



HAL
open science

Internalisation cellulaire et effets biologiques de nanoparticules fluorescentes de silice. Influence de la taille et de la charge de surface

Andréa Kurtz-Chalot Kurtz-Chalot

► **To cite this version:**

Andréa Kurtz-Chalot Kurtz-Chalot. Internalisation cellulaire et effets biologiques de nanoparticules fluorescentes de silice. Influence de la taille et de la charge de surface. Génie des procédés. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, 2014. Français. NNT : 2014EMSE0755 . tel-01088608

HAL Id: tel-01088608

<https://theses.hal.science/tel-01088608v1>

Submitted on 28 Nov 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



NNT : 2014 EMSE 0755

THÈSE

Présentée par

Andréa KURTZ-CHALOT

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne

Spécialité : Génie des procédés

INTERNALISATION CELLULAIRE ET EFFETS BIOLOGIQUES DE NANOPARTICULES FLUORESCENTES DE SILICE : INFLUENCE DE LA TAILLE ET DE LA FONCTIONNALISATION DE SURFACE

Le 7 octobre 2014

Membres du jury

Présidente :	Nadine MILLOT	Professeur, Université de Bourgogne
Rapporteurs :	Nadine MILLOT	Professeur, Université de Bourgogne
	Carine MICHIELS	Professeur, Université de Namur
Examineurs :	Christian VILLIERS	Chargé de recherche INSERM, Institut A.Bonniot
	Hervé HILLAIREAU	Maître de conférences, Université Paris Sud
	Matteo MARTINI	Maître de conférences, Université de Lyon
Directeurs :	Didier BERNACHE-ASSOLLANT	Professeur émérite, ENSMSE, Saint-Etienne
	Michèle COTTIER-JOUFFRE	Professeur, Université de Saint-Etienne
Co-encadrante :	Valérie FOREST	Maître assistante, ENSMSE, Saint-Etienne
Encadrant invité :	Jérémie POURCHEZ	Maître de Recherche, ENSMSE, Saint-Etienne

Spécialités doctorales
 SCIENCES ET GENIE DES MATERIAUX
 MECANIQUE ET INGENIERIE
 GENIE DES PROCEDES
 SCIENCES DE LA TERRE
 SCIENCES ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

Responsables :
 K. Wolski Directeur de recherche
 S. Drapier, professeur
 F. Gruy, Maître de recherche
 B. Guy, Directeur de recherche
 D. Grailot, Directeur de recherche

Spécialités doctorales
 MATHEMATIQUES APPLIQUEES
 INFORMATIQUE
 IMAGE, VISION, SIGNAL
 GENIE INDUSTRIEL
 MICROELECTRONIQUE

Responsables
 O. Roustant, Maître-assistant
 O. Boissier, Professeur
 JC. Pinoli, Professeur
 A. Dolgui, Professeur
 S. Dauzere Peres, Professeur

EMSE : Enseignants-chercheurs et chercheurs autorisés à diriger des thèses de doctorat (titulaires d'un doctorat d'État ou d'une HDR)

ABSI	Nabil	CR		CMP
AVRIL	Stéphane	PR2	Mécanique et ingénierie	CIS
BALBO	Flavien	PR2		FAYOL
BASSEREAU	Jean-François	PR		SMS
BATTON-HUBERT	Mireille	PR2	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
BERGER DOUCE	Sandrine	PR2		FAYOL
BERNACHE-ASSOLLANT	Didier	PR0	Génie des Procédés	CIS
BIGOT	Jean Pierre	MR(DR2)	Génie des Procédés	SPIN
BILAL	Essaid	DR	Sciences de la Terre	SPIN
BOISSIER	Olivier	PR1	Informatique	FAYOL
BORBELY	Andras	MR(DR2)	Sciences et génie des matériaux	SMS
BOUCHER	Xavier	PR2	Génie Industriel	FAYOL
BRODHAG	Christian	DR	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
BRUCHON	Julien	MA(MDC)	Mécanique et ingénierie	SMS
BURLAT	Patrick	PR2	Génie Industriel	FAYOL
COURNIL	Michel	PR0	Génie des Procédés	DIR
DARRIEULAT	Michel	IGM	Sciences et génie des matériaux	SMS
DAUZERE-PERES	Stéphane	PR1	Génie Industriel	CMP
DEBAYLE	Johan	CR	Image Vision Signal	CIS
DELAFOSSÉ	David	PR1	Sciences et génie des matériaux	SMS
DESRAYAUD	Christophe	PR2	Mécanique et ingénierie	SMS
DOLGUI	Alexandre	PR0	Génie Industriel	FAYOL
DRAPIER	Sylvain	PR1	Mécanique et ingénierie	SMS
FEILLET	Dominique	PR2	Génie Industriel	CMP
FEVOTTE	Gilles	PR1	Génie des Procédés	SPIN
FRACZKIEWICZ	Anna	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
GARCIA	Daniel	MR(DR2)	Génie des Procédés	SPIN
GERINGER	Jean	MA(MDC)	Sciences et génie des matériaux	CIS
GOEURIOT	Dominique	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
GRAILLOT	Didier	DR	Sciences et génie de l'environnement	SPIN
GROSSEAU	Philippe	DR	Génie des Procédés	SPIN
GRUY	Frédéric	PR1	Génie des Procédés	SPIN
GUY	Bernard	DR	Sciences de la Terre	SPIN
HAN	Woo-Suck	CR	Mécanique et ingénierie	SMS
HERRI	Jean Michel	PR1	Génie des Procédés	SPIN
KERMOUCHE	Guillaume	PR2	Mécanique et Ingénierie	SMS
KLOCKER	Helmut	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
LAFORÉST	Valérie	MR(DR2)	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
LERICHE	Rodolphe	CR	Mécanique et ingénierie	FAYOL
LI	Jean-Michel		Microélectronique	CMP
MALLIARAS	Georges	PR1	Microélectronique	CMP
MOLIMARD	Jérôme	PR2	Mécanique et ingénierie	CIS
MONTHEILLET	Frank	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
MOUTTE	Jacques	CR	Génie des Procédés	SPIN
NEUBERT	Gilles			FAYOL
NIKOLOVSKI	Jean-Pierre			CMP
NORTIER	Patrice	PR1		SPIN
PIJOLAT	Christophe	PR0	Génie des Procédés	SPIN
PIJOLAT	Michèle	PR1	Génie des Procédés	SPIN
PINOLI	Jean Charles	PR0	Image Vision Signal	CIS
POURCHEZ	Jérémy	CR	Génie des Procédés	CIS
ROBISSON	Bruno			CMP
ROUSSY	Agnès	MA(MDC)		CMP
ROUSTANT	Olivier	MA(MDC)		FAYOL
ROUX	Christian	PR		CIS
STOLARZ	Jacques	CR	Sciences et génie des matériaux	SMS
TRIA	Assia	Ingénieur de recherche	Microélectronique	CMP
VALDIVIESO	François	MA(MDC)	Sciences et génie des matériaux	SMS
VIRICELLE	Jean Paul	MR(DR2)	Génie des Procédés	SPIN
WOLSKI	Krzysztof	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
XIE	Xiaolan	PR1	Génie industriel	CIS
YUGMA	Gallian	CR	Génie industriel	CMP
BERGHEAU	Jean-Michel	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE
BERTRAND	Philippe	MCF	Génie des procédés	ENISE
DUBUJET	Philippe	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE
FEULVARCH	Eric	MCF	Mécanique et Ingénierie	ENISE
FORTUNIER	Roland	PR	Sciences et Génie des matériaux	ENISE
GUSSAROV	Andrey	Enseignant contractuel	Génie des procédés	ENISE
HAMDI	Hédi	MCF	Mécanique et Ingénierie	ENISE
LYONNET	Patrick	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE
RECH	Joël	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE
SMUROV	Igor	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE
TOSCANO	Rosario	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE
ZAHOUANI	Hassan	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE

A mes épatantes grand-mères,
Geneviève et Brana.

"Would you tell me, please, which way I ought to go from here?"
"That depends a good deal on where you want to get to," said the Cat.
"I don't much care where..." said Alice.
"Then it doesn't matter which way you go," said the Cat.
"... so long as I get somewhere." Alice added as an explanation.
"Oh, you're sure to do that," said the Cat, "if you only walk long enough."

(Alice's Adventures in Wonderland, by Lewis Carroll)

REMERCIEMENTS

Tout comme ce manuscrit de thèse constitue une synthèse délicate de ces trois années de travaux de recherche scientifique, ces quelques pages de remerciements ne peuvent contenir l'ampleur de ce que vous m'avez apporté. Cependant, elles me permettent de vous remercier pour vos contributions de près et de loin à mes trois années de thèse de doctorat et de vous signifier comme vous fûtes de merveilleuses rencontres...

Un grand merci à mes directeurs, le Professeur Didier Bernache-Assollant et le Professeur Michèle Cottier-Jouffre, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser une thèse de doctorat dans la prestigieuse Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne. Je tiens également à vous remercier pour les moments partagés et vos conseils avisés sur mes travaux, malgré vos nombreuses autres grandes responsabilités. Ce fut pour moi un enseignement précieux.

Je suis extrêmement reconnaissante envers les membres de mon jury de thèse pour le temps et l'attention consacrés à l'évaluation de mon travail. Merci au Professeur Nadine Millot d'avoir accepté d'être rapporteur pour ma soutenance de thèse et présidente du jury. Merci au Professeur Carine Michiels d'avoir accepté d'être rapporteur pour ma soutenance de thèse et d'avoir fait le déplacement depuis Namur en Belgique. Merci également à Hervé Hillaireau d'avoir accepté d'être examinateur pour ma soutenance de thèse. Echanger avec vous, experts dans des domaines variés, et surtout recevoir vos avis extérieurs sur mon travail fut extrêmement enrichissant. Tout autant, merci à Matteo Martini et Christian Villiers d'avoir accepté d'être examinateurs pour ma soutenance de thèse mais également d'avoir été de patients collaborateurs tout au long du projet. Vos avis, de physico-chimiste et de biologiste respectivement, ont contribué de loin à la progression de mon travail de recherche, moi qui ne suis ni vraiment biologiste ni vraiment physico-chimiste.

Mon parcours au sein du Laboratoire Interdisciplinaire d'étude des Nanoparticules Aérosolisées, le LINA, fut riche en découvertes, tant scientifiques qu'humaines. Le nanomonde, comme son intitulé ne l'indique pas, est vaste et passionnant, et le monde de la recherche académique l'est tout autant. Merci à mes encadrants de m'avoir guidée dans ces deux mondes. Merci au docteur Valérie Forest, ma co-encadrante référente et biologiste consciencieuse, pour m'avoir ouvert la porte de son bureau régulièrement et avoir su apporté sa rigueur scientifique à l'ensemble de mes productions. Je te laisse le soin de finir ce que j'ai commencé, et après ces heures consacrées à partager nos points de vue à Saint-Etienne mais aussi pendant les congrès, tu as toute ma confiance professionnelle. J'ai été ta première « vraie » doctorante, j'espère que tu peux en être fière, et je te souhaite de pouvoir être fière des nombreux doctorants qui suivront. Merci au docteur Jérémie Pourchez, mon co-encadrant officiel et physico-chimiste enthousiaste, pour son esprit d'équipe communicatif et l'originalité pertinente de ses nombreuses idées. Merci au docteur Delphine Boudard, ma co-encadrante non-officielle et biologiste méticuleuse, pour sa douceur à toute épreuve et l'intransigeance de ses observations. Merci à Valérie Bin, tu m'as apporté une

REMERCIEMENTS

formation technique de qualité pour l'étude des cellules et merci également pour ton oreille attentive à toutes mes petites souffrances de doctorante. Merci au docteur Lara Leclerc, mon maître Jedi et une jeune chercheuse dynamique, pour son énergie contagieuse et son soutien dans mes travaux poursuivant les siens. Je te souhaite de trouver une place à la hauteur de tes compétences afin de pouvoir faire ce que tu aimes auprès de ceux que tu aimes. Je pars pour de tout autres aventures, comme je l'avais prévu bien avant d'envisager la thèse, mais ce passage parmi vous aura été bien plus attractif que je ne l'avais imaginé et constitue un bagage non négligeable pour la suite de mes projets. Merci. Je vous souhaite le meilleur professionnellement et personnellement.

Merci à toutes les personnes avec qui j'ai eu l'opportunité de collaborer pendant les trois ans : les « fournisseurs » de nanoparticules de Lyon et leur optimisme à toute épreuve, Matteo Martini (à nouveau), l'équipe de l'ILM, Olivier Tillement et Lucie Sancey, l'équipe de l'INSA, Pascal Perriat et Gustavo Braga Alcantara, et la société Nano-H, Laurence Marmuse et Cédric Louis. Je remercie également, ceux qui m'ont encadrée en microscopie avec leur énergie et leurs conseils, aux Mines de Saint-Etienne, Marilyne Mondon, au Pôle Optique, Sabine Palle, et à la faculté de médecine, Alain Guignandon et Odile Sabido. Je tiens à remercier l'équipe du CMP de Gardanne qui m'a réservé un bien court mais très bon accueil, Rosin Owens, Sherrine Tria et Manuelle Bongo, et l'équipe de l'IAB de Grenoble d'une grande gentillesse, Christian Villiers (à nouveau) et Morgane Couvet.

D'autre part, mon temps ayant été étiré entre les locaux des Mines de Saint-Etienne et de la faculté de médecine, je tiens à remercier l'ensemble des personnes côtoyées régulièrement au bâtiment C et un peu plus, pour leur accueil et leur bonne humeur, je ne me suis jamais sentie étrangère parmi vous et ce fut très appréciable : Gwendoline, Coralie, Nathalie, David, Carole, Marie-Claude, Stéphane, Jérôme, Alexandre, Laetitia ...

Tout autant, merci à Françoise Bresson, « vibrant wonder-secretary », et Amélie Chatagnon qui l'a remplacée au pied levé. Vous m'avez permis de ne pas me retrouver complètement perdue dans les méandres administratifs qui accompagnent la thèse. Merci à Joelle Guelon et Adélaïde Crabit aussi, pour la gestion de la formation doctorale de bout en bout.

Pendant la thèse de doctorat, j'ai pu assister au Comité de la Recherche des Mines Saint-Etienne. Merci à Valérie Perret et à Christian Roux de permettre aux doctorants d'avoir des représentants au sein de ces instances.

Je tiens aussi à remercier mon premier laboratoire de recherche, le BiiGC, dirigé par le Professeur Gain et le Professeur Thuret à la faculté de médecine, qui m'a permis d'envisager la thèse de doctorat à la suite de mon stage de Master. L'ensemble de l'équipe est restée d'un grand soutien au long de ces trois années, les anciens, Simone, Zhiguo, Nelly, Chaker, Binh-Minh, Aurélien,

REMERCIEMENTS

comme les plus nouveaux Giacomo, Clotilde, Tanguy, Nicolas, Nadine, Marie-Caroline, Anne-Sophie et Chantale.

De plus, en parallèle de la thèse de doctorat, j'ai eu l'opportunité de participer à une aventure bien différente avec l'équipe de la banque de tissus de l'EFS de Saint-Etienne. J'ai rarement été aussi motivée les veilles de week-end qu'en votre compagnie, Sophie, Sandrine, Christian et Catherine. Merci de m'avoir fait une petite place dans votre superbe activité et de m'avoir permis de mettre et garder un pied dans un établissement à caractère biomédical. J'ai pu voir le service et son personnel évoluer sur 3 ans, et cela constitue une expérience professionnelle magnifique pour la toute jeune Ingénieur-Docteur que je suis.

Je tiens maintenant à remercier plus spécifiquement, ceux avec qui j'ai eu la chance de partager l'expérience de la thèse, tout un tas d'autres doctorants formidables rencontrés à peu près partout à Saint-Etienne et par l'Association Stéphanoise des JEunes Chercheurs, et dont certains sont maintenant jeunes docteurs. Ces trois années auraient été bien moins sympathiques sans vous pour partager mes doutes, mes joies, mes peines, mes soirées, mes week-ends, et toutes ses activités extravagantes (mention toute spéciale à la via-ferrata sous la pluie) !!! Vous êtes tous des amitiés précieuses !

Agathe, merci d'être toi, curieuse et enthousiaste, et d'avoir été là pour partager quasi-tout ce que j'ai découvert à Saint-Etienne les nanos, les assos, le Méliès, les sainté-pass, le Sziget, le footing, etc. Jules, mon coach sportif mais pas que, tu m'as permis de garder la forme en toutes circonstances. Estelle, tu vaux sacrément le détour, notamment car en plus des chips tu fais très bien le guacamole. Vous êtes fantastiques !

Clotilde, ma grande dame, étonnante et généreuse, tellement ravie de t'avoir (re)rencontrée. Zhiguo, tu es une personne admirable, très enrichissante et un vrai chercheur. Jean-Philippe, fou de médecin va ! Merci pour les discussions, les conseils, ta bonne humeur. Giacomo, merci de m'avoir mise à la salsa, j'attends cependant les légendaires lasagnes. Fiona, tu es un papillon, merci pour ton sourire et ta douceur inévitables. Antoine, tu es surprenant, merci pour les moments partagés, notamment en co-bureaux. Binh-Minh, merci pour ton regard sur les choses et ta gaité. Aly, merci pour tes éclats de rire et ta philosophie de vie. Franck, merci pour ta sérénité. Gaëlle, merci pour les échanges privilégiés et les bons moments. Baptiste, merci pour ta bisounourserie. Amélie, merci pour ton dynamisme et ton courage. Laura, merci pour ta force tranquille et les calïns. Dimitri, merci pour les débats enflammés et ton ironie. Olivier, merci pour tes interventions incongrues. Maxym, merci pour ta fantaisie et ton humour.

