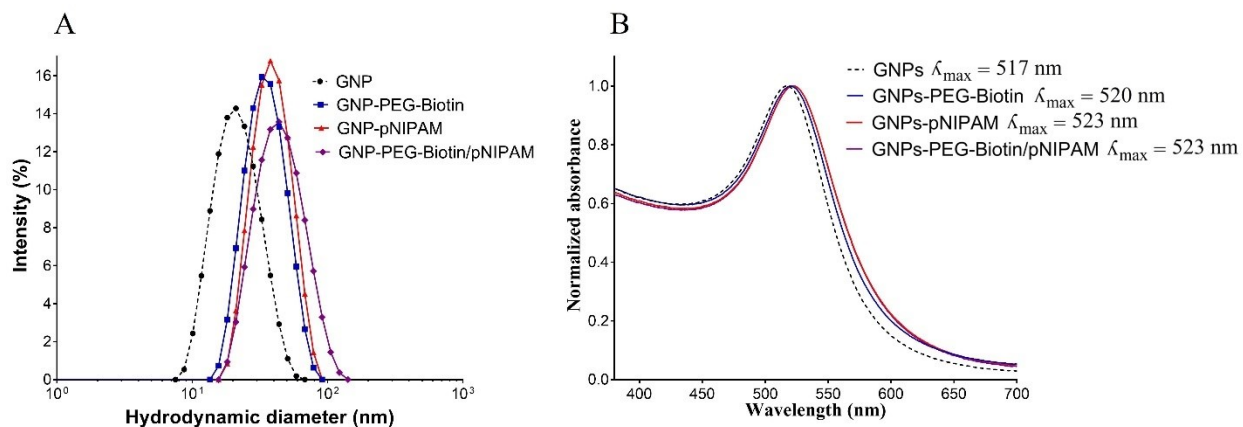


Figure 4.2. Diamètre hydrodynamique (DLS) des GNPs (A) et spectres UV-vis (B) des GNPs fonctionnalisées par le PEG-Biotin, pNIPAM ou un mélange des deux (Ratio initial PEG_{1K}-Biotine : pNIPAM_{10K}1:10).

Pour moduler l'amplitude de la répulsion stérique associée aux chaînes de furtivité (pNIPAM), nous avons fait varier le ratio molaire entre le PEG-Biotin et le pNIPAM dans la solution initiale de greffage. Comme présenté dans la **Table 4.1**, le ratio molaire final sur les GNPs est plus faible que le ratio molaire initial. Lors de la fonctionnalisation des nanoparticules métalliques avec un

mélange de molécules thiol ω -fonctionnels, le ratio molaire final sur les GNPs est similaire à celui dans la solution initiale si la quantité totale de polymères est en défaut par rapport la concentration requise pour recouvrir complètement la surface des nanoparticules. Si la quantité totale de polymères est supérieure à cette concentration, le ratio molaire final sur les GNPs est en faveur de polymère avec une vitesse d'adsorption plus élevée. Il faut noter que le nombre maximal de molécules thiol ω -fonctionnels sur GNPs peut être théoriquement déterminé en se basant sur la taille de GNPs et l'empreinte minimale de molécule thiol ω -fonctionnel sur GNPs déterminée à $0.189 \text{ nm}^2/\text{molécule}$ (210). Le diamètre de GNPs est de 15 nm, nous avons donc le nombre maximal de molécules thiol ω -fonctionnels sur GNPs est calculé à 3738 molécule/GNPs. Dans cette étude, les GNPs ont été fonctionnalisées avec un ratio initial Polymère-à-GNPs ($\Phi_{\text{Polymère/GNPs}}$) entre 7 000 et 60 000 chaînes/GNPs, qui est en excès par rapport au nombre maximal de polymères sur GNPs. Il est probable que la vitesse d'adsorption du PEG-Biotin sur la surface d'or soit plus forte que celle du pNIPAM.

Table 4.1. Préparation des GNPs fonctionnalisées avec une monocouche mixte PEG_{1K}-Biotin : pNIPAM_{10K}

GNPs fonctionnalisées	Ratio initial PEG _{1K} -Biotine : pNIPAM _{10K}	Ratio réel (*) PEG _{1K} -Biotine : pNIPAM _{10K}	Polymère total (**) (chaîne/GNPs)
GNPs-PEG _{1K} -Biotine	-	-	300±15
GNPs-MB2-10	1 : 05	1 : 0.05-0.08	280±20
GNPs-MB2-20	1 : 10	1 : 0.06-0.10	260±30
GNPs-MB2-50	1 : 25	1 : 0.29-0.37	180±50
GNPs-MB2-100	1 : 50	1 : 1.57-2.31	170±40

MB (Mixed brush): Couche mixte de PEG_{1K}-Biotin et pNIPAM_{10K}

(*) : Le ratio réel PEG-Biotin/pNIPAM est déterminé par la spectroscopie ¹H RMN quantitative.

Les courbes de calibration sont présentées dans **Figure S4.2**

(**) : La quantité surfacique totale de polymères est calculée à partir les résultats de ¹H RMN et UV-vis (détails dans la section **3.5.2.6**)

4.2.2 Thermosensibilité des GNPs fonctionnalisées

Pour évaluer la thermosensibilité des GNPs fonctionnalisées, le comportement des monocouches de PEG_{2K} (à la place de PEG_{1K}-Biotin) et pNIPAM ont été suivi en DLS et Spectroscopie UV-vis. Le diamètre hydrodynamique des nanoparticules en suspension dans l'eau (GNPs-pNIPAM, GNPs-PEG, GNPs-PEG/pNIPAM, la caractérisation de ces GNPs fonctionnalisées est présentée dans **Table S4.1**) a été mesuré de 25°C à 41°C. Le diamètre hydrodynamique des GNPs-pNIPAM a légèrement diminué (de 39 nm à 31 nm, **Figure 4.3**), contrairement à celles des GNPs-PEG, ce qui traduit le repliement des chaînes de pNIPAM au-dessus de sa LCST (32°C). Lorsque les expériences ont été répétées dans le PBS, les GNPs-pNIPAM ont vu leur diamètre hydrodynamique augmenter et leur bande d'absorption s'est déplacée vers le rouge, suggérant une agrégation (**Figure 4.4, Figure 4.5**). Les études de potentiel zêta montrent que la charge de surface est négative dans l'eau (**Figure 4.6**), probablement à cause du citrate résiduel à la surface des nanoparticules, ce qui stabilise les particules. Dans le PBS, la charge des nanoparticules est plus proche de la neutralité ce qui mène à une agrégation (**Figure 4.4A**). Pour les GNPs-PEG/pNIPAM (voir **Table S4.1**), nous n'avons pas observé de variation de taille sur la gamme de température étudiée. Les chaînes de PEG et pNIPAM sur la surface de GNPs-PEG/pNIPAM présentent la conformation de brosse dense (**Table S4.1**), ce qui pourrait empêcher le repliement du pNIPAM au-dessus de 32°C en raison de la gêne stérique.

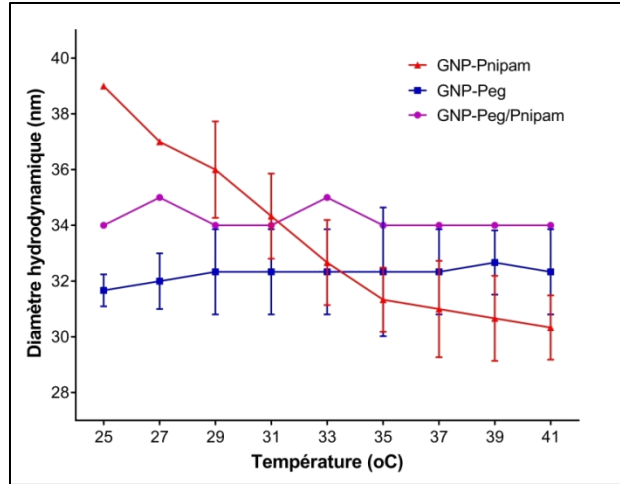


Figure 4.3. Diamètre hydrodynamique de GNPs fonctionnalisées en suspension dans l'eau en fonction de la température. Nombre de répétition = 1

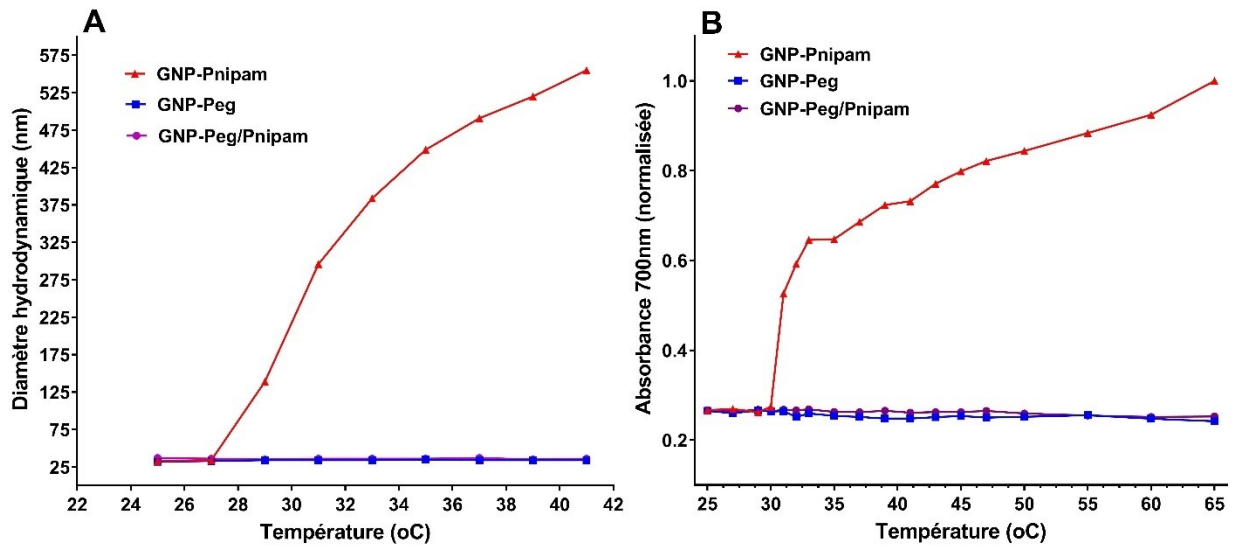


Figure 4.4. Diamètre hydrodynamique (A) et Absorbance à 700 nm (B) de GNPs fonctionnalisées en suspension dans PBS en fonction de la température. Nombre de répétition = 1

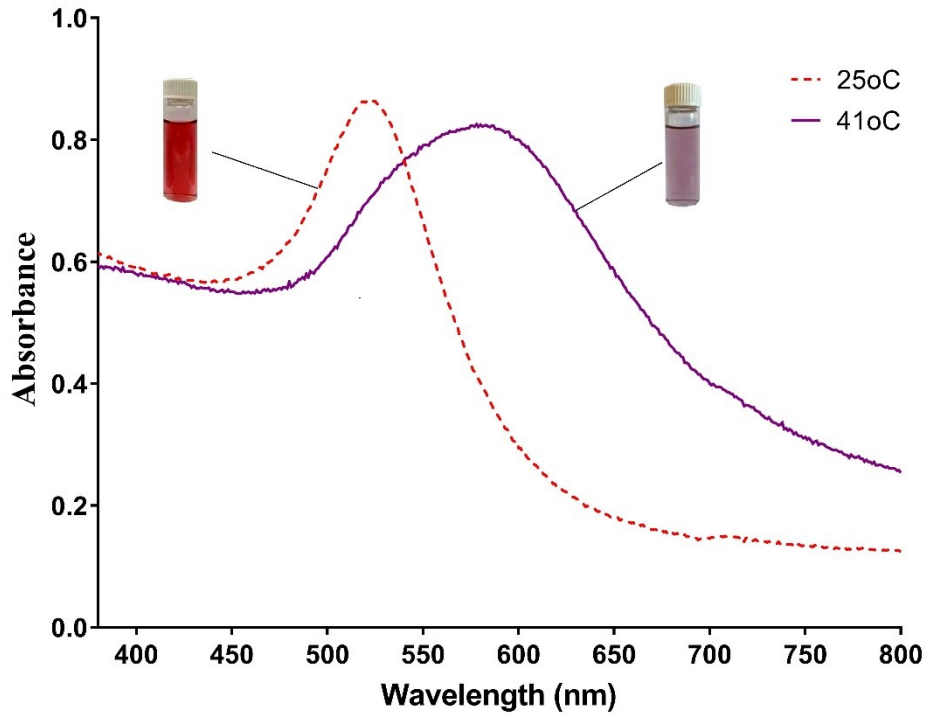


Figure 4.5. Spectre UV-vis de GNPs-pNIPAM en suspension dans PBS à 25°C et 41°C et photo ci-jointe présentant un changement de couleur (rouge vers bleu) lors de l'agrégation

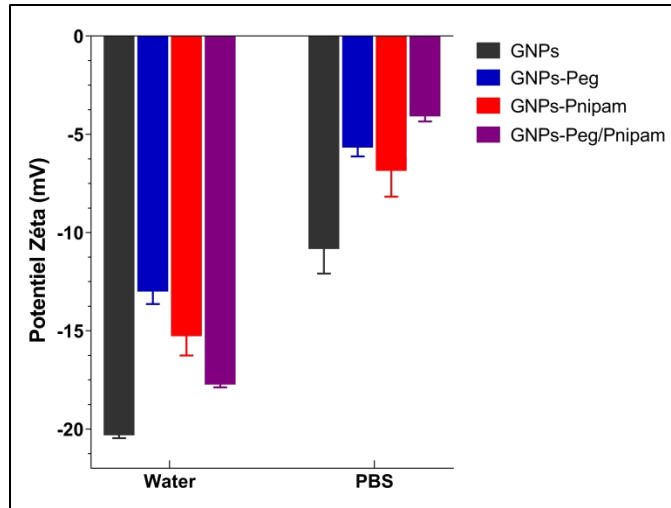


Figure 4.6. Potentiel Zêta des GNPs fonctionnalisées dans l'eau MiliQ et dans PBS

4.2.3 Préparation des surfaces de streptavidine

Afin d'évaluer l'adsorption sélective en fonction de la densité surfacique de récepteur, des surfaces de streptavidine de différentes densités surfaciques ont été préparées de façon similaire à l'approche utilisée pour TfR (section 3.5.2.3), en augmentant le temps de couplage. **Figure 4.7** montre que la quantité de streptavidine immobilisée sur la surface peut être ajustée par le temps de réaction (entre 1 et 30 min).

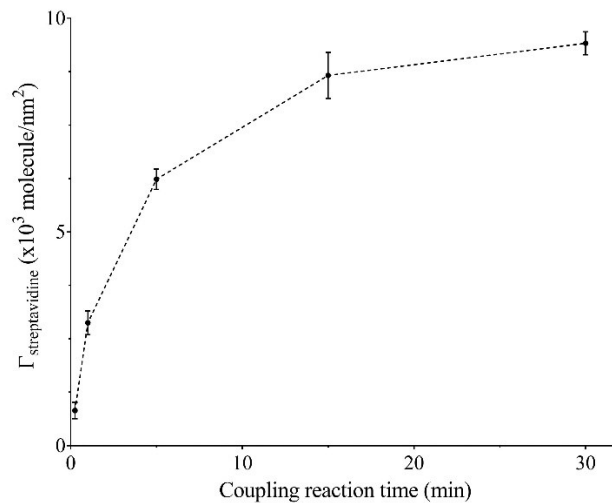


Figure 4.7. Densité surfacique de streptavidine, mesuré par SPR (voir la section 3.5.2.7). Les conditions de couplage sont décrites dans la section 3.5.2.3. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de la moyenne d'une mesure de SPR sur trois zones de détection différentes.

4.2.4 Adsorption des GNPs fonctionnalisées sur les surfaces de streptavidine

Afin d'évaluer l'adsorption des GNPs fonctionnalisées, les surfaces de Streptavidine ont été incubées dans les solutions de GNPs (1 pM). Les GNPs adsorbées sur les substrats ont été visualisées par AFM puis dénombrées. Le nombre des GNPs adsorbées (GNPs-PEG_{1K}-Biotin, GNPs-MB2 (10-100), **Table 4.1**) sur les substrats de Streptavidine de différentes densités

surfaiques sont affichés dans la **Figure 4.7**. La densité surfaique de GNPs adsorbées augmente en fonction de la densité surfaique de Streptavidine pour toutes les quantités de pNIPAM sur les GNPs. Cependant, les résultats ne montrent pas clairement l'effet de chaînes de pNIPAM sur la sélectivité de l'interaction GNPs-surface de Streptavidine. Ces résultats peuvent être expliqués par nombreuses raisons. En premier, l'affinité biotine-streptavidine est très forte ($K_d \sim 10^{-14}$ M (232)), ce qui provoque une adsorption même à une faible densité surfaique de récepteur. Tel décrit dans le chapitre 1, section **1.3.2**, il faut une affinité ligand-récepteur modérée pour la super-sélectivité. En deuxième, il se peut que les chaînes de PEG-Biotine et pNIPAM se distribuent de manière hétérogène sur la surface de GNPs (îlot de PEG-Biotin et îlot de pNIPAM). Donc, il pourrait y avoir des régions où la biotine est exposée et où le pNIPAM n'empêche pas la liaison biotin-streptavidine. Finalement, il se peut que la densité surfaique relative de pNIPAM/PEG_{1K}-Biotin (maximum deux chaînes de pNIPAM pour une chaîne de PEG, voir Table 4.5) ne soit pas suffisante pour permettre un empêchement d'adsorption de GNPs sur les surfaces de récepteurs à faibles densités.

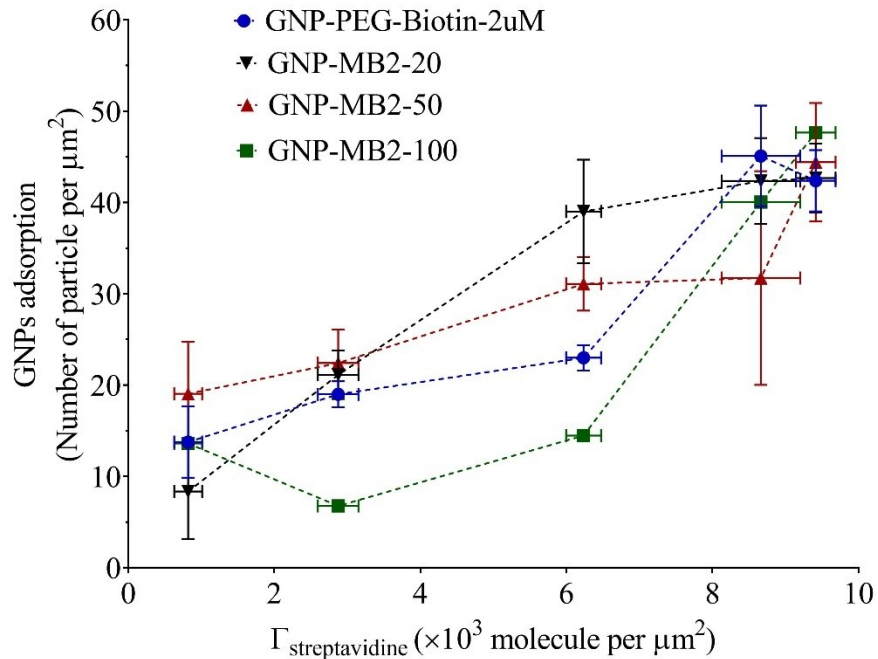


Figure 4.8. Quantification des GNPs adsorbées sur les substrats de Streptavidine aux différentes densités surfaciques de Streptavidine, par AFM.

Nous avons effectué une étude préliminaire pour caractériser la distribution de ces deux polymères (PEG-Biotine et pNIPAM) sur la surface d'or. Pour ce faire, nous avons greffé les deux polymères sur une surface d'or plane et nous avons observé les surfaces par AFM. Les images topographiques sont présentées dans la **Figure 4.9**. À cause de la résolution limitée, la caractérisation par AFM ne permet pas de distinguer les deux polymères et de déterminer leur distribution surfacique. En perspective, il serait possible d'utiliser la microscopie à effet tunnel (STM, en anglais, Scanning Tunneling Microscopy) pour caractériser la ségrégation de phase de la monocouche PEG-Biotin/pNIPAM. En général, la STM permet de déterminer la morphologie et la propriété électrique de la surface à une résolution atomique. Des défauts sur la monocouche ou des changements de composition conduisent à des changements de la propriété électrique et peuvent

être détecté par STM. En effet, la ségrégation de phase à l'échelle moléculaire de la monocouche mixte d'alcanethiol sur la surface d'or a été rapporté à l'aide de STM (233).

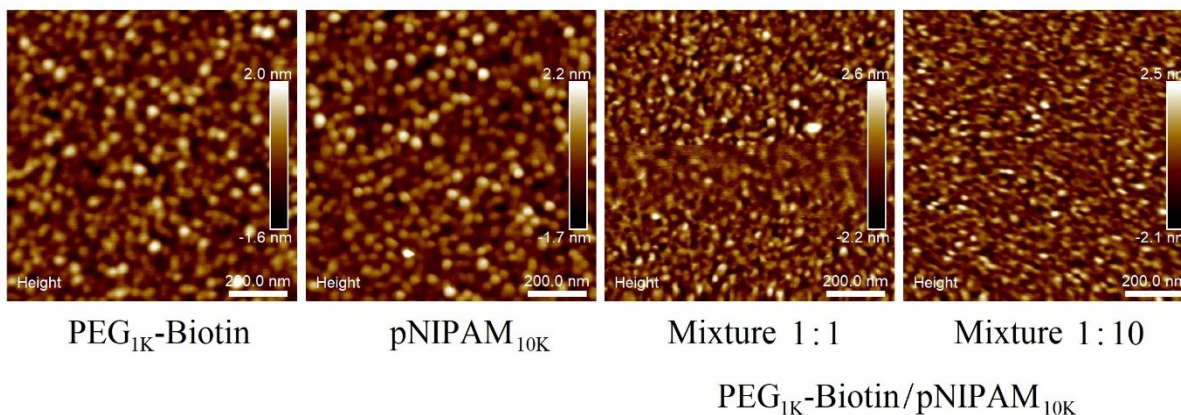


Figure 4.9. Images d'AFM des surfaces d'or fonctionnalisées avec $\text{PEG}_{1\text{K}}\text{-Biotin}$, $\text{pNIPAM}_{10\text{K}}$ et les mélanges $\text{PEG}_{1\text{K}}\text{-Biotin/pNIPAM}_{10\text{K}}$. Des polymères sont greffés sur la surface plane d'or par immersion la surface dans la solution de polymère dans la DMF. Les concentrations des solutions sont $\text{PEG}_{1\text{K}}\text{-Biotin}$ ($10 \mu\text{M}$), $\text{pNIPAM}_{10\text{K}}$ ($10 \mu\text{M}$), Mixture 1:1 ($\text{PEG}_{1\text{K}}\text{-Biotin}$ $10 \mu\text{M}$ et $\text{pNIPAM}_{10\text{K}}$ $20 \mu\text{M}$), Mixture 1:10 ($\text{PEG}_{1\text{K}}\text{-Biotin}$ $10 \mu\text{M}$ et $\text{pNIPAM}_{10\text{K}}$ $100 \mu\text{M}$).

4.2.5 Conclusion

Pour préparer une monocouche mixte stimuable, nous avons utilisé le pNIPAM en tant que chaîne furtive. Toutefois, plusieurs limitations ont été identifiées : le pNIPAM est greffé en très faible quantité en présence de $\text{PEG}_{1\text{K}}\text{-Biotine}$, et ne semble pas influencer la liaison de la biotine à la streptavidine. Pour répondre à l'hypothèse d'une trop forte affinité entre la biotine et la streptavidine, nous avons repris l'étude avec un autre couple ligand-récepteur DW4-TfR, présentant une affinité modérée $K_D = 104 \text{ nM}$ (**Figure 3.2**) et une monocouche bimodale contenant PEG portant ligand et PEG non-fonctionnel à différentes longueurs. Néanmoins, les résultats de

cette étude préliminaire ont montré que le choix de ligand ainsi que la chaîne de furtivité jouent des rôles essentiels pour la conception des nanoparticules sélectives.

4.3 Matériels et Méthodes

Les matériels et méthodes sont similaires aux méthodes décrites dans la section 3.5.2, avec les modifications décrites ci-après.

4.3.1 Matériels

Thiol PEG Biotin (SH-PEG_{1K}-Biotin, M_w 1000 g/mol, number of ethylene glycol units n_{PEG} 23) a été acheté chez Jenkem Technology (Texas, USA), Thiol pNIPAM (SH-pNIPAM, M_w 10000 g/mol, the number of N-Isopropylacrylamide units n_{NIPAM} 88) a été acheté chez Polymersource (Montréal, Canada). La streptavidine a été achetée chez Sigma Aldrich (Oakville, Canada).

4.3.2 Méthodes

Fonctionnalisation de GNPs avec PEG_{1K}-Biotin et pNIPAM: Le PEG_{1K}-Biotin-à-GNPs ratio de greffage $\Phi_{\text{PEG-Biotin}/\text{GNPs}}$ est fixé à 1167 chaîne/GNPs. Les pNIPAM-à-GNPs ratios de greffage $\Phi_{\text{pNIPAM}/\text{GNPs}}$ sont 5833, 11667, 29175 et 58350 chaîne/GNPs.

Quantification de polymères greffés sur GNPs: PEG_{1K}-Biotin et pNIPAM greffés sur GNPs ont été quantifiés par RMN-¹H quantitative. Les échantillons RMN ont été préparés dans DMSO-D₆. Le pic pour PEG_{1K}-Biotin est à 3.60 ppm, le pic pour pNIPAM est à 1.15 ppm (voir **Figure S4.1**).

Mesure de potentiel Zêta: Le potentiel Zêta de GNPs a été mesuré à l'aide d'un Malvern Zetasizer Nano (DLS, ZEN5600 Zetasizer NANO-ZSP, Malvern, UK). Les échantillons ont été préparés en diluant GNPs dans de l'eau Mili-Q ou PBS 1X (concentration en GNPs ~ 0.8 nM).

Évaluation de thermosensibilité des GNPs par DSL: La taille des GNPs a été mesurée dans un range de température (25 – 40°C) à l'aide d'un Malvern DLS (ZEN5600 Zetasizer NANO-ZSP, Malvern, UK).

Évaluation de thermosensibilité des GNPs par la spectroscopie UV-vis: Le spectre UV-vis des GNPs a été acquis sur un spectrophotomètre Cary 100 UV-vis (plage de 800 à 350 nm, incrément de 0,5 nm) (Californie, États-Unis).

4.3.3 Annexes

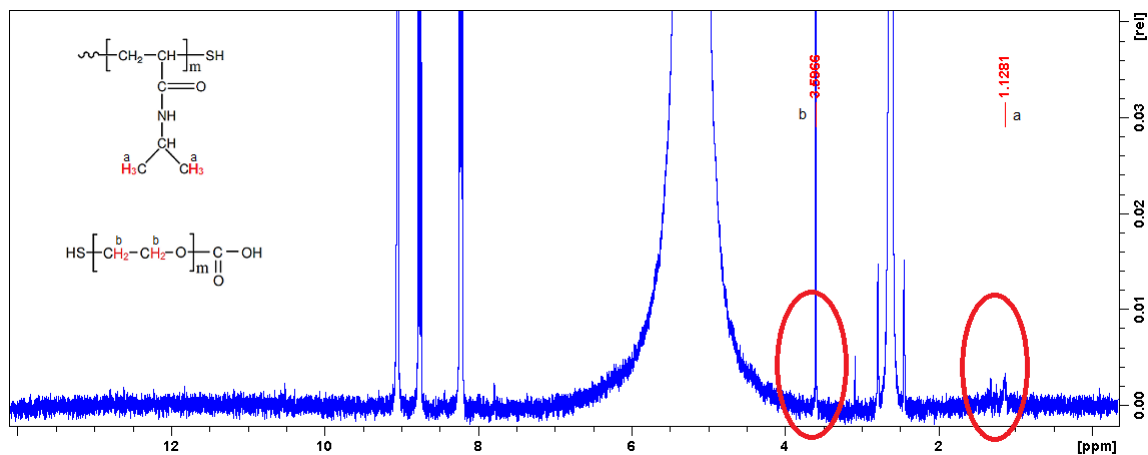


Figure S4.1. Le spectre $^1\text{H-RMN}$ enregistré dans DMSO-D_6 de l'échantillon préparé à partir de solution GNP-PEG/pNIPAM purifiée

Cette Figure montre les pics de proton H^a (de PEG) et de proton H^b de pNIPAM utilisés pour l'établissement des courbes de calibration (**Figure S4.2**) et pour la quantification de de PEG et pNIPAM, respectivement dans l'échantillon RNM.

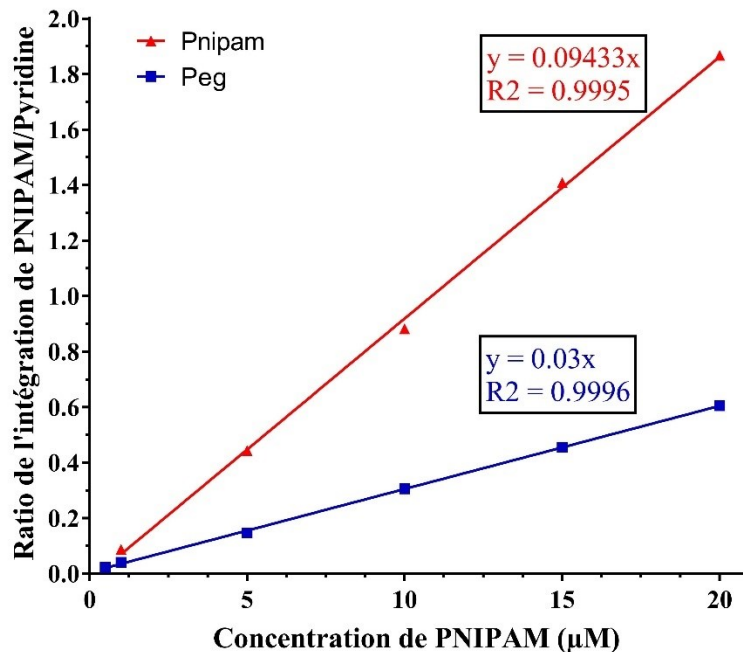


Figure S4.2. Courbes de calibration pour pNIPAM (A) et PEG (B) (^1H -RMN, DMSO- D_6), basée sur les protons caractéristiques a pour pNIPAM et b pour PEG (**Figure S4.1**)

Cette Figure montre les courbes de calibration pour PEG et pNIPAM utilisées pour la quantification de PEG et pNIPAM greffés sur la surface de GNPs.

Table S4.1. Caractérisation quantitative des GNPs fonctionnalisées utilisées dans l'étude de thermosensibilité.