Merci aussi à tous ceux que je connais moins bien mais que j'ai beaucoup appréciés : Hélène, ma première co-bureau, ravie que tu aies pu mener les choses comme tu le souhaitais. Thomas, ton parcours m'impressionnera toujours, merci pour ton soutien et ton empathie. Merci aussi à Lucile,

REMERCIEMENTS

Aaron, Marine, Guillaume, Damien, Wafa, Guénaëlle, David, Pierre, Klervi, Fanette, Omar, Irina, Emilie, Manu, Rebecca, Jie, Sophie ... et les petits derniers Clément et Clémentine.

Merci aussi aux pas doctorants de Saint-Etienne que la thèse a mis sur mon chemin quand même. Gwendoline merci pour ta force de caractère et ton énergie. Alexia, Alexia, Aurélie, Aurélien merci pour tous ses beaux moments partagés aussi en votre compagnie.

Enfin merci à celui qui a suivi tout ça de très près et l'a supporté, Aurélien Bernard. Merci d'avoir mis tout ça sur ma route et de m'y avoir accompagnée. Et merci à ceux qui ont suivi tout ça de très loin, Ma famille Chalot-Larou-Kurtz-Bernard. Merci Maman pour ton étonnement et ta fierté, merci Papa pour ta curiosité et ton intérêt, merci Juju et Léo pour vos encouragements et merci à mes Grand-mères pour leur soutien épatant. Je vous aime.

Andréa

THÈSE

Présentée par

Andréa KURTZ-CHALOT

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne

Spécialité : Génie des procédés

**INTERNALISATION CELLULAIRE ET EFFETS BIOLOGIQUES DE
NANOPARTICULES FLUORESCENTES DE SILICE :
INFLUENCE DE LA TAILLE ET DE LA
FONCTIONNALISATION DE SURFACE**

Le 7 octobre 2014

Préambule

La thèse présentée s'inscrit dans le cadre d'études de biotoxicité menées au *Laboratoire Interdisciplinaire d'étude des Nanoparticules Aerosolisées* (LINA). Le LINA, a été créé en 2009 dans le cadre de l'IFR 143 (IFRESIS – Institut Fédératif de Recherche en Science Ingénierie et Santé) et labellisé équipe d'accueil (EA 4624) par *l'Agence d'Evaluation de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur* (AERES) en 2011. L'équipe mixte réunit, autour du thème des nanoparticules, les compétences en physique et chimie du solide de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne et les compétences en biologie et en médecine de l'Université Jean Monnet et du Centre Hospitalier Universitaire de Saint-Etienne. L'évaluation et la recherche en matière d'activité biologique des nanoparticules constituent la thématique transversale de l'équipe.

Mon projet se focalise plus spécifiquement sur les questions fondamentales d'interactions entre les cellules et les nanoparticules et notamment l'étude de la réponse cellulaire induite. Sur ces phénomènes, l'impact des paramètres physico-chimiques des nanoparticules semble jouer un rôle clé et a pu être investigué dans le cadre de collaborations avec des équipes lyonnaises, l'équipe FENNEC (Formation Elaboration de NaNomatériaux et Cristaux) de *l'Institut Lumière Matière* (ILM) de l'Université de Lyon et la société Nano-H®, avec le développement de nanoparticules synthétisées à façon à l'échelle du laboratoire, dites nanoparticules « modèles ». De même une collaboration avec *l'Institut Albert Bonniot* (IAB) de Grenoble a permis de s'intéresser à la couche de protéines formée à la surface des nanoparticules, modifiant sa chimie et influant sur les interactions entre les cellules et les nanoparticules.

SOMMAIRE

PREAMBULE.....	- 3 -
LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	- 6 -
LISTE DES FIGURES	- 6 -
LISTE DES TABLEAUX	- 9 -
PRINCIPALES ABREVIATIONS.....	- 10 -
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	- 13 -
I. LE NANOMONDE	- 14 -
I.1. Les nanoparticules	- 14 -
I.1.1. La définition de l'échelle nanométrique et la classification des nano-objets	- 14 -
I.1.2. Les modes de production des nano-objets	- 15 -
I.1.3. Les propriétés nanométriques	- 17 -
I.2. Applications industrielles des nano-objets.....	- 18 -
I.2.1. Les secteurs de pointe	- 19 -
I.2.1. Les enjeux financiers des nanotechnologies	- 19 -
I.2.3. Le marché des nanotechnologies	- 21 -
I.3. Les nanoparticules à application directe sur l'homme	- 23 -
I.3.1. Les différentes approches.....	- 24 -
I.3.2. Les types de ciblage	- 25 -
I.4. La silice amorphe à l'état nanoparticulaire.....	- 27 -
I.4.1. Le classement R-nano de la silice amorphe.....	- 27 -
I.4.2. Le matériau silice amorphe.....	- 27 -
I.4.3. Les nanoparticules de silice amorphe.....	- 27 -
II. LA NANOTOXICOLOGIE	- 29 -
II.1. L'aspect environnemental et sanitaire des nanoparticules	- 29 -
II.1.1. L'origine des nanoparticules	- 29 -
II.1.2. L'évaluation de la quantité des nanoparticules dans l'environnement.....	- 30 -
II.2. Les effets biologiques des nanoparticules	- 31 -
II.2.1. La pénétration des nanoparticules dans l'organisme	- 31 -
II.2.2. Les pathologies liées à l'inhalation de particules.....	- 33 -
II.2.3. La prévention des risques	- 35 -
II.2.4. Les programmes de recherche sur les risques sanitaires liés aux nanoparticules	- 36 -
II.3. La toxicologie des nanoparticules.....	- 38 -
II.3.1. La toxicologie <i>in vivo</i> des nanoparticules.....	- 38 -
II.3.2. La toxicologie <i>in vitro</i> des nanoparticules	- 39 -
III. LES INTERACTIONS NANOPARTICULES/CELLULES.....	- 42 -
III.1. La prise en charge des nanoparticules par la cellule	- 42 -

SOMMAIRE

III.1.1. La pinocytose	- 43 -
III.1.2. La phagocytose.....	- 43 -

III.1.3. L'étude de l'internalisation cellulaire	- 44 -
III.2. La dégradation des nanoparticules par la cellule.....	- 46 -
III.2.1. Les enzymes lytiques.....	- 46 -
III.2.2. L'étude de l'hydrolyse	- 46 -
III.2.3. Le rejet des débris issus de la dégradation des nanoparticules	- 47 -
III.3. Les paramètres modifiant les capacités d'internalisation cellulaire des nanoparticules.....	- 48 -
III.3.1. Les caractéristiques physiques.....	- 48 -
III.3.2. Les caractéristiques chimiques	- 49 -
III.3.3. Les caractéristiques secondaires.....	- 51 -
APPROCHE EXPERIMENTALE	- 55 -
I. EFFET DE LA FONCTIONNALISATION DE SURFACE DES NANOPARTICULES DE SILICE SUR LEUR ADSORPTION A LA SURFACE DE LA CELLULE, LEUR INTERNALISATION ET LEUR CYTOTOXICITE	- 58 -
I.1. Introduction et méthodologie.....	- 58 -
I.2. Publication I – Acceptée	- 60 -
I.3. Données complémentaires et perspectives d'études	- 80 -
I.4. Bilan.....	- 85 -
II. ADAPTATION D'UNE METHODE INNOVANTE POUR LA QUANTIFICATION DE LA PHAGOCYTOSE DE NANOPARTICULES A DOUBLE FLUORESCENCE SENSIBLES AU PH	- 87 -
II.1. Introduction et méthodologie.....	- 87 -
II.2. Publication II - Soumise.....	- 89 -
II.3. Données complémentaires et perspectives d'études.....	- 110 -
II.4. Bilan.....	- 113 -
III. INTERACTIONS PROTEINES/NANOPARTICULES : IMPACT SUR L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DE NANOPARTICULES DE SILICE	- 115 -
III.1. Introduction et méthodologie.....	- 115 -
III.2. Projet de publication III.....	- 116 -
III.3. Données complémentaires et perspectives d'études.....	- 131 -
III.4. Bilan.....	- 137 -
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	- 140 -
ANNEXES.....	III
I. Caractérisation physico-chimique des particules.....	IV
II. Principe des différents dosages utilisés.....	VI
III. Coloration May-Grünwald Giemsa	XI
IV. Microscopie électronique.....	XII
V. Microscopie confocale	XV
REFERENCES.....	XIX

LISTE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES

Figure 1 – La classification des nano-objets selon leur degré de dimension nanométrique.	15 -
Figure 2 – Situation des nanoparticules par rapport à l'échelle de taille du vivant et des technologies (librement inspiré d'Invitrogen).	15 -
Figure 3 - Approches d'élaboration des nano-objets manufacturés (librement inspiré de l'INRS).	16 -
Figure 4 – Pour une particule sphérique : rapport surface/volume (en bleu) et fraction des atomes présents en surface de la particule (en rouge) en fonction du diamètre de la particule (D'après INRS - Particules ultra-fines et santé au travail - Caractéristiques et effets potentiels sur la santé).	17 -
Figure 5 - Secteurs industriels utilisant des nano-objets (D'après Tsuzuki, 2009).	18 -
Figure 6 – Les enjeux financiers des nanotechnologies (D'après Roco, 2011).	21 -
Figure 7 – Nombre de nano-produits sur le marché mondial classés par domaines d'applications (Project on Emerging Nanotechnologies).	22 -
Figure 8 - Evolution des caractéristiques de surface des nano-vecteurs entre les trois différentes générations de nanomédicaments, exemple des coquilles d'encapsulation et des liposomes.	25 -
Figure 9 - Classement des nano-objets en fonction de leur origine de formation (librement inspiré de l'INRS).	29 -
Figure 10 – Exposition aux nanomatériaux (D'après Nanosafe.org).	31 -
Figure 11 - Schéma représentant les différentes voies de pénétration des nanoparticules dans l'organisme humain conduisant à leur translocation vers différents organes (Librement inspiré de Vicari et al. 2010).	32 -
Figure 12 – Modèle prédictif de la déposition des nanoparticules dans les voies respiratoires en fonction de leur taille (Adapté de Oberdörster et al., 2005).	33 -
Figure 13 - Schéma représentatif de la relation taille/surface spécifique.	34 -
Figure 14 - Grille des risques potentiels (D'après Maynard et al., 2006).	36 -
Figure 15 - Recensement des publications concernant la nanotoxicité (GoPubMed)	37 -
Figure 16 - Schéma des principales voies d'internalisation cellulaire : (A) la phagocytose et les différentes voies de pinocytose (B) (C) (D) et (E) (Hillaireau et Couvreur, 2009).	42 -
Figure 17 - Schéma illustrant les différentes étapes de la phagocytose (D'après Boumahdi, 2009).	44 -
Figure 18 – Observation microscopique de figures de macropinocytose précoce par (A) microscopie électronique à balayage, (B) microscopie électronique à transmission, (C) microscopie photonique et (D) microscopie à épifluorescence (les nanoparticules émettent une fluorescence rouge) (D'après Rima et al., 2013).	45 -
Figure 19 - Schéma récapitulatif des activités lytiques des lysosomes (Histologie, Jean Pierre DADOUNE, Médecine-Sciences Flammarion).	47 -
Figure 20 - Diagramme représentant les liens à établir au cours de ce travail de thèse.	56 -
Figure 21 - Principe de la quantification de la phagocytose par quenching au bleu trypan (D'après Leclerc et al., 2010).	59 -
Figure 22 - Evolution des courbes d'étalonnage de l'intensité de fluorescence des nanoparticules en fonction de la dose lors de la variation de pH de 8 à 4.	81 -
Figure 23 - Mesures en silice et en or par ICP-AES d'une gamme étalon de NP(0) diluées dans l'eau MilliQ à partir d'une solution stock à 20g/L	82 -

LISTE DES ILLUSTRATIONS

<i>Figure 24 - Représentation schématique de la mort cellulaire par les voies de la nécrose, de l'apoptose et de l'autophagie (Librement inspiré des supports de formation de Louvain Coopération).....</i>	83 -
<i>Figure 25 - Etude de l'activité de la Caspase-3 chez des macrophages RAW 264.7 après 20 heures de contact avec les nanoparticules de silice NP(--), NP(0) et NP(++)......</i>	84 -
<i>Figure 26 - Schéma récapitulatif de l'effet de la fonctionnalisation de surface des nanoparticules de silice (pour la dose de 50 µg/mL) sur leur adsorption à la surface du macrophage, leur internalisation et leur cytotoxicité. .</i>	86 -
<i>Figure 27 - Structure schématique des nanoparticules développées.</i>	87 -
<i>Figure 28 - Principe de fonctionnement de la particule à double fluorescence FITC/pHrodo. (A) Principe d'évolution de la couleur de la particule en fonction de son interaction avec la cellule. (B) Image illustrative de l'internalisation par des macrophages RAW 264.7 (noyaux marqués en bleu au Hoechst) de particules submicroniques (en jaune du à la superposition des fluorescences rouge et verte) réalisée en microscopie à épifluorescence. (C) Spectres d'émission du pHrodo et du FITC en fonction du pH (D'après Leclerc et al., 2012).</i>	88 -
<i>Figure 29 – Images de microscopie confocale de cellules RAW 264.7 après incubation avec des particules de silice à double fluorescence FITC/pHrodo de 130 nm de diamètre. De gauche à droite les temps d'incubation étaient respectivement de 1, 5 et 15 heures pour une dose de 150 µg de particules/mL. Les couleurs correspondent au FITC en vert pour les nanoparticules adsorbées en surface de la cellule et au pHrodo en rouge lorsque les nanoparticules sont internalisées. La superposition des fluorescences, témoin de la colocalisation des nanoparticules dans les phagolysosomes, apparaît en jaune.</i>	110 -
<i>Figure 30 - Extraits de vidéo-microscopie montrant la répartition des particules P60 (A) et P130 (B) contenant les fluorochromes FITC en vert et pHrodo en rouge (vert et rouge superposés apparaissant en jaune) au cours du temps. La membrane cytoplasmique des macrophages est rendue visible avec le contraste de phase, les noyaux ont été marqués au Hoechst en bleu.</i>	111 -
<i>Figure 31 - Schéma figuratif de l'effet (à la dose de 60 µg/mL) de la taille des particules de silice sur leur adsorption à la surface du macrophage, leur internalisation et leur cytotoxicité.</i>	113 -
<i>Figure 32 – Viabilité (test MTT) des macrophages RAW 264.7 après 24 h de contact avec des particules de silice amorphe commerciales (Polyscience pour les PS et W.R. Grace and Company pour les ludox) de 7 à 300 nm de diamètre. Les données sont présentées selon une gamme de doses en fonction (A) de la masse ou (B) de l'aire de surface de la particule. L'étude a été réalisée en triplicat (Waters et al., 2009).</i>	114 -
<i>Figure 33 - Schéma descriptif des lots de nanoparticules mis au point.</i>	115 -
<i>Figure 34 - Processus global pour l'étude de la corona protéique développé par la plateforme Prométhée.</i>	131 -
<i>Figure 35 - Processus de la digestion protéique développé par la plateforme Prométhée.</i>	132 -
<i>Figure 36 - Process de spectrométrie de masse développé à l'IAB.</i>	132 -
<i>Figure 37 - Exemple de chromatographie pour des protéines de la corona réalisé par la plateforme Prométhée : PM échelle de poids moléculaires, S0 sérum seul avant incubation, S1 sérum après incubation avec les nanoparticules, L1 surnageant après le premier lavage.</i>	133 -

LISTE DES ILLUSTRATIONS

<i>Figure 38 – Schéma du lien entre la fonctionnalisation de surface des nanoparticules et (1) directement la formation de la corona protéique puis (2) indirectement leur internalisation par les macrophages et leur réponse biologique.</i>	<i>- 137 -</i>
<i>Figure 39 - Principe de la technique de diffusion dynamique de la lumière.</i>	<i>IV</i>
<i>Figure 40 - En DLS, la courbe d'auto corrélation créée à partir des variations d'intensité du signal permet d'obtenir des informations sur le mouvement des particules et ainsi d'en déduire leur taille.</i>	<i>IV</i>
<i>Figure 41 - Charge et potentiels électriques d'une particule dont le potentiel zêta (Simon-Deckers, 2008).</i>	<i>V</i>
<i>Figure 42 - Principe du dosage de la LDH (Promega).</i>	<i>VI</i>
<i>Figure 43 - Etude d'artefact dû à la présence de particules de silice dans le test LDH utilisé pour les macrophages RAW 264.7. Exemple des NP(--), NP(0) et NP(++). (***) indique une différence de signal significative entre le paramètre étudié et le contrôle positif).</i>	<i>VII</i>
<i>Figure 44 - Principe du dosage ELISA du TNF-α.</i>	<i>VIII</i>
<i>Figure 45 - Etude d'artefact dû à la présence de particules de silice dans le test TNF-α utilisé pour les macrophages RAW 264.7. Exemple des NP(--), NP(0) et NP(++). (***) indique une différence de signal significative entre le paramètre étudié et le contrôle positif).</i>	<i>VIII</i>
<i>Figure 46 - Principe de l'essai « Oxiselect » (Euromedex).</i>	<i>IX</i>
<i>Figure 47 - Etude de la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) par les macrophages RAW 264.7 après 90 minutes de contact avec des nanoparticules de silice. Exemple des NP(--), NP(0) et NP(++). (***) indique une différence de signal significative entre le paramètre étudié et le témoin cellules seules).</i>	<i>X</i>
<i>Figure 48 - Principe du dosage de la caspase-3.</i>	<i>X</i>
<i>Figure 49 - Observations de la lignée de macrophages RAW 264.7 après coloration MGG (objectif x40) après cytocentrifugation (A) ou incubation en chambre de culture Lab-Tek permettant la conservation de la morphologie de ces cellules semi-adhérentes (B).</i>	<i>XI</i>
<i>Figure 50 - Schéma du principe d'un Microscope Electronique à Balayage.</i>	<i>XIII</i>
<i>Figure 51 - Schéma des interactions faisceau d'électrons-matière.</i>	<i>XIV</i>
<i>Figure 52 - Echantillons de nanoparticules sphériques de silice avec un coeur d'or observés (A) en MET et (B) en MEB.</i>	<i>XIV</i>
<i>Figure 53 - Principe de la confocalité d'un microscope à balayage laser. Seule la lumière d'émission de fluorescence (beam splitter) provenant du plan focal (focus level) est collectée au niveau du détecteur (photomultiplicateur) pour constituer l'image (CMCM Stéphaneois).</i>	<i>XV</i>
<i>Figure 54 - Schéma explicatif des sections de plans de coupe en microscopie confocale avec l'image d'un plan focal en XZ et YZ, et d'une image moyennée finale acquise sur une série de plans de coupe.</i>	<i>XVI</i>
<i>Figure 55 - Différence de netteté entre une image confocale et non-confocale (CMCM Stéphaneois).</i>	<i>XVI</i>

LISTE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 - Exemples d'applications actuelles des nanomatériaux (INRS 2012) :.....</i>	<i>- 20 -</i>
<i>Tableau 2 - Catégories de substances produites et/ou importées en France en plus grande quantités (plus de 100 tonnes) (D'après « Éléments issus des déclarations des substances à l'état nanoparticulaire », R-Nano novembre 2013) :</i>	<i>- 23 -</i>
<i>Tableau 3- Modèle théorique d'adsorption des protéines à la surface des nanoparticules (Norde, 2008) :.....</i>	<i>- 136 -</i>

PRINCIPALES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

AERES : Agence d'Évaluation de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur

Afssa : Agence française de sécurité sanitaire des aliments

Afsset : Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail

Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ANSM : Agence Nationale de la Sécurité et du Médicament

BT : Bleu Trypan (en anglais Trypan Blue, TB)

CEFIC : European Chemical Industry Council

CMF : Cytométrie en flux (en anglais flow cytometry, FCM)

DGS : Direction Générale de la Santé

DLS : Diffusion dynamique de la lumière (de l'anglais Dynamic Light Scattering)

ELISA : Méthode immuno-enzymatique (de l'anglais Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

EMSE : Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne

EPA : US Environmental Protection Agency

FDA : Food and Drug Administration

FITC : Fluorescéine isothiocyanate

FSC : Forward scatter

IAB : Institut Albert Bonniot

IFRESIS : Institut Fédératif de Recherche en Science Ingénierie et Santé

ICP : Spectrométrie d'émission atomique par torche à plasma (de l'anglais Induced Coupled Plasma spectroscopy)

ILM : Institut Lumière Matière

Ineris : Institut national de l'environnement industriel et des risques

INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité

InVS : Institut de Veille Sanitaire

IP : Iodure de Propidium (en anglais Propidium Iodide, PI)

IRRST : Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail

PRINCIPALES ABREVIATIONS

ISO : Organisation internationale pour la normalization (de l'anglais International Organization for Standardization)

LBA : Lavages Broncho-Alvéolaires

LDH : Lactate déshydrogénase

LINA : Laboratoire Interdisciplinaire d'étude des Nanoparticules Aérosolisées

MEB : Microscopie Electronique à Balayage (en anglais Scanning Electron Microscopy, SEM)

MET : Microscopie Electronique à Transmission (en anglais Transmission Electron Microscopy, TEM)

MFI : Intensité moyenne de fluorescence (de l'anglais Mean Fluorescence Intensity)

MGG : May-Grünwald Giemsa

MTT : Sel de tétrazolium (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium)

NIA : National Institute on Aging

NOAA : Nano-Objets, leurs Agrégats et Agglomérats

ONG : Organisation Non Gouvernementale

ORL : Oto-Rhino-Laryngique

PCR : Réaction en Chaîne par Polymérase (de l'anglais polymerase chain reaction)

PCRD : Programme Cadre de Recherche et Développement

PEN : Project on Emerging Nanotechnologies

PFA : Paraformaldéhyde

PME : Petite et Moyenne Entreprise

Reach : Enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des produits chimiques (de l'anglais Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals)

ROS : Espèces oxygénées réactives (de l'anglais Reactive Oxygen Species)

SSC : Side scatter

SVF : Sérum de Veau Foetal (en anglais Fetal Calf Serum, FCS)

TACD : Transatlantic consumer dialogue

TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha

UIC : Union des Industries Chimiques

UJM : Université Jean Monnet

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

En 1959, le physicien Richard Feynman a déclaré : "Les principes de la physique, pour autant que nous puissions en juger, ne s'opposent pas à la possibilité de manipuler des choses atome par atome". Il suggère alors d'explorer l'univers de l'infiniment petit. Mais ce n'est que dans les années 1980, avec la découverte du microscope à effet tunnel (en anglais Scanning Tunneling Microscope, STM), puis celle du microscope à force atomique (en anglais Atomic Force Microscope, AFM), que l'extrême précision des outils scientifiques a permis aux chercheurs de concevoir, fabriquer et manipuler les nano-objets. On parle alors de la nanotechnologie, une démarche expérimentale utilisant la nanophysique, la nano-chimie et la biologie. Elle promet un éventail impressionnant d'applications qui pour certaines ont déjà commencé à être commercialisées : tout d'abord pour le secteur industriel puis dans les produits de consommation courante, et, plus récemment, de la nanotechnologie commence à émerger la nanomédecine. Actuellement la réglementation sur les nano-objets peine à être établie mais est déjà perçue comme nécessaire pour limiter leurs éventuels dangers à long terme sur l'Homme et sur l'environnement. En parallèle, la communauté scientifique apporte progressivement des éléments de réponse quant à la compréhension de leurs mécanismes de toxicité potentielle, mais les approches souvent disparates ne permettent pas encore de tirer de conclusion générale. Par conséquent il apparaît nécessaire de développer des méthodes d'analyse permettant d'évaluer l'impact de caractéristiques physico-chimiques définies des nanoparticules sur leurs potentiels effets biologiques.

Dans ce chapitre seront tout d'abord donnés une définition et un descriptif du nanomonde et de ses perspectives, particulièrement en ce qui concerne le modèle choisi dans cette étude : les nanoparticules de silice amorphe. Les risques pour l'Homme seront ensuite abordés et complétés par un bilan succinct de l'état de l'art en nanotoxicologie. Puis, l'influence de différents paramètres sur l'interaction nanoparticules/cellules sera discutée.

I. Le nanomonde

Actuellement de nombreuses recherches s'orientent vers l'infiniment petit : le nanomonde. Le préfixe « nano- » est relié au nanomètre, soit l'unité de mesure de longueur du système international valant un milliardième de mètre (10^{-9}m). Dans la nature, cette échelle est courante : un assemblage d'atomes de 0,1 nm forme les molécules, les protéines, la matière, etc. Pour l'homme, la manipulation de la matière à cette taille est récente et rend possible la manipulation des propriétés physiques et chimiques des matériaux, on parle alors de nanotechnologie.

I.1. Les nanoparticules

I.1.1. La définition de l'échelle nanométrique et la classification des nano-objets

Plus spécifiquement, l'échelle dite nanométrique se situe entre 1 et 100 nm (ISO/TS27687 (2008)). Il s'agit de l'ordre de grandeur caractéristique des processus nanométriques dans lesquels le ratio $\frac{\text{surface}}{\text{volume}}$ a un rôle prépondérant. En outre les particules dont les dimensions sont comprises entre 100 et 500 nm présentent également de potentielles caractéristiques nano-spécifiques (ANSES 2014).

Les nano-objets peuvent être classés selon le nombre de dimensions possédées à l'échelle nanométrique, comme ci-dessous (ISO TS/80004-1 (2011)) :

- Nanomatériau (aucune dimension nanométrique) : matériau possédant une structure interne ou de surface à l'échelle nanométrique comme les matériaux nanoporeux avec des pores de taille nanométrique, les nanocomposites constitués de nano-objets de dimension inférieure, ou les solides nanocristallins contenant des nanocristaux. La Commission Européenne regroupe ces nanomatériaux sous l'appellation NOAA pour « nano-objets, agglomérats (liés par des interactions faibles de type Van der Waals) et agrégats (liés chimiquement) », y sont également inclus un certain nombre d'éléments par dérogation comme les fullerènes et les graphènes qui ne correspondent pas tout à fait à cette définition mais nécessitent la même attention (Commission Européenne, 2011) (Lidén, 2011).
- Nanofilm (une dimension nanométrique) : revêtement de surface d'épaisseur de quelques nanomètres.
- Nanofibre (deux dimensions nanométriques) : nanotube, nanofilament ou nanobâtonnet. La longueur supérieure à 100 nm est en général comprise entre 500 nm et 10 μm et le rapport de cette longueur sur le diamètre à l'échelle nanométrique est supérieur à 3.
- Nanopoudre (trois dimensions nanométriques) : nanoparticules plus ou moins sphériques.

Les nano-objets sont donc classés selon la figure 1 ci-dessous :

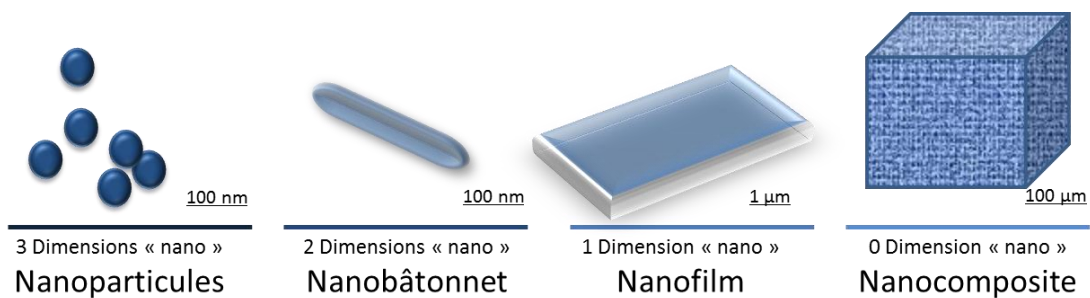


Figure 1 – La classification des nano-objets selon leur degré de dimension nanométrique.

Du point de vue de la taille, les nanoparticules se situent sur l'échelle du monde vivant entre l'hélice d'ADN (diamètre 2 nm) et un virus (diamètre 100 nm) comme montré dans la figure 2 ci-dessous :

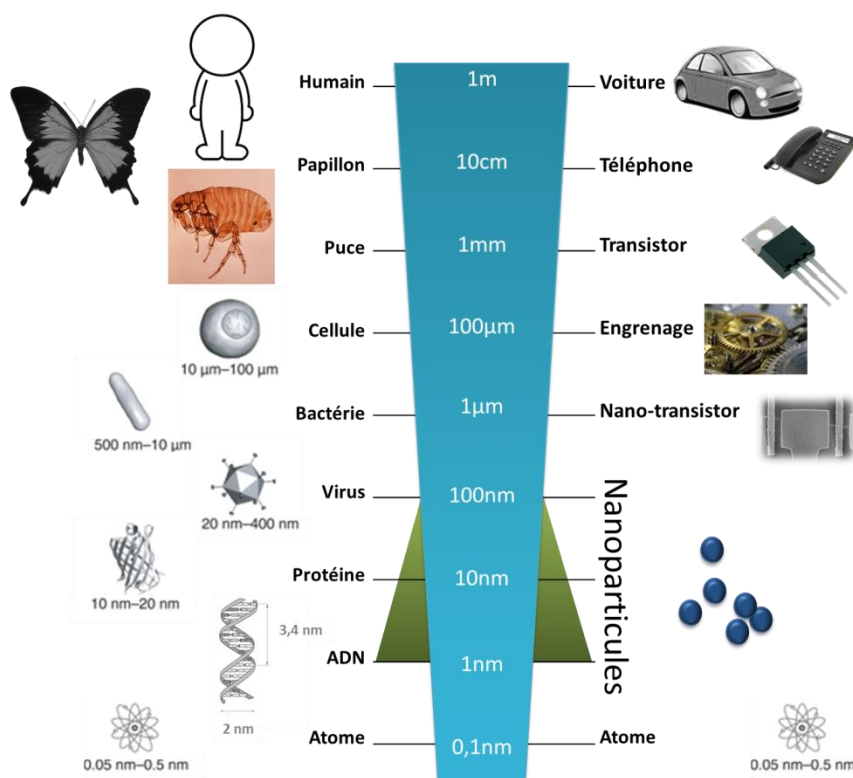


Figure 2 – Situation des nanoparticules par rapport à l'échelle de taille du vivant et des technologies (librement inspiré d'Invitrogen).

I.1.2. Les modes de production des nano-objets

Les nano-objets peuvent être obtenus par une approche ascendante (bottom-up), un assemblage atome par atome, ou par une approche descendante (top-down), une déstructuration d'un matériau massif par attaque physique ou chimique. Ces deux approches sont représentées dans la figure 3 :

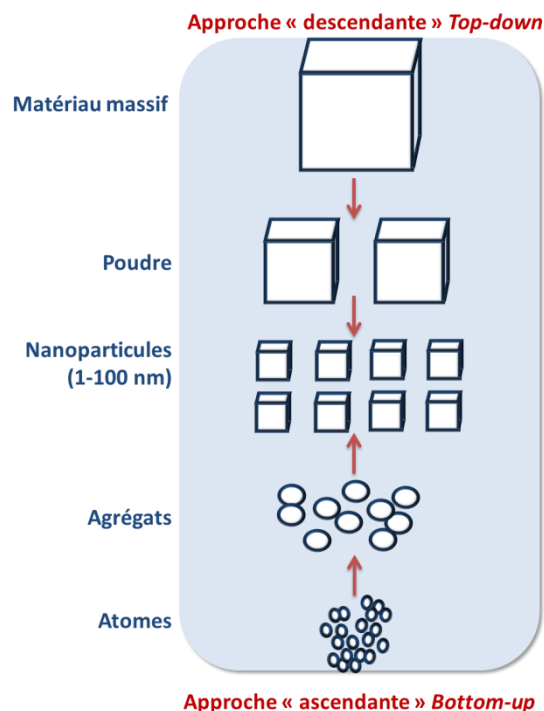


Figure 3 - Approches d'élaboration des nano-objets manufacturés (librement inspiré de l'INRS).

Ces deux approches regroupent à l'échelle industrielle plus de 29 procédés pour la production de nano-objets (Busnaina, 2007). Ils peuvent être séparés en cinq grands types de production selon les procédés physiques, chimiques et mécaniques utilisés (Aitken, 2004) :

- 1) Les procédés physiques par évaporation/condensation en phase gazeuse basés sur une nucléation de vapeur sursaturée suivie d'une croissance de particules par condensation, coagulation et capture. Ils regroupent entre autres : la pyrolyse laser, la pyrolyse de flamme, l'évaporation à haute température et les synthèses dans un plasma (plasma de micro-ondes, plasma thermique),
- 2) Les dépôts physiques en phase vapeur (PPV ou PVD pour l'anglais Physical Vapor Deposition),
- 3) Les procédés chimique par réactions et précipitations en milieu liquide et en milieu solide (la plupart des métaux et oxydes), les procédés sol-gel (la plupart des polymères) en micro-émulsion (le solvant permet la formation de micelle encapsulantes où va se produire la polymérisation en chaîne), les fluides super-critiques avec réaction chimique,
- 4) Les dépôts chimiques en phase vapeur (CPV ou CVD pour l'anglais Chemical Vapor Deposition),
- 5) Les procédés mécaniques par attrition (torsion, friction, laminage) qui consistent en une réduction mécanique de la taille du matériau à l'aide de frottements et d'impacts à haute énergie.

Les procédés 1), 2), 3) et 4) sont des approches ascendantes et le procédé 5) est une approche descendante. Les deux types d'approche tendent à converger en termes de dimension des objets synthétisés. Cependant, l'approche descendante permet une production en quantité intéressante pour l'industrie que permet difficilement l'approche ascendante. Pour autant, l'approche ascendante permet la fabrication d'une plus grande diversité d'architectures, souvent un meilleur contrôle de l'état nanométrique (tailles et distributions granulométriques relativement monodisperses, positionnement des molécules, homogénéité des produits) et ainsi un meilleur contrôle des propriétés de la matière à cette échelle (Ostiguy *et al.*, 2006b).

I.1.3. Les propriétés nanométriques

Lorsqu'une particule est à l'échelle micro ou macroscopique, ses propriétés physiques et chimiques découlent du matériau qui la constitue. Le passage de la matière à des dimensions nanométriques, comme une rugosité ou une porosité nanométrique du matériau, augmente fortement la surface spécifique de l'objet, c'est-à-dire l'aire superficielle par gramme de solide. Ainsi, le nombre d'atomes en surface d'un nano-objet est bien plus important que pour des objets plus grands. De plus, comme le montre la figure 4, à l'échelle nanométrique, le taux d'atomes en surface par rapport au nombre total d'atomes augmente lorsque la taille du nano-objet diminue : par exemple, une nanoparticule de 10 nm de diamètre comporte environ 2 500 atomes dont 30% à sa surface tandis qu'une nanoparticule de 1 nm de diamètre comporte environ 50 atomes dont 90% en surface. Or, ce sont principalement les atomes présents en surface des objets qui interagissent avec l'environnement lors des réactions chimiques engendrées.