Nanoparticules	$\sigma_{\text{PEG}}^{(a)}$ (chaîne/nm ²)	$\sigma_{\text{pNIPAM}}^{(a)}$ (chaîne/nm ²)	D (nm) ^(b)	$R_F^{(c)}/D$ PEG Conformation ^(d)	$R_F^{(c)}/D$ pNIPAM Conformation ^(d)
GNPs-PEG	1.01	-	0.99	3.47 – Brosse dense	-
GNPs-pNIPAM	-	0.15	2.53	-	1.44 - Brosse
GNPs-PEG/pNIPAM	0.75	0.13	1.07	3.21 – Brosse dense	3.43 - Brosse dense

^(a): σ_{PEG} , σ_{pNIPAM} sont la densité de greffage de PEG, pNIPAM, respectivement. Elles sont calculées à partir des résultats de RMN et UV-vis (voir la section **3.5.2.6**)

^(b): D est la distance entre la chaîne adjacente greffée $D = (1/\sigma)^{1/2}$

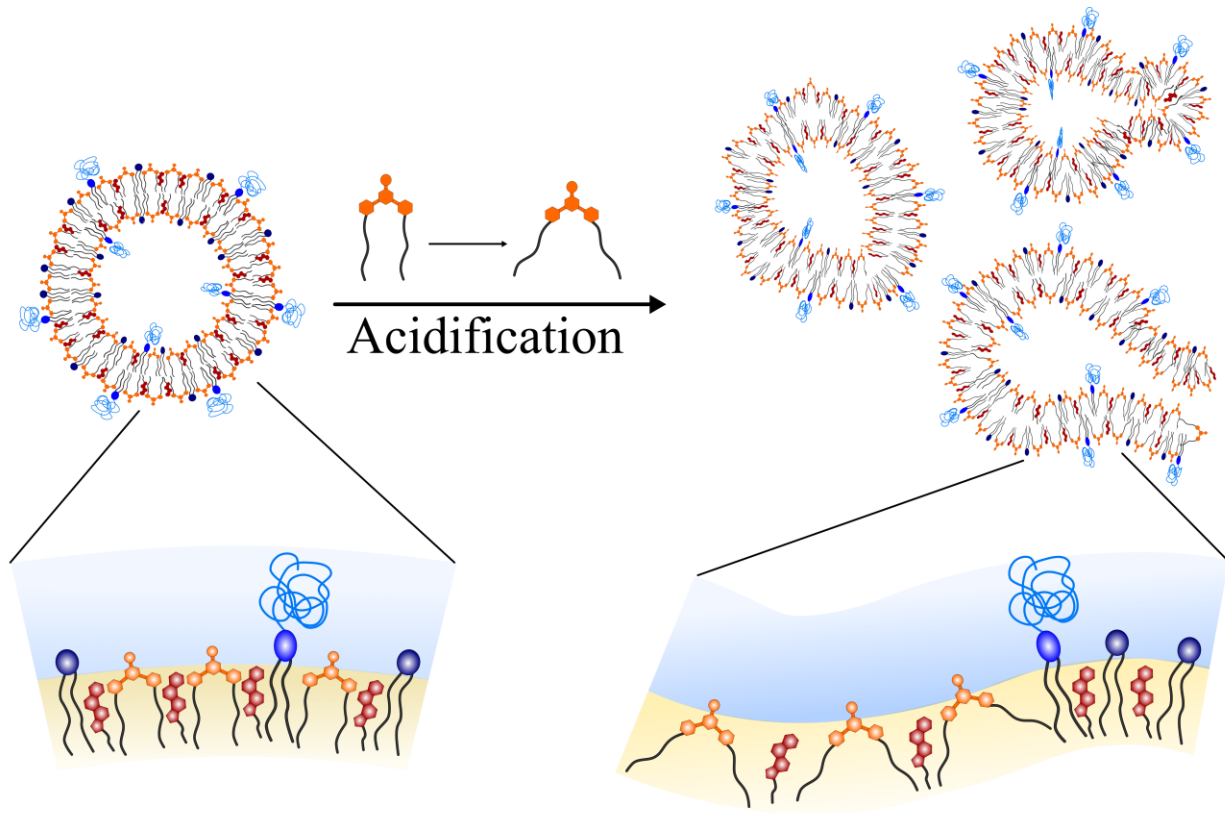
^(c): R_F est le rayon de Flory, $R_F = \alpha n^{3/5}$ (206), où n est la nombre de monomère de polymère ($n_{\text{PEG}} (2 \text{ kDa}) = 45$, $n_{\text{pNIPAM}} (10 \text{ kDa}) = 88$); α est la longueur d'un monomère ($\alpha_{(\text{PEG})} = 0.35 \text{ nm}$ (207), $\alpha_{(\text{pNIPAM})} = 0.25 \text{ nm}$ (234)).

^(d): Les polymères présentent une conformation de brosse ($R_F/D > 1$) et une conformation de brosse dense ($R_F/D > 1$) (206, 235).

Cette Table présente la caractérisation de la monocouche polymérique sur la surface des GNPs utilisées dans l'étude de thermosensibilité. La monocouche polymérique sur GNPs-PEG et GNPs-pNIPAM adopte une conformation de brosse. La monocouche polymérique sur GNPs-PEG/pNIPAM adopte une conformation de brosse dense, ce qui pourrait empêcher le repliement du pNIPAM au-dessus de 32°C en raison de la gêne stérique (voir **Figure 4.3**)

Chapitre 5

Déstabilisation membranaire des nanoparticules lipidiques pH-sensibles



pH-Switchable lipids: from molecular switch to macroscopic changes in lipid vesicles

Huu Trong Phan^a, Victor Passos Gibson^a, Aurore Guédin^c, Emmanuel Ibarboure^d, Nadia El Mammeri^e, Axelle Grélard^e, Jean-François Le Meins^d, Erick J. Dufourc^e, Antoine Loquet^e, Jeanne Leblond Chain^{c*}, Suzanne Giasson^{a,b,*}

^aFaculty of Pharmacy, University of Montréal, Montréal, H3C 3J7, Canada; ^bDepartment of Chemistry, University of Montréal, Montréal, H3C 3J7, Canada; ^cUniversity of Bordeaux, CNRS, INSERM, ARNA, UMR 5320, U1212, F-33000 Bordeaux, France; ^dLaboratoire de Chimie des Polymères Organiques LCPO Université de Bordeaux CNRS Bordeaux INP UMR 562916 Avenue Pey Berland F-33600 Pessac France; ^eInstitut de Chimie et de Biologie des Membranes et des Nano-objets, Institut Européen de Chimie et Biologie, CNRS, UMR 5248, Université de Bordeaux, Pessac, France

Keywords: (pH-switchable lipids, membrane biophysics, lipid nanoparticles, endosomal escape, pH-sensitive)

Abstract

Recently, the use of conformationally pH-switchable lipids drastically enhanced cytosolic drug delivery of lipid nanoparticles. Understanding the process by which the pH-switchable lipids disturb the assembly of lipid nanoparticles, thereby triggering cargo release remains a challenging task and is crucial to optimize the rational design of pH-switchable lipids. Here, a mechanism of pH-triggered membrane destabilization, from the molecular switch to the triggered release of a model drug in lipid vesicles, is proposed based on morphology observations of lipid nanoparticles and phase behavior studies of lipid membrane. Using microscopic techniques and Dynamic Light

Scattering, we show that lipid nanoparticles undergo minor morphological modifications under acidic conditions, mainly related to the protonation and conformational switch of the pH-switchable lipids. Confocal microscopy on large unilamellar vesicles suggested that the switchable lipids enhance the membrane dynamics and enhances its permeability at acidic pH, releasing a calcein probe. Phase behavior studies (DSC, ^2H -ssNMR) demonstrated that the switchable lipids abolish the transition temperature of phospholipids and lead to a fluid state of the bilayer. At a molecular scale, Magic Angle Sample Spinning ^{13}C -NMR demonstrated that switchable lipids remained anchored in the lipid bilayer at acidic pH, the hydrophilic head exhibiting a high mobility whereas the lipid anchor being immobilized in the bilayer. The protonation of the lipids increased the area occupied by the lipid at the interface of a Langmuir monolayer, altering the molecular packing of the lipid bilayer. Altogether, our observations demonstrate that the pH-induced conformational change and protonation of the switchable lipid is responsible for the pH-triggered membrane destabilization.

5.1 Introduction

Endosomal entrapment is a major barrier to the cytosolic delivery of macromolecules such as nucleic acids, proteins and therapeutic peptides. Many strategies have been developed to facilitate endosomal escape of drug carrier, such as virus or bacteria derived agents, endosomolytic peptides (236), pH-sensitive polymers or pH-sensitive lipids included in the formulation of lipid nanoparticles (LNPs) (149). The recent approval of three pH-sensitive lipid nanoparticle formulations for RNA delivery (Onpattro[®] (150), Comirnaty[®] (151), Spikevax[®] (152)) show that pH-sensitive LNPs are the most advanced nanomedicines. Such achievement is partly due to their capability to promote an efficient intracellular delivery of nucleic acids (149). The pH-sensitive LNPs are typically composed of phospholipids and cholesterol for particle structure and

biocompatibility, mainly distributed at the particle periphery of the LNPs (237), PEGylated lipids to ensure colloidal stability upon administration (238) and an ionizable lipid, mainly distributed in the particle core for nucleic acid encapsulation and facilitate endosomal escape. This latter, exhibiting the theoretical pK_a between 8.4 and 9, is recognized as the “key” component of LNPs, such as DLin-MC3-DMA, ALC-0315, SM-102 from Onpattro[®], Comirnaty[®], Spikevax[®] formulations, respectively. The pH-sensitive LNPs exhibit pK_a between 5.8 and 7 (by TNS binding assay (239), they are neutral at pH 7.4 (physiological) and positively charged at acidic pH (endosomal), which may promote membrane disruption and promotes endosomal escape of the LNPs (149).

Recently, we reported the use of two pH-switchable lipids (SL2 and CSL3) (**Figure 5.1**) which improved endosomal escape and intracellular delivery of cell-impermeable compounds (157), siRNA (156, 159) or miRNA (158). These lipids are built on two aliphatic chains linked by a di(methoxyphenyl)-pyridine unit, designed to exhibit a U-shape at neutral pH and incorporate into a lipid bilayer (**Figure 5.1**). The protonation of the pyridine favors hydrogen bonding between the methoxy and pyridinium groups, freezing the rotation between aromatic cycles, and promoting a W-shape of the tweezers (157, 240) (**Figure 5.1**). When incorporated into LNPs bilayer, SL2 (**Figure 5.1**) (157) enabled fast cytosolic delivery of sulforhodamine B via endosomal escape in HeLa cells, even in the presence of Poly(ethylene glycol). For siRNA delivery, a cationic switchable lipid CSL3 was designed from the structure of SL2 by adding cationic headgroup (**Figure 5.1**) (156). Compared with SL2, CSL3 displays a cationic headgroup -N(CH₃)CH₂CH₂N(CH₃)₂ on the para-position of the pyridine ring instead of -N(CH₃)₂ (156). LNPs containing CSL3 showed a highly efficient siRNA delivery both *in vitro* and *in vivo* studies (156, 159, 241).

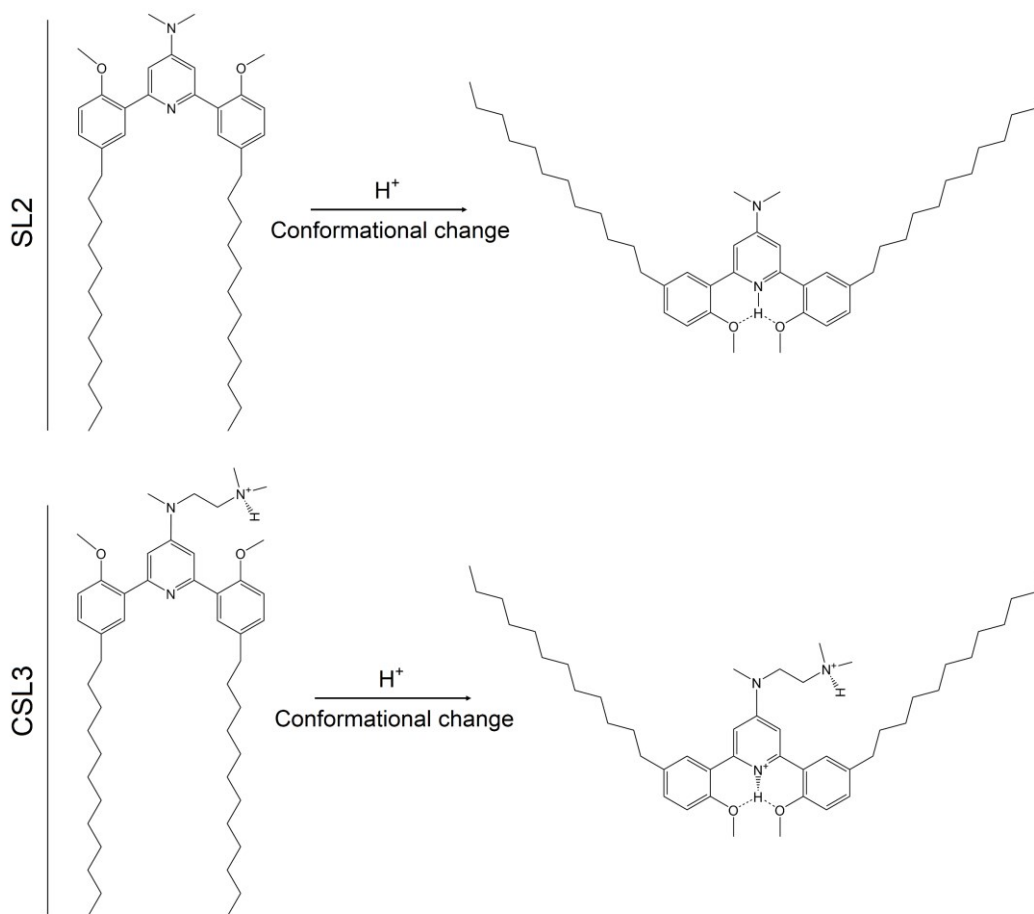


Figure 5.1. Schematic representation of protonation-induced conformational change of the pH-sensitive switchable lipids. The predicted pK_a values of SL2 and CSL3 are 5.28 and 5.39, respectively (Chemstation software).

Nevertheless, the process by which the LNPs facilitate endosomal escape and intracellular delivery remains unclear. A few destabilization mechanisms for similar systems have been reported in the literature including a phase transition from bilayer structure to an amorphous oil phase of pH-sensitive lipid *KC2* when pH rose from 4 to 7.4 (161); a transition from lamellar (at pH 7.4) to hexagonal phases (at pH 5) of the pH-sensitive lipid *DOPE* (242); a conformational shortening of the hydrophobic moiety of pH-sensitive lipid *I* followed by a set of membrane perturbation (243,

244) or fusion between *DC-LNPs* and endosomal membrane mediated by electrostatic interaction (245). For the switchable lipids SL2 and CSL3, the fast pH-triggered bilayer destabilization and subsequently cytoplasmic delivery of the LNPs cargo is expected to be related to the conformational switch of these lipids under acidic conditions, since a negative control lipid CSL4 (see **Figure 1.11**), which can be protonated but does not switch conformation, abolishes their transfection ability (157). Hence, the membrane destabilization induced by the conformational change might be different from those mentioned above.

In the present study, three series of pH-sensitive LNPs were investigated (SL2, CSL3 and CSL3/siRNA) to elucidate the mechanism of membrane destabilization. First, the impact of pH on the morphology of pH-sensitive LNPs was studied by Dynamic Light Scattering (DLS) and different microscopic techniques including Cryogenic Transmission Electron Microscopy (TEM), Freeze-Fracture Scanning Electron Microscopy (FF-SEM), Atomic Force Microscopy (AFM). Second, we examined pH-switchable giant unilamellar vesicles by confocal Microscopy and observed the pH-triggered release of calcein. Third, the effect of pH on the phase behavior of DSPC/pH-sensitive switchable lipid mixtures were investigated using Differential Scanning Calorimetry (DSC), Langmuir-Blodgett compression isotherm and Wide-line deuterium Nuclear Magnetic Resonance (NMR). Finally, the membrane dynamic was studied using Magic Angle Sample Spinning (MAS) carbon-13 NMR.

5.2 Results

5.2.1 Influence of pH on the ζ -potential and the morphology of pH-responsive LNPs

According to the previous results, LNPs containing 50 mol% of pH-switchable lipid (SL2 or CSL3) and co-lipids (cholesterol: DSPC: DSPE-PEG₂₀₀₀., respectively 37.5:10:2.5 mol%) showed

a highly efficient cytosolic delivery (156, 157). Hence, LNPs were formed by extrusion of hydrated lipid film consisting of the same lipid composition (**Table S5.1**), titled SL2-LNPs or CSL3-LNPs, respectively. CSL3-LNPs encapsulating siRNA (titled CSL3-siRNA) were generated by incubation of LNPs with siRNA (amino lipid nitrogen-to-siRNA phosphate (N/P) ratio of 4). The hydrodynamic diameter (D_H) and the surface charge (ζ -potential) of LNPs were measured at various pH values and reported in **Figure 5.2**, **Table S5.1** and **Figure S5.1**. At pH 7.4, SL2 exhibited a negative surface charge, whereas CSL3-LNPs display a positive surface charge due to its cationic headgroup, in line with previous observations (156, 157). Upon nucleic acid complexation, the CSL3-LNPs surface charge switched to negative values, suggesting the display of siRNA on the surface of vesicles, as already reported for several commercial ionizable lipids (239). For all LNPs, SL2-LNPs, CSL3-LNPs and CSL3-siRNA, decreasing the suspension pH from 7.4 to 3.5 led to an increase of 20 mV in the ζ -potential, exhibiting a pK_a of 5.4, 5.3 and 5.7 for SL2, CSL3 et CSL3-siRNA, respectively (**Figure 5.2**), which is consistent with predicted values (156, 157). D_H remained unchanged and PDI remained low, indicating a relatively narrow size distribution. The increase in ζ -potential can be explained by the protonation of the pyridine moiety on the pH-switchable lipids SL2 and CSL3, adding more positive charges to the surface of LNP. This behavior is in agreement with the ionizable lipids previously reported (239). The encapsulation of siRNA is expected to occur through electrostatic interaction between siRNA and CSL3, the encapsulation efficiency (EE) of CSL3-LNPs and other ionizable LNPs (Dlin-MC3-DMA, ALC-0315, SM-102) at different pHs were measured by a SYBR® Gold fluorescence assay. Higher EE was observed at acidic pH due to the higher positive charge of lipid for all LNPs (**Figure S5.2**). Interestingly, CSL3-LNPs shows EE of ~ 50% while other ionizable LNPs exhibit

EEs of $\sim 0\%$ at pH 7.4. This is probably due to π -stacking interactions between aromatic ring of CSL3 and RNA nucleobases (246).

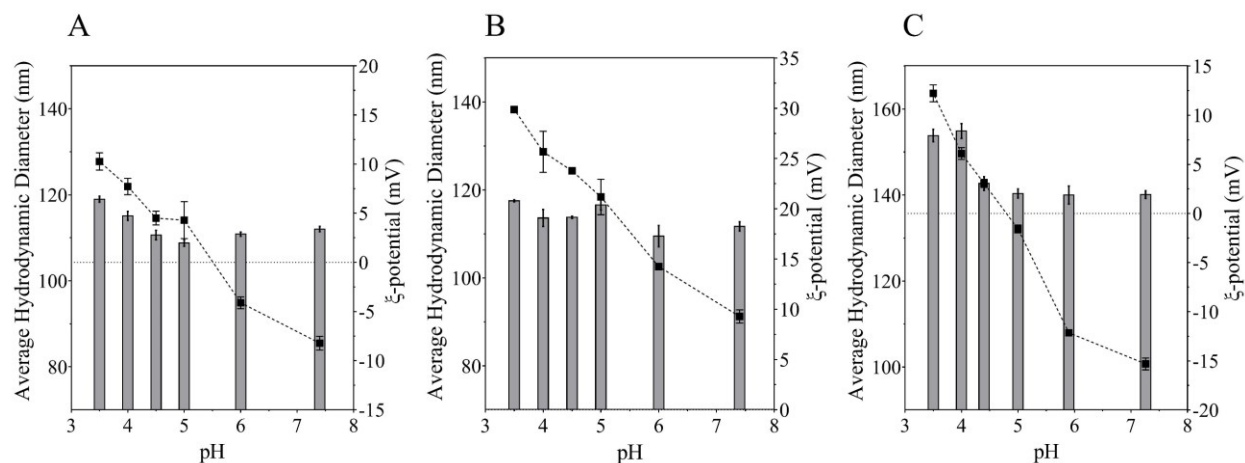


Figure 5.2. Effect of pH on D_H (grey bar) and ζ -potential (black square) of SL2-LNPs(A), CSL3-LNPs(B) and CSL3-siRNA lipoplexes (C). Error bars represent the standard deviation of the mean of three measurements. D_H by Dynamic Light Scattering (DLS) and ζ -potential by Electrophoretic Light Scattering (ELS). The ζ -potential pH-titration curves were fitted to extended Henderson–Hasselbalch equation (where the effect of degree of ionization and ionic strength on the shape of pH titration curve was considered) to obtain pK_a of 5.4, 5.3 and 5.7 for SL2, CSL3 et CSL3-siRNA, respectively.

The effect of pH on the morphology and on the topography of pH-switchable LNPs were observed by Cryo-TEM, FF-SEM and AFM (Figure 5.3, Figure 5.4, Figure 5.5 and Figure S5.3, Figure S5.4, Figure S5.5). The particle size on microscopic images was measured by ImageJ. In agreement with DLS, FF-SEM and Cryo-TEM shows no significant different of particle size upon acidification (Figure S5.3, Figure S5.4, Figure S5.5). Note that the lateral dimension of LNPs measured by AFM is expected to be larger than that obtained by other techniques (SEM, TEM)

due to the broadening effect of the AFM tip (247, 248). For all LNPs (SL2-LNPs, CSL3-LNPs and CSL3-siRNA), an increase in particle size was observed in AFM upon acidification (**Figure S5.5**).

At pH 7.4, SL2-LNPs (**Figure 5.3**, additional images on **Figure S5.3**), show a spherical shape, relatively homogeneous and well-dispersed on microscopic images. When pH decreases to 5, the particles underwent major morphology changes. Polygonal vesicles were noticed in cryo-TEM. Interestingly, LNPs are heterogeneously distributed on microscopic images and several particles sit closely, forming islets or grapes. These islets, observed in AFM and FF-SEM, could result from the low surface charge of SL2-LNPs at pH 5 (**Figure 5.2**), promoting aggregation of LNPs.

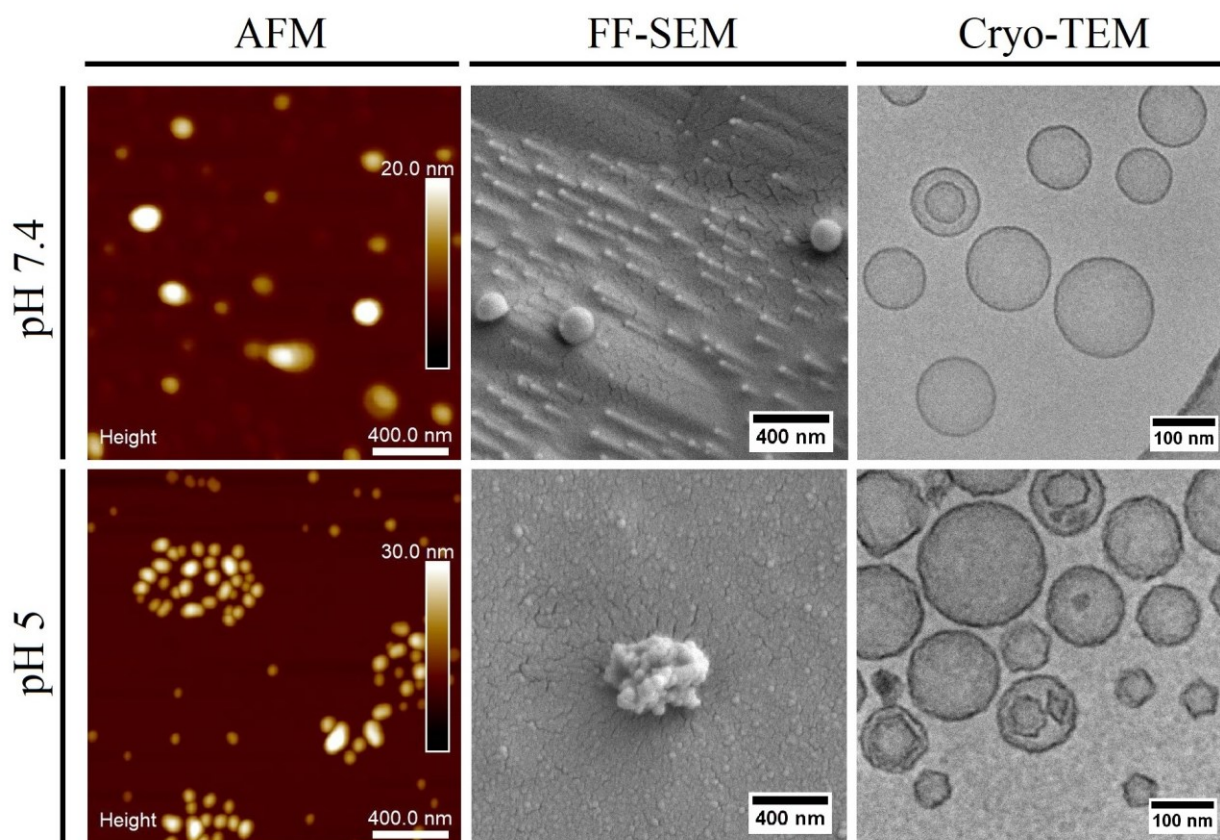


Figure 5.3. Photographs of SL2-LNPs at pH 7.4 and 5 by AFM, FF-SEM and Cryo-TEM.

Like SL2-LNPs, CSL3-LNPs (**Figure 5.4**) at pH 7.4 are mainly spherical and homogeneous. Unlike SL2-LNP, CSL3-LNPs are well-dispersed on microscopic images under acidic condition, which is likely due to their high positive surface charge (**Figure 5.2B**). The CSL-LNPs adopt some irregular shapes such as dumbbell shaped vesicles or polygonal vesicles at pH acidic. The appearance of these irregular structures is the proof of pH-induced morphological change of CSL3-LNPs

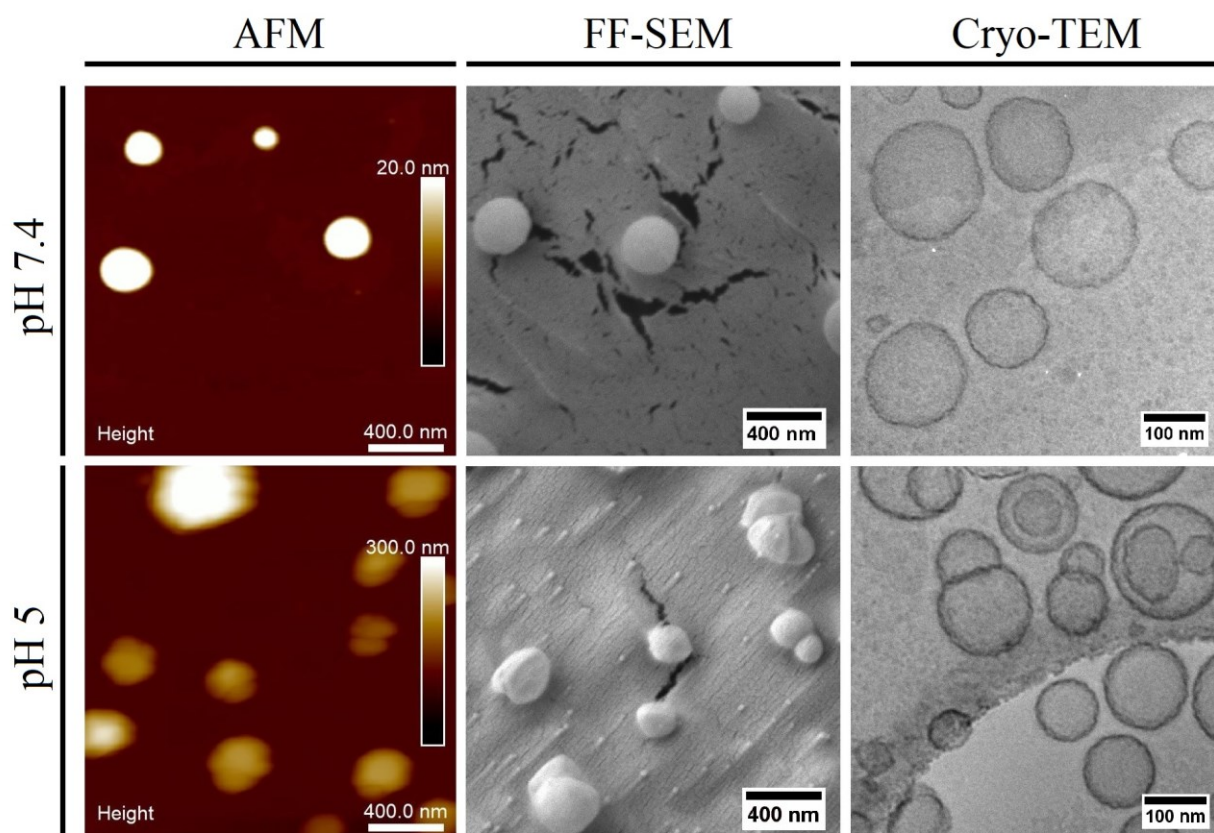


Figure 5.4. Photographs of CSL3 LNPs at pH 7.4 and 5 by AFM, FF-SEM and Cryo-TEM.

CSL3/siRNA lipoplexes (**Figure 5.5**) appear to be spherical vesicles with a homogeneous distribution at both pH conditions. Occasionally, a couple of vesicles were observed stucked together at pH 7.4 for FF-SEM specimens. No major difference in LNPs morphology were

identified between both pH values using Cryo-TEM, FF-SEM and AFM. However, Cryo-TEM micrographs show higher number multilamellar vesicles at pH 7, vs pH 5 (34% vs. 4%, **Figure S5.5**) where most of vesicles are unilamellar. This indicates some membrane reorganization, which could not be detected by AFM, FF-SEM or DLS.