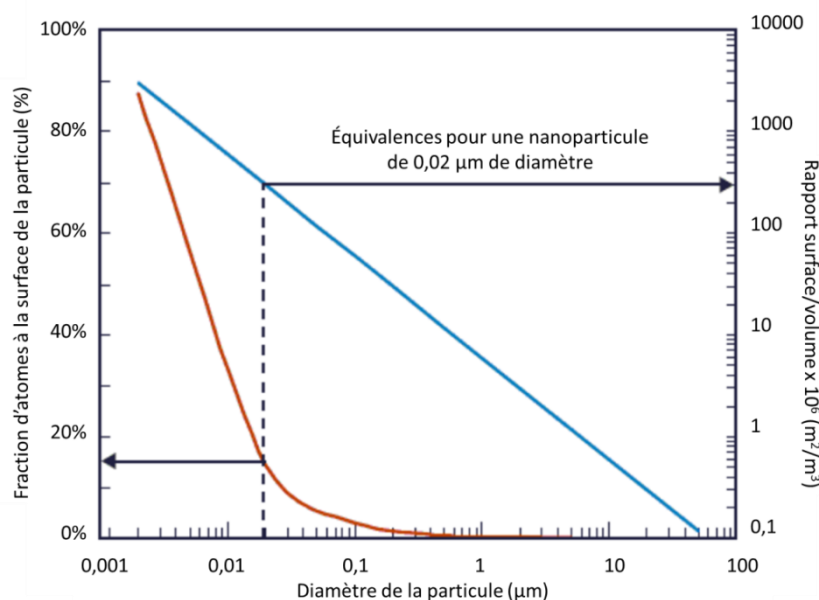


Figure 4 – Pour une particule sphérique : rapport surface/volume (en bleu) et fraction des atomes présents en surface de la particule (en rouge) en fonction du diamètre de la particule (D'après INRS - Particules ultra-fines et santé au travail - Caractéristiques et effets potentiels sur la santé).

Par conséquent, à l'échelle nanométrique, l'énergie d'activation même du nano-objet, c'est-à-dire la quantité d'énergie à apporter à un composé d'une masse donnée pour provoquer une réaction, est diminuée donc sa réactivité chimique, physique et thermique est augmentée. Cela confère des propriétés remarquables à la matière (Lidén, 2011).

Par exemple l'or, connu pour être inerte sous forme micrométrique, est un catalyseur à l'échelle nanométrique (Zhang *et al.*, 2013). De même une solution de nanoparticules de silice peut servir d'interface d'adhésion à des matériaux de type gélatineux (Rose *et al.*, 2014) et le nano-argent est un agent anti-bactérien (Markowska *et al.*, 2013). Toutes les familles de matériaux (métaux, céramiques, oxydes magnétiques, carbones, etc.) voient leurs propriétés chimiques modifiées, ainsi les connaissances de la matière établies à l'échelle micrométriques ne sont pas transposables à l'échelle nanométrique.

I.2. Applications industrielles des nano-objets

De ces nouvelles propriétés découlent les innovations potentielles des nanotechnologies : matériau à résistance à la traction augmentée, matériau imperméable aux gaz, matériau autonettoyant, aérogel super-isolant...

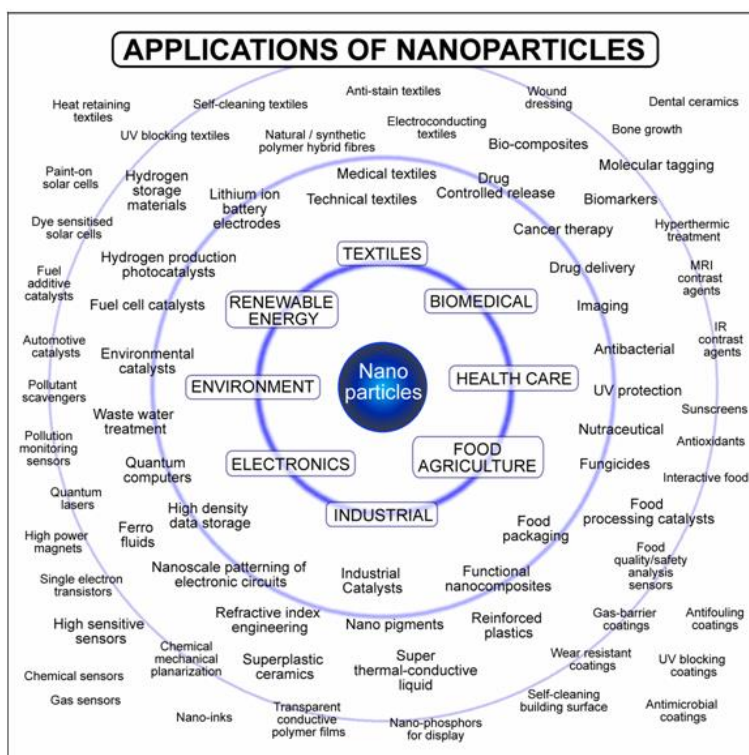


Figure 5 - Secteurs industriels utilisant des nano-objets (D'après Tsuzuki, 2009).

Comme représenté dans la figure 5, l'ensemble des secteurs industriels (électronique, énergie renouvelable, biomédical...) tente d'en tirer profit et de nouveaux secteurs à l'interface entre plusieurs disciplines émergent, comme par exemple les textiles médicaux, matelas nano-alvéolés ou le packaging alimentaire intelligent.

I.2.1. Les secteurs de pointe

Le premier secteur à s'approprier le nanomonde est l'électronique, car les nanotechnologies vont permettre de miniaturiser au plus fin des composants élémentaires comme les transistors. Cependant, aux nouvelles propriétés s'ajoutent de nouvelles contraintes. Ainsi, sous la limite des 100 nm, les ingénieurs sont confrontés à la difficulté inhérente à l'utilisation d'objets aux propriétés plus quantiques que macroscopiques (« fuite » des particules de leur transistor par exemple) (Goldhaber-Gordon *et al.*, 1997).

D'autre part, des applications liées à l'environnement sont également envisagées pour augmenter l'autonomie des voitures électriques grâce à des nanoparticules de phosphate de fer lithié (Bruce *et al.*, 2008), pour retenir les principes actifs dissous dans les eaux usées grâce à des membranes de filtration contenant des nanoparticules d'oxyde de zinc (Li *et al.*, 2008), ou encore pour accroître l'efficacité des cellules photovoltaïques des panneaux solaires grâce aux nanoparticules de dioxyde de titane (Barolo *et al.*, 2013).

En outre, bien qu'il soit difficile de savoir ce qu'il en est exactement à travers le monde, les gouvernements investissent lourdement dans le secteur des nanotechnologies pour la Défense. Par exemple en 2010, le Ministère de la Défense américain a versé plus d'un quart du budget alloué par son gouvernement (soit environ 436 millions de dollars) dans les nanotechnologies. L'arsenal nanotechnologique potentiel serait, à court terme, très diversifié, allant des caméras multi-spectrales aux détecteurs chimiques, en passant par des blindages de véhicules plus performants et des armures aux propriétés de résistance inégalées (Politique et Objectifs Scientifiques, Edition 2010, Orientations 2011-2012, Direction générale de l'armement).

D'autres exemples d'applications actuelles des nano-objets sont répertoriés dans le tableau 1 ci-dessous, cette liste n'est pas exhaustive, car de nouvelles propriétés des éléments nanoparticulaires sont encore à découvrir :

I.2.1. Les enjeux financiers des nanotechnologies

Le budget et les ressources humaines consacrés aux nanotechnologies sont en pleine expansion : le marché mondial des nanotechnologies est estimé à 3 milles milliards de dollars d'ici 2015 d'après une analyse du *Global industry analyst* et, il augmenterait de 25% tous les trois ans d'après le *World Nanotechnology Market* selon les données présentées dans la figure 6 (Hullmann, 2006).

En particulier, pour la recherche en nanotechnologies, l'Europe a investi 3,5 milliards d'euros entre 2007 et 2013 dans le cadre du 7^{ème} Programme-Cadre de Recherche et de Développement (PCRD).

Tableau 1 - Exemples d'applications actuelles des nanomatériaux (INRS 2012) :

SECTEUR D'ACTIVITE	EXEMPLE D'APPLICATIONS ACTUELLES ET POTENTIELLES
Automobile, aéronautique et aérospatial	Matériaux renforcés et plus légers, peintures extérieures avec effet de couleur plus brillantes, anti-rayures, anti-corrosion et anti-salissures. Capteurs optimisant les performances des moteurs, détecteurs de glace sur les ailes d'avion, pneumatiques plus durables et recyclables. Additifs pour diesel permettant une meilleure combustion...
Electronique et communication	Mémoire à haute densité et processeurs miniaturisés, cellules solaires, bibliothèque électronique de poche, ordinateurs ultra-rapides, technologie sans fil, écrans plats et souples...
Agroalimentaire	Emballages actifs, additifs tels que les colorants, anti-agglomérants et émulsifiant innovants...
Chimie et matériaux	Pigments, charges, inhibiteurs de corrosion, catalyseurs multifonctionnels, revêtements antibactériens et ultra résistants...
Construction	Ciments autonettoyants et antipollution, vitrage antisalissure. Peintures, vernis et colles innovants...
Pharmacie et santé	Médicaments et agents actifs, surfaces adhésives médicales anti-allergènes, médicaments sur mesure délivrés spécifiquement, surfaces biocompatibles pour implants. Vaccins et imagerie innovants...
Cosmétique	Crèmes solaires transparentes, pâte à dentifrice abrasive, maquillage de meilleure tenue...
Energie	Nouveaux types de batteries, fenêtres intelligentes, matériaux isolants plus efficaces...
Environnement et écologie	Diminution des émissions de dioxyde de carbone, production d'eau ultra pure à partir d'eau de mer, pesticides et fertilisants plus efficaces et moins dommageables...
Défense	Systèmes de surveillance miniaturisés, systèmes de guidage précis, textiles légers et protecteurs se réparant eux-mêmes...

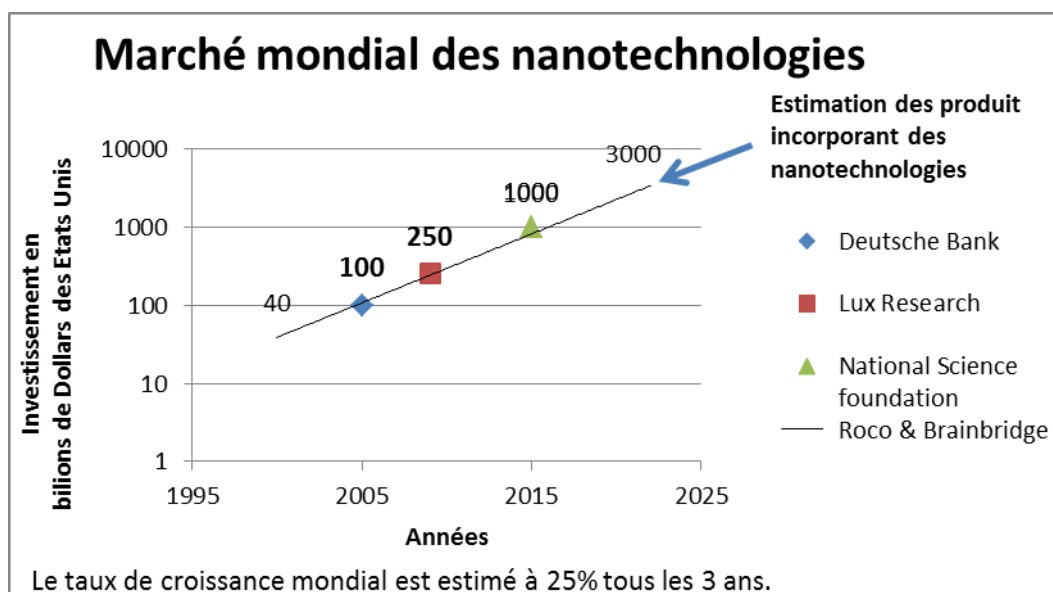


Figure 6 – Les enjeux financiers des nanotechnologies (D'après Roco, 2011).

I.2.3. Le marché des nanotechnologies

Les nano-objets ouvrent le champ à de nouvelles propriétés mais également à l'amélioration des propriétés existantes, à la miniaturisation et au remplacement des matériaux réduisant *in fine* l'encombrement et donc le coût. Ainsi, de nombreux nano-produits sont déjà présents sur le marché.

Le *Project on Emerging Nanotechnologies* (PEN) du *Woodrow Wilson Institute* en collaboration avec le *Virginia Tech Center for Sustainable Nanotechnology* estime à 1628 le nombre de nano-produits commercialisés dans le monde en 2013, dont 440 au niveau européen et 32 en France. La figure 7 montre leur répartition par secteurs industriels pour le marché mondial. Cependant, ces chiffres sous-estiment le marché des nanotechnologies, car l'étiquetage des nanomatériaux n'est pas obligatoire pour le moment.

Par comparaison, un précédent inventaire réalisé conjointement par le *Bureau Européen des Unions de Consommateurs* (BEUC) et l'*Association européenne pour la coordination de la représentation des consommateurs dans la normalisation* (ANEC), estimait déjà en 2010 à 475 le nombre de produits de consommation présents sur le marché européen soit un nombre de produits plus important que les 440 répertoriés par le PEN en 2013.

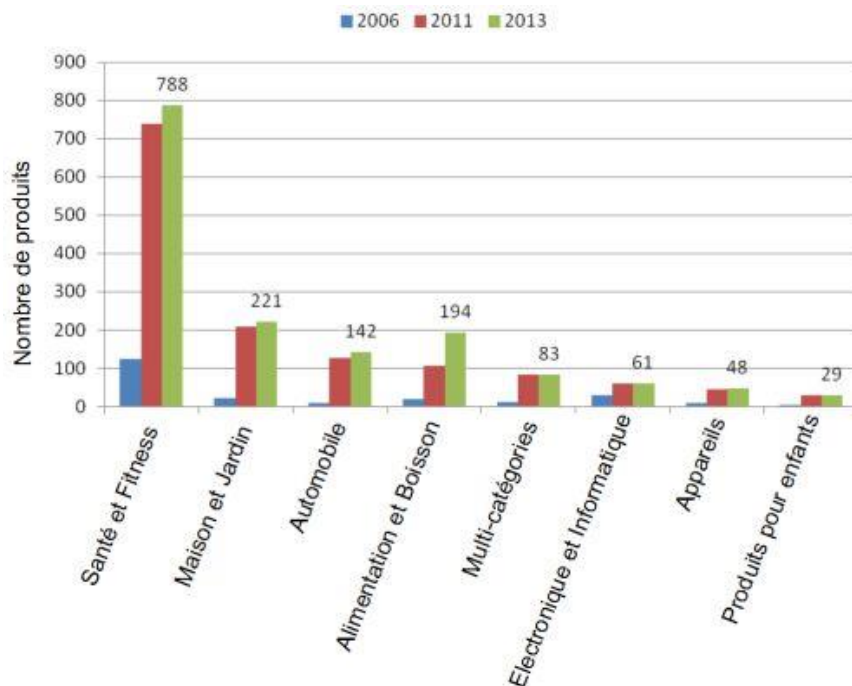


Figure 7 – Nombre de nano-produits sur le marché mondial classés par domaines d'applications (Project on Emerging Nanotechnologies).

Après une première initiative uniquement française du Ministère de l'Ecologie, le Parlement européen a mis en place de nouvelles règles pour l'étiquetage de produits commercialisés comportant des substances à l'état nanoparticulaire. Cependant, ces règlements ne s'appliquent qu'à quelques catégories de produits seulement : règlement pour les cosmétiques (obligatoire depuis juillet 2013), règlement pour les biocides (obligatoire depuis septembre 2013), règlement INCO pour l'alimentation (obligatoire à partir de décembre 2014). De plus, chacune de ces trois catégories a redéfini de manière hétérogène les notions associées aux « nanomatériaux ». En outre, ces règlements sont limités par de nombreuses dérogations comme par exemple le fait que les substances déjà utilisées sous forme nanométrique depuis plusieurs dizaines d'années ne doivent pas nécessairement être stipulées sur l'étiquette du produit commercialisé.