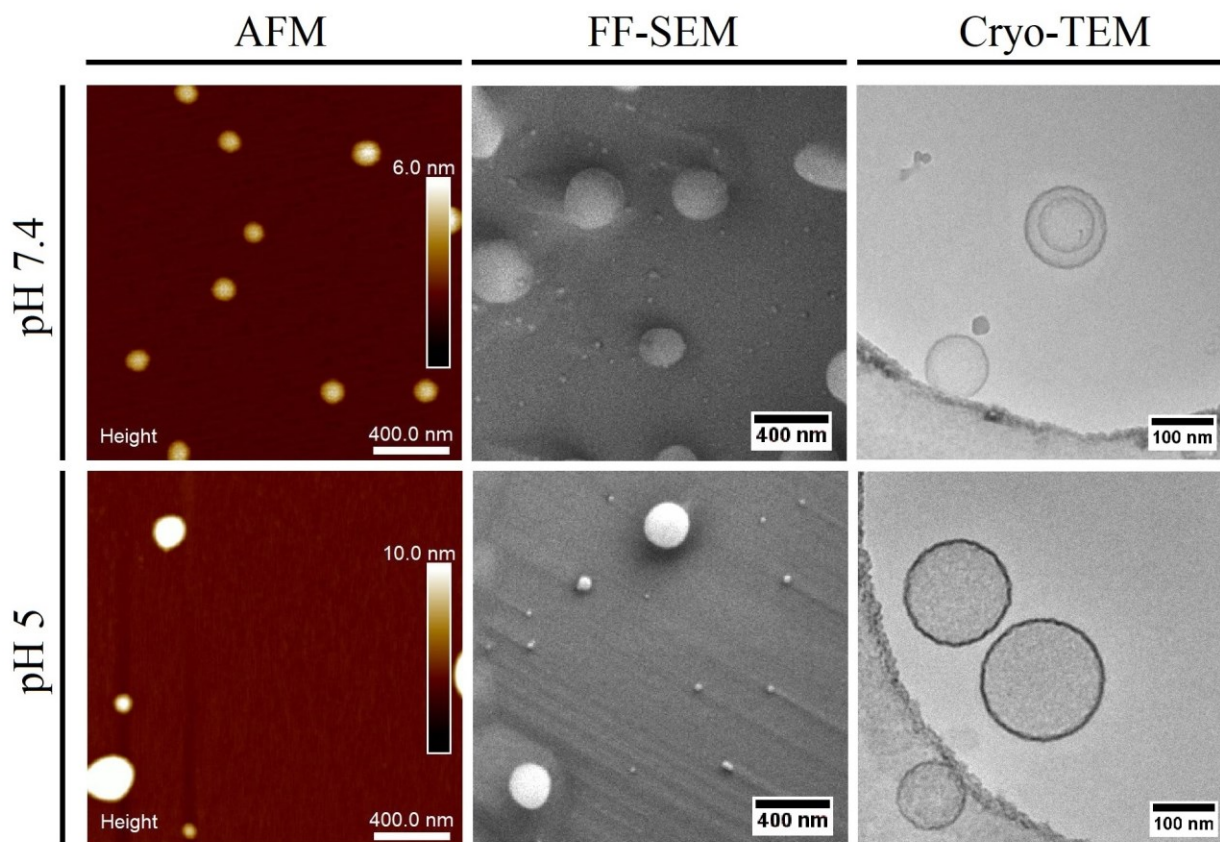


Figure 5.5. Photographs of CSL3-siRNA lipoplexes at pH 7.4 and 5 by AFM, FF-SEM and Cryo-TEM.

Microscopic techniques provided the proof of SL2-LNPs morphological change upon acidification but did not capture the details of the membrane transformation process. To investigate the role of the switchable lipid SL2 on the morphological changes, we prepared giant unilamellar vesicles (GUV) instead of nano-sized LNPs. This technique was previously performed to observe the pH-

triggered deformation of lipid vesicles of CSL3/POPC or hybrid lipid/polymer CSL3/PDMS₃₆-b-PEO₂₃ vesicles on a microscopic scale (241). Here, we prepared GUV-SL2 (SL2/POPC 50: 50 mol%,) with rhodamine-Phosphatidylethanolamine (Rho-PE) at 0.1% w/w to visualize the lipid bilayer. POPC was used to allow the formation of macro-sized vesicles. As shown in **Figure 5.6A**, the vesicles displayed a spherical shape with a mean diameter of $12 \pm 4 \mu\text{m}$ (by ImageJ, see methods). Fluorescence was homogenously distributed within the GUV membrane, confirming that Rho-PE is a relevant probe to monitor membrane deformation.

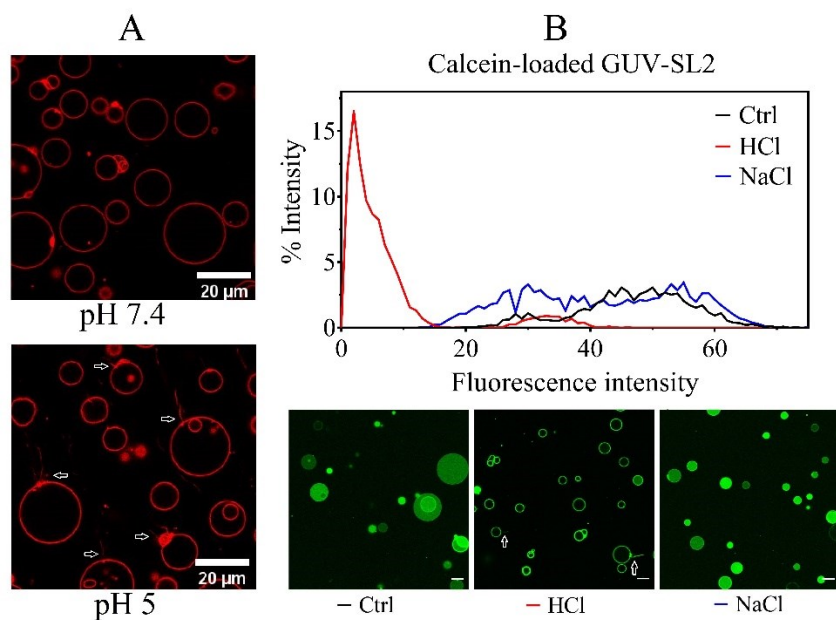


Figure 5.6. (A) Representative confocal photographs of GUV-SL2 containing Rho-PE. (B) Overall calcein fluorescence intensity in GUV-SL2 before (black line) and after HCl treatment (red line) or NaCl treatment (blue line), reported as the percentage of particles exhibiting a specific fluorescence intensity. Arrows indicate positive membrane curvature (Protruding tubes). Scale bar: 10 μm .

Upon acidification, SL2-GUV demonstrated membrane deformations, such as budding of daughter vesicles or burst of membrane excess (**Figure 5.6**, see film and **Figure S5.6** for additional images). The membrane abnormalities were numbered and classified in 4 main events: inward or outward structures formation (tubular protrusions, membrane attached aggregation), internalized vesicles, or membrane fluctuation (non-round shaped vesicles) and compared to GUV-POPC as negative control (**Table S5.2**) as previously analyzed (241). GUV-SL2 display slightly more vesicles with membrane abnormalities than GUV-POPC at pH 7.4 (32% vs 21.5%). After HCl treatment, the proportion of abnormalities GUV-SL2 raised to 69%. As a control, no major morphological modification was observed for GUV-POPC treated with HCl (21.5 to 23% abnormalities), GUV-POPC treated with NaCl (21.5 to 29% abnormalities). The main modifications were the protrusion of outward structures (**Table S5.2**), usually referred as positive curvatures (249) demonstrated by quantitative analysis (from 6 to 43% of vesicles analyzed) and qualitative observation occasionally forming “daughter-vesicles” (see supplementary movie). These findings are consistent with previous observations for CSL3-GUV, which showed an increase in outward structures induced by acidification (241).

The impact of the membrane fluctuation on the permeability of vesicles was monitored by the calcein release assay. Calcein was successfully encapsulated inside GUV-SL2 by electroformation method. The permeability of GUV-SL2 was monitored based on the fluorescence intensity of calcein using confocal microscopy (241).(**Figure 5.6B**). As a control, we have previously demonstrated that calcein-loaded POPC-GUV were not affected by HCl treatment (241). Interestingly, GUV-SL2 lost their fluorescent content (*Left shift* of overall intensity, **Figure 5.6B**). This effect was not observed when vesicles were treated with NaCl at the same concentration, excluding some osmotic shock effect. This means that calcein was completely released from the

vesicles, or that the interior medium of GUV acidified and impaired the fluorescence of calcein. Either of these scenarios is attributed to an increased permeability of the membrane to ions or small molecules upon acidification, as it was observed for GUV-CSL3 (241). Although these results cannot be directly correlated to SL2-LNPs because of the difference in vesicle size and in lipid compositions, confocal observations confirm the critical role of the switchable lipid in pH-induced membrane destabilization and pH-triggered release.

5.2.2 Phase behavior of lipid membranes

The morphological changes of pH-switchable LNPs upon acidification is hypothetically related to the conformational change and the protonation of the switchable lipids, which probably leads to the alteration of their molecular packing and affects lipid assembly. Therefore, the phase behaviour of switchable lipid membranes was further investigated.

The effect of the switchable lipid CSL3 and pH on the phase behavior of lipid membrane was first studied by static solid-state $^2\text{H-NMR}$ ($^2\text{H-ssNMR}$). As the quadrupolar interaction dominates all other magnetic or electric interactions the use of $^2\text{H-ssNMR}$ specifically probes the dynamic behavior of deuterated phosphatidylcholine, the reporter lipid, in a high-intricated lipid mixture. In absence of CSL3, the spectra were essentially the same regardless of pH (**Figure S5.7**) and showed very broad (160-140 kHz maximum width) axially asymmetric spectral shapes (powder patterns typical of unoriented samples) at low temperature. To quantify the degree of ordering “micro-fluidity” of DSPC chains, the chain order parameter S_{CD} was calculated as $(|\langle S_{CD} \rangle_{chain}| = \sqrt{3}M_1/\pi A_Q)$ (250, 251), where M_1 is the first spectral moment, $A_Q = 167$ kHz is the static quadrupolar coupling constant (252). $2\langle S_{CD} \rangle_{chain} = 1$ for a completely rigid membrane

and is 0 for an entirely disordered system as in isotropic liquids. The calculated $2\langle S_{CD}\rangle_{chain}$ for all spectra was plotted as function of temperature (**Figure 5.7A**).

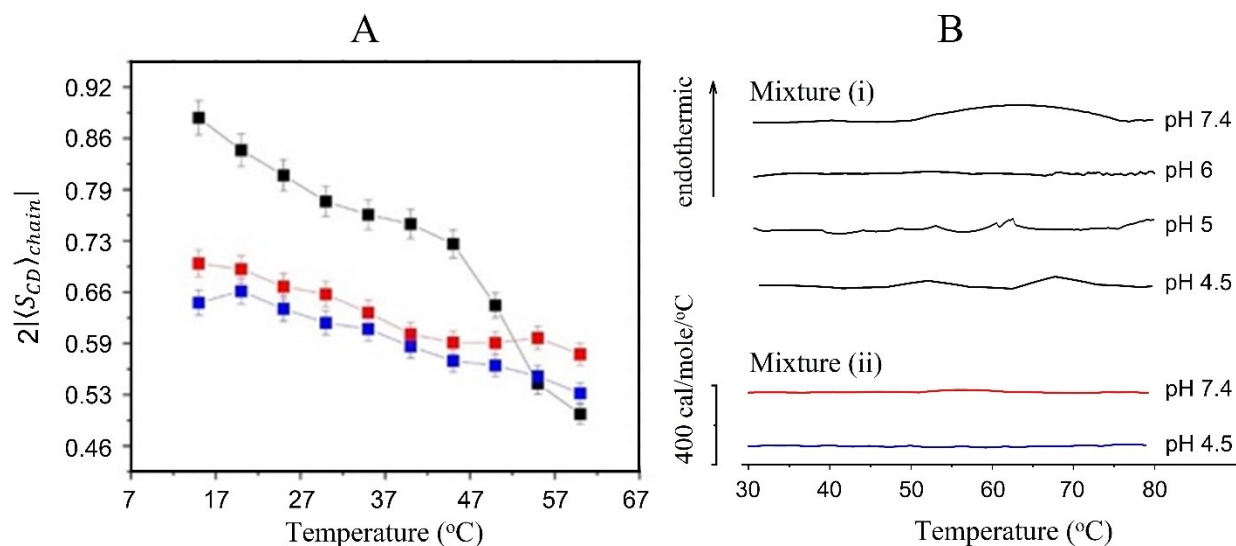


Figure 5.7. (A) The chain order parameter ($2\langle S_{CD}\rangle_{chain}$) vs temperature for DSPC($^2H_{70}$), Cholesterol, DSPE-PEG (60:37.5:2.5 mole%, 250 mM total lipids, pH=7.0) (253), CSL3, DSPC($^2H_{70}$), Cholesterol, DSPE-PEG (50:10:37.5:2.5 mole%, 250 mM, pH=4.5) (253), CSL3, DSPC($^2H_{70}$), Cholesterol, DSPE-PEG (50:10:37.5:2.5 mole%, 250 mM, pH=7.0) (253). Accuracy in calculation is 5. (B) Thermograms (by DSC) of mixture (i) (CSL3:DSPC:Cholesterol 50:10:40 %mol) and mixture (ii) (CSL3:DSPC:Cholesterol:DSPE-PEG 50:10:37.5:2.5 %mol) at different pHs.

In absence of CSL3, the DSPC ordering is near 0.89-0.75 at low temperature, a quite elevated value but lower than a value near 1.0 that is usually obtained in the absence of cholesterol and DSPE-PEG (pure s_o phase). This reflects the effect of cholesterol on membranes, lowering the ordering at low temperatures (250, 254, 255). The sudden decrease of the order parameter $2\langle S_{CD}\rangle_{chain}$ to 0.5 allows picturing the phase transition near 325 K (52°C), very close to the phase

transition detected for protonated (256, 257) DSPC (55°C) and deuterated DSPC (51°C) (258) and in agreement with transition temperature (T_m) measured by DSC for pure DSPC (**Figure S5.10**). Addition of CSL3 at pH 7.0 leads to axially symmetric spectra with maximum width of 110-120 kHz (**Figure S5.8**) that are very similar over the whole temperature range. This translates into chain ordering values of 0.64-0.53, much lower than that in the absence of CSL3 at low temperature and slightly higher at elevated temperatures, suggesting that the lipid mixture exhibits a liquid-ordered phase over the studied temperature. Very interestingly, lowering the pH to 4.5 leads to the same series of axially symmetric spectra over the entire temperature range with a larger width. This translates into chain order parameters (0.69-0.59) markedly higher than those observed at pH 7 (**Figure 5.7A**).

The effect of the switchable lipid CSL3 and pH on the phase behavior of lipid membrane was also examined by Differential Scanning Calorimetry (DSC) for mixture (i) containing 50 %mol CSL3, 10 %mol DSPC, 40 %mol Cholesterol and mixture (ii) containing 50% CSL3, 10% DSPC, 37.5% cholesterol and 2.5% DSPE-PEG₂₀₀₀ hydrated at different pH values. As shown in **Figure 5.7B**, no peak can be detected on the thermograms of these two mixtures at different pH-values. This suggests that these mixtures are in the same phase, probably a liquid-ordered phase, over the whole studied temperature and pH range, in agreement with ²H-ssNMR results. The thermogram of pure switchable lipids (CSL3 and SL2, **Figure S5.9**, did not show any peak either over the whole investigated temperature. Since cholesterol is known to intercalate between the hydrocarbons chains and separate the lipids in gel phase (259, 260), *i.e.*, fluidizing the lipid membrane, we hypothesize that the effect of switchable lipids will be more obvious on simplified systems, without cholesterol nor DSPE-PEG. Pure DSPC rehydrated at pH 7.4 shows a sharp endothermic peak at around 55°C (**Figure S5.10A**), corresponding to its gel-to-liquid phase

transition (261). At both pHs values, the addition of 20% or more SL2 to DSPC leads to a slight downshift ($\sim 1^\circ\text{C}$) of the phase transition peak and an increase of its width, indicating that SL2 decreased the chain packing of DSPC membrane (**Figure S5.10A**). In addition, the acidification of SL2/DSPC mixture (60:40 mol%) to pH 4.5 or lower leads to a complete abolishment of the phase transition (**Figure S5.10B**), suggesting the disrupting effect of pH on the lipid membrane. In summary, the DSC results are in line with H^2 -NMR results, showing the disordering effect of the switchable lipids (CSL3 or SL2) on the lipid membrane at both pHs (7.4 and 5). The study on the simplified mixture (SL2/DSPC) suggests that the switchable lipid might disturb the chain packing of DSPC and this effect is stronger upon acidification ($\text{pH} \leq 4.5$).

To further investigate the effect of pH on lipid monolayers, the Langmuir isotherms of pure monolayers (SL2 or CSL3) and mixed monolayers (SL2/DSPC or CSL3/DSPC), deposited on an aqueous subphase at pHs 7.4 and 5 were performed (**Figure S5.11**). Three quantitative parameters of isotherms including the lift-off area (A_0), illustrating the molecular area in the gas phase L_g , the limiting area (A_{lim}), illustrating the molecular area in the condensed liquid phase L_c and the excess Gibbs energy of mixing (ΔG_{exc}) were determined (**Table 5.1**, see section 5.4.11 for details).

Table 5.1. Limiting area of SL2 and CSL3 at the Air/Water Interface at 22 °C at two pHs

Lipid	A_0 (\AA^2) ^a		A_{lim} (\AA^2) ^b		ΔG_{exc} ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$) ^c	
	pH 5	pH 7.4	pH 5	pH 7.4	pH 5	pH 7.4
SL2	131.9 ± 2.0	69.4 ± 0.3	52.9 ± 0.7	52.8 ± 0.3	-	-
CSL3	100.2 ± 1.3	77.4 ± 1.3	68.9 ± 0.3	63.0 ± 0.3	-	-
DSPC	55.7 ± 1.0	53.4 ± 1.4	53.3 ± 0.6	51.9 ± 0.1	-	-
SL2/DSPC 50:50	102.5 ± 0.7	66.0 ± 0.5	45.5 ± 0.2	45.4 ± 0.1	-708 ± 22	-505 ± 66
CSL3/DSPC 50:50	81.1 ± 0.5	67.7 ± 0.2	55.5 ± 0.4	54.2 ± 0.1	-427 ± 62	-115 ± 22

^a A_0 corresponds to the molecular area when the surface pressure can be detected, *i.e.*, $\pi \geq 1$ mN/m.(262)

^b A_{lim} correspondsto the intercept of the extrapolated steep rising part of the compression isotherm curve with the abscissa axis.

^c Negative value of ΔG_{exc} represents a thermodynamically stable mixed monolayer. ΔG_{exc} was analyzed at $\pi = 30$ mN/m

For DSPC isotherms, the acidification does not affect significantly A_0 or A_{lim} , meaning that there is no pH effect on the molecular area of DSPC monolayer, as expected (263). For the isotherms of all monolayers containing the switchable lipid (SL2, CSL3, SL2/DSPC and CSL3/DSPC), the acidification leads to an increase in A_0 , but has no significant effect on A_{lim} . This means that the acidification induces an expansion in molecular area of L_g phase but does not affect the molecular area of L_c phase. On the decreasing the subphase pH, the central pyridine of the switchable lipid (theoretical pK_a of 5.28 (157)) becomes protonated, giving rise to electrostatic repulsions. Simultaneously, the protonation of pyridine ring also triggers the conformational switch of lipids (**Figure 5.1**). (157, 240) Both changes (electrostatic repulsion and conformational switch) might contribute to the expansion of molecular area. However, the expansion effect of electrostatic repulsion should be more pronounced for compressed monolayer than for expanded monolayer (264), which is not the case for isotherms of switchable lipid monolayers. It is therefore relevant to conclude that the expansion of molecular area in the L_g phase is largely due to the conformational switch of lipid at pH 5. Indeed, the disordered hydrocarbon chains of the switchable lipid at pH 5 disrupt the chain ordering of the monolayer in gas phase. In the L_c phase, the monolayer presents a strong lateral intermolecular interaction, the hydrocarbon chains are compelled to re-organize in a uniformly oriented arrangement (265). Note that A_{lim} of all monolayers being $\sim 45 - 69 \text{ \AA}^2$ corresponds to the cross-sectional area of two hydrocarbon chain (265), confirming the highly closed and ordered packing of lipid in the L_c phase. ΔG_{exc} -values (**Table 5.1**) are negative for both binary monolayer (SL2/DSPC and CSL3/DSPC) at two pHs, indicating that the incorporation of pH-switchable lipids into DSPC membrane favors the formation of thermodynamically stable monolayer at both pHs. Interestingly, the decrease in ΔG_{exc} upon acidification of subphase was

observed for both binary monolayers. This means that the packing between pH-switchable lipid and DSPC is tighter at acidic pH.

5.2.3 Mobility of lipids in the lipid membranes containing the CSL3 lipid switch

Magic Angle Sample Spinning (MAS) ^{13}C -NMR spectroscopy (MAS- ^{13}C -NMR) was performed to detect the mobility of molecules in lipid membrane containing CSL3. Two types of MAS- ^{13}C -NMR spectra including INEPT-MAS and CP-MAS, were acquired (see section 5.4.12 for details). INEPT-MAS spectra (**Figure 5.8C**) detect molecular moieties in the highly mobile regime (membrane surface or middle of bilayer), on the other hand, CP-MAS (**Figure 5.8D**) detects molecular moieties in the rigid regime (lipid membrane). At pH 4.5, cholesterol signals and a large portion of the aliphatic chain signals are detected in the CP spectrum, indicating that their presence in the most rigid core of the membrane. Conversely, PEG ($-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{43}$), lipid head groups (from CSL3 and phospholipids ($-\text{N}(\text{CH}_3)_3$)) and the end of the long aliphatic chains ($-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) are mainly observed in the INEPT spectrum showing their location at the membrane surface, or in the extremity of the bilayer. This demonstrates that, at acidic pH, CSL3 lipid is still anchored in the lipid structure, and only the extremities of CSL3 lipid (headgroup, lipid extremity) exhibit some mobility. This finding is in line with Langmuir isotherms results, which showed that CSL3 and DSPC formed stable mixed monolayers at two pHs (7.4 and 5).

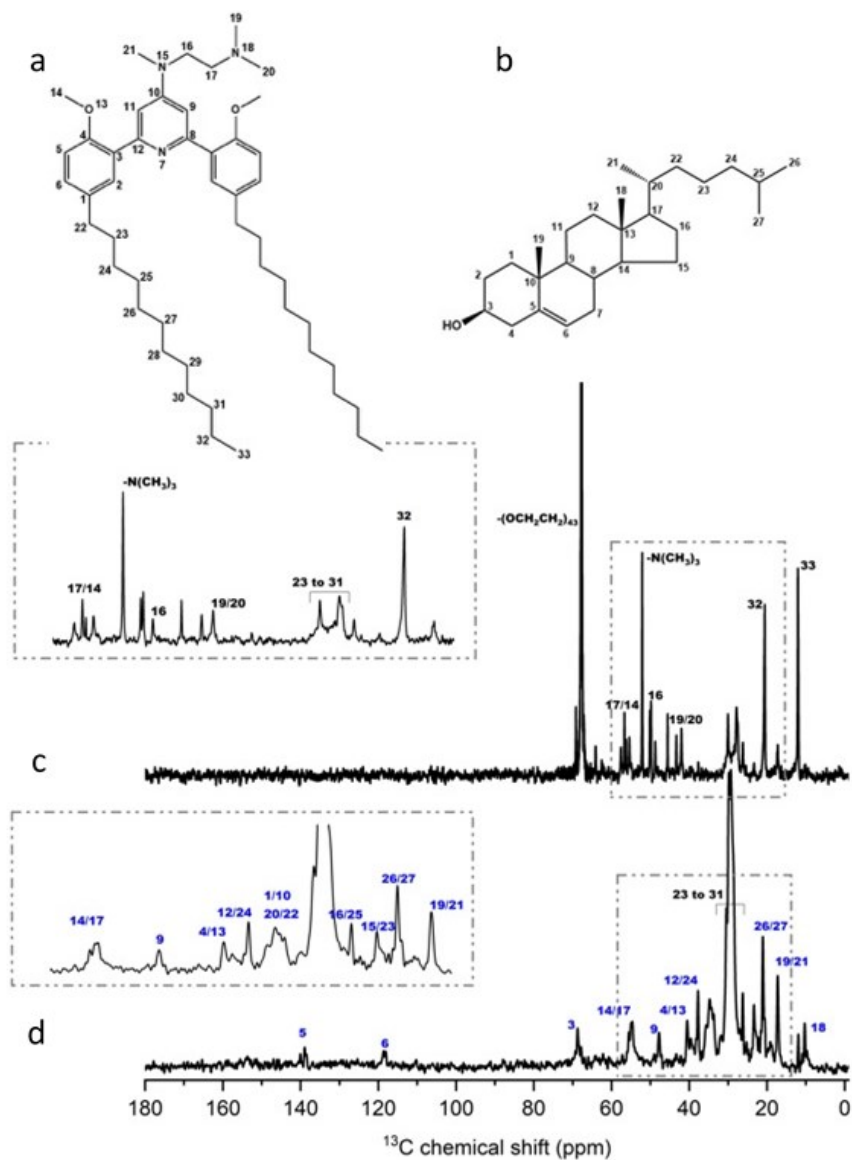


Figure 5.8. Magic Angle Sample Spinning ^{13}C -NMR spectra of CSL3, DSPC($^2\text{H}_{70}$), Cholesterol, DSPE-PEG (50:10:37.5:2.5 mole%, 250 mM, pH = 4.5, T = 20°C). a) schematic representation of the CSL3 molecule with carbon atoms numbering. b) schematic representation of the cholesterol molecule with carbon atoms numbering. c) INEPT-MAS spectrum and expansion. d) CP-MAS spectrum and expansion. The numbering blue for cholesterol and black for CSL3 and other lipids. The peak assignment was based on 1D and 2D experiments performed on individual cholesterol or CSL3 molecules dissolved in chloroform solution (**Figure S5.13**)

5.3 Discussion

pH-switchable lipids have been developed to improve endosomal escape and increase intracellular drug delivery. They have proven successful for siRNA, miRNA delivery *in vitro* and *in vivo*.(156, 158, 159) Their efficiency is attributed to the conformational switch upon acidification, making them a new class of lipids for intracellular delivery. In this study, we provide insight into the nature of conformational switch within the membrane and propose a mechanism responsible for the cargo release from the LNPs, based on a range of techniques from macroscopic to microscopic observations.

The first – and unexpected – observation is that only minor modifications have been observed on several properties of the switchable LNPs (CSL3 or SL2/DSPC/Cholesterol/DSPE-PEG). At macroscopic level, DLS and microscopic results are in good agreement and show that LNPs exhibit similar particle size between pH 7.4 and 5. Microscopic techniques provide additional information on the shape and on the internal structure of LNPs. LNPs present liposome-like structure, *i.e.*, vesicles comprising at least one lipid bilayer surrounding the internal aqueous compartment at both pH conditions (neutral and acidic). At supramolecular level, phase behavior studies by DSC and ^2H -ssNMR showed that the switchable lipid abolish phospholipid phase transition, providing the lipid membrane with an insensitive membrane ordering, on a large temperature scale at both pH conditions. The temperature insensitive membrane order has been reported once by adding plant sterols into lipid membrane, to provide the ability to resist to membrane thermal shocks (250). For drug delivery, this property would ensure the thermal stability of switchable LNPs.

Nevertheless, the switchable LNPs undergo subtle change in morphology upon acidification, such as the appearance of grape-like aggregation of polygonal vesicles for SL2-LNPs, the formation of

some budding or irregular shape for CSL3-LNPs and the decrease of multilamellar vesicles for CSL3/siRNA LNPs. ^2H -ssNMR results showed that the acidification gives rise to a broad signal of the quadrupolar interactions of pH-switchable lipid membrane. Such line broadening has been observed for several phospholipid membrane in the presence of NIPAM copolymer (266) or nisin (267). In both cases, it was suggested that the line broadening is related to the change in curvature of lipid membrane, which is expected for the pH-switchable lipid membrane. At this point, one may hypothesize that the change in curvature of lipid membrane may lead to either the expulsion of some lipids or the reorganization of lipid assemblies. The former is excluded based on MAS- ^{13}C -NMR results, which confirm the presence of all lipids in the membrane upon acidification. In order to focus on the impact of switchable lipids, we simplified the lipid composition to the pH-switchable lipid and a conventional phospholipid (POPC or DSPC) for confocal observation and phase behavior studies. Confocal microscopy showed that GUV containing the pH-switchable lipids exhibit pH-induced membrane deformation and pH-induced permeability perturbation. Although the lipid composition and the particle size of LNPs and GUV are different, confocal results provide additional evidence that pH-induced membrane destabilization is due to the switchable lipids. DSC studies on SL2/DSPC systems show that the acidification (to $\text{pH} \leq 4.5$) leads to a complete disruption of gel phase ordering of DSPC. Langmuir isotherms demonstrate that the acidification leads to an area expansion of the monolayer (in expanded phase) of pure pH-switchable lipids or their mixture with DSPC. As suggested in the results section, this area expansion is mainly due to the conformational switch of lipids.

Taken all these observation into account, we propose the pH-triggered membrane destabilization of LNPs illustrated for CSL3 in **Figure 5.9**. At neutral pH, CSL3 is homogeneously incorporated into the lipid membrane with other co-lipids (DSPC, DSPE-PEG₂₀₀₀ and cholesterol), forming

liposome-like spherical vesicles. The acidification of the medium leads to the protonation of the pyridine and - probably simultaneously - to the conformational change of the switchable lipid, altering the molecular packing of lipids. Likely, switchable lipids increase their molecular area, decreasing the local packing, causing co-lipids reorganization and changing the membrane local curvature. On a macroscopic scale, this might translate into membrane defects and trigger alternative shapes formation, such as budding or protrusion. This process might affect the permeability of lipid membrane and allow the release of the LNPs content.

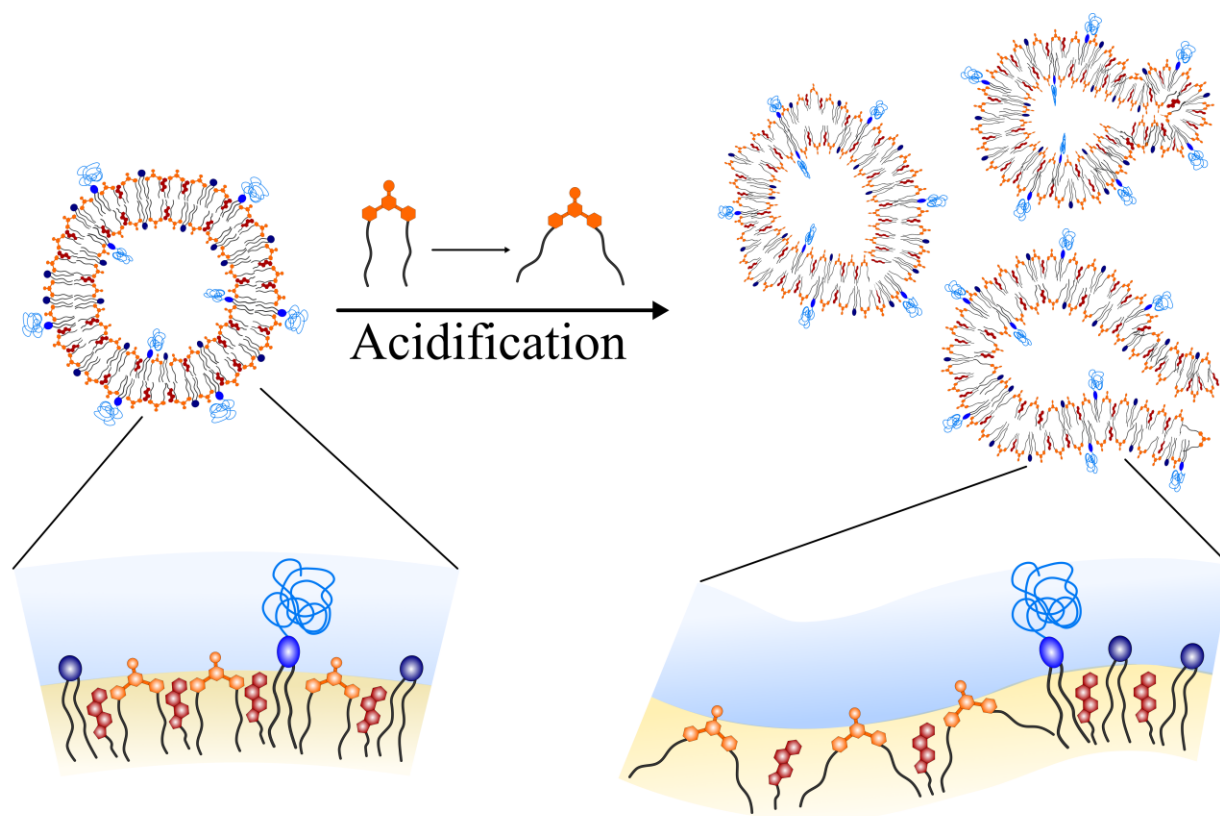


Figure 5.9. The proposed mechanism of membrane destabilization of LNPs containing 50% pH-switchable lipid CSL3.

In conclusion, we report lipid nanoparticles that induce membrane destabilization under acidic condition thanks to a pH-switchable lipid. We show that the conformational change of the pH-

switchable lipid increases the area occupied at the interface, causing membrane dynamics phenomena, that result in reorganization of lipid vesicle into alternative assemblies. This process is suggested to promote the leakage of LNPs cargo. These results could be useful for optimal utilization and rational design of the pH-switchable lipid as well as other similar switchable stimuli-sensitive lipids. In perspective, lipid mixing and intracellular trafficking studies would provide more information on the mechanism of endosomal escape of the switchable LNPs encapsulating siRNA.

5.4 Experimental section

5.4.1 Materials

All organic solvents and chemicals were ordered from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada), Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada). Cholesterol, DSPC (1,2 distearoylsn-glycero-3-phosphocholine), DSPE-PEG₂₀₀₀ (N-(carbonylmethoxypolyethyleneglycol2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3phosphoethanolamine, sodium salt), POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-distearoyl-²H₇₀-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC(²H₇₀)), were supplied by Avanti® Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Cationic switchable lipid SL2 was synthesized as previously described (268). Cationic switchable lipid CSL3 was custom synthesized by Richman Chemicals according to the described procedure (156) (Lower Gwynedd, PA, USA). ALC0315, SM102, DLinMC3 were purchased at Sinopeg (Xiamen, Fujian, China). Control siRNA (sense UAGCGACUAAACACAUCAAUU; antisense UUGAUGUGUUUAGUCGCUAUU) was provided by Alpha DNA (Montréal, QC, Canada). All solvents and products were used as received.

5.4.2 LNPs preparation

Liposomal formulations were prepared by manual extrusion. Briefly, stock solutions (20-40 mg/mL) of cationic switchable lipids (SL2, CSL3) and commercial lipids (DSPC, Cholesterol, DSPE-PEG₂₀₀₀) were prepared in ethanol or chloroform and stored at -80°C before use. The lipid stock solutions were combined in a 5 mL round-bottom flask at the desired molar ratio, and the organic solvent was removed under reduced pressure. The lipid film was hydrated with 1 mL of PBS buffer for imaging (pH 7.4, 1X, prepared in MiliQ water), unless indicated otherwise. The lipid suspension was then subjected to stepwise extrusions through polycarbonate membranes (400 and 200 nm – 11 passages per membrane) using a LiposoFast manual extruder (Avestin Inc., Ottawa, ON, Canada) preheated at 65°C. Liposomal formulations were stored in darkness at 4°C in microcentrifuge tubes.

CSL3 LNPs/SiRNA complexation: CSL 3 LNPs solution and siRNA solution were diluted in sterile 5% dextrose and combined at the charge ratio (N/P : moles of cationic switchable lipid / moles of phosphate from nucleic acids) of 4. Complexation was then realized during 15 minutes at 50°C under vigorous vortexing (1200 rpm) in a Labnet Vortemp™ 56.

5.4.3 Dynamic Light Scattering (DLS)

Particle size, size distribution, and ζ -potential of the different formulations were determined using a Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, UK). To evaluate the influence of pH on size and ζ -potential of LNPs, the lipid film was hydrated with a pH 7.4 buffer (5 mM HEPES and 5 mM NaCl). Samples were diluted in 10 mM HEPES buffer at different pHs (7.4; 6; 5; 4.5; 4; 3.5), then loaded in the capillary cell mounted in the apparatus for size and ζ -potentials measurements (equilibrium time is 3 min for each measurement). All measurements were carried out at 25 °C in triplicate and reported as the number mean \pm SD.

5.4.4 siRNA encapsulation efficiency

LNPs encapsulating siRNA were formulated by rapid mixing of lipids solution (in ethanol, 0.7 mM total lipids, 0.5 mL, 3 mL/min) with siRNA solution (in PBS, 105 mL, 9 mL/min) at the charge ratio (N/P : moles of cationic switchable lipid / moles of phosphate from nucleic acids) of 4. The lipid mixture was composed of ionizable lipid (CSL3 or DLin-MC3-DMA or ALC-0315 or SM-102), cholesterol, DSPC, DSPE-PEG₂₀₀₀ : 50/37.5/10/2.5 mol%. The suspension of lipid nanoparticles after mixing was dialyzed overnight at room temperature against PBS to remove ethanol (Pur-A-Lyzer dialysis kit, cutoff 100 kDa, Merck). A series of buffer was prepared using 10mM HEPES, 130mM NaCl, 10mM NH₄OAc, 10mM MES, adjusted to pH 3.5-10 using NaOH or HCl. In a 96-well plate, 15 μL of LNP (from dialysis) were diluted with 85 μL of each buffer (3 wells/pH condition). A control sample contain 100 μL of buffer (3 wells/pH condition). 50 μL of a SYBR[®] Gold 4X (Thermo Scientific) was added to each well and the fluorescence of free siRNA was measured ($\lambda_{ex/em} = 495/537$) and a Safire microplate reader (Tecan, Seestrasse, Switzerland). Then, 10 μL of Triton 10% was added to each well. After 1h complexation at room temperature, total siRNA was measured again. For each pH, fluorescence was corrected with the blank solution (without LNP) and siRNA encapsulation efficiency (%) was calculated as follows:

$$EE (\%) = \frac{\text{Fluorescence with triton} - \text{Fluorescence without triton}}{\text{Fluorescence with triton}} \times 100$$

Results were fitted using the sigmoidal model by Graphpad Prism.

5.4.5 Surface topography (AFM)

AFM samples were prepared by deposition of 5 μL (5 μL , ~ 0.5 -1 mM total lipids) of diluted LNPs dispersion onto a freshly cleaved mica surface and dried under a gentle flow of dry nitrogen prior to AFM experiments.

AFM imaging were performed with a Multimode microscope equipped with a Nanoscope V extended controller (Digital Instruments, Santa Barbara, CA) at room temperature and in ambient air. Images were acquired in the Peakforce QNM mode (at a scan rate of 1 Hz) using standard triangular cantilevers with sharpened Si_3N_4 tips (Digital Instruments, Santa Barbara, CA), then treated with Digital Nanoscope software.

5.4.6 Cryogenic Transmission Electron Microscopy (Cryo-TEM)

Prior to sample vitrification, Quantifoil grids (Quantifoil R2/1 100 holey carbon films grids, Cu 200 mesh) were treated by a Glow Discharge System (ELMO Cordouan). An aliquot (5 μL , ~ 0.5 -1 mM total lipids) of the LNPs sample was dripped onto a grid, blotted for 3 s and vitrified by plunging into liquid ethane with a FEI Vitrobot in 100% relative humidity, at 20°C. Samples were imaged using a FEI Tecnai T12 (Eindhoven, The Netherlands). Transmission Electron Microscope (TEM) operated at an acceleration voltage of 120 kV with a Gatan cryo-holder. Images were collected at defocus between 2–4 μm on a FEI Eagle 16-megapixel CCD camera at a magnification of $\sim 67,000\times$.

5.4.7 Free-Fracture Electron Microscopy (FF-SEM)

The samples were prepared by filling a rivet with the LNPs preparation (2 μL , 0.2 mM total lipids), itself mounted on a stub, at room temperature. Freezing was carried out by plunging the stub in liquid nitrogen then vacuum pumping until nitrogen slush formed. Afterwards, the frozen sample was transferred to the preparation chamber (-140°C), fractured and sublimed (-95°C) for 12 min.

Platinum was used for coating the samples (10 μ A for 40 sec) before observation. Specimens were then put into the SEM cryo stage (-140 °C) to be observed, using CRYO-SEM PP3010T (Quorum Technologies_England). Observations were done at 3 kV, in high vacuum mode using a GeminiSEM 300 FESEM (ZEISS, Germany).

5.4.8 Analysis of particle from AFM, TEM, SEM and Confocal micrographs

Particle size: micrographs obtained for each sample were used to determine particle size (as compared by diameter to the scale bar) using ImageJ. 50-100 LNPs were manually counted for each sample.

The percentage of multilamellar LNPs: From Cryo-TEM micrographs, the number of multilamellar vesicles (displaying more than 2 bilayers) was manually counted and divided by the total number of vesicles. 50-100 LNPs were manually counted for each sample.

5.4.9 Confocal imaging

Giant unilamellar vesicles (GUV) were prepared using the electroformation method (241). Briefly, a 1.4 mg.mL⁻¹ solution of lipids in chloroform (POPC or a mixture of POPC: SL2 at 50:50 mol%) was deposited thrice in each side of an indium tin oxide (ITO)-coated glass slide (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) using a capillary tip. For confocal visualization, rhodamine-PE at 0.1% *w/w* was added to the lipid solution. The electroformation chamber was set by connecting both ITO-covered slides using a rubber O-ring, which were then dried under vacuum overnight. The next day, samples were connected to an AC generator and an alternative voltage (10 Hz, 2 V) was applied, followed by the immediate addition of 200 μ L of 100 mM sucrose solution. GUV were harvested 45 min after electroformation. To study the effect of acidic conditions onto GUV membranes' permeability, giant vesicles were hydrated with 100 μ L of 100 mM sucrose solution

containing 10 μM of calcein during electroformation. GUV were harvested after 45 min of electroformation. Non-encapsulated calcein was removed by dialysis against sucrose 100 mM overnight at room temperature using a Float-A-Lyzer G2 device (MWCO 50 KDa, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Finally, calcein-loaded GUV were harvested in a 0.5 mL dark Eppendorf and protected from light until testing. Samples were analyzed within 24 h after preparation.

All images were acquired on a Leica TCS SP5 (Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Germany) inverted confocal microscope (DMI6000). A 50- μL aliquot of 100 mM sucrose suspension of GUV was added into 150 μL iso-osmolar (100 mOsm L^{-1}) glucose solution containing in an eight-well $\mu\text{-Slide}$ (Ibidi, Martinsried, Germany). Vesicles were allowed to sediment for at least 2 min before imaging. It is important to stress that vesicles were formulated in sucrose 100 mM and allowed to sediment in a glucose solution prepared at same concentration to avoid osmolarity shock. In order to evaluate the morphological and/or loaded-calcein intensity changes upon acidification, 39 μL of an iso-osmolar HCl solution in glucose (100 mOsm L^{-1} , 4×10^{-4} mM) was added directly in the well chamber. This volume of HCl was sufficient to, within 2 min, drop the pH down to 4.7, which was a value lower than the pH of the SL2 conformation switch. As a control, the same volume of an iso-osmolar sucrose solution of NaCl (100 mOsm L^{-1} , 4×10^{-4} mM) was added to the vesicles-containing chamber. Rhodamine-PE labelled membranes were imaged using an argon laser line with an excitation/range of emission of 514 nm/600–700 nm (Rhodamine-PE). Images were processed using Fiji/ImageJ software.

To calculate the overall fluorescence intensity of loaded calcein immediately before and after (2 min) HCl treatment, 13 images per condition were processed by ImageJ software on the same Region of Interest (ROI). Fluorescence intensity ranged from 0 to 250 and the number of pixels

for each intensity was normalized by the total amount of pixels measured. A normal distribution of fluorescence intensity was plotted using GraphPad (Prism 7, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

5.4.10 Thermal analysis (DSC)

Multilamellar LNPs were prepared by thin film hydration method as described above. The lipid film was hydrated by TRIS/MES buffer (TRIS 50 mM, MES 50 mM, NaCl 130 mM, EDTA 0,5 mM, pH 3.5; 4; 4.5; 5; 6; 7.4). The LNPs dispersion was diluted in TRIS/MES buffer (with the corresponding pH) at a total lipid concentration of 10 mM. Thermograms were recorded on a VP-DSC calorimeter (MicroCal, Northampton, MA) from 30°C to 80°C, at a heating rate of 30°C/h. The reference cell was filled with the corresponding buffer. Data acquisition and treatment were performed with the software supplied with the device (MicroCal software, Northampton, MA).

5.4.11 Langmuir-Blodgett

The Langmuir–Blodgett (LB) trough used is from Nima Technology (Coventry, England). A controllable Teflon barrier was used to control the total air/water interface area available for the amphiphilic molecules. Surface pressure was measured using a Platinum Wilhelmy plate. Prior to each experiment, the Teflon tray and Wilhelmy plate were thoroughly cleaned with Chloroform and rinsed several times with Mili-Q water. The Langmuir trough was first filled with 1 mM buffer solution with definite pH value. Phosphate buffer (pH 7.4) and acetate buffer (pH 5) were used to adjust pH to the desired value. Then, the surface was completely compressed with the mobile barrier and any floating material were removed by air suction. The cleaning process was repeated until the change in surface pressure on compression was less than 0.1 mN/m at fully compressed area. About 100 μ L of lipid solution (CSL3 or SL2, 5×10^{-4} M in chloroform) was gently deposited

dropwise at the water/air interface of Langmuir trough. After 30 min for Chloroform evaporation, the compression isotherm (surface pressure (π) – Area (A)) was recorded at a compression rate of 5 mm/min. All experiments were repeated at least three times, showing good reproducibility.

Based on the $\pi - A$ isotherms, the parameters lift-off area (A_0) and limiting area (A_{lim}) were determined. The parameter A_0 defines the molecular area in the gas phase L_g , corresponds to the molecular area when the surface pressure can be detected, *i.e.*, $\pi \geq 1$ mN/m.(262) On the other hand, the parameter A_{lim} determines the molecular area in a closely packed monolayer (L_c), corresponding to the intercept of the extrapolated steep rising part of the compression isotherm curve with the abscissa axis.

The thermodynamic stability of the mixed monolayer (SL2/DSPC or CSL3/DSPC) compared to pure monolayer were quantified through the parameter excess Gibbs energy of mixing (ΔG_{exc}) for the binary systems determined as follows (269):

$$\Delta G_{exc} = \int_0^{\pi} [A_{1,2} - (x_1 A_1 + x_2 A_2)] d\pi \quad (35)$$

where $A_{1,2}$ A_1 and A_2 are the molecular area of mixed monolayer, pure monolayer of components 1 and 2 at the same surface pressure, respectively. x_1 and x_2 are the respective mole fractions of the components in the mixed monolayer. The $\pi \sim 30$ mN/m mimics the lateral pressure of lipid bilayer of lipid vesicles or cell (270, 271), therefore, ΔG_{exc} was analyzed at this pressure.

5.4.12 Solid state NMR

For solid-state NMR samples, lipids (CSL3, DSPC($^2H_{70}$), Cholesterol and DSPE-PEG, 50:10:37.5:2.5 mol%, 25 μ mol, 17 mg total lipids) were mixed and dissolved in EtOH/CHCl₃ (1:1). A control sample, without CSL3 was also prepared (DSPC($^2H_{70}$), cholesterol, DSPE-PEG

60:37.5:2.5 mol%, 25 μmol , 18 mg total lipids). The solvents were evaporated under a stream of compressed air. The residual lipid film was dispersed in 1 ml of milliQ filtered water and freeze-dried overnight. The resulting powder was suspended into 100 μL of a 10 mM HEPES buffer (150 mM NaCl, pH 7, made with deuterium-depleted water) to obtain a hydration (h = mass of water over the total mass of the system (phospholipids plus water) of 85 to 90 %. After shaking into a vortex mixer samples were frozen in liquid nitrogen for 30 s, heated at 55 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min in a water bath and shaken again for better sample homogeneity; this freeze-thaw-shaking cycle was repeated 3 times and the resulting milky dispersion transferred into a 4 mm diameter Zirconium rotor 80 μL , (Cortecnet, Voisins Le Bretonneux, France).

For ^2H static (wide-line) ssNMR, a quadrupolar spin echo sequence (272) was applied at the ^2H frequency of 76.8 MHz on a 500 MHz (11.7 T) Bruker Avance III NMR spectrometer, with a 90° pulse of 3.8 μs , an echo delay of 40 μs , a recycle delay of 2 s, a spectral width of 500 kHz and a number of acquisition varying from 500 to 5120. We acquired spectra at different temperatures, ranging from 278 to 333K. The temperature of the sample was stabilized for 20 minutes prior acquisition.

For carbon-13 (^{13}C) observation, samples were subjected to Magic Angle Sample Spinning (MAS) experiments, turning the wide line into quasi high-resolution ^{13}C -NMR spectra. The experiments were performed at 293K with a spinning speed at the magic angle of 11 kHz (As the anisotropy of ^{13}C -chemical shielding is relatively small, a moderate spinning speed of 11 kHz was sufficient to average it to zero, resulting into liquid-like spectra). Two types of pulse sequences were applied to proton-enhance the otherwise very weak ^{13}C -NMR signal (unlabeled samples). The first was the Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer type sequence (INEPT) (273), which is a liquid-like sequence, abundantly used for isotropic (liquid) samples, that transfers the enormous

^1H polarization to the low abundant ^{13}C nuclei using the ^1H - ^{13}C indirect (through bonds) dipolar interaction, also called J-coupling. This sequence is only effective when the molecules or molecular moieties are in a highly mobile regime, typically much shorter than 1 ms, or for order parameters below 0.1 (274). The second type of ^{13}C sequence is Cross Polarization MAS (CP-MAS) (275), which transfers the ^1H - ^{13}C direct (through space) dipolar interaction to ^{13}C . This interaction is only present in solids or highly organized (liquid-crystals, membranes) systems and called D-coupling. It is made possible when molecules undergo slow motions ($> \mu\text{s}$) or have elevated order parameters (> 0.1) (274). Experimental conditions for INEPT-MAS spectrum and expansion: recycling time of 3 s, NS=20 k, acquisition time 80 ms, spectral width 300 ppm, MAS spinning rate 11 kHz, temperature 293 K, noise filtering with an exponential line broadening of 10 Hz. Experimental conditions for CP-MAS spectrum and expansion: a recycling time of 3 s, NS=20 k, acquisition time 20 ms, spectral width 300 ppm, contact time 1.5 ms, MAS spinning rate 11 kHz, temperature 293 K, noise filtering with an exponential line broadening of 10 Hz, proton decoupling of 100 kHz

^1H - ^{13}C HSQC and HMBC, liquid-state NMR experiments were performed on a Bruker NEO NMR spectrometer operating at 700 MHz for ^1H and 176 MHz for ^{13}C , by mean of a TXI HCN 5 mm probe. 1D proton and carbon liquid state experiments were performed on a Bruker Avance III HD NMR spectrometer operating at 400 MHz for ^1H , and 100 MHz for ^{13}C by mean of a SmartProbe HX 5 mm.

The NMR spectra were processed using Bruker TopSpin software. For broadband ^2H -ss NMR, the spectral moments were computed using an in-house routine as described earlier (276). The simulation of the deuterium powder spectra was also performed (276) and allowed to plot the variation of the carbon-deuterium order parameters (S_{CD}) as a function of the carbon numbering

along the DSPC chains. This allows describing the gradient of dynamics from the membrane interface to the bilayer center (SI, Figure S8).

5.5 Supporting information

pH-Switchable lipids: from molecular switch to macroscopic changes in lipid vesicles

Huu Trong Phan^a, Victor Passos Gibson^a, Aurore Guédin^c, Emmanuel Ibarboure^d, Nadia El Mammeri^e, Axelle Grélard^e, Jean-François Le Meins^d, Erick J. Dufourc^e, Antoine Loquet^e, Jeanne Leblond Chain^{c*}, Suzanne Giasson^{a,b,*}

^aFaculty of Pharmacy, University of Montréal, Montréal, H3C 3J7, Canada; ^bDepartment of Chemistry, University of Montréal, Montréal, H3C 3J7, Canada; ^cUniversity of Bordeaux, CNRS, INSERM, ARNA, UMR 5320, U1212, F-33000 Bordeaux, France; ^d Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques LCPO Université de Bordeaux CNRS Bordeaux INP UMR 562916 Avenue Pey Berland F-33600 Pessac France; ^eInstitut de Chimie et de Biologie des Membranes et des Nano-objets, Institut Européen de Chimie et Biologie, CNRS, UMR 5248, Université de Bordeaux, Pessac, France

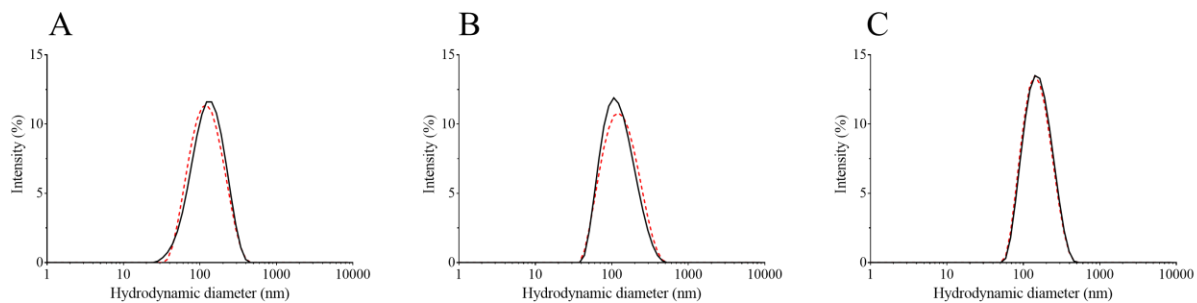


Figure S5.1. Hydrodynamic diameter histogram of SL2-LNPs (A), CSL3-LNPs (B) and CSL3-siRNA (C) at pH 7.4 (solid black line) and pH 5 (dashed red line).

This Figure shows that the hydrodynamic diameter of switchable pH-sensitive LNPs do not change significantly upon acidification.

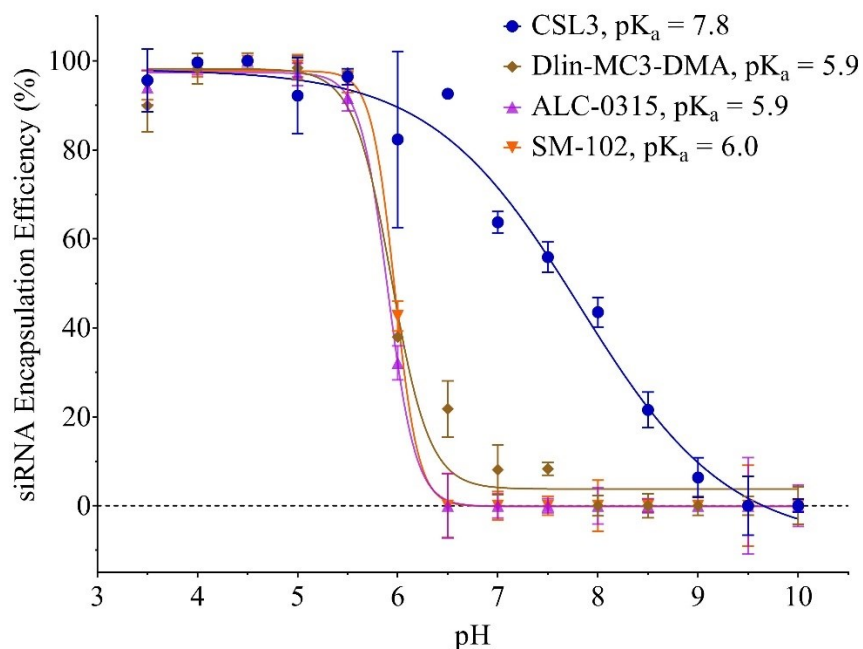


Figure S5.2. siRNA Encapsulation Efficiency of CSL3-LNPs and other ionizable LNPs at different pHs. The curves were fitted using the sigmoidal model by Graphpad Prism.

This Figure shows the encapsulation efficiency (EE) of CSL3-LNPs and other ionizable LNPs (Dlin-MC3-DMA, ALC-0315, SM-102) at different pHs. As expected, higher EE was observed at acidic pH due to the higher positive charge of lipid for all LNPs. Interestingly, CSL3-LNPs shows EE of ~ 50% while other ionizable LNPs exhibit EEs of ~ 0% at pH 7.4.

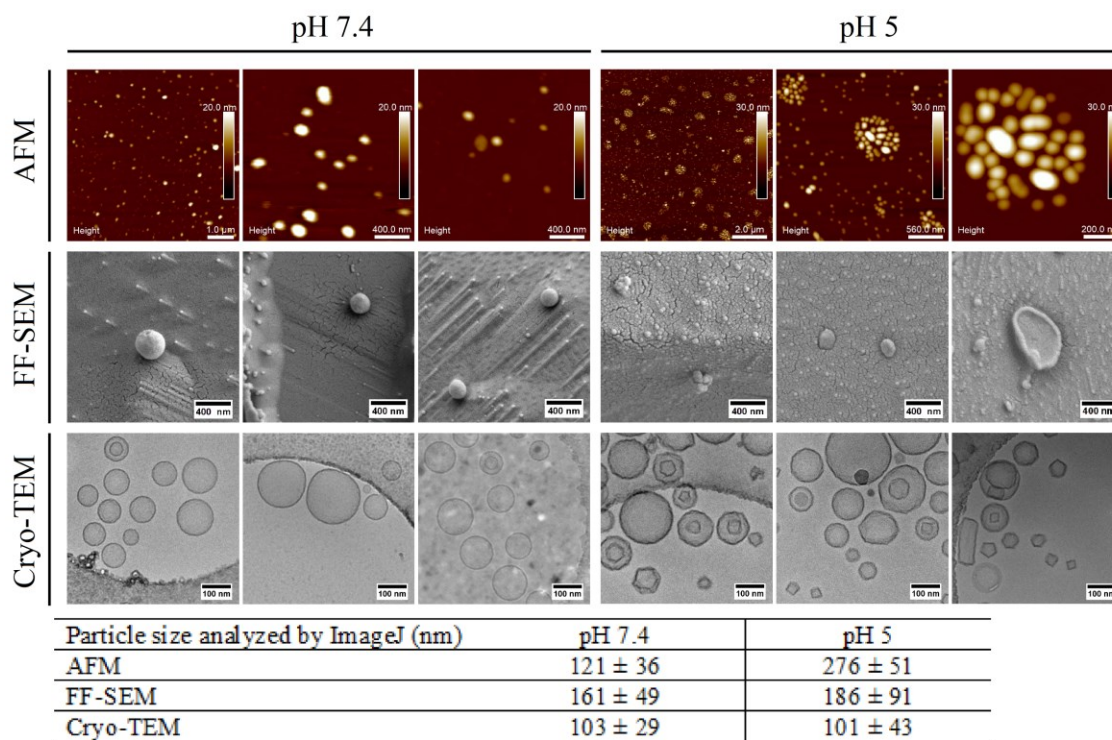


Figure S5.3. Photographs of SL2-LNPs by AFM, FF-SEM and Cryo-TEM. See Method for particle analysis by ImageJ.

Addition photographs to **Figure 5.3**, showing morphological change of SL2-LNPs upon acidification

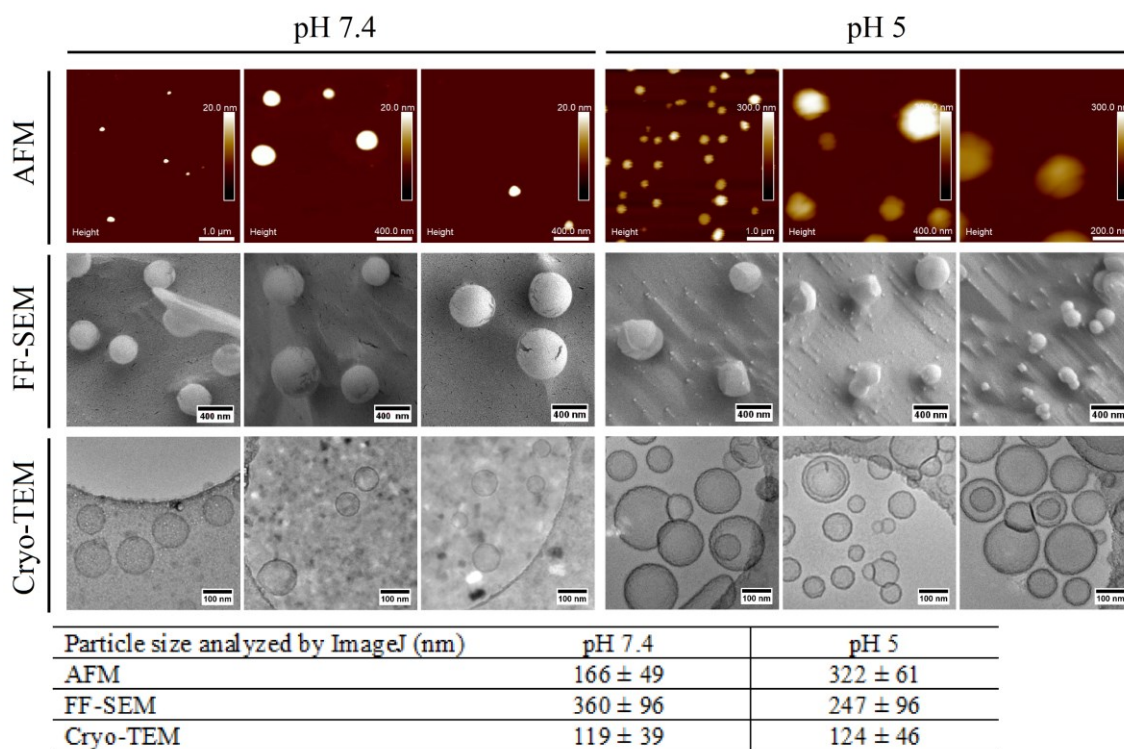
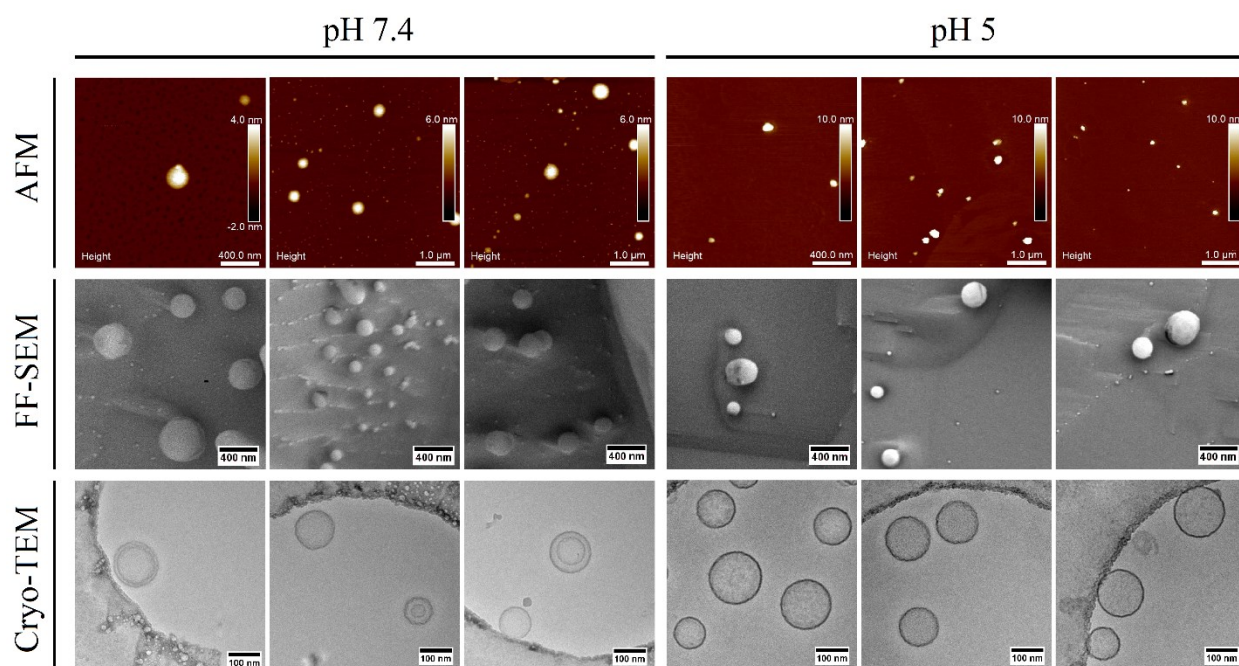


Figure S5.4. Photographs of CSL3-LNPs by AFM, FF-SEM and Cryo-TEM. See Method for particle analysis by ImageJ

Addition photographs to **Figure 5.4**, showing morphological change of CSL3-LNPs upon acidification.