La France est également le premier pays à s'être doté d'un registre des nanomatériaux, commercialisés ou utilisés en laboratoires de recherche, présents sur son territoire : *la déclaration annuelle des substances à l'état nanoparticulaire* (Selon le Décret n° 2012-232 du 17 février 2012 relatif à la déclaration annuelle des substances à l'état nanoparticulaire pris en application de l'article L. 523-4 du code de l'environnement). Mais l'ensemble des données de ce registre, traité par l'ANSES sous le nom *R-nano*, n'est pas encore accessible au public, et beaucoup resteront confidentielles au nom du respect du secret industriel ou commercial. Néanmoins, une publication d'informations partielles a été officiellement présentée fin novembre 2013 par le Ministère de l'Ecologie, du Développement durable et de l'énergie (rapport ANSES, *Éléments issus des déclarations des substances à l'état nanoparticulaire*, publié en novembre 2013) :

Tableau 2 - Catégories de substances produites et/ou importées en France en plus grande quantité (plus de 100 tonnes) (D'après « Éléments issus des déclarations des substances à l'état nanoparticulaire », R-Nano novembre 2013) :

MASSE PRODUITE ET/OU IMPORTEE EN Kg	NOM CHIMIQUE
274837135	Noir de carbone / C
155071912	Dioxyde de silicium/silice amorphe / SiO ₂
34501525	Carbonate de calcium / CaCO ₃
14321466	Dioxyde de titane / TiO ₂
2193565	Oxyde d'aluminium / Al ₂ O ₃
1568000	Copolymère de chlorure de vinylidène / (C ₂ H ₃ Cl) _n
780661	Jaune d'oxyde magnétique de fer / Fe ₂ O ₃ .H ₂ O
492000	Acide silicique, sel d'aluminium et de sodium / (Si(OH) ₄), NaAl ₃ H ₁₄ (PO ₄) ₈ .4H ₂ O
287695	Oxyde de zinc / ZnO
208979	2,2'-[(3,3'-dichloro[1,1'-bisphényle]-4,4'-diyl)bis[N-2,4-diméthylpjenyl]-3-oxobutyramide]
173641	Trioxyde de fer / Fe ₂ O ₃
150584	Pyrrolo(3,4-C)pyrrrole-1,4-dione,2,5-dihydro-3,6-diphényl
141232	2-[(2-méthoxy-4-nitrophényl)azo]-N-(2-méthoxyphényl)-3-oxobutyramide
138100	2-propénoate, 2-méthyl-méthyl ester polymère avec 1,3-butadiène, butyl, 2-propénoate et éthénylbenzène
138000	Pyrrolo[3,4-C]purrole-1,4-dione, 3,6-Bis([1,1'-Biphényl]-4-yl)-2,5-dihydro]
136500	Hydroxyde d'aluminium
134740	4,4'-diamino[1,1'-biantracène]-9,9',10,10'-tétranone
107796	Dioxyde de cérium / CeO ₂

Le registre R-Nano révèle en France la présence d'au moins 282 014 tonnes produites de substances nanoparticulaires et de 222 090 tonnes importées. Suite à la publication du registre français, la Commission Européenne, sollicitée depuis 2009 à ce sujet par le Parlement ainsi que la BEUC et l'ANEC, a lancé une consultation publique pour la mise en place d'un registre étendu à toute l'Europe.

I.3. Les nanoparticules à application directe sur l'homme

Le registre R-Nano présenté ci-dessus, s'intéresse également aux substances à l'état nanoparticulaire pour des domaines tels que la pharmacologie et la médecine. Pour ces domaines l'utilisation des

nanotechnologies implique la mise en contact volontaire de nano-objets avec l'organisme humain, ce qui entraîne un développement plus lent. Cependant, la nanomédecine possède un énorme potentiel en terme d'approches ciblées (Santhosh et Ulrich, 2013).

I.3.1. Les différentes approches

Avec l'évolution des modes de vie et le vieillissement de la population, les maladies comme les affections neurologiques (maladie d'Alzheimer), hépatiques (diabète), cardiaques, et plus encore les cancers, constituent des problèmes croissants de santé publique. Actuellement, les traitements efficaces n'ont pas encore été mis au point et les nanotechnologies constituent une piste certaine pour améliorer la thérapie ciblée et le diagnostic précoce de ces maladies (Boisselier et Astruc, 2009).

I.3.1.1. Les approches thérapeutiques

La vectorisation des médicaments par les nanoparticules a pris un essor considérable ces dernières années. A titre d'exemple, plusieurs nano-vecteurs de la société Cerulean Pharma (en essais cliniques depuis 2013) sont utilisés contre les cancers rectaux ou le cancer du poumon (Gaur *et al.*, 2014), et le Doxil® est un liposome contenant de la doxorubicine utilisé pour le traitement du cancer avancé de l'ovaire (Wright *et al.*, 2006).

Outre la délivrance de principes actifs et d'agents thérapeutiques biologiques de manière ciblée dans la zone à traiter, comme pour les thérapies géniques, les nanoparticules peuvent être utilisées pour d'autres types de thérapies : la radiothérapie (par transport d'une source radioactive), la thermothérapie (par transport d'une source d'énergie à activation magnétique) ou encore la thérapie photodynamique (par transport d'agents photosensibilisateurs à forte propriété oxydante) (Kong *et al.*, 2013 ; Leung *et al.*, 2013 ; Teng *et al.*, 2013). L'utilisation de nanoparticules permet alors de concentrer le traitement, comme par exemple, les nanoparticules NanoXray à base de dioxyde de hafnium développées par Nanobiotix® (en essais cliniques depuis 2012) qui permettent d'amplifier l'effet létal des rayons ionisant dans la tumeur sans nécessiter une augmentation de la dose de rayon X traversant les tissus sains.

I.3.1.2. Les approches diagnostiques

Les nanoparticules permettent d'améliorer l'imagerie médicale en terme de précision et de puissance du signal, mais également de sécurité du patient. En effet, les nanoparticules peuvent être marquées par des fluorophores et colorants ou présenter des propriétés de résonance magnétique ou radioactive (Choi *et al.*, 2007). Par exemple des nanoparticules de silice imprégnés de colorant organique fluorescent (Cornell-dots® en essais cliniques depuis 2011), et des nanoparticules d'oxyde de fer (Sinerem® ou Clariscan®) ou contenant du gadolinium (Gadomer® de Schering) qui induisent des champs magnétiques locaux.

I.3.1.3. Les approches théranostiques

Les nanoparticules permettent aussi de développer des approches combinées diagnostiques et thérapeutiques, dites « théranostiques » (Sumer et Gao, 2008 ; Choi *et al.*, 2012). En effet, des matériaux présentant des propriétés intrinsèques d'agent d'imagerie (quantum dot semi-conducteurs, QDs, oxyde de fer superparamagnétique, SPIONs, et nanoparticules d'or) peuvent être combinés à des agents traitant. Par exemple l'équipe de Roy a développé des nanoparticules d'ormosils pour la thérapie photodynamique en encapsulant l'agent anti-cancéreux 2-devinyl-2-(1-hexyloxyethyl) pyropheophorbide dans une nanoparticules de silice contenant de l'eau, ce qui permet à la substance traitante d'émettre une fluorescence détectable (Roy *et al.*, 2003).

I.3.2. Les types de ciblage

A une taille micrométrique l'administration des suspensions pharmaceutiques par voie intraveineuse peut entraîner des risques d'embolie. A l'opposé, la conception de suspensions nanoparticulaires permet de les adresser de manière spécifique vers les sites de lésions (Chandolu et Dass, 2013). Cet acheminement peut résulter de deux types de ciblage : passif ou actif.

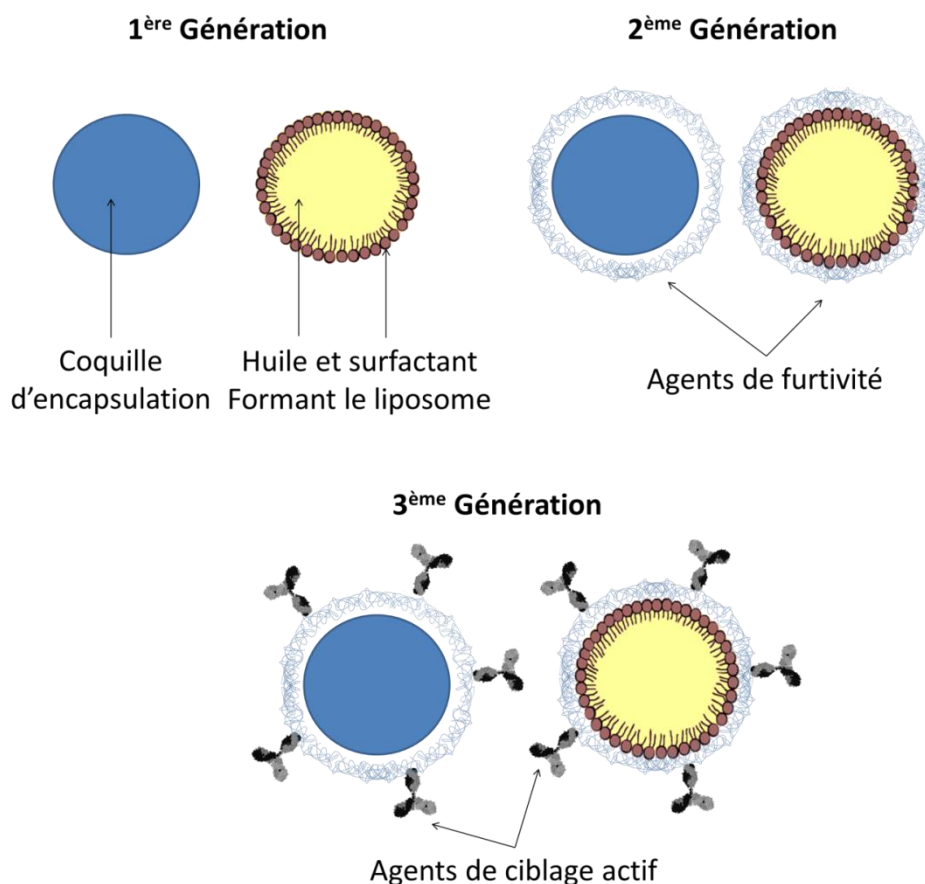


Figure 8 - Evolution des caractéristiques de surface des nano-vecteurs entre les trois différentes générations de nanomédicaments, exemple des coquilles d'encapsulation et des liposomes.

1.3.2.1. Le ciblage passif par les nanovecteurs de première génération

Le ciblage passif est principalement valable en oncologie et résulte de l'effet de perméabilité et de rétention tissulaire spécifique des zones tumorales (appelé effet « EPR » pour Enhanced Permeability and Retention effect). En effet, la vascularisation modifiée des zones tumorales permet l'entrée passive des nanoparticules à forte rémanence vasculaire en raison de leur petite taille (Papahadjopoulos *et al.*, 1991). De plus, l'élimination des nanoparticules de ces zones est limitée car le drainage lymphatique y est altéré. En outre, il a été montré que l'adressage de nanomédicaments par effet « EPR » est également possible dans d'autres pathologies, comme l'encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE) (Calvo *et al.*, 2002) et l'uvéite auto-immune (de Kozak *et al.*, 2004). La première génération de nanomédicaments regroupe ainsi les simples nano-colloïdes stables en milieu aqueux et présentant une faible capacité d'élimination par le système rénal.

1.3.2.2. Le ciblage passif par les nanovecteurs de deuxième génération

Toutefois, la rémanence vasculaire des nanoparticules est généralement limitée par le processus d'« opsonisation ». En effet, les éléments exogènes, potentiellement pathogènes, subissent un marquage biochimique passif par adsorption de protéines, dites opsonines, à leur surface. Ces corps sont alors reconnus comme « étrangers » par les cellules phagocytaires dotées de récepteurs pour les opsonines. De ce fait, ces particules vont être prises en charge par les macrophages du système immunitaire dans les zones spécifiques où ils ont été activés. Ce phénomène d'opsonisation peut être limité par l'ajout de groupements à la surface de la nanoparticule augmentant la gêne stérique et empêchant ainsi l'adsorption de protéines à sa surface. Ainsi, la deuxième génération de nanomédicaments est caractérisée par l'ajout d'agents de furtivité à la surface du nanovecteur comme par exemple des polymères tel le PEG (polyéthylène glycol). Le PEG présente de nombreux avantages car il est biocompatible, soluble en milieu aqueux, et peu toxique. De plus, il est autorisé par la *Food and Drug Administration* (FDA) pour l'injection chez l'homme.

1.3.2.3. Le ciblage actif par les nanovecteurs de troisième génération

La troisième génération de nanomédicaments permet un ciblage actif grâce à la fixation, sur l'enveloppe extérieure de la nanoparticule, de molécules de reconnaissance telles que des anticorps spécifiques de la pathologie. Ainsi ces nanoparticules permettent par exemple la visualisation spécifique de tumeurs et par conséquent des diagnostics précoces et précis. Ce type de ciblage implique d'utiliser un matériau constitutif de la nanoparticule permettant de fixer facilement et de manière durable la molécule d'adressage. Un des matériaux pressentis est la silice amorphe.

I.4. La silice amorphe à l'état nanoparticulaire

I.4.1. Le classement R-nano de la silice amorphe

Les nanoparticules de silice amorphe occupent la deuxième position du registre R-Nano pour la quantité la plus importante de substances à l'état nanoparticulaire agréées présentes en France (avec plus de 155 000 tonnes présentes dans les céramiques et les peintures mais aussi dans les produits alimentaires...), derrière le noir de carbone (plus de 270 000 tonnes présentes dans des articles électroniques, des produits cosmétiques, l'encre ou les toners et l'agriculture...) et devant le carbonate de calcium (plus de 30 000 tonnes présentes dans le bâtiment et l'automobile mais aussi dans la sylviculture...) et le dioxyde de titane (plus de 10 000 tonnes présentes dans les solvants chimiques aux services de santé en passant par les plastiques et les parfums...).

I.4.2. Le matériau silice amorphe

D'origine synthétique (à l'exception de la terre de diatomée), la silice amorphe, un matériau inorganique, présente une forte stabilité chimique (inertie indépendante du pH et de la température et faible solubilité dans l'eau), une bonne résistance à de fortes températures et une conductivité élevée (Asefa et Tao, 2012). La silice amorphe est notamment utilisée dans le monde entier comme charge de renforcement pour le caoutchouc, comme agent épaississant dans des systèmes liquides de revêtement, les adhésifs ou les encres d'imprimerie (Ferch et Toussaint, 1996). De plus, en raison de sa haute pureté, la silice amorphe est également largement utilisée pour des applications directes sur l'organisme humain. Par exemple comme support ou agent libre pour de nombreuses applications pharmaceutiques et comme anti-agglomérants alimentaires, et en particulier pour des applications biomédicales comme des comblements dentaires, des cathéters, des biocapteurs et des substituts osseux (Auffinger *et al.*, 2013 ; Colilla *et al.*, 2008 ; Vallet-Regi et Balas, 2008).

De plus, la toxicité des silices amorphes de synthèse demeure faible, contrairement à celle des silices cristallines. Il n'existe en effet pas d'indication d'un pouvoir silicogène pour les silices amorphes industrielles (McLaughlin *et al.*, 1997). Actuellement, d'après le centre international de recherche sur le cancer il n'y a pas de conclusion épidémiologique avérée sur la silice amorphe.

I.4.3. Les nanoparticules de silice amorphe

Par conséquent, la silice est un matériau de choix pour le développement des nano-objets. De plus, des études *in vivo*, comme celle de Borak *et al.*, ont montré que des nanoparticules de silice amorphe injectées dans la circulation sanguine de rats peuvent se dissoudre dans l'organisme et être éliminées en grande partie par les urines, malgré quelques phénomènes de biopersistance mineurs dans les reins et les poumons (Borak *et al.*, 2012). Ainsi, la nanosilice est déjà utilisée comme antiagglomérant, dans les produits alimentaires en poudre tels que le sel et le sucre, ou comme agent fluidifiant, dans les sauces industrielles, sous la forme de l'additif E551. Elle est également présente, comme anti-UV

ou nano-abrasif pour les pâtes dentifrices et les cosmétiques de certaines formulations contenant de l'acide silicique (Maynard *et al.*, 2006).

Les nanoparticules de silice (SiO_2) dont la surface est chargée négativement et majoritairement hydrophile est essentiellement constituée de groupements silanes (silanols SiOH , partiellement déprotonés SiO^- à pH physiologique). De plus, la silice est idéale pour la synthèse de nanoparticules modèles. En effet, il est possible de synthétiser chimiquement des particules de silice amorphe de différentes tailles grâce à différentes méthodes comme la méthode de Stöber, avec l'ammoniac comme catalyseur (Stöber *et al.*, 1968), et l'adaptation de Schulman en microémulsions inverses, avec un microréacteur aqueux (« water in oil ») (Schulman *et al.*, 1959). En outre, à partir de ces particules de silice il est possible de fonctionnaliser à façon leur surface par un très grand nombre de réactifs organosilanes. Ainsi, des particules de silice peuvent être fonctionnalisées en surface par des groupements chimiques tels que les fonctions carboxyliques ou amines qui permettent de développer des solutions colloïdales stables de charge globale négative ou positive. De cette manière, il est possible de développer des nanoparticules « à façon » présentant des caractéristiques physico-chimiques d'intérêt bien définies et contrôlées afin d'en évaluer l'impact biologique.

La présence croissante des nanoparticules notamment pour des usages domestiques, nécessite de s'interroger sur leurs effets biologiques et leur toxicité potentielle. En particulier pour les nanoparticules de silice amorphe, car de récentes études menées sur des produits du commerce contenant l'additif E551 ont permis d'isoler les nanoparticules et de confirmer leur effet cytotoxique sur des lignées issues de fibroblastes de poumon humain (WI-38) (Athinarayanan *et al.*, 2014)

Les nanotechnologies, rendues possibles par l'évolution d'un ensemble de technologies de pointes, sont liées à l'essor actuel des secteurs de l'innovation et s'avèrent prometteuses dans le secteur médical. En conséquence leur utilisation est en expansion, notamment pour les nanoparticules synthétiques de silice amorphe. Cependant, favoriser leur utilisation nécessite d'en maîtriser en amont les effets sur l'Homme et l'environnement.

II. La nanotoxicologie

L'étude des effets biologiques des nanoparticules sur la santé de l'Homme et l'environnement, est nécessaire au développement des nanotechnologies. La nanotoxicologie, l'étude spécifique de la toxicité des nanomatériaux sur les systèmes vivants, poursuit deux buts : (1) le développement de modèle d'études pour connaître les facteurs influant sur la fréquence et la gravité des effets biologiques des nanoparticules et (2) la caractérisation de ces effets biologiques.

II.1. L'aspect environnemental et sanitaire des nanoparticules

II.1.1. L'origine des nanoparticules

Si le marché des nanotechnologies, définies comme un ensemble de procédés de fabrication et de manipulation de structures à l'échelle nanométrique, n'a fait son apparition que dans les années 1980, les nanoparticules non intentionnellement générées par l'Homme existent depuis toujours.

Ainsi, il existe trois classes de nanoparticules en fonction de leur provenance, résumées en figure 9 :

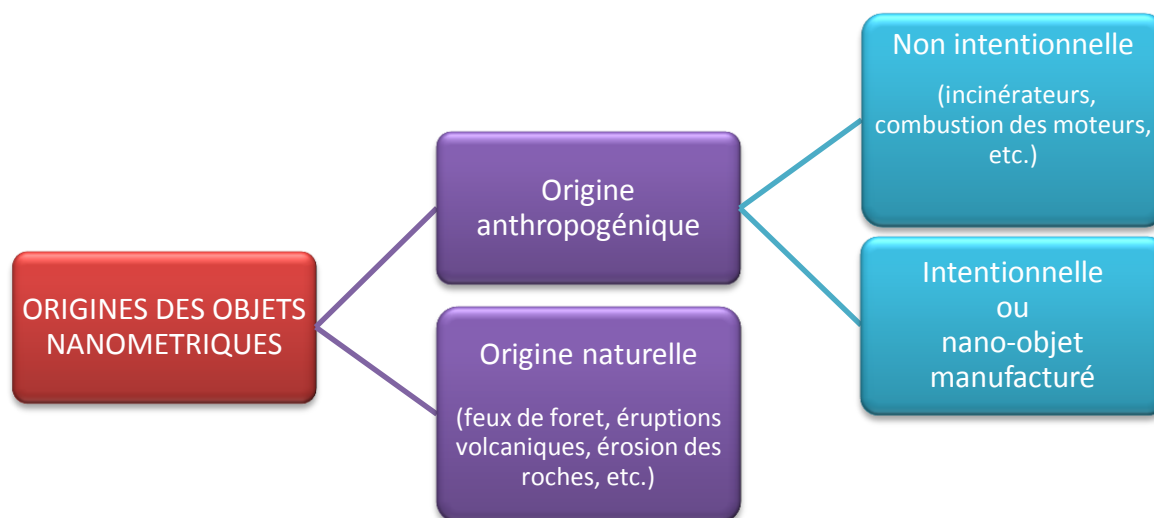


Figure 9 - Classement des nano-objets en fonction de leur origine de formation (librement inspiré de l'INRS).

- les nanoparticules d'origine naturelle résultent essentiellement des phénomènes de nucléation et de condensation des gaz et vapeurs dans l'atmosphère comme les fumées volcaniques, les incendies de forêt,
- les nanoparticules d'origine anthropogénique non-intentionnelle sont issues des procédés chauds tels que les fumées de soudage, la combustion des moteurs ou encore les activités industrielles,
- les nanoparticules d'origine anthropogénique intentionnelles se retrouvent sous la dénomination de nanoparticules manufacturées.

II.1.2. L'évaluation de la quantité des nanoparticules dans l'environnement

Outre la détermination de la provenance des nanoparticules, il est très difficile d'évaluer les quantités de nanoparticules auxquelles l'homme est exposé chaque jour. Or ces données d'exposition de l'homme sont cruciales pour évaluer les risques potentiels liés à la présence des nanoparticules dans l'environnement.

Les campagnes de mesures localisées prennent en compte des particules diverses dénommées PM10, PM2,5 et PM1 selon leur taille en micromètres (en anglais Particulate Matter, PM) et, plus récemment, les nanoparticules ou particules ultrafines PM0,1 (de taille 100nm) (Seaton et Donaldson, 2012).

Mais l'exposition d'un individu aux nanoparticules est dépendant d'autres facteurs mal connus tels que son environnement quotidien (urbain ou rural), sa profession (contact direct avec des produits contenant des nanoparticules volatiles comme les peintures...) et son hygiène de vie (tabagisme...). Des schémas d'expositions comme celui présenté en figure 10 apparaissent aujourd'hui incomplets.

Les premiers résultats des mesures montrent que dans un milieu relativement préservé tel qu'une zone rurale, chaque millilitre d'air contient environ 10 000 nanoparticules. Ce chiffre augmente dans les zones urbaines plus exposées. Les particules ultrafines ont en premier lieu été décelées dans les fumées des moteurs diesels et plus généralement au niveau du trafic urbain, chaque millilitre d'air pouvant contenir quelques centaines de milliers de nanoparticules (INERIS, 2012).

Mais les mesures réalisées sur l'environnement quotidien ne suffisent pas à caractériser le niveau d'exposition d'un individu, car l'essor des nano-objets a entraîné la production de plus en plus importante de nanoparticules manufacturées auxquels les travailleurs peuvent être directement exposés. Outre les travailleurs, les populations, en tant que consommateurs mais aussi en cas de dissémination non contrôlée des nanoparticules manufacturées dans l'environnement, sont elles aussi de plus en plus exposées. En effet, en milieu professionnel (usine de silice, minoterie, atelier de soudage, etc.) chaque millilitre d'air peut contenir plusieurs centaines de milliers de nanoparticules et la quantité de résidus de ces nanomatériaux, qui est relarguée dans l'environnement (lors de

l'extraction, la manipulation, l'utilisation des produits contenant les substances nanométriques, ou encore durant leur cycle de vie et jusqu'à leur incinération ou mise en décharge), est mal connue. Par exemple, en 2013, des chercheurs ont estimé qu'entre 63 et 91% des 300 000 tonnes de nanomatériaux manufacturés produits dans le monde en 2010 ont bien fini dans des décharges, le reste étant relargué dans les sols (8 à 28%), l'eau (de 0,4 à 7%), ou l'atmosphère (0,1-1,5 %) (Keller *et al.*, 2013).

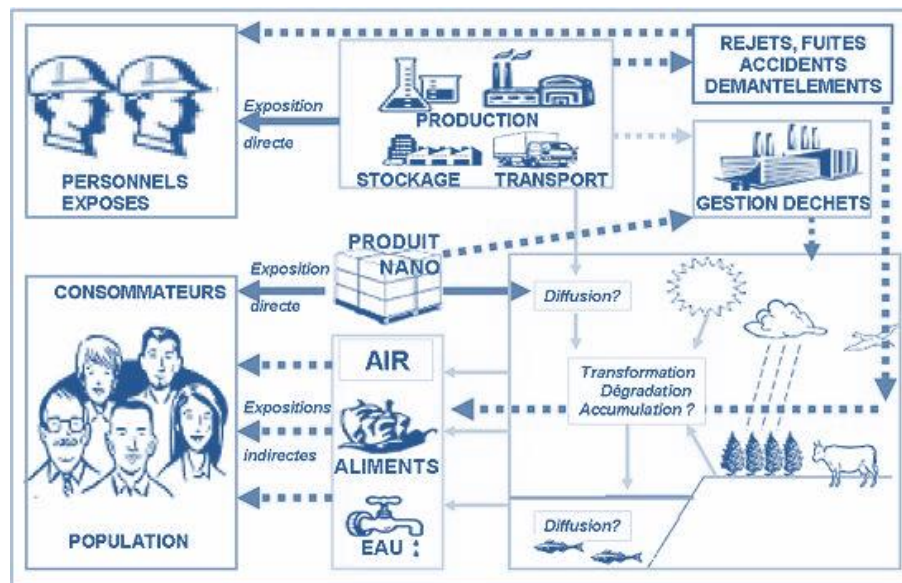


Figure 10 – Exposition aux nanomatériaux (D'après Nanosafe.org).

Par l'essor des nanotechnologies, l'homme est exposé à des doses de nanoparticules bien supérieures à celles du passé et à des nano-objets de compositions nouvelles par rapport à celles présentes naturellement.

II.2. Les effets biologiques des nanoparticules

II.2.1. La pénétration des nanoparticules dans l'organisme

L'ensemble des nanoparticules peut pénétrer l'organisme par trois voies : la voie respiratoire, la voie digestive et la voie cutanée. La voie respiratoire étant la plus fréquente, elle est par conséquent la plus étudiée (Hervé-Bazin, 2007). D'autre part, de l'inhalation de nanoparticules, découle la sollicitation de la voie digestive via l'appareil muco-ciliaire respiratoire (carrefour des voies aéro-digestives), car certaines particules inhalées passent dans le mucus, lui-même pris en charge par la voie digestive lors de la déglutition. De plus, des nanoparticules entrent dans la composition de

nombreux aliments, compléments alimentaires et médicaments que nous assimilons par voie digestive. La voie cutanée est sollicitée lors de l'utilisation de cosmétiques contenant des nano-objets, comme des crèmes solaires contenant des nanoparticules de dioxyde de titane, ou, plus rarement lors de contact entre la peau et une surface contenant des nano-objets libres.

Ces voies naturelles s'opposent aux voies intentionnelles comme les voies d'injections volontaires appliquées dans des cadres thérapeutiques et diagnostiques. D'autre part, les expositions aux nanoparticules peuvent être aiguës (forte concentration pendant un temps court) ou, et c'est le cas le plus fréquent, chroniques (faibles concentrations sur de longues durées). De manière générale les nanoparticules souvent non dégradées par les systèmes de défense de l'organisme y persistent et s'y accumulent. Ce phénomène, appelé biopersistence, peut être accompagné de migration des nanoparticules vers différents organes (Nune *et al.*, 2009). En effet, les nanoparticules ou particules ultrafines ont, du fait de leur taille, la faculté de franchir les barrières structurales fonctionnelles que sont les barrières épithéliales (alvéo-capillaires, gastro-intestinales ou hémato-encéphalique) pour passer dans la circulation sanguine générale - comme c'est aussi le cas pour beaucoup de nano-objets ou particules fines ($< 2,5 \mu\text{m}$) - et atteindre d'autres organes (Karmakar *et al.*, 2014 ; Oberdörster *et al.*, 2004). Par ce phénomène, appelé translocation, des matériaux de dimension inférieure à 300 nm peuvent ainsi se retrouver dans les cellules de tous les tissus comme présenté en figure 11 (Garnett et Kallinteri, 2006) et, pour les matériaux de dimension inférieure à 70 nm, jusque dans les noyaux des cellules où ils sont susceptibles d'être génotoxiques, c'est-à-dire susceptibles d'entraîner des dommages à l'ADN (mutations, cassures...) (Geiser *et al.*, 2005).

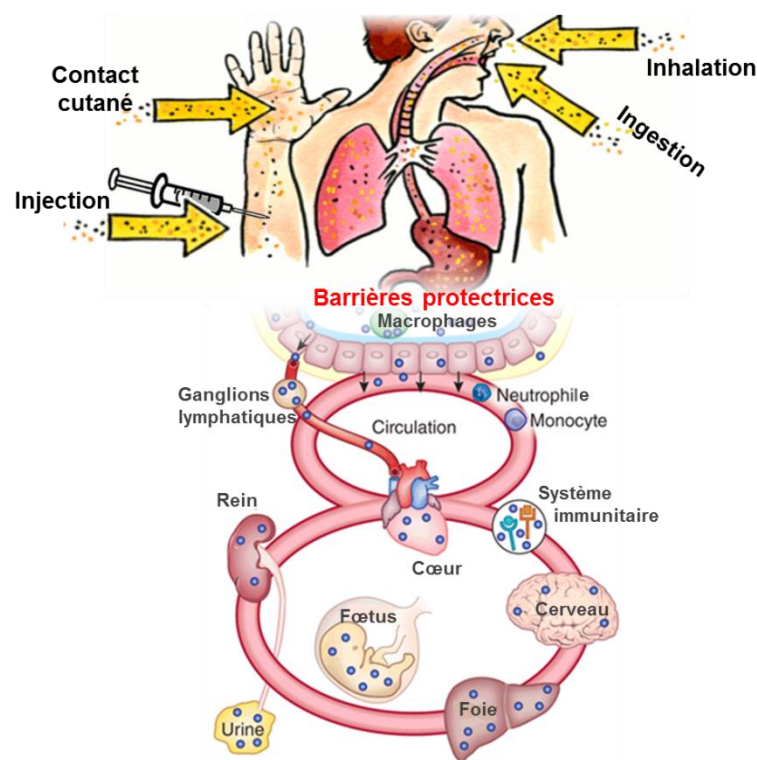


Figure 11 - Schéma représentant les différentes voies de pénétration des nanoparticules dans l'organisme humain conduisant à leur translocation vers différents organes (Librement inspiré de Vicari *et al.* 2010).

En complément de ces observations, des modèles mathématiques prédictifs, peuvent permettre d'établir la cartographie de dépôt des particules dans différentes régions du tractus respiratoire, comme présenté en figure 12. Cependant, ces modèles réalisés en fonction du diamètre aérodynamique des particules, ne prennent pas en compte les différences physiologiques (dépendantes du sexe, de l'âge, et de l'état de santé), qui influent sur la façon de respirer de l'individu, ni la forme de la particule, en général assimilée à une sphère pour permettre les calculs.

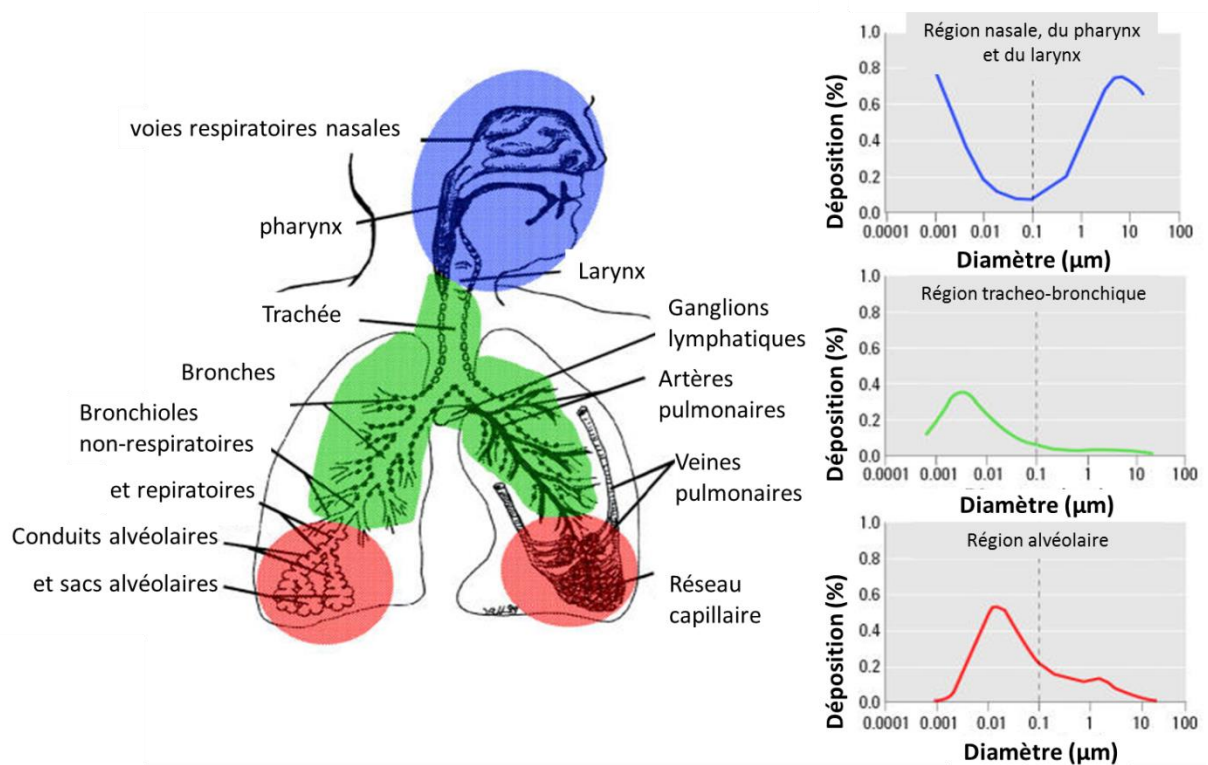


Figure 12 – Modèle prédictif de la déposition des nanoparticules dans les voies respiratoires en fonction de leur taille (Adapté de Oberdörster *et al.*, 2005).

II.2.2. Les pathologies liées à l'inhalation de particules

Des maladies pulmonaires plus ou moins graves, provoquées par l'inhalation de poussières de taille micrométrique (poussières de fer, de béryllium, de charbon, de silice cristalline type quartz, d'amiante), sont connues depuis longtemps notamment en milieu professionnel : pneumoconioses (asbestose et silicose par exemple), cancers broncho-pulmonaires ou de la plèvre (mésothéliome) (Ostiguy, 1979 ; Hayashi et Kajita, 1988 ; Hamilton *et al.*, 2008) (Gambelli *et al.*, 2004) Depuis une dizaine d'années, les données épidémiologiques permettent de penser qu'en raison de leurs dimensions nanométriques, les particules ultrafines et les nanoparticules manufacturées pourraient

également avoir une toxicité spécifique (Sayes *et al.*, 2007 ; Catelas *et al.*, 1999 ; Donaldson *et al.*, 2002).

En effet, pour un même volume de matière, le volume d'1 particule de 5 µm de diamètre équivaut à 12 500 nanoparticules de 100 nm de diamètre. Par extension cet ensemble de nanoparticules présentent une surface 50 fois plus grande que la surface de la seule microparticule, comme représenté dans la figure 13. En conséquence, les contacts avec les membranes et molécules biologiques sont plus importants dans le cas de nanoparticules, ce qui les rend beaucoup plus réactives.