Particle size analyzed by ImageJ (nm)	pH 7.4	pH 5
AFM	120 ± 20	176 ± 44
FF-SEM	221 ± 97	210 ± 84
Cryo-TEM	131 ± 37	121 ± 35
Number of multilamellar vesicles/total count	13/39	5/96

Figure S5.5. Photographs of CSL3-siRNA lipoplexes by AFM, FF-SEM and Cryo-TEM. See Method for particle analysis by ImageJ.

Addition photographs to **Figure 5.5**, showing morphological change of CSL3-siRNA upon acidification

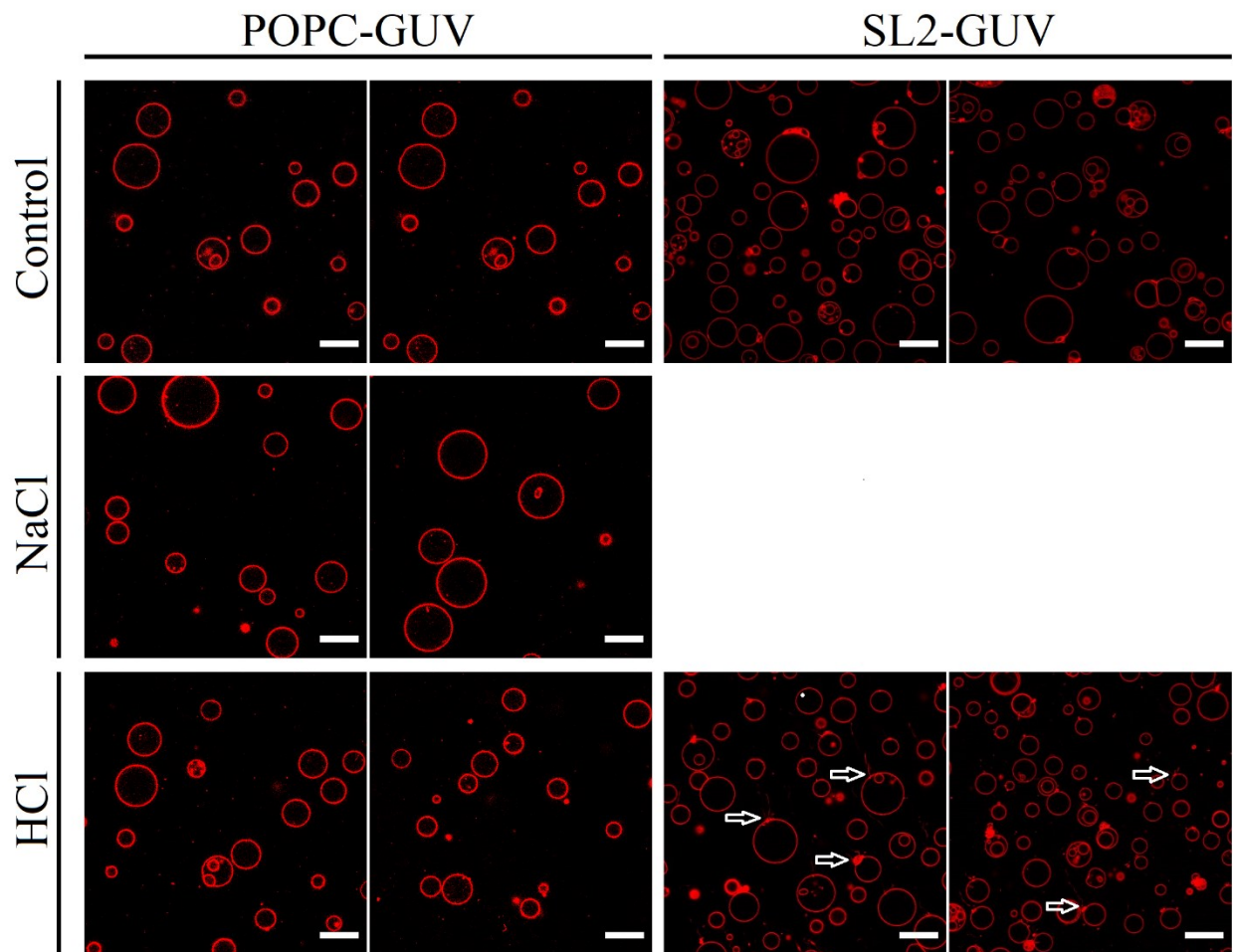


Figure S5.6. Morphological changes of GUVs upon HCl or NaCl treatment. Arrow indicates vesicles with outward projections. Scale bar: 20 μm .

This Figure shows an increase of vesicles with membrane deformations (mainly membrane with outward projections) of SL2-GUV after HCl treatment. Such change is not observed for POPC-GUV (negative control)

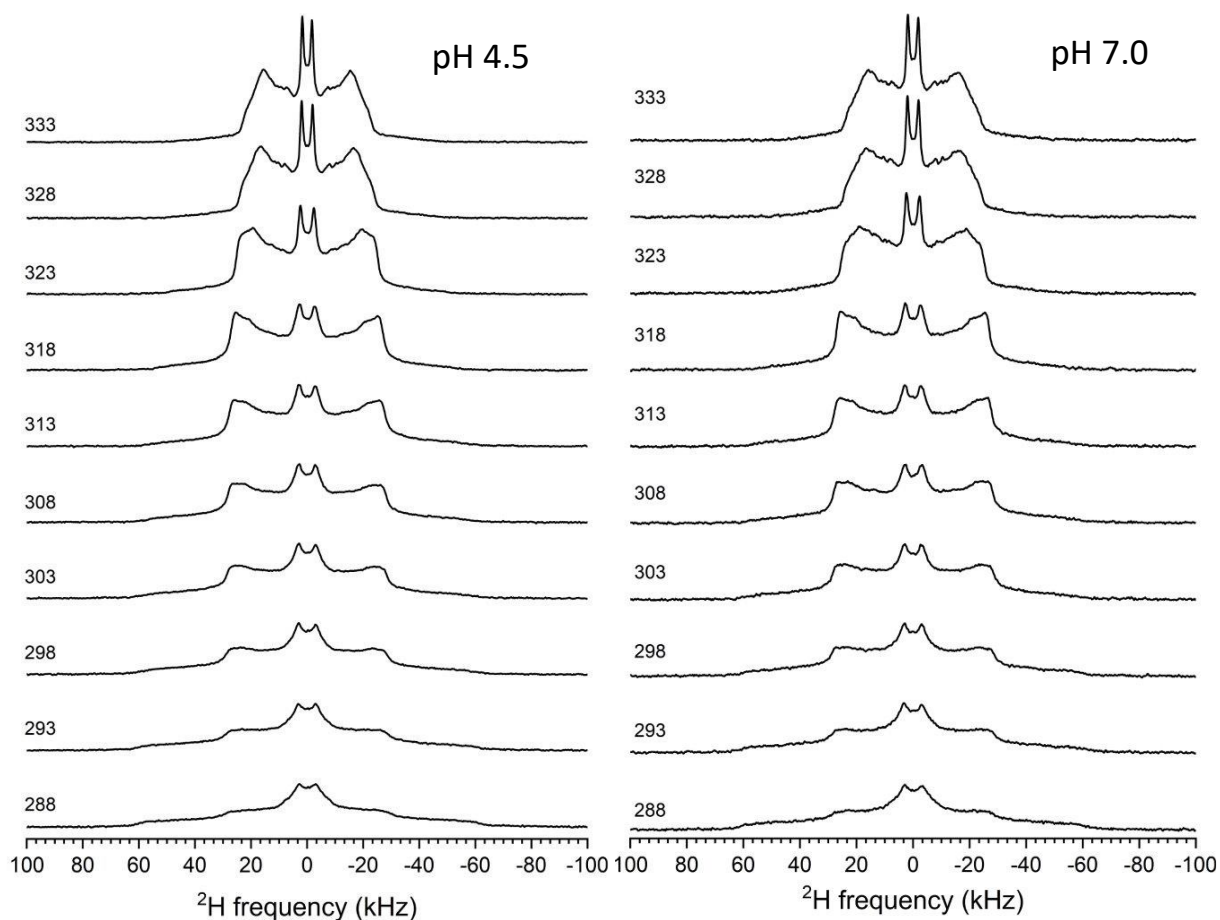


Figure S5.7. Deuterium-NMR spectra of DSPC($^2\text{H}_{70}$), Cholesterol, DSPE-PEG (60:37.5:2.5 mole%) multilamellar liposomes at pH 4.5 and 7.0. Acquisition and processing were performed with the following parameters: time domain of 2K points, Fourier transformation on 4K points from the echo maximum, number of scans 500, noise filtering with an exponential line broadening of 300Hz, 20 min stabilization between each temperature. Sequence parameters as in materials and methods.

This Figure shows the D-NMR spectra of lipid membrane in the absence of CSL3 at pH 4.5 and 7. Based on these spectra, the chain order parameter for DSPC($^2\text{H}_{70}$) was calculated and reported as function of temperature (see **Figure 5.7**)

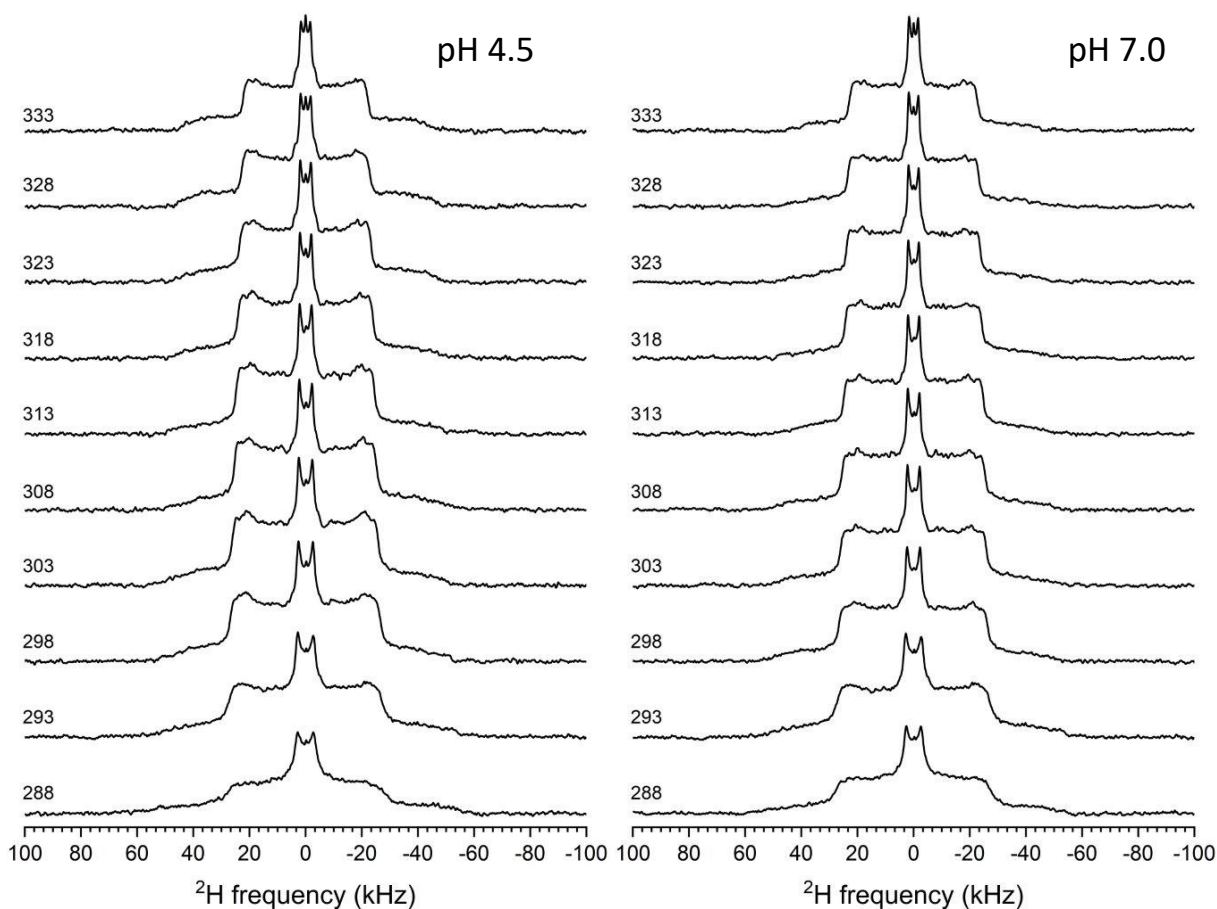


Figure S5.8. Deuterium-NMR spectra of CSL3, DSPC($^2\text{H}_{70}$), Cholesterol, DSPE-PEG (50:10:37.5:2.5 mole%) multilamellar liposomes at pH 4.5 and 7.0. Acquisition and processing were performed with the following parameters: time domain of 4096 points, Fourier transformation on 8K points from the echo maximum, number of scans 4096 for pH=7.0 and 5120 for pH=4.5, noise filtering with an exponential line broadening of 500 Hz, 20 min stabilization between each temperature. Sequence parameters as in materials and methods.

This Figure shows the D-NMR spectra of lipid membrane in the presence of CSL3 at pH 4.5 and 7. Based on these spectra, the chain order parameter for DSPC($^2\text{H}_{70}$) was calculated and reported as function of temperature (see **Figure 5.7**).

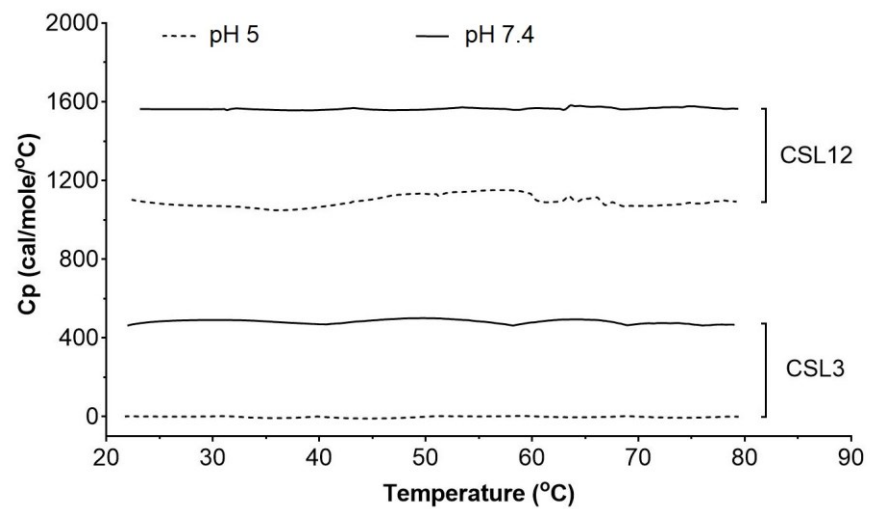


Figure S5.9. Thermogram of pure SL2 and pure CSL3 at pH 5 and 7.4.

This Figure shows that both SL2 and CSL3 exist in the same phase over the studied temperature (23 to 80°C).

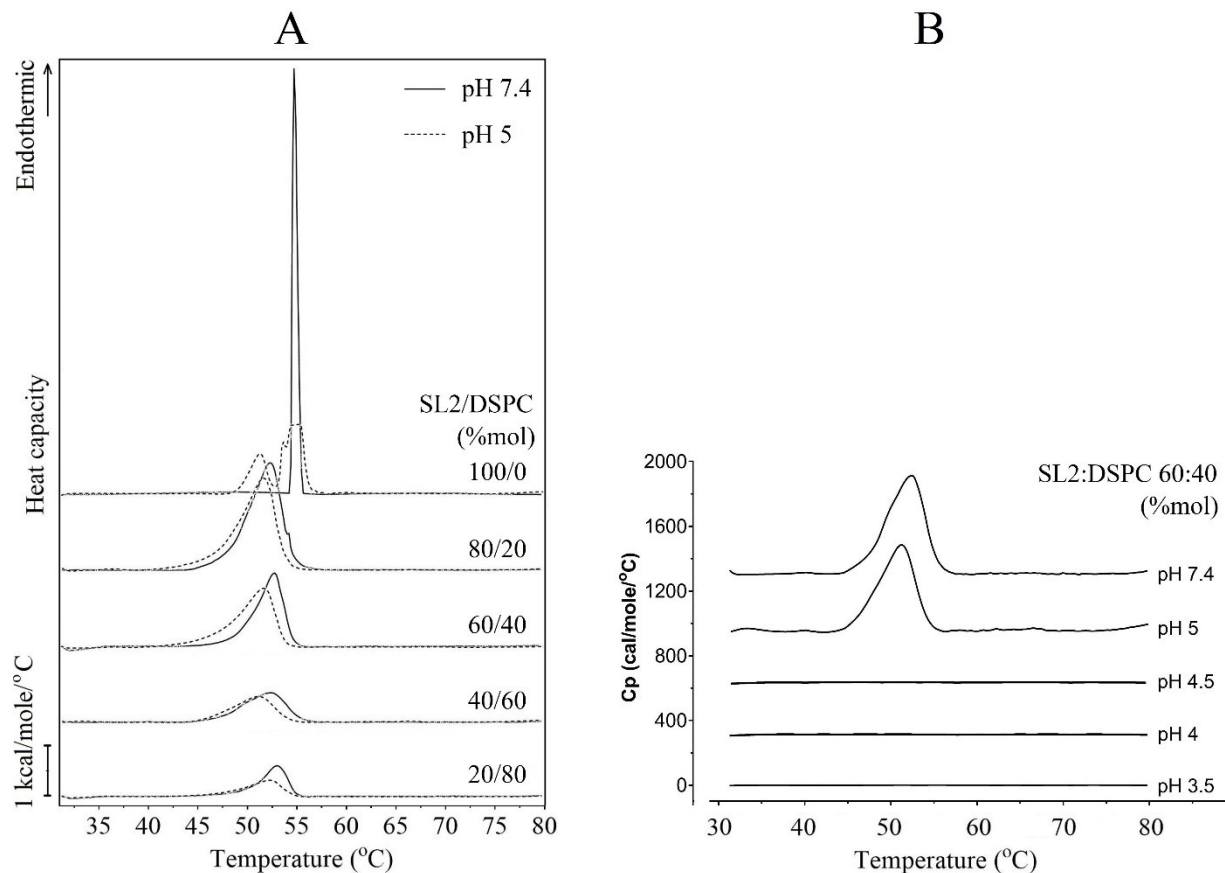


Figure S5.10. (A) Thermograms of SL2/DSPC mixtures at pH 7.4 and pH 5, (B) Thermograms of mixture containing SL2/DSPC 60:40 %mol at different pHs

Since cholesterol is known to intercalate between the hydrocarbons chains and separate the lipids in gel phase(259, 260), *i.e.*, fluidizing the lipid membrane, we hypothesize that the effect of pH on the thermal behavior of the lipid membrane will be more obvious on simplified systems, without cholesterol nor DSPE-PEG. Therefore, thermograms of SL2/DSPC mixtures were examined by DSC. The results show that the addition of 20% or more SL2 to DSPC leads to a decrease in the chain packing of DSPC membrane. For SL2/DSPC 60:40 mol% mixture, the acidification from pH 7.4 to pH 4.5 leads to an abolishment of phase transition of DSPC membrane.

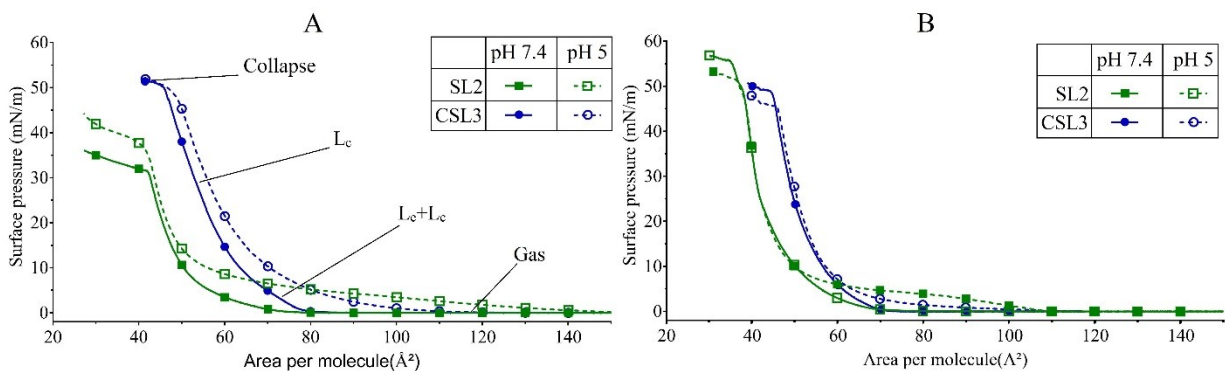


Figure S5.11. Representative compression isotherms of (A) CSL3 and SL2 monolayers; (B) CSL3/DSPC mixture (50:50) and SL2/DSPC mixture (50:50) monolayer measured at aqueous subphase pH values 7.4 and 5.0. For clarity, only the most relevant reproducible isotherms are illustrated. All isotherms exhibit four different regimes: gas phase, liquid expanded (L_e) to liquid condensed phase (L_c) transition, L_c phase liquid, and collapsed phase. The standard deviation in surface pressure among triplicate experiments was smaller than 0.5 mN/m.

This Figure was used to determine the quantitative parameters of the monolayer isotherm for SL2 and CSL3 monolayer (see **Table 5.1**).

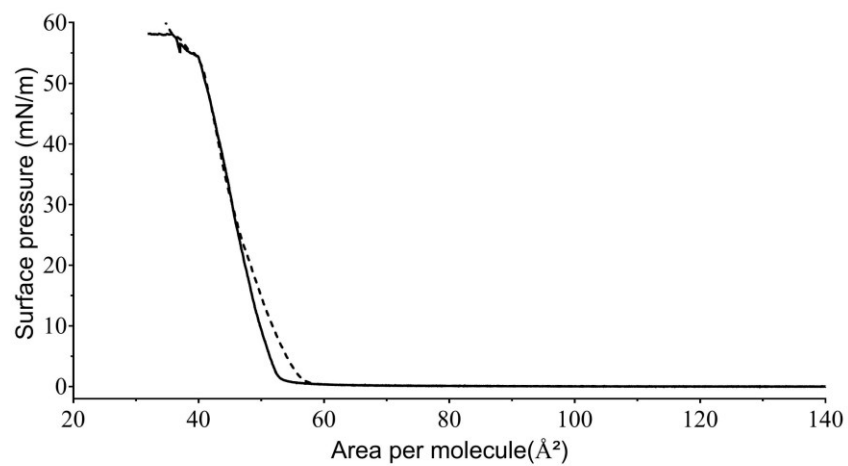


Figure S5.12. Compression isotherms of DSPC monolayer measured at aqueous subphase pH values 7.4 (solid line) and 5.0 (dash line).

This Figure together with **Figure S5.11** were used to determine the excess Gibbs energy of mixing (ΔG_{exc}) (see **Table 5.1**).

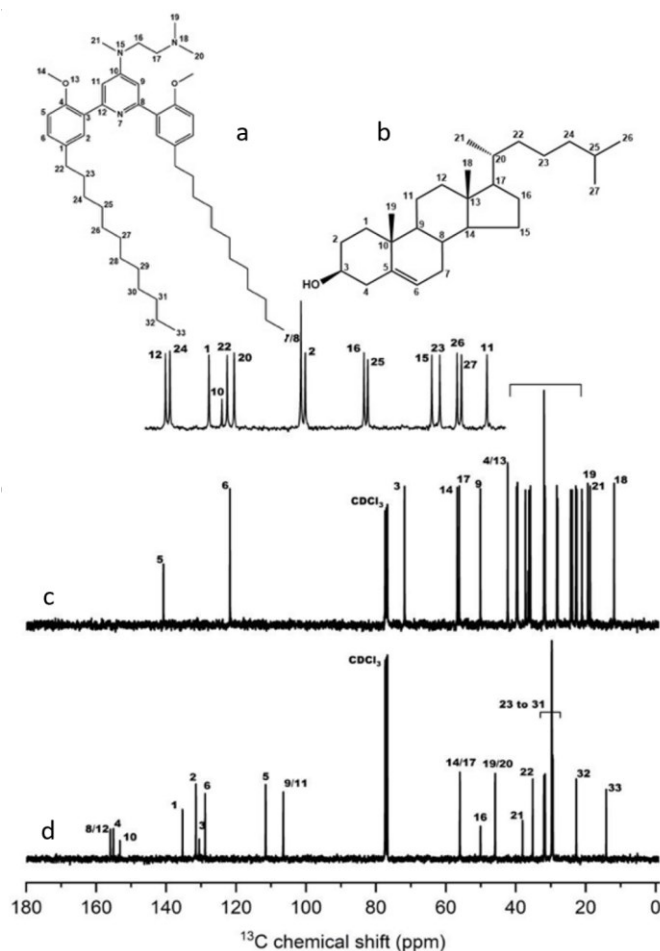


Figure S5.13. ^{13}C -NMR spectra of CSL3 (d), Cholesterol (c), dissolved in CDCl_3 , with respective carbon numbering (a) and (b). Acquisition and processing were performed with the following parameters: sequence details, carbon detection with proton decoupling during acquisition, time domain of 32 k points, ns=256 for CSL3 and 64 for cholesterol, spectral window 250 ppm, Fourier transformation on 32 k points, noise filtering with an exponential line broadening of 3 Hz.

The peak assignment in **Figure 5.8** was based on the ^{13}C -NMR spectra on this Figure.

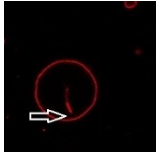
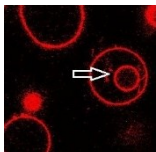
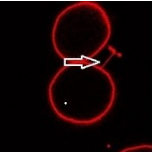
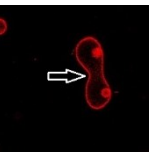
Table S5.1. Physicochemical properties of SL2-LNPs, CSL3-LNPs and CSL3-siRNA lipoplexes.

Error bars represent the standard deviation of the mean of three measurements.

pH	SL2-LNPs			CSL3-LNPs			CSL3-siRNA		
	SL2/DSPC/Chol/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 50/10/37.5/2.5 %mol			CSL3/DSPC/Chol/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 50/10/37.5/2.5 %mol			CSL3/DSPC/Chol/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 50/10/37.5/2.5 %mol - N/P ratio of 4		
	D _H (nm)	PDI	ζ-potential (80)	D _H (nm)	PDI	ζ-potential (80)	D _H (nm)	PDI	ζ-potential (80)
7.4	112 ± 1	0.20 ± 0.01	- 8 ± 1	112 ± 1	0.17 ± 0.01	9 ± 1	140 ± 1	0.14 ± 0.01	- 15 ± 1
6	111 ± 1	0.15 ± 0.00	- 4 ± 1	109 ± 2	0.11 ± 0.02	14 ± 1	140 ± 2	0.16 ± 0.01	- 12 ± 1
5	109 ± 1	0.16 ± 0.02	4 ± 2	117 ± 1	0.21 ± 0.02	21 ± 2	140 ± 1	0.15 ± 0.01	- 2 ± 1
4.5	111 ± 1	0.15 ± 0.02	5 ± 1	114 ± 1	0.16 ± 0.02	24 ± 1	142 ± 2	0.16 ± 0.01	3 ± 1
4	115 ± 1	0.16 ± 0.01	8 ± 1	114 ± 2	0.16 ± 0.01	26 ± 1	155 ± 2	0.15 ± 0.01	6 ± 1
3.5	119 ± 1	0.19 ± 0.01	10 ± 1	117 ± 1	0.16 ± 0.01	30 ± 1	154 ± 2	0.17 ± 0.01	12 ± 1

This Table shows the lipid composition of LNPs and the physicochemical characterization of LNPs at various pH. The results show that the acidification of LNPs suspension leads to an increase in ζ-potential of LNPs while their hydrodynamic diameter remains unchanged.

Table S5.2. Morphological changes of GUV upon HCl or NaCl treatment

	Number of Vesicles Analyzed	Vesicles with Inward Structures ¹	Internalized Vesicles	Vesicles with Outward Structures ¹	Membrane Fluctuation ²	Total abnormalities
						
GUV-SL2 50%	142	7 %	15 %	6 %	4 %	32%
GUV-SL2 50% + HCl	167	13 %	10 %	43 %	3 %	69%
GUV-POPC	64	15 %	5 %	1.5 %	0	21.5%
GUV-POPC+ NaCl	77	18 %	5 %	6.5 %	0	29.5%
GUV-POPC + HCl	79	18 %	4 %	1 %	0	23%

¹ nanotube, aggregations; ² fluctuating non-rounded vesicles.

This Table presents the quantitative characterization of morphological changes of GUV upon HCl or NaCl treatment. The results show that the HCl treatment, the proportion of abnormal GUV-SL2 increases from 32% to 69%. As negative controls, no major morphological change was observed for GUV-POPC after HCl or NaCl treatment.

Chapitre 6

Discussion générale

La possibilité de concevoir des nanoparticules capables d'interagir sélectivement avec leur site thérapeutique reste un enjeu capital dans le domaine de la nanomédecine. Depuis plusieurs années, l'analyse fondamentale de la physiopathologie tumorale a identifié des caractéristiques cellulaires et environnementales du cancer, comme la surexpression de certains récepteurs membranaires. Notre contribution consiste à prendre en compte ces connaissances pour améliorer la conception des nanoparticules de façon rationnelle. Ce chapitre discute les apports importants de cette thèse à l'état des connaissances actuelles, les applications potentielles ainsi que les études en perspective pour l'avancement de connaissances énoncées.