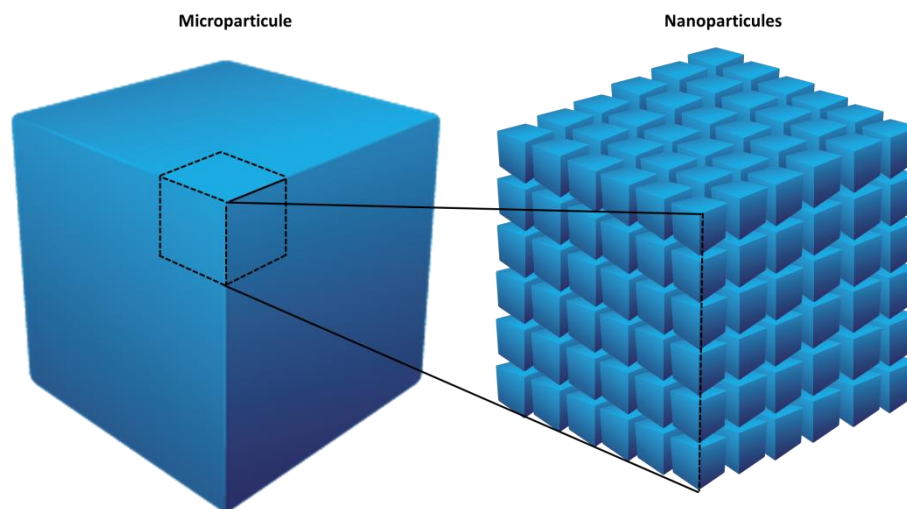


Figure 13 - Schéma représentatif de la relation taille/surface spécifique.

De plus, ces contacts, sources de radicaux libres, pourraient être en partie responsables de la toxicité des poussières ultrafines, qui possèdent un potentiel inflammatoire important, et ce également pour des poussières que l'on pensait être «inertes» ou biocompatibles (dioxyde de titane, silice amorphe...). Or, l'inflammation est à l'origine de nombreuses pathologies pulmonaires (emphysème, fibrose, silicose) consécutives à l'inhalation de poussières ou même de pathologies digestives (maladie de Crohn) (Song *et al.*, 2009).

Ainsi les connaissances sur la toxicologie des particules micrométriques ne sont pas applicables aux particules nanométriques et la spécificité de l'échelle nanométrique comprend, outre les nouvelles propriétés innovantes des matériaux, de nouvelles propriétés quant à leur réactivité biologique (Mamaeva *et al.*, 2013). Par exemple de récentes études ont mis en garde contre les effets toxiques des nanoparticules d'argent - présentes en tant que biocide dans les produits du quotidien (déodorants, emballages alimentaires, textiles...) - sur leur risque pour la fertilité masculine (Gromadzka-Ostrowska *et al.*, 2012 ; Klein *et al.*, 2013). De même des nanoparticules d'oxyde de zinc - permettant de lutter contre les radiations UV dans les crèmes solaires - peuvent pénétrer une peau

lésée et potentiellement augmenter la probabilité d'apparition de cancers de la peau ou être ingérées et détruire les cellules du colon (Wang *et al.*, 2013 ; De Angelis *et al.*, 2013). Les nanoparticules de dioxyde de titane - présentes également dans les crèmes solaires, et utilisées comme pigment blanc et agent opacifiant de dentifrices ou de fromages – pourraient provoquer des inflammations similaires à celles de l'amiante au niveau des poumons de même que les nanotubes de carbone – composant renforçant et allégeant pour les équipements sportifs (Soto *et al.*, 2008). Enfin les nanoparticules d'aluminium –utilisées comme adjuvant dans des vaccins- pourrait entraîner des troubles neurologiques (Milačić *et al.*, 2009).

Ces pathologies posent un problème de santé publique : bien que les risques potentiels liés à l'exposition aux nanoparticules et leur variabilité commencent à être révélés, l'absence de pathologies clairement associées rend difficile leur diagnostic. De plus, ces risques potentiels s'avèrent différents pour chaque type de nanoparticule et des effets retardés combinés à différentes expositions sont à envisager.

Cependant, les nanoparticules ouvrent des perspectives innovantes non négligeables à condition de pouvoir prévenir et contrôler leur toxicité potentielle. Ainsi, la mise en place d'un consensus standardisé en nanotoxicologie sous forme d'une réglementation officielle s'avère nécessaire.

II.2.3. La prévention des risques

La prévention actuelle passe par l'analyse du risque tel qu'il est établi pour l'hygiène du travail, par exemple par l'*Institut National de Recherche et de Sécurité au travail* (INRS) en France mais le système d'analyse est international. Ainsi, le risque direct pour la santé humaine résulte de deux facteurs : (1) d'une part la toxicité intrinsèque du produit et (2) d'autre part le niveau d'exposition des personnes au produit. En complément, un ensemble d'associations de consommateurs américaines et européennes regroupées sous le lobby *Dialogue Transatlantique des Consommateurs* (en anglais *Transatlantic Consumer Dialogue*, TACD) préconise depuis 2009 de hiérarchiser officiellement les applications nano de la plus à la moins risquée. Une grille de risques sanitaires de nano-objets présent dans des produits du quotidien et classés selon les données issues de la recherche est présentée dans la figure 14 ci-dessous.

De cette manière, la prévention du risque suppose une bonne connaissance de l'identité des nanoparticules dangereuses, de la caractérisation de leurs dangers et du degré de toxicité associée. Or, dans le cas des nanoparticules, les connaissances sont encore très parcellaires.

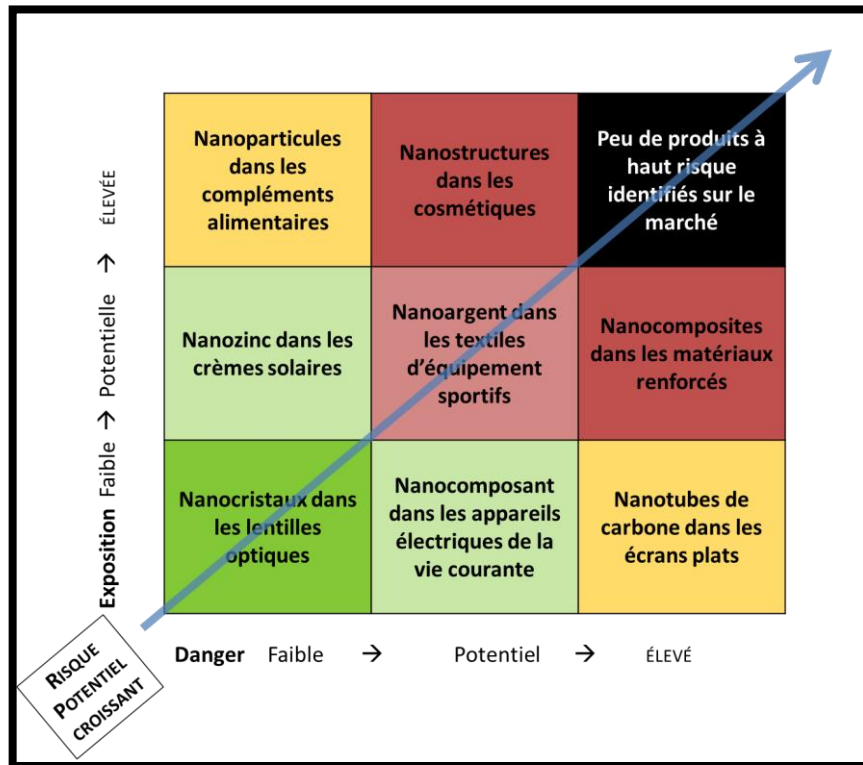


Figure 14 - Grille des risques potentiels (D'après Maynard et al., 2006).

II.2.4. Les programmes de recherche sur les risques sanitaires liés aux nanoparticules

Concernant l'étude des risques sanitaires liés aux nanoparticules, des programmes de recherche à l'échelle européenne (3 à 5 ans) sont initiés par de grands groupes tels que le *Commissariat à l'Energie Atomique et aux énergies alternatives* (CEA) ou encore *l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail* (ANSES). Ils bénéficient de financements du gouvernement, de la Commission Européenne, tels que les *Programmes Cadre de Recherche et Développement* (PCRD), ou encore d'organismes partenaires tels que la *Direction Générale de la Santé* (DGS) en France.

Par exemple, Nanosafe à l'initiative du CEA, se positionne en amont de la commercialisation des nanotechnologies. Nanosafe a pour but de créer une base de données de l'ensemble des connaissances sur les risques liés aux nanoparticules et ainsi de contribuer à de nouvelles réglementations et normalisations pour leurs applications futures.

- Nanosafe 1 (2003-2004) a permis d'établir un état des lieux des risques associés aux éléments nanoparticulaires,
- Nanosafe 2 (2005-2009) a permis de développer des méthodes innovantes de détection et de traçabilité des nanoparticules aussi bien dans l'air que dans l'eau, et de proposer des méthodes d'étude de leur propagation et de leur nanotoxicité dans l'environnement et chez les organismes vivants.

En parallèle le programme Nanogenotox initié par l'Agence Exécutive pour la Santé et les Consommateurs (AESC), a pour objectif de caractériser les nanomatériaux déjà sur le marché (dioxyde de titane, silice et nanotubes de carbone). Nanogenotox (2010-2013) a, entre autres, permis d'ouvrir des perspectives d'étude standardisées de la génotoxicité des nano-objets industrialisés.

A ce jour, et malgré des budgets et des efforts de recherche importants, le bilan des scientifiques s'est globalement achevé sur la nécessité de continuer les recherches tant le domaine des nanotechnologies est étendu (diversité des nano-objets en termes de compositions, de structures et d'applications ...) et la recherche peu focalisée.

Comme le démontre le graphique présenté en figure 15 sur le recensement des publications d'études de nanotoxicité de ces dernières années, de plus en plus d'études expérimentales ont cours en laboratoires : (1) *In vivo*, sur des animaux, afin de détecter des potentiels symptômes associés à la toxicité de nano-objets et (2) *In vitro*, sur des lignées cellulaires, afin de déterminer de manière fondamentale la mécanistique et les réponses cellulaires précises à l'origine de la toxicité des nanoparticules. Cependant, ces études sont difficilement comparables tant le domaine de la nanotoxicologie est large (diversité des approches scientifiques en termes de techniques d'évaluation, de doses et de modèles employés...) et peu standardisé.

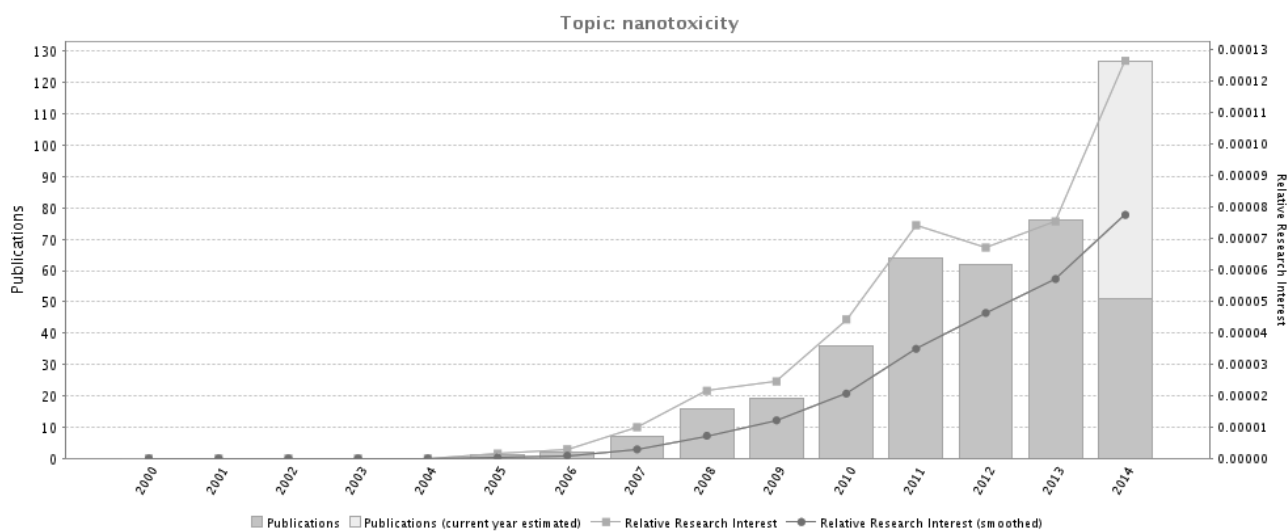


Figure 15 - Recensement des publications concernant la nanotoxicité (GoPubMed)

Il existe peu d'études toxicologiques chez l'Homme et ces dernières concernent essentiellement le champ de la nanomédecine. Dans ce domaine, l'étude du risque concernant l'utilisation de nanoparticules à visée diagnostique ou thérapeutique passe par les essais cliniques sur l'homme pendant plusieurs années pour un nano-objet identifié selon un cahier des charges précis. Ces processus, très règlementés et très coûteux, bénéficient du financement d'investisseurs et de bourses

spécifiques comme le projet Nanomed 2020 amorcé en 2012 et financé à hauteur de 500 000 euros par l'Europe.

II.3. La toxicologie des nanoparticules

II.3.1. La toxicologie *in vivo* des nanoparticules

Les études *in vivo* montrent que le devenir des nanomatériaux une fois dans l'organisme est difficile à appréhender. D'une part à cause de la complexité des interactions biologiques, d'autre part, car la taille de nanoparticules est proche de la limite de résolution de la plupart des dispositifs de mesures ou d'observation. Par exemple, la microscopie photonique standard est limitée à 200 nm en résolution. En outre, l'utilisation de microscopes électroniques à haute résolution, jusqu'à 0,08 nm pour les microscopes électroniques à transmission, induit de nouvelles contraintes comme la difficulté à différencier visuellement une nanoparticule des composants de la cellule de même ordre de grandeur. D'autre part, concernant la toxicologie des nanoparticules, la littérature regroupe des méthodes d'étude très hétérogènes (modèles cellulaires, tests ELISA, mesures en CMF, PCR ...) et donc difficilement comparables mais qui tendent à démontrer une biodistribution et une bio-toxicité spécifiques du type de nanoparticule.

II.3.1.1. La biodistribution

Une étude de Jong *et al.*, sur la biodistribution de particules d'or chez la souris (étudiées 24 heures après injection par voie intraveineuse), a montré que des particules de 250 et 50 nm de diamètre atteignaient toutes deux les poumons, le foie, les reins et la rate, mais les nanoparticules de 50 nm de diamètre atteignaient également le cœur. Par ailleurs, des nanoparticules d'or de 10 nm sont parvenues traverser les barrières hémato-encéphalique et hémato-testiculaire (De Jong *et al.*, 2008). Ces données confirment l'intuition que plus la particule est petite et plus la probabilité qu'elle traverse les barrières biologiques est élevée.

Cependant, d'autres études amènent à penser que les seuils de distribution en fonction de la taille varient aussi en fonction de la nature du matériau et de la voie d'administration (He *et al.*, 2010 ; Liu *et al.*, 2012). Par exemple, une étude de Oberdörster *et al.* a montré que des nanoparticules de graphite de 50 nm inhalées durant 24 heures par des rats traversaient également la barrière hémato-encéphalique (Oberdörster *et al.*, 2004).

La biodistribution est également influencée par le revêtement de surface de la nanoparticule (Arnida *et al.*, 2011 ; Sakurai *et al.*, 2012). Par exemple une étude de Faure *et al.*, sur la biodistribution chez la souris de nanoparticules mixtes de silice et d'oxyde de gadolinium (étudiée 72 heures après injection par voie intraveineuse), a montré que la fonctionnalisation de surface des nanoparticules par un type

de longues chaînes de polymères (PEG2000-OCH₃) favorisait l'accumulation des nanoparticules spécifiquement dans les tumeurs. A l'inverse une chaîne de polymères différente et plus courte (PEG250-COOH) a favorisé la circulation systémique (dans le sang) des nanoparticules jusqu'à leur élimination par les reins et la vessie (Faure *et al.*, 2009).

Les études disponibles sur la biodistribution des nanoparticules ne permettent pas de tirer de conclusion unique en raison de la variabilité des paramètres tels que les matériaux étudiés, les modes et les doses d'administration des nanoparticules. Le seul point commun entre ces études est l'échelle nanométrique du produit testé. A cette échelle, il en va de même pour les études de bio-toxicité.

II.3.1.2. La bio-toxicité

Les études de toxicité *in vivo* n'apportent pas de conclusion générale mais tendent à confirmer que les matériaux classiquement considérés comme biologiquement inertes, comme les oxydes métalliques (dioxyde de titane ou de platine...) ou les métaux précieux (or, argent), peuvent provoquer des réactions biologiques à l'échelle nanométrique (Kaewamatawong *et al.*, 2006). Par exemple une étude de Cho *et al.* a montré qu'une instillation, par voie intra-trachéale, de nanoparticules de silice amorphe de 14 nm de diamètre a provoqué une inflammation sévère du poumon de la souris. avec production du facteur de nécrose tumorale et d'interleukines spécifiques pour des doses comprises entre 2 et 50 mg/kg. Cependant cette étude a également montré que les réponses cellulaires étaient variables et dépendaient conjointement de la dose utilisée et du délai d'observation variant de 24 h à plusieurs semaines.(Cho *et al.*, 2007).

De manière générale les études *in vivo* sont limitées par des facteurs extérieurs non maîtrisés (stress de l'animal, environnement dans l'animalerie, résistance aux anesthésies ...) et le seuil de détection parfois peu précis, comme par exemple l'étude de la perte de poids de l'animal ou d'organes spécifiques, de sa consommation d'eau ou de nourriture. De plus, la réglementation concernant les lois éthiques de l'utilisation des animaux en laboratoire tend à limiter ces études. C'est pourquoi les études *in vitro*, bien qu'elles ne reflètent pas la complexité de l'organisme d'un être vivant ni même la complexité d'un organe ou d'un tissu, sont généralement utilisées de manière complémentaire.