6.1 Adsorption sélective à la densité surfacique de récepteur

Le chapitre 2 présente l'adsorption sélective à la densité surfacique de récepteurs des nanoparticules fonctionnalisées avec une monocouche bimodale (BiNPs). Pour rappel, la monocouche bimodale (138) comprend une fraction des chaînes portant un ligand de ciblage

(chaîne de ciblage) et une fraction des chaînes non-fonctionnelles servant de revêtement furtif (chaîne de furtivité). Nos résultats ont démontré, pour la première fois, la preuve expérimentale sur l'adsorption sélective à la densité surfacique des BiNPs. En accord avec les études théoriques (139) et de simulation (140, 141), cette étude confirme que la BM avec les chaînes de furtivité (1) plus longues que les chaînes de ciblage présente une meilleure sélectivité à la densité surfacique de récepteurs, par rapport à la BM avec les chaînes de furtivité plus courtes. De plus, nous avons montré qu'une augmentation de la densité surfacique de cette chaîne de furtivité permet une amélioration de cette sélectivité. Comme décrit dans le chapitre 3 (section 3.4.1), ces deux paramètres (densité surfacique et longueur de la chaîne de furtivité) contribuent à la répulsion stérique, diminuant l'affinité apparente entre les nanoparticules et la surface de récepteurs, ce qui favorise la sélectivité (128). Le modèle théorique dans le chapitre 2 (section 3.4.1) permet de rationaliser nos observations expérimentales et nous pouvons également expliquer nos résultats par un argument statistique. Considérons une nanoparticule multivalente adsorbée sur une surface de récepteurs par un certain nombre de liaisons i . La nanoparticule se détache de la surface de récepteurs lorsque toutes les liaisons ligand-récepteur sont dissociées. Nous considérons que les liaisons sont indépendantes les unes des autres. La probabilité que la nanoparticule se détache de la surface peut être exprimée par :

$$P_{NP} \sim (P_{indi})^i \quad (36)$$

Où P_{indi} est la probabilité qu'une liaison individuelle soit dissociée ($P_{indi} \leq 1$), qui dépend de l'énergie libre de liaisons ligand-récepteur, F_{bind} , et la pénalité d'énergie libre liée à la répulsion stérique récepteur-chaîne de furtivité, F_{rep} . L'utilisation d'une chaîne de furtivité défavorise la formation de la liaison ligand-récepteur, conduisant à une grande valeur de P_{indi} . Lorsque la densité surfacique de récepteurs diminue, i diminue et P_{NP} se rapproche de P_{indi} . Autrement dit, la

probabilité que la nanoparticule adsorbe sur la surface de récepteurs est petite. À l’opposé, lorsque la densité surfacique de récepteurs augmente, i augmente et P_{NP} se rapproche de zéro malgré que P_{indi} soit grande à cause de l’effet de la répulsion. Autrement dit, la probabilité que la nanoparticule s’adsorbe sur la surface de récepteurs reste grande. Par conséquent, la sélectivité augmente. Il est aussi important de noter que cette sélectivité ne requiert pas la présence d’un polymère stimuable. **Table 4.1** montrent qu’il est plus difficile à maîtriser la composition ainsi que la distribution surfacique des chaînes de furtivité et de ciblage pour une couche mixte avec pNIPAM. De ce fait, utiliser le même polymère pour la chaîne de furtivité et pour la chaîne de ciblage simplifie le design des nanoparticules.

Pour modéliser la surface fonctionnelle des nanoparticules, des GNPs ont été choisies en raison de la facilité à fonctionnaliser leur surface : la fonctionnalisation peut être facilement obtenue par auto-assemblage d’une monocouche (SAM) de PEGs portant un groupement terminal thiol qui se lie spontanément à la surface des GNPs via la liaison covalente Au-S. Ce choix des GNPs est approprié pour le contexte de la présente étude *in vitro*, cependant, pour des études sur les animaux, un changement du type de nanoparticules pourra être nécessaire. Parce que de nombreuses études ont rapporté la toxicité *in vivo* des GNPs administrées par voie intraveineuse (277, 278). De plus, l’attachement des médicaments sur les GNPs est habituellement effectuée par l’adsorption (chimique ou physique) sur leur surface, ce qui complique la fonctionnalisation surfacique des GNPs avec la BM. Nous pouvons penser à utiliser les nanoparticules lipidiques (LNPs) qui ont démontré leur innocuité et efficacité en clinique (mentionné dans le chapitre 1). La fonctionnalisation des LNPs peut être effectuée par l’utilisation des lipides modifiés avec le PEG et le PEG-ligand. Les paramètres de conception d’une BM à savoir la densité surfacique de chaînes de ciblage et de chaînes de furtivité peuvent être contrôlés en modulant la composition du mélange

lipidique lors de formulation. Pour le ligand, un ligand de nature d'aptamère DW4 a été choisi parce que sa synthèse implique peu d'étapes et permet d'un attachement direct de DW4 au PEG en utilisant la chimie des phosphoramidites (chapitre 3, section **3.5.2.1**). Cependant, un ligand de nature d'aptamère (comme DW4) n'est pas très pertinent pour être fonctionnalisé sur la surface des LNPs parce que le lipide cationique (souvent utilisé pour l'échappement endosomal, chapitre 1) dans la formulation des LNPs peut être complexé avec l'aptamère par une interaction électrostatique (279). Cette interaction peut influencer l'affinité ligand-récepteur. En outre, des évaluations préliminaires (par SPR) ont montré que le ligand DW4 perd son affinité avec TfR dans le milieu en présence d'albumine de sérum bovin (151). Par conséquent, nous avons utilisé le tampon PBS additionné de $MgCl_2$ 1 mM (PBS-M), pour correspondre aux conditions testées dans la littérature (186). Il serait donc important d'utiliser un ligand qui maintient son affinité dans un milieu biologique, en utilisant un ligand de différente nature, par exemple, le folate. Le folate est surexprimé dans certaines conditions pathologiques et les nanoparticules fonctionnalisées avec le folate peuvent être internalisées par la voie d'endocytose CAV (280, 281). L'affinité entre le folate et le récepteur de folate est plus forte que celle entre DW4 et TfR ($K_d = 10^{-10}$ M), comme décrit dans le chapitre 3 (section **3.4.1**), donc, l'utilisation des chaînes de fonctionnalité plus longues et à une densité surfacique plus élevée sera nécessaire pour assurer la sélectivité de ces nanoparticules fonctionnalisées avec folate.

Afin de quantifier les polymères (PEG et PEG-DW4) greffés sur la surface de GNPs, nous avons développé une méthode de quantification en nous basant sur trois techniques: la 1H -RMN quantitative, la fluorimétrie, la spectroscopie UV-vis. La 1H -RMN quantitative a été rapportée pour la quantification des SAM de polymères sur la surface des GNPs (210, 282). Cette technique présente une approche simple et efficace pour quantifier les SAMs mixtes contenant les polymères

de natures différentes (la détection est basée sur un signal spécifique à la chimie de chaque polymère). Par conséquent, la ^1H -RMN quantitative ne permet pas de distinguer des polymères de même nature chimique mais avec des longueurs différentes, ce qui est le cas de notre étude. Les SAMs contiennent deux chaînes de PEGs : l'un non-fonctionnel et l'autre PEG-DW4 de différentes longueurs. Pour surmonter ce problème, le PEG-DW4 a été tout d'abord quantifié par fluorimétrie (à l'aide d'une sonde fluorescente Sybr gold). La quantité de PEG non-fonctionnel est déterminée indirectement par la différence entre la quantité totale de PEG mesurée par ^1H -RMN et la quantité de PEG-DW4 mesurée par fluorimétrie. La combinaison de ^1H -RMN quantitative, la fluorimétrie et la spectroscopie UV-Vis (qui permet la détermination de la concentration des GNP) a permis de déterminer précisément la quantité de PEG et de PEG-DW4 à la surface des GNPs (Chapitre 2). Notons que, l'intégrité des signaux de ^1H -RMN pour les PEGs greffés sur les GNPs est affectée par les électrons de conduction à la surface métallique de GNPs (210). Par conséquent, nous avons dû dissoudre les GNPs dans l'eau régale avant la quantification. La digestion de GNPs n'affecte pas l'intégrité de PEGs (210). Cette approche de quantification des polymères sur la surface des nanoparticules peut potentiellement servir pour d'autres types de nanoparticules comme les LNPs. Pour les LNPs dont la surface est fonctionnalisée avec du PEG il est possible de quantifier directement des PEGs dans une suspension de LNPs sans avoir besoin de les dissoudre (283, 284). Lorsque les LNPs sont dispersées dans le solvant D_2O , seulement le PEG surfacique peut être détecté par RMN et les signaux de PEG enfoui dans les LNPs ne sont pas visibles (284). Il faudrait également adapter la technique de quantification de ligands. Prenons l'exemple du folate, de nombreuses études ont rapporté la fonctionnalisation de folate sur les nanoparticules pour le ciblage actif, mais peu d'études ont rapporté la quantification de folate

greffé sur la surface des nanoparticules. Nous proposons d'utiliser la chromatographie HPLC avec un détecteur UV pour la quantification de folate (285).

Pour imiter les membranes cellulaires, le récepteur de la transferrine (TfR) a été immobilisé sur une monocouche auto-assemblée de PEG bifonctionnel (SH-PEG_{2K}-COOH) (SAM-PEG) par couplage peptidique. La SAM-PEG sert à limiter les adsorptions non-spécifiques indésirables qui ne sont pas médiées par la liaison spécifique ligand-récepteur (286-289), ce qui a été vérifié par SPR (Chapitre 3, **Figure 3.2C**). C'est un prérequis essentiel pour étudier les interactions spécifiques entre TfR et DW4. Pour moduler la densité surfacique de protéines immobilisées, différentes approches ont été rapportées dans la littérature, à savoir l'ajustement du pH de la solution de couplage (290) ou l'utilisation de SAM mixtes portant un groupement fonctionnel (-COOH ou -NH₂) et une extrémité inerte (291-293). Le changement de pH peut causer une modification irréversible de la conformation des protéines, ce qui conduit à un changement d'affinité (294, 295). Pour contrôler la densité surfacique de récepteurs d'une SAM mixte, plusieurs conditions expérimentales, à savoir la composition surfacique de groupement fonctionnel (-COOH ou -NH₂) sur la SAM mixte, la relation entre la densité surfacique de protéines immobilisées et la composition du groupement fonctionnel, doivent être optimisées pour contrôler la densité surfacique de récepteurs. Par exemple, Nafisa *et al.* ont rapporté que les surfaces avec 10% ou 100% de groupements amines (-NH₂) ont mené à la même densité surfacique de peptides immobilisés alors qu'une surface avec 20% de groupements amine a donné une densité surfacique supérieure d'immobilisation (293). Nombreuses études ont également rapporté cette même tendance (292, 296). En effet, il existe une densité optimale de groupement fonctionnel sur la surface pour la réaction couplage, au-delà de cette densité, les groupements fonctionnels sont spatialement plus proches les uns des autres, ce qui empêche l'accès des peptides pour le couplage.

Dans notre étude, nous avons modulé le temps de réaction pour varier la densité surfacique de TfR immobilisés. Cette approche s'est avérée simple, peu coûteuse et efficace. En effet, la quantification par SPR a montré que la densité surfacique de TfR est corrélée (de façon non linéaire) au temps de la réaction de couplage. Les surfaces de TfR présentent des densités surfaciques entre $\sim 860 - 7980$ molécules/ μm^2 , ces densités représentent relativement bien celles chez les cellules. En effet, les densités surfaciques de TfR membranaire chez les cellules HEK293 (lignée cellulaire humaine normale transformée) et les cellules RAMOS (lignée cellulaire tumorale surexprimant TfR) sont approximativement 92 molécules/ μm^2 et 9200 molécules/ μm^2 , respectivement (297, 298). Néanmoins, la composition des surfaces modèles de récepteurs ne représentent pas parfaitement la membrane cellulaire. Les surfaces modèles sont des SAM de chaînes de PEG exposant un ligand, le TfR, alors que les membranes cellulaires naturelles sont connues pour exposer à leur surface non seulement des récepteurs mais également d'autres polymères tels que le glycocalyx (62), qui peuvent fournir une répulsion stérique modulant l'affinité apparente ainsi que la sélectivité de l'interaction nanoparticule/cellule (24, 28). Par conséquent, il est nécessaire de valider la sélectivité des nanoparticules sur les cellules exprimant TfR, comme suggéré ci-après

En perspective, les résultats présentés dans ce projet sont prometteurs et pourraient être exploités pour le développement de nanoparticules pour le ciblage de cellules surexprimant un récepteur spécifique. Par contre, certaines études seront nécessaires pour vérifier si la sélectivité observée est valable sur les cellules. En particulier, il est nécessaire d'étudier l'effet des composants sériques (protéines, macrophages) sur l'adsorption sélective des nanoparticules *in vitro*. Tel qu'il a été présenté dans le chapitre 1, une fois administrées dans la circulation sanguine, les nanoparticules seront en contact avec de nombreux composants biologiques. L'adsorption non-

spécifique sur la surface des nanoparticules pourra avoir un impact important sur les propriétés de sélectivité des nanoparticules. Ensuite, il est essentiel de valider l'adsorption sélective des nanoparticules sur les cellules exprimant TfR à différents niveaux. Nous pouvons utiliser les lignées cellulaires présentant différentes densités surfaciques de TfR. Par exemple, Wang J. *et al* (298) ont utilisé les lignées cellulaires (HeLa, Ramos, H460, SK-OV-3, HepG2, LNCaP et HEK 293) exprimant différentes densités surfaciques de TfR. Dans cette étude, la quantité de TfR entre les lignées a été déterminée par la cytométrie de flux (à l'aide d'un anticorps-TfR fluorescent). Pour les études cellulaires, il n'est pas possible de mesurer directement l'adsorption des nanoparticules à la surface cellulaire, mais plutôt de quantifier les nanoparticules internalisées dans les cellules après l'adsorption. Comme décrit dans le chapitre 1, l'internalisation cellulaire des nanoparticules peut être réalisée sans la médiation de la liaison ligand-récepteur. Donc, il faudrait avoir au moins une lignée cellulaire qui n'exprime pas TfR comme un contrôle négatif.

Pour rationaliser l'adsorption des GNPs, un modèle théorique a été développé, par Dr. Stefano Angioletti Uberti, en adaptant la théorie de super-sélectivité de Martinez-Veracoechea et Frenkel (128). Ce modèle statistique est basé sur une description simplifiée à gros grains et n'est pas attendu de capturer tous les détails des systèmes expérimentaux, cependant, une prédiction qualitative peut être attendue. Il est pertinent de discuter certaines limites de ce modèle. Tout d'abord, le modèle suppose que les liaisons individuelles ligand-récepteur se forment de manière indépendante. Ce scénario est susceptible de se produire lorsque la densité surfacique de récepteurs et de ligands est adéquatement faible pour que des interactions (par exemple, gêne stérique) entre les récepteurs et les ligands puissent être ignorées. Quand la densité surfacique de récepteurs et de ligands est élevée, l'adsorption devrait être inférieure à la valeur prédite. En plus, le modèle exclut l'effet de la taille du ligand sur la répulsion de la brosse polymérique. En pratique, si la taille est

suffisamment large jusqu'à un point auquel sa présence perturbe fortement la densité surfacique locale des chaînes polymères, et donc la répulsion stérique (voir l'équation 16). Finalement, à partir de **Figure 3.3A**, nous remarquons que les courbes expérimentales d'adsorption atteignent le plateau plus tôt que la théorique (l'adsorption théorique est supérieure à l'adsorption mesurée sur des surfaces à haute densité de récepteurs). Ce phénomène peut être attribué à la supposition sur la formation indépendante des liaisons individuelles ligand-récepteur mentionné au-dessus. En outre, pour calculer la valeur d'adsorption théorique des GNPs, nous considérons un site d'adsorption A_{site} qui présentant un nombre de récepteur actifs N_R . La probabilité d'avoir N_R sur le site A_{site} est $P(N_R, \bar{N}_R)$ avec \bar{N}_R est la moyenne (qui étant calculé à partir de la valeur expérimentale de la densité surfacique de récepteur, voir l'équation 23). $P(N_R, \bar{N}_R)$ est calculé par la distribution de Poisson. Il faut noter que la distribution surfacique des récepteurs suit la loi de Poisson seulement si la densité surfacique de récepteur est faible. Pour des surfaces à haute densité surfacique de récepteurs, $P(N_R, \bar{N}_R)$ avec $N_R > \bar{N}_R$ pourrait être surestimée. Par conséquent, l'adsorption de GNPs serait surestimée.

6.1.1 Considérations lors du développement des BiNPs pour la super-sélectivité

La sélectivité des BiNPs peut être obtenue par un choix approprié de paramètres de conception de la monocouche bimodale. En se basant sur la théorie de super-sélectivité, nous présentons les points importants pour concevoir un système BiNPs ayant une sélectivité à la densité surfacique de récepteurs. L'expression théorique de la sélectivité est (voir le chapitre 3, l'équation 1)

$$\alpha_{(\Gamma_R)} \equiv \frac{d \ln \Gamma_{NP}}{d \ln \Gamma_R} \quad (1)$$

Notre objectif est de concevoir un système ayant une valeur maximale de α à une densité surfacique de récepteurs ciblée Γ_{onset} . Autrement dit, nous voulons une variation élevée (supra-linéaire) de la densité surfacique de nanoparticules adsorbées Γ_{NPs} face à une variation de la densité surfacique de récepteurs Γ_R à Γ_{onset} . Γ_{NPs} est exprimée par (équations 2, 3, 26):

$$\Gamma_{\text{NPs}} = A_{\text{site}} \times \frac{\rho_{\text{NP}} v_0 \exp[-\beta(F_{\text{bind}} + F_{\text{rep}})]}{1 + \rho_{\text{NP}} v_0 \exp[-\beta(F_{\text{bind}} + F_{\text{rep}})]}$$

Comme décrit dans le chapitre 3, βF_{bind} et βF_{rep} sont l'énergie libre de liaison ligand-récepteur et la pénalité de l'énergie libre liée à la répulsion stérique récepteur- chaîne de furtivité, respectivement. βF_{bind} et βF_{rep} sont exprimées par l'équation 4 et 16, respectivement (Chapitre 3):

$$\beta F_{\text{bind}} = \sum_{i=R,L} N_i \left[\ln p_i + \frac{1}{2} (1 - p_i) \right] \quad (4)$$

$$\beta F_{\text{rep}} = N_R f_{\text{rep}} = N_R C V_R \xi_2(r = R_{\text{NP}} + h_1)^{-3} g \quad (16)$$

Selon l'équation 16, βF_{rep} augmente linéairement en réponse de N_R , N_R est le nombre de récepteurs qui se trouvent dans les zones d'interaction et qui peuvent participer à la formation de la liaison ligand-récepteur. L'équation 2 est une expression mathématique exacte pour βF_{bind} , mais elle masque la relation entre βF_{bind} et N_R . Il est possible de simplifier l'équation 2 par une approximation de champ moléculaire (182) comme suivant:

$$\beta F_{\text{bind}} \sim \begin{cases} -N_R \ln[1 + N_L \exp(\beta \Delta G_{\text{bond}})], & N_R < N_L \\ -N_L \ln[1 + N_R \exp(\beta \Delta G_{\text{bond}})], & N_R > N_L \end{cases} \quad (37)$$

L'équation (37) montre que βF_{bind} diminue linéairement avec N_R pour les N_R faibles ($N_R < N_L$) et diminue de façon exponentielle avec N_R pour les N_R élevés ($N_R > N_L$). Nous pouvons

énoncer la règle #1 « le nombre de ligands N_L doit être supérieur au nombre de récepteurs N_R pour avoir une variation de βF_{bind} avec N_R plus élevée ». Dans ce scénario, l'énergie libre d'adsorption peut être exprimée comme :

$$\beta(F_{bind} + F_{rep}) \equiv N_R(R - B) \quad (38)$$

Où, R et B sont les coefficients de répulsion et d'attraction, respectivement, qui dépendent des paramètres de conception du système. Pour faciliter l'interprétation, réécrivons (équations 2, 3, 26):

$$\Gamma_{NPs} = A_{site} \times \frac{\rho_{NP} v_0 \exp[N_R(B - R)]}{1 + \rho_{NP} v_0 \exp[N_R(B - R)]} \quad (39)$$

Pour avoir une valeur de α élevée à une densité surfacique de récepteurs ciblée Γ_{Onset} , le produit $\rho_{NP} v_0 \exp[N_R(B - R)]$ doit être *petit et augmenter avec* N_R ($\ll 1$) à partir de Γ_{Onset} (le nombre de récepteurs correspondant à Γ_{Onset} est nommé $N_{R-onset}$). Pour cela, différentes approches peuvent être considérées :

- i, Diminuer la concentration de nanoparticules en solution ρ_{NP} : C'est la manière la plus simple d'améliorer l'adsorption sélective. Par contre, une concentration trop faible conduit à une faible quantité de nanoparticules adsorbées.
- ii, Minimiser le volume d'adsorption v_0 : en diminuant la longueur effective de la chaîne de ciblage (équations 17 et 18, chapitre 2) ou en diminuant le diamètre hydrodynamique des nanoparticules. Cependant, la diminution de v_0 peut mener à une diminution du coefficient B, qui diminue l'amplitude de la variation de $\exp[N_R(B - R)]$ en réponse de N_R , par conséquent, la sélectivité. Donc, il n'est pas très bénéfique de trop diminuer v_0 .

iii, Minimiser $(B - R)$: Le produit de $N_{R-onset}(B - R)$ doit être petit mais toujours positif. À titre d'exemple, si nous visons à cibler les surfaces de récepteurs à haute densité surfacique ($N_{R-onset}$ élevé), il faudrait diminuer $(B - R)$ pour minimiser le produit $N_{R-onset}(B - R)$. Pour cela, nous pouvons diminuer B ou augmenter R: (a) Diminution de B (coefficient d'attraction): plusieurs paramètres influencent la valeur de B. En premier, un ligand ayant une affinité modérée avec le récepteur cible peut être utilisé pour diminuer B. Cependant, les interactions non-spécifiques peuvent devenir dominantes lors de l'utilisation d'un ligand à trop faible affinité (299). En deuxième, bien que les diminutions de la longueur de la chaîne de ciblage, de la taille des nanoparticules et de la densité surfacique de ligands permettent de diminuer B (en diminuant le nombre de ligands et de récepteurs qui participent à l'interaction nanoparticule-cellule), elles provoquent également une diminution de l'amplitude de la variation de βF_{bind} en réponse de N_R à cause de la perte de l'effet combinatoire. Par conséquent, il n'est pas préférable de diminuer considérablement la valeur de B; (b) Augmentation de R (coefficient de répulsion): la longueur et/ou la densité surfacique de la chaîne de furtivité peut être augmentées pour augmenter R. À cette étape, il faut s'assurer que la valeur de R soit égale à $R_{max} < B$, sinon, la répulsion devient trop forte et inhibe complètement l'adsorption. Cette approche est très bénéfique pour atteindre une super-sélectivité visée et c'est ce que nous avons montré dans le chapitre 2.

6.2 Déstabilisation membranaire sélective au pH acide

Le chapitre 3 présente la déstabilisation membranaire sélective au pH acide des nanoparticules lipidiques contenant un lipide bascule pH-sensible (SL2 ou CSL3). Pour rappel, ces lipides sont construits sur une bascule moléculaire (« switch ») qui change de conformation

par acidification. Les études récentes ont montré que les nanoparticules lipidiques contenant de tels lipides permettent la délivrance cytosolique du contenu thérapeutique, sur plusieurs modèles *in vitro* et *in vivo*, en particulier du cancer (rétinoblastome). Toutefois, afin de comprendre les avantages et les limites du système, le mécanisme de déstabilisation membranaire des nanoparticules lipidiques a été étudié par différentes méthodes biophysiques. Nos résultats confirment que le mécanisme de déstabilisation membranaire de LNPs contenant SL2 ou CSL3 à pH acide est associé au changement conformationnel de ces lipides. Plus spécifiquement, les résultats de LB ont en effet montré une expansion de l'aire surfacique occupée par les lipides bascules dans la monocouche lipidique, qui est probablement due au changement conformationnel et à la protonation du lipide. Cette modification n'entraîne pas de séparation de phase de la membrane lipidique. En effet, les résultats DSC, LB et RMN-C¹³ ont démontré que les lipides bascules sont capables de s'incorporer de manière homogène avec les co-lipides et que la présence de CSL3 dans la bicouche lipidique est favorisée thermodynamiquement à pH neutre et encore plus à pH acide. Cependant, la modification conformationnelle du lipide bascule induit des fluctuations et des défauts de la membrane lipidique, qui se traduisent par des changements morphologiques des vésicules lipidiques (microscopie). En outre, la protonation à pH acide des lipides bascules (mesure de potentiel- ζ) favorise leur interaction avec les phospholipides (tels que la DSPC) et induit probablement la fusion membranaire avec des membranes chargées négativement, qui a été rapportée par les travaux de Viricel *et al.* (156, 157). Finalement, tous ces changements en morphologie sont probablement responsables du relargage du cargo encapsulé dans les LNPs. Il faut noter que le mécanisme de fusion membranaire suggéré ici est cohérent avec le mécanisme proposé pour les LNPs ionisables (300) tel que décrit dans le chapitre 1 (section

1.4). De plus, la déstabilisation membranaire de manière spontanée (en absence des vésicules chargées négativement) est nouvelle et spécifique aux lipides bascules.

Les méthodes souvent utilisées pour la formulation des LNPs comprennent l'extrusion et le mélange par microfluidique et elles peuvent avoir un impact important sur la morphologie et donc certainement sur le mécanisme de déstabilisation. En effet, les LNPs, préparées par extrusion dans le cadre de cette étude (chapitre 5), sont des vésicules assez homogènes présentant une bicouche avec un cœur aqueux à pH 7.4. Cependant, des résultats de l'étude préliminaire (par le groupe de Dr. Leblond Chain (INSERM Bordeaux, France)) démontrent que des LNPs-CSL3, préparées par microfluidique, sont des vésicules aux formes et tailles hétérogènes présentant une bicouche avec un cœur aqueux ou lipidique à pH 7,4. Les CSL3-LNPs encapsulant siARN, préparées par microfluidique, sont des vésicules avec un cœur dense et une « couronne » multi-lamellaire. Ces observations sont très similaires avec les LNPs ionisables contenant KC2 (LNPs-KC2) (161). La structure du cœur solide de LNPs sans siARN reflète probablement une phase huileuse du lipide ionisable sous forme neutre à pH 7,4 (161). En présence de siARN, les LNPs ionisables présentent des structures lamellaires qui « sandwichent » le siARN entre deux bicouches lipidiques (161). Il est fort probable que les CSL3-LNPs présentent également cette organisation.

Il est pertinent de mentionner certaines limites des modèles expérimentaux employés dans cette étude. Par exemple, pour l'étude de microscopie confocale, POPC (au lieu de DSPC) a été utilisé comme co-lipide pour faciliter la formation des vésicules géantes (GUV) en utilisant la technique (électro-formation) et le protocole disponible dans notre laboratoire. Il est donc nécessaire de reproduire nos résultats avec des formulations de GUV plus proches avec celles de LNPs parce qu'il est bien connu que la composition de LNPs a un impact important sur les propriétés physicochimiques des LNPs (153). Pour l'étude de potentiel ζ , un large range de pH

(7.4 à 3.5) a été utilisée. Il est bien évident que la valeur de pH 3.5 ne soit pas représentative de ce qui se passe dans les cellules, mais la mesure du potentiel ζ des LNPs à ce pH permet d'obtenir une estimation de la valeur pK_a apparente des LNPs à l'aide de l'équation de Henderson-Hasselbalch. Finalement, tel que mentionné dans le chapitre 1, les nanoparticules en général et les LNPs en particulier sont souvent internalisées par les voies d'endocytose, et se retrouvent dans les vésicules endocytaires. Leurs interactions avec la membrane endosomale et d'autres composants cellulaires jouent un rôle important sur le mécanisme de déstabilisation membranaire. En perspective, les études de trafic intracellulaire des LNPs donneront des informations intéressantes sur le mécanisme de déstabilisation membranaire ainsi que sur l'échappement endosomal. Pour visualiser les LNPs, il est possible d'encapsuler des sondes fluorescentes dans les LNPs et observer indirectement les LNPs par microscopie. Les techniques de microscopie par localisation de molécules individuelles (SMLM) permettent d'obtenir des résolutions bien au-dessous de la barrière de diffraction (301). L'utilisation de ces microscopies a permis d'observer la distribution et le trafic des LNPs individuelles et même du siARN dans les cellules (302).

Les études *in vitro* (sur les cellules) et *in vivo* ont montré que les LNPs bascules sont capables de pénétrer dans des cellules sans l'aide d'un ligand. Par contre, nous pouvons améliorer l'efficacité de ciblage des LNPs aux cellules pathologiques surexprimant un récepteur spécifique en fonctionnalisant leur surface avec une monocouche bimodale BM (contenant PEG et PEG-ligand), comme présenté dans le chapitre 2. Dans ce scénario, il sera nécessaire de valider la capacité de déstabilisation membranaire et l'échappement endosomal des LNPs en présence de BM. Il est bien connu que la présence de PEG dans la formulation de LNPs empêche l'échappement endosomal des LNPs (303). Pour les LNPs bascules, il est rapporté que la formulation de LNPs contenant 5% PEG présente encore une bonne capacité de relargage et de

fusion membranaire à pH acide (157). De cette étude, nous avons observé le changement morphologique ainsi que le relargage de calcéine à pH acide pour les formulations de LNPs bascules contenant 2.5% de PEG. Néanmoins, des études supplémentaires sur la déstabilisation membranaire ainsi que sur le trafic intracellulaire des LNPs bascules fonctionnalisées avec BM sont essentielles pour confirmer l'efficacité de l'échappement endosomal.

Finalement, les mécanismes proposés peuvent être utilisés pour expliquer d'autres systèmes similaires. Récemment, le concept « conformational molecular switch » initié par le groupe de Dr. Leblond Chain prend de l'ampleur dans le développement des nanoparticules lipidiques pour la délivrance sélective au stimulus (171). Dans cette stratégie, des lipides bascules stimuli-sensibles ont été synthétisés en se basant sur une unité de basculement qui subit un changement conformationnel en présence des ions (H^+ , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+}) ou des métabolites cibles (ATP, lipide phosphatidylsérine) (171, 304, 305). Les résultats ont montré une délivrance hautement sélective au stimulus et aux cellules cibles. Il est très probable que la délivrance de cargo de ces systèmes soit médiée par une déstabilisation membranaire. Par exemple, des LNPs contenant un lipide bascule sensible à l'ATP sont des vésicules non sphériques avec une bicouche lipidique avant le traitement avec ATP et deviennent des vésicules non-sphériques denses de lipides après le traitement avec l'ATP (**Figure 6.1**) (304).

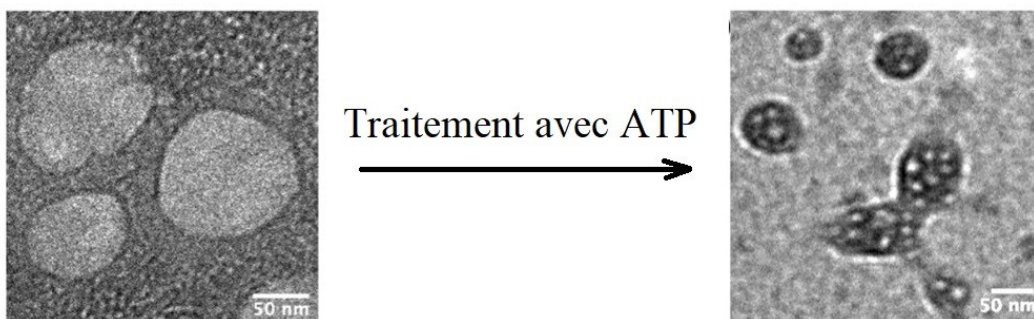


Figure 6.1. Changement morphologique des LNPs contenant un lipide bascule sensible à l'ATP (304).

Les résultats de notre projet peuvent être exploités pour optimiser le concept de « conformational switch ». Par exemple, les isothermes de la monocouche lipidique LB ont montré une expansion importante de l'aire moléculaire pour la phase L_c -to- L_c , mais une expansion négligeable pour la phase L_c à pH acide. Comme expliqué dans le chapitre 5, ce phénomène est dû à une forte interaction de van der Waals entre les chaînes lipidiques de la phase L_c . Ce phénomène peut diminuer la réponse (changement conformationnel) au pH. Il faut noter qu'il est toujours préférable de minimiser la quantité de lipides synthétiques pH-sensibles dans la formulation de LNPs (dans le but de diminuer la toxicité). Quelques approches pourraient être envisagées pour améliorer l'amplitude de la réponse au pH : (1) l'utilisation des chaînes insaturées (les liaisons doubles défavorisent l'empilement des chaînes); (306) la modification de l'unité de basculement pour permettre un plus grand angle de rotation des chaînes hydrocarbonées (**Figure 6.2**). Il est également possible d'améliorer la réponse au pH des LNPs bascules en ajoutant dans leur formulation des co-lipides « aidants » à savoir le lipide fusogène DOPE (favorisant la formation de phase non-lamellaire) (300) ou d'autres lipides ionisables (307).

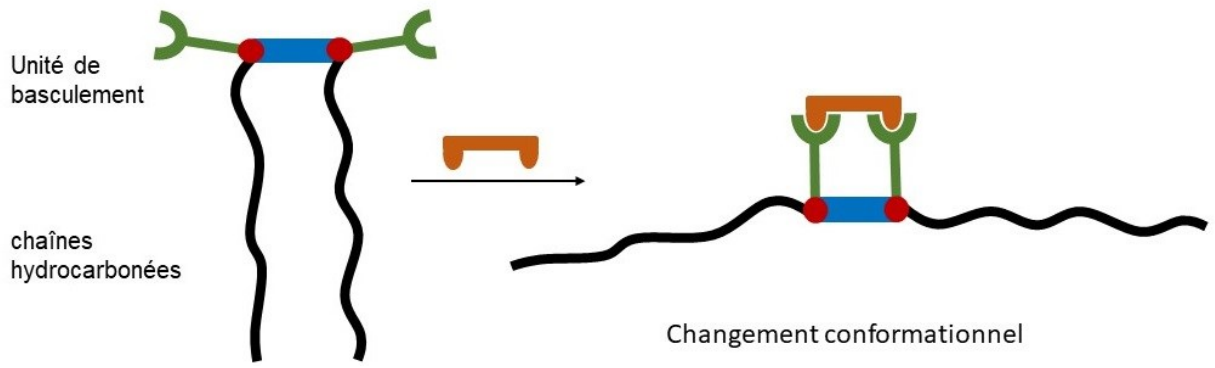


Figure 6.2. Schéma représentant une rotation à grande angle de l'unité de basculement permettant un changement considéré de conformation moléculaire.

Chapitre 7

Conclusions

Dans cette thèse est rapporté l'étude des réponses sélectives à la densité surfacique de récepteurs et au pH acide des nanoparticules fonctionnelles et l'impact des paramètres de conception sur ces comportements sélectifs. De telles fonctionnalités peuvent être employées dans le développement et l'optimisation des systèmes de ciblage thérapeutique à base des nanoparticules.

Le ciblage actif des NP est largement utilisé pour améliorer leur sélectivité envers la cellule ou le tissu d'intérêt. Par exemple, les anticorps sont couramment conjugués aux NP pour favoriser le ciblage sélectif. (1,2) Cependant, la traduction clinique des NP à ciblage actif est difficile, sans formulation approuvée à ce jour. (3) Le succès clinique limité indique qu'une meilleure compréhension des pièges rencontrés dans le ciblage actif des IP est nécessaire.

Malgré les grandes promesses et l'activité intense dans ce domaine au cours des dernières décennies, le ciblage actif des nanoparticules a été décevant en clinique, sans traitement approuvé jusqu'à présent.

Pour équiper les nanoparticules d'une adsorption sélective à la densité surfacique de récepteurs, nous avons proposé de fonctionnaliser leur surface avec une monocouche bimodale partiellement fonctionnalisée. Un modèle biomimétique de l'interface nanoparticule-cellule a été développé et optimisé pour tester l'adsorption des nanoparticules sur les surfaces de récepteur à différentes densités surfaciques. En utilisant ce modèle expérimental en combinaison avec la modélisation théorique, une preuve expérimentale détaillée et systématique sans précédent sur la sélectivité envers la densité surfacique de récepteurs de nanoparticules décorées de la monocouche bimodale a été démontrée. L'utilisation des chaînes de furtivité plus longues que les chaînes de ciblage a permis d'augmenter la super-sélectivité. Un modèle théorique a été développé pour décrire la répulsion due à des chaînes de furtivité: une augmentation de la longueur et/ou de la densité surfacique de la chaîne de furtivité entraîne une augmentation de la répulsion stérique. Une relation entre la répulsion stérique et la sélectivité a été établie : une augmentation de la répulsion conduit à une amélioration de la sélectivité. Ces résultats pourraient être exploités pour la conception expérimentale des systèmes multivalentes présentant un comportement super-sélectif désiré. Afin de généraliser ces résultats à des nanomédicines, il est indispensable de conduire des études supplémentaires plus proches des réalités cliniques. Tout d'abord, l'utilisation des nanoparticules plus appropriées pour la vectorisation pharmaceutique comme discuté dans le chapitre 6. Il serait ensuite nécessaire d'évaluer le comportement sélectif des nanoparticules sur les cellules ciblées parce que le modèle (expérimental et théorique) de notre étude ne reflète pas complètement les cellules, par exemple, l'élasticité, la courbure des cellules ou la présence d'autres

composants à la surface cellulaire comme le glycocalyx. Il fut démontré que ces paramètres ont joué un rôle important sur l'adsorption cellulaire des nanoparticules (182, 308). Il est aussi important de tester l'adsorption sélective des nanoparticules par une étude *in vivo*, tel que décrit dans le chapitre 1, notre organisme présente plusieurs barrières qui peuvent affecter le comportement sélectif des nanoparticules. En particulier, la matrice extracellulaire (ECM) peut avoir un impact sur la diffusion des nanoparticules, modifiant ainsi la cinétique d'adsorption des nanoparticules (308, 309). Des nanoparticules peuvent être séquestrées par le système réticulo-endothélial (MPS), raccourcissant leur circulation sanguine. La formation de la couronne de protéines à la surface des nanoparticules peut modifier leur fonctionnalité de ciblage sélectif (310).

Pour mieux comprendre le mécanisme pour lequel les nanoparticules lipidiques bascules pH-sensibles facilitent la délivrance cytosolique, nous avons proposé l'étude de l'impact du pH et des lipides bascules pH-sensibles sur les propriétés physico-chimiques des mélanges lipidiques et des nanoparticules lipidiques. Il a été démontré qu'en s'incorporant dans la bicouche lipidique, les lipides bascules ont la capacité de promouvoir la déstabilisation de la membrane lipidique dans le milieu acide, déclenchant ainsi la libération de leur contenu. Sur la base d'observations microscopiques et de mesures biophysiques, un mécanisme de déstabilisation membranaire est proposé par lequel lors de l'acidification, le changement conformationnel des lipides bascules provoque un réarrangement de l'assemblage lipidique, ce qui conduit à des modifications morphologiques des vésicules lipidiques (formes irrégulières, agglomérat, vésicules polygonales). Durant la transformation morphologique, la membrane lipidique devient plus perméable, favorisant la fuite des médicaments encapsulés. Ces résultats pourraient être utiles pour la compréhension des mécanismes de délivrance ciblée des molécules bascules stimuli-sensibles. Il faut noter que certains modèles expérimentaux de cette étude ont été simplifiés pour isoler

l'influence d'autres paramètres et d'étudier uniquement l'effet de pH et des lipides bascules sur le comportement physicochimique des nanoparticules lipidiques, par conséquent, certaines conclusions tirées de cette étude ne représentent pas parfaitement le mécanisme d'échappement endosomal. Il est ainsi très important de conduire des études supplémentaires telles que discutées dans le chapitre 6 pour permettre une meilleure compréhension de mécanisme d'échappement endosomal.

Les réponses sélectives des nanoparticules rapportées par ce projet serviront potentiellement à concevoir efficacement les nanoparticules fonctionnelles aux ciblages sélectifs. Dans un scénario idéal, nous pourrions formuler des nanoparticules lipidiques bascules pH-sensibles fonctionnalisées avec une monocouche bimodale pour le ciblage thérapeutique au cancer où les cellules tumorales sont caractérisées par une surexpression d'un récepteur spécifique. Ces nanoparticules seront capables de transporter leur cargo (agents thérapeutiques) aux cellules ciblées grâce à leur adsorption sélective à la densité surfacique de récepteur et puis relarguer leur cargo une fois endocytées dans les cellules grâce au mécanisme de l'échappement endosomal.

Chapitre 8

Bibliographie

1. Moreno PM & Pego AP (2014) Therapeutic antisense oligonucleotides against cancer: hurdling to the clinic. *Front Chem* 2:87.
2. Canada LAdlspd (2021) *Statistiques canadiennes sur le cancer 2021*.
3. Caroline S.Zeind MGC (2018) *Applied therapeutics the clinical use of drugs* (Wolters Kluwer) 11 Ed p 2379.
4. Torchilin VP (2000) Drug targeting. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 11:S81-S91.
5. Wu Q, Yang Z, Nie Y, Shi Y, & Fan D (2014) Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: Mechanisms and lab approaches. *Cancer Letters* 347(2):159-166.
6. Minchinton AI & Tannock IF (2006) Drug penetration in solid tumours. *Nature Reviews Cancer* 6(8):583-592.
7. Strebhardt K & Ullrich A (2008) Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature Reviews Cancer* 8(6):473-480.
8. Jain V, Jain S, & Mahajan SC (2015) Nanomedicines based drug delivery systems for anti-cancer targeting and treatment. *Curr Drug Deliv* 12(2):177-191.
9. Krukiewicz K & Zak JK (2016) Biomaterial-based regional chemotherapy: Local anticancer drug delivery to enhance chemotherapy and minimize its side-effects. *Materials Science and Engineering: C* 62:927-942.

10. Wolinsky JB, Colson YL, & Grinstaff MW (2012) Local drug delivery strategies for cancer treatment: gels, nanoparticles, polymeric films, rods, and wafers. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 159(1):14-26.
11. Mitchell MJ, *et al.* (2021) Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* 20(2):101-124.
12. Mishra B, Patel BB, & Tiwari S (2010) Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 6(1):9-24.
13. Halwani AA (2022) Development of Pharmaceutical Nanomedicines: From the Bench to the Market. *Pharmaceutics* 14(1).
14. Administration USFaD (2004) FDA Approves New Drug Treatment for Age-Related Macular Degeneration.
15. Patra JK, *et al.* (2018) Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology* 16(1):71.
16. Mitragotri S, *et al.* (2017) Drug Delivery Research for the Future: Expanding the Nano Horizons and Beyond. *Journal of Controlled Release* 246:183-184.
17. Hua S, de Matos MBC, Metselaar JM, & Storm G (2018) Current Trends and Challenges in the Clinical Translation of Nanoparticulate Nanomedicines: Pathways for Translational Development and Commercialization. *Front Pharmacol* 9:790.
18. Blanco E, Shen H, & Ferrari M (2015) Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology* 33(9):941-951.
19. Mura S, Nicolas J, & Couvreur P (2013) Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nature Materials* 12(11):991-1003.

20. Wagner AM, Gran MP, & Peppas NA (2018) Designing the new generation of intelligent biocompatible carriers for protein and peptide delivery. *Acta Pharm Sin B* 8(2):147-164.
21. Zhao Z, Ukidve A, Kim J, & Mitragotri S (2020) Targeting Strategies for Tissue-Specific Drug Delivery. *Cell* 181(1):151-167.
22. Juliano R, Bauman J, Kang H, & Ming X (2009) Biological Barriers to Therapy with Antisense and siRNA Oligonucleotides. *Molecular Pharmaceutics* 6(3):686-695.
23. Liu J, Yu M, Zhou C, & Zheng J (2013) Renal clearable inorganic nanoparticles: a new frontier of bionanotechnology. *Materials Today* 16(12):477-486.
24. Gustafson HH, Holt-Casper D, Grainger DW, & Ghandehari H (2015) Nanoparticle uptake: The phagocyte problem. *Nano Today* 10(4):487-510.
25. Tenzer S, *et al.* (2013) Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nature Nanotechnology* 8(10):772-781.
26. Sahay G, Alakhova DY, & Kabanov AV (2010) Endocytosis of nanomedicines. *Journal of Controlled Release* 145(3):182-195.
27. Song G, Petschauer JS, Madden AJ, & Zamboni WC (2014) Nanoparticles and the mononuclear phagocyte system: pharmacokinetics and applications for inflammatory diseases. *Curr Rheumatol Rev* 10(1):22-34.
28. Harris JM & Chess RB (2003) Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nature Reviews Drug Discovery* 2(3):214-221.
29. Knop K, Hoogenboom R, Fischer D, & Schubert US (2010) Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *Angew Chem Int Ed Engl* 49(36):6288-6308.

30. Davis ME, Chen Z, & Shin DM (2008) Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* 7(9):771-782.
31. Jiang S & Cao Z (2010) Ultralow-Fouling, Functionalizable, and Hydrolyzable Zwitterionic Materials and Their Derivatives for Biological Applications. *Advanced Materials* 22(9):920-932.
32. Parodi A, *et al.* (2013) Synthetic nanoparticles functionalized with biomimetic leukocyte membranes possess cell-like functions. *Nature Nanotechnology* 8(1):61-68.
33. Hu C-MJ, *et al.* (2011) Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(27):10980-10985.
34. Rodriguez PL, *et al.* (2013) Minimal "Self" Peptides That Inhibit Phagocytic Clearance and Enhance Delivery of Nanoparticles. *SCIENCE* 339(6122):971-975.
35. Mehta D & Malik AB (2006) Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. *Physiological Reviews* 86(1):279-367.
36. Banks WA (2016) From blood–brain barrier to blood–brain interface: new opportunities for CNS drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* 15(4):275-292.
37. Braet F & Wisse E (2002) Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comparative Hepatology* 1(1):1.
38. Maeda H, Nakamura H, & Fang J (2013) The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65(1):71-79.
39. Hashizume H, *et al.* (2000) Openings between Defective Endothelial Cells Explain Tumor Vessel Leakiness. *The American Journal of Pathology* 156(4):1363-1380.

40. Matsumura Y & Maeda H (1986) A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* 46(12 Pt 1):6387-6392.
41. Nakamura Y, Mochida A, Choyke PL, & Kobayashi H (2016) Nanodrug Delivery: Is the Enhanced Permeability and Retention Effect Sufficient for Curing Cancer? *Bioconjug Chem* 27(10):2225-2238.
42. Yuan F, *et al.* (1995) Vascular Permeability in a Human Tumor Xenograft: Molecular Size Dependence and Cutoff Size1. *Cancer Research* 55(17):3752-3756.
43. Yuan F, *et al.* (1996) Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(25):14765-14770.
44. Danquah MK, Zhang XA, & Mahato RI (2011) Extravasation of polymeric nanomedicines across tumor vasculature. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63(8):623-639.
45. Choi KY, Liu G, Lee S, & Chen X (2012) Theranostic nanoplatfoms for simultaneous cancer imaging and therapy: current approaches and future perspectives. *Nanoscale* 4(2):330-342.
46. Sykes EA, *et al.* (2016) Tailoring nanoparticle designs to target cancer based on tumor pathophysiology. *Proc Natl Acad Sci USA* 113(9):E1142-E1151.
47. Carpentier A, *et al.* (2016) Clinical trial of blood-brain barrier disruption by pulsed ultrasound. *SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE* 8(343):343re342-343re342.

48. Potchen EJ, Kinzie J, Curtis C, Siegel BA, & Studer RK (1972) Effect of irradiation on tumor microvascular permeability to macromolecules. *Cancer* 30(3):639-642.
49. Miller MA, *et al.* (2017) Radiation therapy primes tumors for nanotherapeutic delivery via macrophage-mediated vascular bursts. *SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE* 9(392):eaal0225.
50. Deepagan VG, *et al.* (2018) Intracellularly Activatable Nanovasodilators To Enhance Passive Cancer Targeting Regime. *Nano Letters* 18(4):2637-2644.
51. Assistance Publique - Hôpitaux de P (2024) Innovative SonoCloud-9 Device for Blood Brain Barrier Opening in First Line Temozolomide Glioblastoma Patients.
52. CarThera (2021) Safety and Efficacy of Transient Opening of the Blood-brain Barrier (BBB) With the SonoCloud-9.
53. Northwestern U, CarThera, Bristol-Myers S, & Lantheus Medical I (2024) Ultrasound-based Blood-brain Barrier Opening and Albumin-bound Paclitaxel for Recurrent Glioblastoma.
54. Chen F & Cai W (2014) Tumor vasculature targeting: a generally applicable approach for functionalized nanomaterials. *Small* 10(10):1887-1893.
55. Neri D & Bicknell R (2005) Tumour vascular targeting. *Nature Reviews Cancer* 5(6):436-446.
56. Sugahara KN, *et al.* (2010) Coadministration of a Tumor-Penetrating Peptide Enhances the Efficacy of Cancer Drugs. *Science* 328(5981):1031-1035.
57. Wang Y, *et al.* (2017) Tumor-Penetrating Nanoparticles for Enhanced Anticancer Activity of Combined Photodynamic and Hypoxia-Activated Therapy. *ACS Nano* 11(2):2227-2238.

58. Akashi Y, *et al.* (2014) Anticancer effects of gemcitabine are enhanced by co-administered iRGD peptide in murine pancreatic cancer models that overexpressed neuropilin-1. *British Journal of Cancer* 110(6):1481-1487.
59. Padera TP, *et al.* (2004) Cancer cells compress intratumour vessels. *Nature* 427(6976):695-695.
60. Lu D, Wientjes MG, Lu Z, & Au JLS (2007) Tumor Priming Enhances Delivery and Efficacy of Nanomedicines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 322(1):80.
61. Stylianopoulos T, *et al.* (2012) Causes, consequences, and remedies for growth-induced solid stress in murine and human tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(38):15101-15108.
62. Decuzzi P, Pasqualini R, Arap W, & Ferrari M (2009) Intravascular delivery of particulate systems: does geometry really matter? *Pharm Res* 26(1):235-243.
63. Decuzzi P, Pasqualini R, Arap W, & Ferrari M (2008) Intravascular Delivery of Particulate Systems: Does Geometry Really Matter? *Pharmaceutical Research* 26(1):235.
64. Ronnov-Jessen L, Petersen OW, & Bissell MJ (1996) Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiological Reviews* 76(1):69-125.
65. Lu P, Weaver VM, & Werb Z (2012) The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *Journal of Cell Biology* 196(4):395-406.
66. Zhang Z, *et al.* (2018) Rational Design of Nanoparticles with Deep Tumor Penetration for Effective Treatment of Tumor Metastasis. *Advanced Functional Materials* 28(40):1801840.

67. Barua S & Mitragotri S (2014) Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: A review of current status and future prospects. *Nano Today* 9(2):223-243.
68. Chauhan VP, *et al.* (2012) Normalization of tumour blood vessels improves the delivery of nanomedicines in a size-dependent manner. *Nature Nanotechnology* 7(6):383-388.
69. Diop-Frimpong B, Chauhan VP, Krane S, Boucher Y, & Jain RK (2011) Losartan inhibits collagen I synthesis and improves the distribution and efficacy of nanotherapeutics in tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(7):2909-2914.
70. Rennick JJ, Johnston APR, & Parton RG (2021) Key principles and methods for studying the endocytosis of biological and nanoparticle therapeutics. *Nature Nanotechnology* 16(3):266-276.
71. Behzadi S, *et al.* (2017) Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chemical Society Reviews* 46(14):4218-4244.
72. Fu X, *et al.* (2020) Precise design strategies of nanomedicine for improving cancer therapeutic efficacy using subcellular targeting. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5(1):262.
73. Donahue ND, Acar H, & Wilhelm S (2019) Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* 143:68-96.
74. Aderem A & Underhill DM (1999) MECHANISMS OF PHAGOCYTOSIS IN MACROPHAGES. *Annual Review of Immunology* 17(1):593-623.
75. Chen F, *et al.* (2017) Complement proteins bind to nanoparticle protein corona and undergo dynamic exchange in vivo. *Nature Nanotechnology* 12(4):387-393.

76. Gratton Stephanie EA, *et al.* (2008) The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(33):11613-11618.
77. Lim JP & Gleeson PA (2011) Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunology & Cell Biology* 89(8):836-843.
78. Meier O, *et al.* (2002) Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *Journal of Cell Biology* 158(6):1119-1131.
79. Wadia JS, Stan RV, & Dowdy SF (2004) Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nature Medicine* 10(3):310-315.
80. Saxena R, *et al.* (2010) Genetic variation in GIPR influences the glucose and insulin responses to an oral glucose challenge. *Nat Genet* 42(2):142-148.
81. Le Roy C & Wrana JL (2005) Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(2):112-126.
82. Ehrlich M, *et al.* (2004) Endocytosis by Random Initiation and Stabilization of Clathrin-Coated Pits. *Cell* 118(5):591-605.
83. Gould GW & Lippincott-Schwartz J (2009) New roles for endosomes: from vesicular carriers to multi-purpose platforms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(4):287-292.
84. Anderson RGW (1998) THE CAVEOLAE MEMBRANE SYSTEM. *Annual Review of Biochemistry* 67(1):199-225.
85. Yameen B, *et al.* (2014) Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting. *Journal of Controlled Release* 190:485-499.

86. Oh P, *et al.* (2007) Live dynamic imaging of caveolae pumping targeted antibody rapidly and specifically across endothelium in the lung. *Nature Biotechnology* 25(3):327-337.
87. Mayor S & Pagano RE (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8(8):603-612.
88. Lu Y & Low PS (2012) Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64:342-352.
89. Hobo W, *et al.* (2013) Improving dendritic cell vaccine immunogenicity by silencing PD-1 ligands using siRNA-lipid nanoparticles combined with antigen mRNA electroporation. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 62(2):285-297.
90. Huotari J & Helenius A (2011) Endosome maturation. *The EMBO Journal* 30(17):3481-3500.
91. Chou LYT, Ming K, & Chan WCW (2011) Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles. *Chemical Society Reviews* 40(1):233-245.
92. Hayat MJAC, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, & Aging. Academic Press SD (2016) Chapter 1-Overview of Autophagy.1-71.
93. Anding AL & Baehrecke EH (2017) Cleaning House: Selective Autophagy of Organelles. *Developmental Cell* 41(1):10-22.
94. Raj EN, Lin Y-W, Chen C-H, Liu K-K, & Chao J-I (2020) Selective Autophagy Pathway of Nanoparticles and Nanodrugs: Drug Delivery and Pathophysiological Effects. *Advanced Therapeutics* 3(9):2000085.
95. Talcott B & Moore MS (1999) Getting across the nuclear pore complex. *Trends in Cell Biology* 9(8):312-318.

96. Symens N, *et al.* (2012) Intracellular partitioning of cell organelles and extraneous nanoparticles during mitosis. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64(1):78-94.
97. Dean DA (1997) Import of Plasmid DNA into the Nucleus Is Sequence Specific. *Experimental Cell Research* 230(2):293-302.
98. Junttila MR & de Sauvage FJ (2013) Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* 501(7467):346-354.
99. Hanahan D & Weinberg Robert A (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144(5):646-674.
100. Sieber S, *et al.* (2017) Zebrafish as an early stage screening tool to study the systemic circulation of nanoparticulate drug delivery systems in vivo. *Journal of Controlled Release* 264(Supplement C):180-191.
101. Allen TM (2002) Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2(10):750-763.
102. Dai Q, *et al.* (2018) Particle Targeting in Complex Biological Media. *Adv Healthc Mater* 7(1):1700575.
103. Pearce AK & O'Reilly RK (2019) Insights into Active Targeting of Nanoparticles in Drug Delivery: Advances in Clinical Studies and Design Considerations for Cancer Nanomedicine. *Bioconjug Chem* 30(9):2300-2311.
104. Rosenblum D, Joshi N, Tao W, Karp JM, & Peer D (2018) Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics. *Nature Communications* 9(1):1410.
105. Byrne JD, Betancourt T, & Brannon-Peppas L (2008) Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60(15):1615-1626.

106. Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, & Farokhzad OC (2014) Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced Drug Delivery Reviews* 66:2-25.
107. Xia Q-s, Zhu T, Jiang Z-y, Ding H-m, & Ma Y-q (2020) Enhancing the targeting ability of nanoparticles via protected copolymers. *Nanoscale* 12(14):7804-7813.
108. Chen C-hB, *et al.* (2008) Aptamer-based endocytosis of a lysosomal enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(41):15908-15913.
109. Wilner SE, *et al.* (2012) An RNA Alternative to Human Transferrin: A New Tool for Targeting Human Cells. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 1:e21.
110. Cheng Z, Al Zaki A, Hui JZ, Muzykantov VR, & Tsourkas A (2012) Multifunctional Nanoparticles: Cost Versus Benefit of Adding Targeting and Imaging Capabilities. *Science* 338(6109):903-910.
111. Gatter KC, Brown G, Trowbridge IS, Woolston RE, & Mason DY (1983) Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance. *Journal of Clinical pathology - BMJ journals* 36(5):539-545.
112. Prost AC, *et al.* (1998) Differential transferrin receptor density in human colorectal cancer: A potential probe for diagnosis and therapy. *International journal of oncology* 13(4):871-875.
113. Yoshida T, Lai TC, Kwon GS, & Sako K (2013) pH- and ion-sensitive polymers for drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 10(11):1497-1513.
114. Zhang K, Zhu X, Jia F, Auyeung E, & Mirkin CA (2013) Temperature-Activated Nucleic Acid Nanostructures. *Journal of the American Chemical Society* 135(38):14102-14105.

115. Kitov PI & Bundle DR (2003) On the Nature of the Multivalency Effect: A Thermodynamic Model. *Journal of the American Chemical Society* 125(52):16271-16284.
116. Stuart MAC, *et al.* (2010) Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials. *Nature Materials* 9(2):101-113.
117. Mastrotto F, *et al.* (2011) Polymer control of ligand display on gold nanoparticles for multimodal switchable cell targeting. *Chemical Communications* 47(35):9846-9848.
118. Zhu L, Kate P, & Torchilin VP (2012) Matrix Metalloprotease 2-Responsive Multifunctional Liposomal Nanocarrier for Enhanced Tumor Targeting. *ACS Nano* 6(4):3491-3498.
119. Sethuraman VA & Bae YH (2007) TAT peptide-based micelle system for potential active targeting of anti-cancer agents to acidic solid tumors. *Journal of Controlled Release* 118(2):216-224.
120. Lee ES, *et al.* (2008) Super pH-sensitive multifunctional polymeric micelle for tumor pHe specific TAT exposure and multidrug resistance. *Journal of Controlled Release* 129(3):228-236.
121. Koren E, Apte A, Jani A, & Torchilin VP (2012) Multifunctional PEGylated 2C5-immunoliposomes containing pH-sensitive bonds and TAT peptide for enhanced tumor cell internalization and cytotoxicity. *Journal of Controlled Release* 160(2):264-273.
122. Cajot S, *et al.* (2012) Smart nanocarriers for pH-triggered targeting and release of hydrophobic drugs. *Acta Biomater* 8(12):4215-4223.

123. Brazzale C, *et al.* (2017) Control of targeting ligand display by pH-responsive polymers on gold nanoparticles mediates selective entry into cancer cells. *Nanoscale* 9(31):11137-11147.
124. Van Butsele K, *et al.* (2011) Stealth properties of poly(ethylene oxide)-based triblock copolymer micelles: A prerequisite for a pH-triggered targeting system. *Acta Biomater* 7(10):3700-3707.
125. Lee ES, Na K, & Bae YH (2005) Super pH-Sensitive Multifunctional Polymeric Micelle. *Nano Letters* 5(2):325-329.
126. Kim C, Lee Y, Kim JS, Jeong JH, & Park TG (2010) Thermally triggered cellular uptake of quantum dots immobilized with poly(N-isopropylacrylamide) and cell penetrating peptide. *Langmuir* 26(18):14965-14969.
127. Sethuraman VA, Na K, & Bae YH (2006) pH-Responsive Sulfonamide/PEI System for Tumor Specific Gene Delivery: An in Vitro Study. *Biomacromolecules* 7(1):64-70.
128. Martinez-Veracoechea FJ & Frenkel D (2011) Designing super selectivity in multivalent nano-particle binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108(27):10963-10968.
129. Mammen M, Choi S-K, & Whitesides GM (1998) Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37(20):2754-2794.
130. Li P, *et al.* (2012) Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins. *Nature* 483(7389):336-340.
131. Sriram SM, Banerjee R, Kane RS, & Kwon YT (2009) Multivalency-Assisted Control of Intracellular Signaling Pathways: Application for Ubiquitin- Dependent N-End Rule Pathway. *Chemistry & Biology* 16(2):121-131.

132. Huskens J, Prins LJ, Haag R, & Ravoo BJ (2018) *Multivalency: concepts, research and applications* (John Wiley & Sons).
133. Woythe L, Tito NB, & Albertazzi L (2021) A quantitative view on multivalent nanomedicine targeting. *Advanced Drug Delivery Reviews* 169:1-21.
134. Carlson CB, Mowery P, Owen RM, Dykhuizen EC, & Kiessling LL (2007) Selective Tumor Cell Targeting Using Low-Affinity, Multivalent Interactions. *ACS Chemical Biology* 2(2):119-127.
135. Tjandra KC & Thordarson P (2019) Multivalency in Drug Delivery—When Is It Too Much of a Good Thing? *Bioconjug Chem* 30(3):503-514.
136. Dietz MS, Fricke F, Krüger CL, Niemann HH, & Heilemann M (2014) Receptor–Ligand Interactions: Binding Affinities Studied by Single-Molecule and Super-Resolution Microscopy on Intact Cells. *ChemPhysChem* 15(4):671-676.
137. Merkel R, Nassoy P, Leung A, Ritchie K, & Evans E (1999) Energy landscapes of receptor–ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature* 397(6714):50-53.
138. Sundaram B, C G, & S S (1986) Antibacterial activity of xanthenes from *Calophyllum inophyllum* L. *Arogya Journal of Health Science* XII:48-49.
139. Tian X, Angioletti-Uberti S, & Battaglia G (2020) On the design of precision nanomedicines. *Sci. Adv.* 6(4):eaat0919.
140. Wang S & Dormidontova EE (2012) Selectivity of ligand-receptor interactions between nanoparticle and cell surfaces. *Phys Rev Lett* 109(23):238102.
141. Curk T & Tito NB (2020) First-order 'hyper-selective' binding transition of multivalent particles under force. *J. Phys.: Condens. Matter* 32(214002).

142. Smith SA, Selby LI, Johnston APR, & Such GK (2019) The Endosomal Escape of Nanoparticles: Toward More Efficient Cellular Delivery. *Bioconjug Chem* 30(2):263-272.
143. Varkouhi AK, Scholte M, Storm G, & Haisma HJ (2011) Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *Journal of Controlled Release* 151(3):220-228.
144. Ma D (2014) Enhancing endosomal escape for nanoparticle mediated siRNA delivery. *Nanoscale* 6(12):6415-6425.
145. Degors IMS, Wang C, Rehman ZU, & Zuhorn IS (2019) Carriers Break Barriers in Drug Delivery: Endocytosis and Endosomal Escape of Gene Delivery Vectors. *Accounts of Chemical Research* 52(7):1750-1760.
146. Vermeulen LMP, De Smedt SC, Remaut K, & Braeckmans K (2018) The proton sponge hypothesis: Fable or fact? *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 129:184-190.
147. Zelphati O & Szoka FC, Jr. (1996) Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(21):11493-11498.
148. Bus T, Traeger A, & Schubert US (2018) The great escape: how cationic polyplexes overcome the endosomal barrier. *J Mater Chem B* 6(43):6904-6918.
149. Hou X, Zaks T, Langer R, & Dong Y (2021) Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nature Reviews Materials* 6(12):1078-1094.
150. Adams D, *et al.* (2018) Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med* 379(1):11-21.
151. Polack FP, *et al.* (2020) Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *New England Journal of Medicine* 383(27):2603-2615.

152. Baden LR, *et al.* (2020) Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *New England Journal of Medicine* 384(5):403-416.
153. Eygeris Y, Gupta M, Kim J, & Sahay G (2022) Chemistry of Lipid Nanoparticles for RNA Delivery. *Accounts of Chemical Research* 55(1):2-12.
154. Kim J, Eygeris Y, Gupta M, & Sahay G (2021) Self-assembled mRNA vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews* 170:83-112.
155. Akinc A, *et al.* (2019) The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. *Nature Nanotechnology* 14(12):1084-1087.
156. Viricel W, *et al.* (2017) Cationic switchable lipids: pH-triggered molecular switch for siRNA delivery. *Nanoscale* 9(1):31-36.
157. Viricel W, Mbarek A, & Leblond J (2015) Switchable Lipids: Conformational Change for Fast pH-Triggered Cytoplasmic Delivery. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54(43):12743-12747.
158. Tabatabaei SN, *et al.* (2019) Co-delivery of miR-181a and melphalan by lipid nanoparticles for treatment of seeded retinoblastoma. *Journal of Controlled Release* 298:177-185.
159. Passos Gibson V, *et al.* (2020) Survivin silencing improved the cytotoxicity of carboplatin and melphalan in Y79 and primary retinoblastoma cells. *International Journal of Pharmaceutics* 589:119824.
160. Viricel W (2016) Nanoparticules lipidiques pH-sensibles basées sur une bascule moléculaire pour la délivrance intracytoplasmique de siRNA. Doctorat Doctorat Thesis (Université de Montréal, Montréal).

161. Kulkarni JA, *et al.* (2018) On the Formation and Morphology of Lipid Nanoparticles Containing Ionizable Cationic Lipids and siRNA. *ACS Nano* 12(5):4787-4795.
162. Wittrup A, *et al.* (2015) Visualizing lipid-formulated siRNA release from endosomes and target gene knockdown. *Nature Biotechnology* 33(8):870-876.
163. Gilleron J, *et al.* (2013) Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape. *Nature Biotechnology* 31(7):638-646.
164. Rehman Zu, Hoekstra D, & Zuhorn IS (2013) Mechanism of Polyplex- and Lipoplex-Mediated Delivery of Nucleic Acids: Real-Time Visualization of Transient Membrane Destabilization without Endosomal Lysis. *ACS Nano* 7(5):3767-3777.
165. Maugeri M, *et al.* (2019) Linkage between endosomal escape of LNP-mRNA and loading into EVs for transport to other cells. *Nature Communications* 10(1):4333.
166. Sahay G, *et al.* (2013) Efficiency of siRNA delivery by lipid nanoparticles is limited by endocytic recycling. *Nature Biotechnology* 31(7):653-658.
167. Lu JJ, Langer R, & Chen J (2009) A Novel Mechanism Is Involved in Cationic Lipid-Mediated Functional siRNA Delivery. *Molecular Pharmaceutics* 6(3):763-771.
168. Hoshino Y, Lee H, & Miura Y (2014) Interaction between synthetic particles and biomacromolecules: fundamental study of nonspecific interaction and design of nanoparticles that recognize target molecules. *Polymer Journal* 46(9):537-545.
169. Alkilany AM, *et al.* (2019) Ligand density on nanoparticles: A parameter with critical impact on nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* 143:22-36.
170. Di Iorio D & Huskens J (2020) Surface Modification with Control over Ligand Density for the Study of Multivalent Biological Systems. 9(1):53-66.

171. Lou J, Zhang X, & Best MD (2019) Lipid Switches: Stimuli-Responsive Liposomes through Conformational Isomerism Driven by Molecular Recognition. *Chemistry – A European Journal* 25(1):20-25.
172. Israelachvili JN, Mitchell DJ, & Ninham BW (1976) Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics* 72(0):1525-1568.
173. Kiessling LL & Lamanna AC (2003) Multivalency in Biological Systems. *Chemical Probes in Biology*, ed Schneider MP (Springer Netherlands), pp 345-357.
174. Joshi A, Vance D, Rai P, Thiyagarajan A, & Kane RS (2008) The Design of Polyvalent Therapeutics. *Chemistry – A European Journal* 14(26):7738-7747.
175. Licata NA & Tkachenko AV (2008) Kinetic Limitations of Cooperativity-Based Drug Delivery Systems. *Physical Review Letters* 100(15):158102.
176. Scheepers MRW, van IJzendoorn LJ, & Prins MWJ (2020) Multivalent weak interactions enhance selectivity of interparticle binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117(37):22690-22697.
177. Magdalena Estirado E, Aleman Garcia MA, Schill J, & Brunsveld L (2019) Multivalent Ultrasensitive Interfacing of Supramolecular 1D Nanoplatfoms. *Journal of the American Chemical Society* 141(45):18030-18037.
178. Dubacheva GV, *et al.* (2014) Superselective Targeting Using Multivalent Polymers. *Journal of the American Chemical Society* 136(5):1722-1725.
179. Wang S & Dormidontova EE (2010) Nanoparticle Design Optimization for Enhanced Targeting: Monte Carlo Simulations. *Biomacromolecules* 11(7):1785-1795.

180. Wang S & Dormidontova EE (2011) Nanoparticle targeting using multivalent ligands: computer modeling. *Soft Matter* 7(9):4435-4445.
181. Dubacheva GV, Curk T, Auzély-Velty R, Frenkel D, & Richter RP (2015) Designing multivalent probes for tunable superselective targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112(18):5579-5584.
182. Liu M, *et al.* (2020) Combinatorial entropy behaviour leads to range selective binding in ligand-receptor interactions. *Nature Communications* 11(1):4836.
183. Albertazzi L, *et al.* (2013) Spatiotemporal control and superselectivity in supramolecular polymers using multivalency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110(30):12203-12208.
184. Angioletti-Uberti S (2017) Theory, simulations and the design of functionalized nanoparticles for biomedical applications: A Soft Matter Perspective. *npj Computational Materials* 3(1):48.
185. Daniels TR, *et al.* (2012) The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1820(3):291-317.
186. Porciani D, *et al.* (2014) Two interconvertible folds modulate the activity of a DNA aptamer against transferrin receptor. *Mol Ther Nucleic Acids.* 3:e144.
187. Chen W, Zhang S, Yu Y, Zhang H, & He Q (2016) Structural-Engineering Rationales of Gold Nanoparticles for Cancer Theranostics. *Advanced Materials* 28(39):8567-8585.
188. Srisombat L, Jamison AC, & Lee TR (2011) Stability: A key issue for self-assembled monolayers on gold as thin-film coatings and nanoparticle protectants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 390(1):1-19.

189. Walkey CD, Olsen JB, Guo H, Emili A, & Chan WCW (2012) Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake. *Journal of the American Chemical Society* 134(4):2139-2147.
190. Stewart A, Zheng S, McCourt MR, & Bell SEJ (2012) Controlling Assembly of Mixed Thiol Monolayers on Silver Nanoparticles to Tune Their Surface Properties. *ACS Nano* 6(5):3718-3726.
191. Jung LS, Campbell CT, Chinowsky TM, Mar MN, & Yee SS (1998) Quantitative Interpretation of the Response of Surface Plasmon Resonance Sensors to Adsorbed Films. *Langmuir* 14(19):5636-5648.
192. Zhang M-Z, Yu R-N, Chen J, Ma Z-Y, & Zhao Y-D (2012) Targeted quantum dots fluorescence probes functionalized with aptamer and peptide for transferrin receptor on tumor cells. *Nanotechnology* 23(48):485104.
193. Zaki A, Dave N, & Liu J (2012) Amplifying the Macromolecular Crowding Effect Using Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* 134(1):35-38.
194. Curk T, Dobnikar J, & Frenkel D (2018) Design Principles for Super Selectivity using Multivalent Interactions. *Multivalency*), pp 75-101.
195. Hunter CA & Anderson HL (2009) What is Cooperativity? 48(41):7488-7499.
196. Leunissen ME, Dreyfus R, Sha R, Seeman NC, & Chaikin PM (2010) Quantitative Study of the Association Thermodynamics and Kinetics of DNA-Coated Particles for Different Functionalization Schemes. *Journal of the American Chemical Society* 132(6):1903-1913.
197. Kuo JC-H, Gandhi JG, Zia RN, & Paszek MJ (2018) Physical biology of the cancer cell glycocalyx. *Nature Physics* 14(7):658-669.

198. Zimmerberg J & Kozlov MM (2006) How proteins produce cellular membrane curvature. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7(1):9-19.
199. Mognetti BM, Cicuta P, & Di Michele L (2019) Programmable interactions with biomimetic DNA linkers at fluid membranes and interfaces. *Rep Prog Phys* 82(11):116601.
200. Angioletti-Uberti S, Varilly P, Mognetti BM, Tkachenko AV, & Frenkel D (2013) Communication: A simple analytical formula for the free energy of ligand–receptor-mediated interactions. 138(2):021102.
201. Varilly P, Angioletti-Uberti S, Mognetti BM, & Frenkel D (2012) A general theory of DNA-mediated and other valence-limited colloidal interactions. 137(9):094108.
202. Tito NB, Angioletti-Uberti S, & Frenkel D (2016) Communication: Simple approach for calculating the binding free energy of a multivalent particle. 144(16):161101.
203. Bachmann SJ, *et al.* (2016) Melting transition in lipid vesicles functionalised by mobile DNA linkers. *Soft Matter* 12(37):7804-7817.
204. Halperin A (1999) Polymer Brushes that Resist Adsorption of Model Proteins: Design Parameters. *Langmuir* 15(7):2525-2533.
205. Komura S & Safran SA (2001) Scaling theory of mixed amphiphilic monolayers. *The European Physical Journal E* 5(3):337-351.
206. de Gennes PG (1980) Conformations of Polymers Attached to an Interface. *Macromolecules* 13(5):1069-1075.
207. Hansen PL, Cohen JA, Podgornik R, & Parsegian VA (2003) Osmotic Properties of Poly(Ethylene Glycols): Quantitative Features of Brush and Bulk Scaling Laws. *Biophysical Journal* 84(1):350-355.

208. Ji X, *et al.* (2007) Size Control of Gold Nanocrystals in Citrate Reduction: The Third Role of Citrate. *Journal of the American Chemical Society* 129(45):13939-13948.
209. Zhao SS, *et al.* (2015) Miniature multi-channel SPR instrument for methotrexate monitoring in clinical samples. *Biosensors and Bioelectronics* 64:664-670.
210. Smith AM, *et al.* (2015) Quantitative Analysis of Thiolated Ligand Exchange on Gold Nanoparticles Monitored by ¹H NMR Spectroscopy. *Analytical Chemistry* 87(5):2771-2778.
211. Bolduc OR, Live LS, & Masson J-F (2009) High-resolution surface plasmon resonance sensors based on a dove prism. *Talanta* 77(5):1680-1687.
212. Homola J (2008) Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species. *Chemical Reviews* 108(2):462-493.
213. Couture M, Zhao SS, & Masson J-F (2013) Modern surface plasmon resonance for bioanalytics and biophysics. *Physical Chemistry Chemical Physics* 15(27):11190-11216.
214. Liu X, Atwater M, Wang J, & Huo Q (2007) Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 58(1):3-7.
215. Bolduc OR & Masson J-F (2008) Monolayers of 3-Mercaptopropyl-amino Acid to Reduce the Nonspecific Adsorption of Serum Proteins on the Surface of Biosensors. *Langmuir* 24(20):12085-12091.
216. Bagheri M, Kiani F, Koohyar F, Khang NT, & Zabihi F (2020) Measurement of refractive index and viscosity for aqueous solution of sodium acetate, sodium carbonate, trisodium citrate, (glycerol + sodium acetate), (glycerol + sodium carbonate), and

- (glycerol + trisodium citrate) at $T = 293.15$ to 303.15 K and atmospheric pressure.
Journal of Molecular Liquids 309:113109.
217. Fischer H, Polikarpov I, & Craievich AF (2004) Average protein density is a molecular-weight-dependent function. *Protein Sci* 13(10):2825-2828.
218. McMeekin TL, Groves ML, & Hipp NJ (1964) Refractive Indices of Amino Acids, Proteins, and Related Substances. *Amino Acids and Serum Proteins*, Advances in Chemistry, (AMERICAN CHEMICAL SOCIETY), Vol 44, pp 54-66.
219. Consortium TU (2020) UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research* 49(D1):D480-D489.
220. Fang J, Du X, Ma Q, & Zhu D-M (2018) Specific responses of surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance techniques to the mass of adsorbates at solid-liquid interfaces. *Sensors and Actuators B: Chemical* 277:241-249.
221. Martinez-Veracoechea FJ & Leunissen ME (2013) The entropic impact of tethering, multivalency and dynamic recruitment in systems with specific binding groups. *Soft Matter* 9(12):3213-3219.
222. Varilly P, Angioletti-Uberti S, Mognetti BM, & Frenkel D (2012) A general theory of DNA-mediated and other valence-limited colloidal interactions. *The Journal of Chemical Physics* 137(9):094108.
223. Dannenberg F, *et al.* (2015) Modelling DNA origami self-assembly at the domain level. *The Journal of Chemical Physics* 143(16):165102.
224. Guo S, Lad N, Ray C, & Akhremitchev BB (2009) Association kinetics from single molecule force spectroscopy measurements. *Biophys J* 96(8):3412-3422.

225. Macdonald J, Houghton P, Xiang D, Duan W, & Shigdar S (2016) Truncation and Mutation of a Transferrin Receptor Aptamer Enhances Binding Affinity. *Nucleic Acid Ther* 26(6):348-354.
226. Gruber AR, Lorenz R, Bernhart SH, Neuböck R, & Hofacker IL (2008) The Vienna RNA Websuite. *Nucleic Acids Research* 36(suppl_2):W70-W74.
227. Gupta V, Sengupta M, Prakash J, & Tripathy BC (2017) Drug Targeting and Delivery. In: Basic and Applied Aspects of Biotechnology. *Basic and Applied Aspects of Biotechnology*, (Springer, Singapore), pp 279-303.
228. Peer D, *et al.* (2007) Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology* 2:751.
229. Loomis K, McNeeley K, & Bellamkonda RV (2011) Nanoparticles with targeting, triggered release, and imaging functionality for cancer applications. *Soft Matter* 7(3):839-856.
230. Cai W, Gambhir SS, & Chen X (2005) Multimodality tumor imaging targeting integrin $\alpha\beta 3$. *BioTechniques* 39(6S):S14-S25.
231. Pelton R (2010) Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) is never hydrophobic. *Journal of Colloid and Interface Science* 348(2):673-674.
232. Dundas CM, Demonte D, & Park S (2013) Streptavidin–biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(21):9343-9353.
233. Stranick SJ, Parikh AN, Tao YT, Allara DL, & Weiss PS (1994) Phase Separation of Mixed-Composition Self-Assembled Monolayers into Nanometer Scale Molecular Domains. *The Journal of Physical Chemistry* 98(31):7636-7646.

234. Kolberg A, *et al.* (2019) Opposing Temperature Dependence of the Stretching Response of Single PEG and PNiPAM Polymers. *Journal of the American Chemical Society* 141(29):11603-11613.
235. Li M, *et al.* (2021) Brush Conformation of Polyethylene Glycol Determines the Stealth Effect of Nanocarriers in the Low Protein Adsorption Regime. *Nano Letters* 21(4):1591-1598.
236. Ahmad A, Khan JM, & Haque S (2019) Strategies in the design of endosomolytic agents for facilitating endosomal escape in nanoparticles. *Biochimie* 160:61-75.
237. Sebastiani F, *et al.* (2021) Apolipoprotein E Binding Drives Structural and Compositional Rearrangement of mRNA-Containing Lipid Nanoparticles. *ACS Nano* 15(4):6709-6722.
238. Kulkarni JA, Witzigmann D, Leung J, Tam YYC, & Cullis PR (2019) On the role of helper lipids in lipid nanoparticle formulations of siRNA. *Nanoscale* 11(45):21733-21739.
239. Carrasco MJ, *et al.* (2021) Ionization and structural properties of mRNA lipid nanoparticles influence expression in intramuscular and intravascular administration. *Communications Biology* 4(1):956.
240. Leblond J, Gao H, Petitjean A, & Leroux J-C (2010) pH-Responsive Molecular Tweezers. *Journal of the American Chemical Society* 132(25):8544-8545.
241. Passos Gibson V, Fauquignon M, Ibarboure E, Leblond Chain J, & Le Meins J-F (2020) Switchable Lipid Provides pH-Sensitive Properties to Lipid and Hybrid Polymer/Lipid Membranes. *Polymers (Basel)* 12(3):637.
242. Monteiro LOF, *et al.* (2018) Paclitaxel-Loaded pH-Sensitive Liposome: New Insights on Structural and Physicochemical Characterization. *Langmuir* 34(20):5728-5737.

243. Samoshina NM, *et al.* (2011) Fliposomes: pH-Sensitive Liposomes Containing a trans-2-morpholinocyclohexanol-Based Lipid That Performs a Conformational Flip and Triggers an Instant Cargo Release in Acidic Medium. *Pharmaceutics* 3(3):379-405.
244. Khomutov GB, *et al.* (2017) Langmuir monolayers and Langmuir-Blodgett films of pH-sensitive lipid. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 532:150-154.
245. Rayamajhi S, *et al.* (2020) pH-responsive cationic liposome for endosomal escape mediated drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 188:110804.
246. Trujillo C & Sánchez-Sanz G (2016) A Study of π - π Stacking Interactions and Aromaticity in Polycyclic Aromatic Hydrocarbon/Nucleobase Complexes. *ChemPhysChem* 17(3):395-405.
247. Couteau O & Roebben G (2011) Measurement of the size of spherical nanoparticles by means of atomic force microscopy. *Measurement Science and Technology* 22(6):065101.
248. Eaton P, *et al.* (2017) A direct comparison of experimental methods to measure dimensions of synthetic nanoparticles. *Ultramicroscopy* 182:179-190.
249. Steinkühler J, De Tillieux P, Knorr RL, Lipowsky R, & Dimova R (2018) Charged giant unilamellar vesicles prepared by electroformation exhibit nanotubes and transbilayer lipid asymmetry. *Scientific Reports* 8(1):11838.
250. Beck JG, Mathieu D, Loudet C, Buchoux S, & Dufourc EJ (2007) Plant sterols in "rafts": a better way to regulate membrane thermal shocks. *Faseb Journal* 21(8):1714-1723.
251. Davis JH, Clair JJ, & Juhasz J (2009) Phase Equilibria in DOPC/DPPC-d(62)/Cholesterol Mixtures. *Biophysical Journal* 96(2):521-539.

252. Burnett LJ & Muller BH (1971) DEUTERON QUADRUPOLE COUPLING CONSTANTS IN 3 SOLID DEUTERATED PARAFFIN HYDROCARBONS-C₂D₆, C₄D₁₀, C₆D₁₄. *J. Chem. Phys.* 55(12):5829-&.
253. Europe ONEotCo (2005) *Validation of Analytical ProceduresdPA/PH/OMCL (05) 47 DEF, ((ICH) ICoH)*.
254. Dufourc EJ (2008) Sterols and membrane dynamics. *Journal of chemical biology* 1(1-4):63-77.
255. Dufourc EJ, Parish EJ, Chitrakorn S, & Smith ICP (1984) STRUCTURAL AND DYNAMICAL DETAILS OF CHOLESTEROL LIPID INTERACTION AS REVEALED BY DEUTERIUM NMR. *Biochemistry* 23(25):6062-6071.
256. Chen W, Dusa F, Witos J, Ruokonen S-K, & Wiedmer SK (2018) Determination of the Main Phase Transition Temperature of Phospholipids by Nanoplasmonic Sensing. *Scientific Reports* 8.
257. Mabrey S & Sturtevant JM (1976) INVESTIGATION OF PHASE-TRANSITIONS OF LIPIDS AND LIPID MIXTURES BY HIGH SENSITIVITY DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73(11):3862-3866.
258. Bryant G, *et al.* (2019) Effect of deuteration on the phase behaviour and structure of lamellar phases of phosphatidylcholines - Deuterated lipids as proxies for the physical properties of native bilayers. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 177:196-203.
259. Marsh D (2010) Liquid-ordered phases induced by cholesterol: A compendium of binary phase diagrams. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1798(3):688-699.

260. Almeida PFF (2009) Thermodynamics of lipid interactions in complex bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1788(1):72-85.
261. Rowe RC (2009) *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (Pharmaceutical Press).
262. Petty MC (1996) *Langmuir-Blodgett Films: An Introduction* (Cambridge University Press, Cambridge).
263. Pétriat F, Roux E, Leroux JC, & Giasson S (2004) Study of Molecular Interactions between a Phospholipidic Layer and a pH-Sensitive Polymer Using the Langmuir Balance Technique. *Langmuir* 20(4):1393-1400.
264. Levental I, Janmey PA, & Cēbers A (2008) Electrostatic contribution to the surface pressure of charged monolayers containing polyphosphoinositides. *Biophys J* 95(3):1199-1205.
265. Girard-Egrot AP & Blum LJ (2007) Langmuir-Blodgett Technique for Synthesis of Biomimetic Lipid Membranes. *Nanobiotechnology of Biomimetic Membranes*, ed Martin DK (Springer US, Boston, MA), pp 23-74.
266. Roux E, Lafleur M, Lataste É, Moreau P, & Leroux J-C (2003) On the Characterization of pH-sensitive Liposome/Polymer Complexes. *Biomacromolecules* 4(2):240-248.
267. El Jastimi R, Edwards K, & Lafleur M (1999) Characterization of permeability and morphological perturbations induced by nisin on phosphatidylcholine membranes. *Biophysical journal* 77(2):842-852.
268. Viricel W, Mbarek A, & Leblond J (2015) Switchable Lipids: Conformational Change for Fast pH-Triggered Cytoplasmic Delivery. *Angew Chem Int Ed Engl* 54(43):12743-12747.

269. Gaines GL (1966) *Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces* (Interscience Publishers,, New York).
270. Marsh D (1996) Lateral pressure in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 1286(3):183-223.
271. Demel RA, Geurts van Kessel WSM, Zwaal RFA, Roelofsen B, & van Deenen LLM (1975) Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 406(1):97-107.
272. Davis JH, Jeffrey KR, Bloom M, Valic MI, & Higgs TP (1976) QUADRUPOLAR ECHO DEUTERON MAGNETIC-RESONANCE SPECTROSCOPY IN ORDERED HYDROCARBON CHAINS. *Chemical Physics Letters* 42(2):390-394.
273. Morris GA & Freeman R (1979) ENHANCEMENT OF NUCLEAR MAGNETIC-RESONANCE SIGNALS BY POLARIZATION TRANSFER. *J. Am. Chem. Soc.* 101(3):760-762.
274. Nowacka A, Bongartz NA, Ollila OHS, Nylander T, & Topgaard D (2013) Signal intensities in H-1-C-13 CP and INEPT MAS NMR of liquid crystals. *J. Magn. Reson.* 230:165-175.
275. Pines A, Waugh JS, & Gibby MG (1972) PROTON-ENHANCED NUCLEAR INDUCTION SPECTROSCOPY - METHOD FOR HIGH-RESOLUTION NMR OF DILUTE SPINS IN SOLIDS. *J. Chem. Phys.* 56(4):1776-&.
276. Beck JG, Mathieu D, Loudet C, Buchoux S, & Dufourc EJ (2007) Plant sterols in “rafts”: a better way to regulate membrane thermal shocks. *The FASEB Journal* 21(8):1714-1723.

277. Chen Y-S, Hung Y-C, Liao I, & Huang GS (2009) Assessment of the In Vivo Toxicity of Gold Nanoparticles. *Nanoscale Res Lett* 4(8):858-864.
278. Sani A, Cao C, & Cui D (2021) Toxicity of gold nanoparticles (AuNPs): A review. *Biochemistry and Biophysics Reports* 26:100991.
279. Cherstvy AG (2007) Electrostatics of DNA Complexes with Cationic Lipid Membranes. *The Journal of Physical Chemistry B* 111(27):7914-7927.
280. Narmani A, *et al.* (2019) Folic acid functionalized nanoparticles as pharmaceutical carriers in drug delivery systems. *Drug Development Research* 80(4):404-424.
281. Kularatne SA & Low PS (2010) Targeting of Nanoparticles: Folate Receptor. *Cancer Nanotechnology: Methods and Protocols*, eds Grobmyer SR & Moudgil BM (Humana Press, Totowa, NJ), pp 249-265.
282. Ha W, *et al.* (2013) Vesicular gold assemblies based on host-guest inclusion and its controllable release of doxorubicin. *Nanotechnology* 24(49):495103.
283. Yu T, *et al.* (2015) Liposome-based mucus-penetrating particles (MPP) for mucosal theranostics: demonstration of diamagnetic chemical exchange saturation transfer (diaCEST) magnetic resonance imaging (MRI). *Nanomedicine* 11(2):401-405.
284. Garcia-Fuentes M, Torres D, Martín-Pastor M, & Alonso MJ (2004) Application of NMR Spectroscopy to the Characterization of PEG-Stabilized Lipid Nanoparticles. *Langmuir* 20(20):8839-8845.
285. Matias R, Ribeiro PRS, Sarraguça MC, & Lopes JA (2014) A UV spectrophotometric method for the determination of folic acid in pharmaceutical tablets and dissolution tests. *Analytical Methods* 6(9):3065-3071.

286. Prime K & Whitesides G (1991) Self-assembled organic monolayers: model systems for studying adsorption of proteins at surfaces. *252(5009):1164-1167*.
287. Rundqvist J, Hoh JH, & Haviland DB (2006) Substrate effects in poly(ethylene glycol) self-assembled monolayers on granular and flame-annealed gold. *Journal of Colloid and Interface Science* 301(1):337-341.
288. Oliverio M, Perotto S, Messina GC, Lovato L, & De Angelis F (2017) Chemical Functionalization of Plasmonic Surface Biosensors: A Tutorial Review on Issues, Strategies, and Costs. *ACS Applied Materials & Interfaces* 9(35):29394-29411.
289. Yu Q, Zhang Y, Wang H, Brash J, & Chen H (2011) Anti-fouling bioactive surfaces. *Acta Biomater* 7(4):1550-1557.
290. Choi SH, Lee JW, & Sim SJ (2005) Enhanced performance of a surface plasmon resonance immunosensor for detecting Ab-GAD antibody based on the modified self-assembled monolayers. *Biosens Bioelectron* 21(2):378-383.
291. Lee JW, Sim SJ, Cho SM, & Lee J (2005) Characterization of a self-assembled monolayer of thiol on a gold surface and the fabrication of a biosensor chip based on surface plasmon resonance for detecting anti-GAD antibody. *Biosensors and Bioelectronics* 20(7):1422-1427.
292. Jans K, *et al.* (2008) Stability of Mixed PEO–Thiol SAMs for Biosensing Applications. *Langmuir* 24(8):3949-3954.
293. Islam N, Gurgel PV, Rojas OJ, & Carbonell RG (2014) Effects of Composition of Oligo(ethylene glycol)-Based Mixed Monolayers on Peptide Grafting and Human Immunoglobulin Detection. *The Journal of Physical Chemistry C* 118(10):5361-5373.

294. O'Brien EP, Brooks BR, & Thirumalai D (2012) Effects of pH on Proteins: Predictions for Ensemble and Single-Molecule Pulling Experiments. *Journal of the American Chemical Society* 134(2):979-987.
295. Thakur G, *et al.* (2014) Investigation of pH-Induced Protein Conformation Changes by Nanomechanical Deflection. *Langmuir* 30(8):2109-2116.
296. Di Iorio D & Huskens J (2020) Surface Modification with Control over Ligand Density for the Study of Multivalent Biological Systems. *ChemistryOpen* 9(1):53-66.
297. Ta H, *et al.* (2015) Mapping molecules in scanning far-field fluorescence nanoscopy. *Nature Communications* 6(1):7977.
298. Wang J, Tian S, Petros RA, Napier ME, & DeSimone JM (2010) The Complex Role of Multivalency in Nanoparticles Targeting the Transferrin Receptor for Cancer Therapies. *Journal of the American Chemical Society* 132(32):11306-11313.
299. Angioletti-Uberti S (2017) Exploiting Receptor Competition to Enhance Nanoparticle Binding Selectivity. *Physical Review Letters* 118(6):068001.
300. Hafez IM, Maurer N, & Cullis PR (2001) On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids. *Gene Therapy* 8(15):1188-1196.
301. Franke C, *et al.* (2019) Correlative single-molecule localization microscopy and electron tomography reveals endosome nanoscale domains. 20(8):601-617.
302. Paramasivam P, *et al.* (2021) Endosomal escape of delivered mRNA from endosomal recycling tubules visualized at the nanoscale. *Journal of Cell Biology* 221(2):e202110137.

303. Remaut K, Lucas B, Braeckmans K, Demeester J, & De Smedt SC (2007) Pegylation of liposomes favours the endosomal degradation of the delivered phosphodiester oligonucleotides. *J Control Release* 117(2):256-266.
304. Lou J, Schuster JA, Barrera FN, & Best MD (2022) ATP-Responsive Liposomes via Screening of Lipid Switches Designed to Undergo Conformational Changes upon Binding Phosphorylated Metabolites. *Journal of the American Chemical Society* 144(8):3746-3756.
305. Sagar R, Lou J, Watson AJ, & Best MD (2021) Zinc Triggered Release of Encapsulated Cargo from Liposomes via a Synthetic Lipid Switch. *Bioconjug Chem* 32(12):2485-2496.
306. Mozart WA, *et al.* (2001) *Le nozze di Figaro* [enregistrement vidéo], Mise en scène, Jean Louis Thamin ; décors, Rudy Sabounghy ; costumes, Patrick Lebreton ; chorégraphie, Catherine Turocy ; montage, Philippe Baillon ; caméras, Pierre Blanc *et al.* (Archiv Produktion,, Hamburg).
307. Han X, *et al.* (2021) An ionizable lipid toolbox for RNA delivery. *Nature Communications* 12(1):7233.
308. Mognetti BM, Cicuta P, & Di Michele L (2019) Programmable interactions with biomimetic DNA linkers at fluid membranes and interfaces. *Reports on Progress in Physics* 82(11):116601.
309. Linne C, Visco D, Angioletti-Uberti S, Laan L, & Kraft DJ (2021) Direct visualization of superselective colloid-surface binding mediated by multivalent interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118(36):e2106036118.

310. Su G, Jiang H, Xu B, Yu Y, & Chen X (2018) Effects of Protein Corona on Active and Passive Targeting of Cyclic RGD Peptide-Functionalized PEGylation Nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics* 15(11):5019-5030.