II.3.2. La toxicologie *in vitro* des nanoparticules

Les modèles *in vitro* livrent une grande quantité d'informations sur la toxicité intrinsèque des nanoparticules et permettent d'établir, à l'échelle de la cellule, des hypothèses sur les mécanismes impliqués dans la toxicité des nanoparticules dans des conditions contrôlées. Cependant, la grande hétérogénéité des études *in vitro*, notamment la variation des modèles cellulaires employés, les temps d'exposition, les doses appliquées et la nature de la méthode de détection de la réponse cellulaire utilisée, permettent difficilement de les comparer et apportent parfois des résultats contradictoires (Horie *et al.*, 2012).

II.3.2.1. Les mécanismes principaux de la nanotoxicité

Récemment, de nombreuses investigations *in vitro* sur la toxicité des nanoparticules ont révélé des mécanismes de toxicité. Ainsi, certaines nanoparticules induisent des réponses cellulaires tandis que d'autres nanoparticules semblent biologiquement inertes. Pour Boczkowski et Lanone deux mécanismes cellulaires se distinguent tout particulièrement en cas d'interaction de la cellule avec des nanoparticules (Boczkowski et Lanone, 2010) :

- l'induction d'un stress oxydant : les nanomatériaux métalliques peuvent participer à la formation de quantités importantes d'espèces réactives de l'oxygène (capacité intrinsèque de la nanoparticule à transférer des électrons vers les dérivés de l'oxygène formant alors des radicaux libres toxiques) et/ou induire une production excessive de ces espèces par les cellules. Ces molécules sont d'une grande réactivité biologique et peuvent endommager les parois des cellules par peroxydation lipidique, ce qui peut induire des réactions d'inflammation, voire de fibrose. Elles peuvent également léser l'ADN des cellules et participer à des processus génotoxiques responsables à terme de risques cancérogènes.
- l'adsorption de molécules biologiquement actives à la surface de la nanoparticule: les nanomatériaux, du fait de leurs propriétés de surface particulières, peuvent adsorber des molécules ayant une fonction biologique, comme des facteurs nécessaires à la croissance cellulaire, induisant ainsi une souffrance et parfois la mort cellulaire, qu'ils soient internalisés dans les cellules ou non.

II.3.2.2. Les nanoparticules « safer by design »

Bien que peu de données de nanotoxicologie complètes et fiables soient disponibles, les données scientifiques actuelles sur les nanoparticules incitent à la prudence, en particulier pour les nanoparticules d'usage courant (rapport de l'ANSES, 2012).

Face à ce constat, des chercheurs tentent de maîtriser, limiter, voire de s'affranchir de la toxicité de certaines nanoparticules, dont les performances techniques sont incontestablement prometteuses, par l'élaboration de nanoparticules « safer by design ». Par exemple, Prasad a montré la diminution de la toxicité de Quantum-Dots (QDs), des cristaux fluorescents à base de cadmium, par leur enrobage dans la gélatine. En effet, les QDs représentent un outil, majeur dans le diagnostic, et prometteur pour le traitement des tumeurs par thérapie ciblée, mais le cadmium est un métal toxique (Prasad *et al.*, 2012).

En ce sens, l'ensemble des études *in vitro* a permis d'affiner les paramètres influant sur la réponse biologique des nanoparticules, notamment les paramètres physico-chimiques recensés dans la norme ISO TS/13014 pour les directives relatives à la caractérisation physico-chimique des nano-objets manufacturés soumis aux essais toxicologiques, tels que l'état d'agglomération et d'agrégation des

nanoparticules, la distribution granulométrique et la charge globale dans un milieu, la taille et la forme de la nanoparticules, la solubilité et la capacité de dispersion des poudres, la composition chimique et la pureté des nanoparticules, la surface spécifique ainsi que la chimie de la surface en contact avec la cellule comme le type et la densité des groupes chimiques de surface (ISO TS/13014 (2012a)) (Albanese *et al.*, 2012).

Bien que ces études laissent percevoir les possibilités de synthèses de particules « safer by design », il est actuellement impossible, à partir de nos connaissances fragmentaires, de pondérer leur importance respective ou de prédire avec précision la toxicité d'une nouvelle nanoparticule. En effet, les paramètres secondaires tels que la méthode de synthèse des nanoparticules, le caractère hydrophile/hydrophobe, les modifications post-synthèse (le recouvrement de surface pour empêcher l'agglomération), et la présence de certains contaminants (tels les métaux pouvant favoriser la formation de radicaux libres) rendent complexe la compréhension de leur toxicité (Schrurs et Lison, 2012). De plus, la solubilité des nanoparticules et la libération d'ions toxiques à long terme sont encore peu étudiés, et ce d'autant moins dans un environnement biologique particulièrement complexe tel que l'organisme humain (Quignard *et al.*, 2012).

Toutefois, des méthodes de modélisation (en anglais Quantitative Structure-Activity Relationship, QSAR) sont développées pour essayer de prédire la réponse biologique ou la réactivité chimique des nanoparticules. En effet, les études QSAR tendent à corréler la structure chimique, par exemple la fonctionnalisation de surface de la nanoparticule ou le type de matériaux, avec un effet bien déterminé, par exemple l'internalisation cellulaire ou l'effet pro-inflammatoire, et proposer une relation mathématique entre les deux. L'expression mathématique obtenue peut alors être utilisée comme moyen prédictif de la réponse biologique pour des structures similaires (Kar *et al.*, 2014 ; Puzyn *et al.*, 2011 ; Xia *et al.*, 2011).

Bien que nos connaissances dans le domaine de la nanotoxicologie soient incomplètes, les méthodes pour détecter et quantifier la présence des nanomatériaux dans l'environnement et dans l'organisme humain sont cruciales. La littérature suggère en complément des études bio-toxicologiques de s'intéresser également aux liens entre les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules et leurs mécanismes d'interactions avec les cellules, dont découle leur toxicité pour l'organisme.

III. Les interactions nanoparticules/cellules

Comprendre les mécanismes d'interactions des nanoparticules avec les cellules pourrait permettre un meilleur contrôle de leur internalisation, mais aussi de leur biodistribution et de leur biopersistance, et donc l'amélioration de la prédiction de leurs effets toxiques éventuels. De plus, le développement des biotechnologies, et en particulier de la nanomédecine, nécessite des recherches approfondies sur le moyen de délivrer de manière spécifique les nanoparticules pour le diagnostic ou le traitement de maladies ciblées.

III.1. La prise en charge des nanoparticules par la cellule

Les cellules immunitaires du corps humain ont un rôle spécifique de défense de l'organisme et d'élimination des éléments exogènes potentiellement pathogènes. Cependant, toutes les cellules présentent des capacités plus ou moins fortes d'internalisation d'éléments de leur environnement, comme les solutés et les particules, et de traitement des déchets générés (Xia *et al.*, 2008 ; Aderem et Underhill, 1999).

Les phénomènes d'internalisation au sens large sont généralement divisés en deux grandes catégories (Conner et Schmid, 2003) : la phagocytose pour l'internalisation de grosses particules et la pinocytose pour l'internalisation de fluides et de solutés comme les particules nanométriques. Ces phénomènes sont représentés en figure 16 ci-dessous.

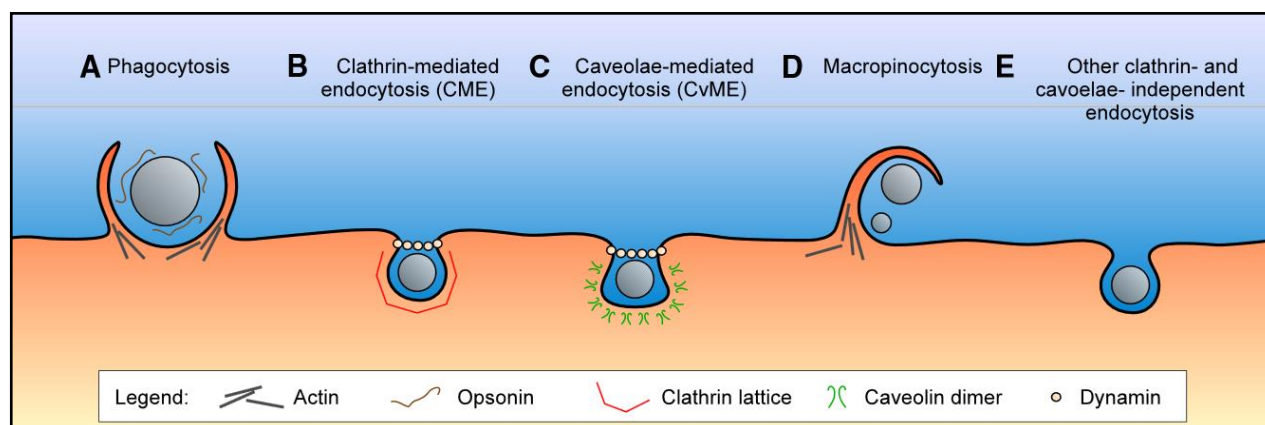


Figure 16 - Schéma des principales voies d'internalisation cellulaire : (A) la phagocytose et les différentes voies de pinocytose (B) (C) (D) et (E) (Hillaireau et Couvreur, 2009).

III.1.1. La pinocytose

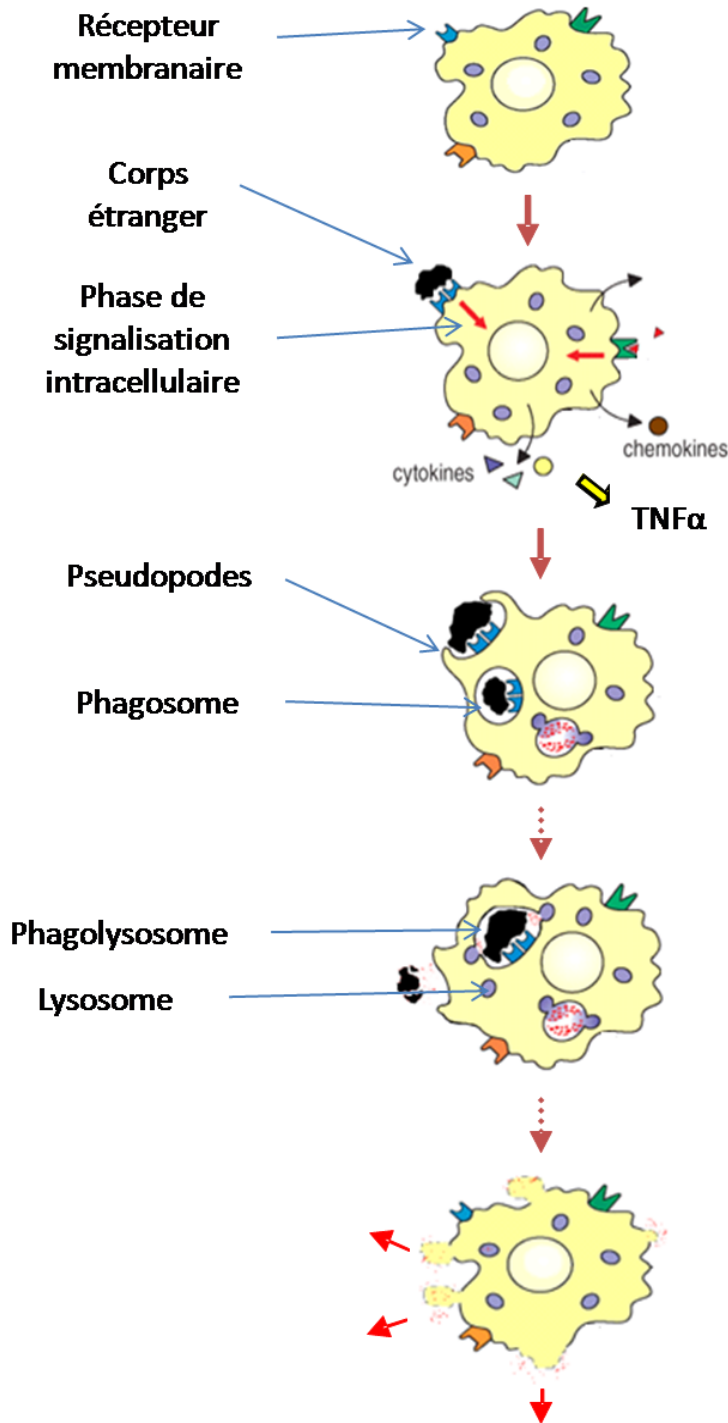
La pinocytose existe dans tous les types cellulaires selon au moins quatre mécanismes de base (Benmerah et Lamaze, 2002) :

- (1) La macro-pinocytose, non spécifique et formant de larges vésicules d'environ 1 μ m de diamètre
- (2) et (3) L'endocytose médiée par la clathrine et l'endocytose médiée par les cavéoles, pour toutes deux les vésicules sont formées au niveau de régions déterminées de la membrane où sont regroupés les récepteurs membranaires spécifiques et les vésicules formées sont de diamètre inférieur à 0,1 μ m
- (4) L'endocytose indépendante de la clathrine et des cavéoles induit également la formation de petites vésicules et se produit en continu dans la cellule.

III.1.2. La phagocytose

Bien qu'elle puisse potentiellement survenir pour tout type cellulaire, la phagocytose est un mécanisme préférentiellement utilisé par les cellules spécialisées, dites cellules phagocytaires comme les macrophages/monocytes, les neutrophiles et les cellules dendritiques. Ce processus dépendant de l'actine du cytosquelette est initié par l'interaction entre un récepteur spécifique du phagocyte et un ligand à la surface de la particule. Lors de la phagocytose des extensions cytoplasmiques, appelées pseudopodes, se forment et vont venir envelopper les larges particules présentes à proximité de la cellule, en général de taille supérieure à 0,5 μ m. Ces vésicules endocytaires sont appelées phagosomes. Il existe plusieurs modes d'initiation potentiels de la phagocytose (Chimini et Chavrier, 2000) présentés dans la figure 17 ci-après avec l'ensemble des étapes du processus.

La phagocytose est nécessaire au rôle de défense des cellules, cependant elle peut échouer, par exemple dans le cas de nanofibres ou de nanotubes trop longs pour être entièrement pris en charge par la cellule (Brown *et al.*, 2007). On parle alors de « phagocytose frustrée ». Suite à ce phénomène des mécanismes d'inflammation, de stress oxydant, de génotoxicité ou d'apoptose peuvent être déclenchés (Kuschner et Wright, 1976).



Macrophage

Chimiotactisme et adhésion

Le macrophage est chimiquement attiré vers le corps étranger à éliminer, entre en contact avec un récepteur membranaire spécifique qui va transduire un signal intracellulaire et déclencher le processus de phagocytose.

Internalisation

Une réorganisation du cytosquelette d'actine conduit à la formation de pseudopodes qui vont englober le corps étranger pour former une nouvelle vacuole intracellulaire : le phagosome.

Digestion

Les lysosomes contiennent des enzymes hydrolytiques et ont un pH naturellement acide. Ils vont fusionner avec le phagosome pour former un phagolysosome. Quand cela est possible le corps étranger est dégradé.

Rejet

Les éléments dégradés sont rejetés dans le milieu extracellulaire par exocytose des vésicules. Les éléments non dégradés persistent dans les macrophages et sont évacués grâce au fonctionnement de l'appareil muco-ciliaire.

Figure 17 - Schéma illustrant les différentes étapes de la phagocytose (D'après Boumahdi, 2009).

III.1.3. L'étude de l'internalisation cellulaire

La voie d'internalisation privilégiée peut être déterminée par des inhibiteurs spécifiques afin de bloquer, de façon fonctionnelle, l'une ou l'autre des voies définies ci-dessus (Herd *et al.*, 2013 ; Zhao

et al., 2011). Ainsi, des études ont montré des voies d'internalisation privilégiées dépendantes d'un type de nanoparticule donné ou de la nature du type cellulaire et de ses propriétés d'internalisation :

- L'endocytose clathrine-dépendante a été privilégiée par les cellules mésenchymateuses (Hmsc) pour des nanoparticules d'argent de 80 nm de diamètre (Greulich *et al.*, 2011) ou par des cellules issues de métastases de cancer de l'utérus (HeLa) pour des nanoparticules en polymère d'acide poly-lactique de 90 nm de diamètre (Harush-Frenkel *et al.*, 2007).
- L'endocytose dépendante des cavéolines a été privilégiée par des cellules humaines d'endothélium aortique pour des nanoparticules de polysiloxane de 100 nm de diamètre (Nishikawa *et al.*, 2009) et par des cellules d'épithélium alvéolaire pour des particules submicroniques d'acide polylactique de 250 nm (Mo et Lim, 2004).
- La pinocytose a été privilégiée par des cellules HeLa pour des particules de polystyrène de 113 nm (Dausend *et al.*, 2008)
- La phagocytose a été privilégiée par des macrophages pour des nanoparticules de gadolinium de 100 nm de diamètre (Liu *et al.*, 2009)

D'autres méthodes basées sur des observations microscopiques de la forme et de la taille des vésicules ainsi que du motif de recouvrement de sa surface sont aussi utilisées. Par exemple Rima *et al.* ont notamment comparé la morphologie de cellules de carcinome épidermoïde (SQ20B), après incubation avec des nanoparticules à base de gadolinium de 5 nm de diamètre, par microscopie électronique à transmission (TEM), microscopie électronique à balayage (MEB) et microscopie photonique. Cette étude a montré deux mécanismes d'internalisation distincts à savoir la diffusion passive et la macropinocytose, voir figure 18 (Rima *et al.*, 2013).

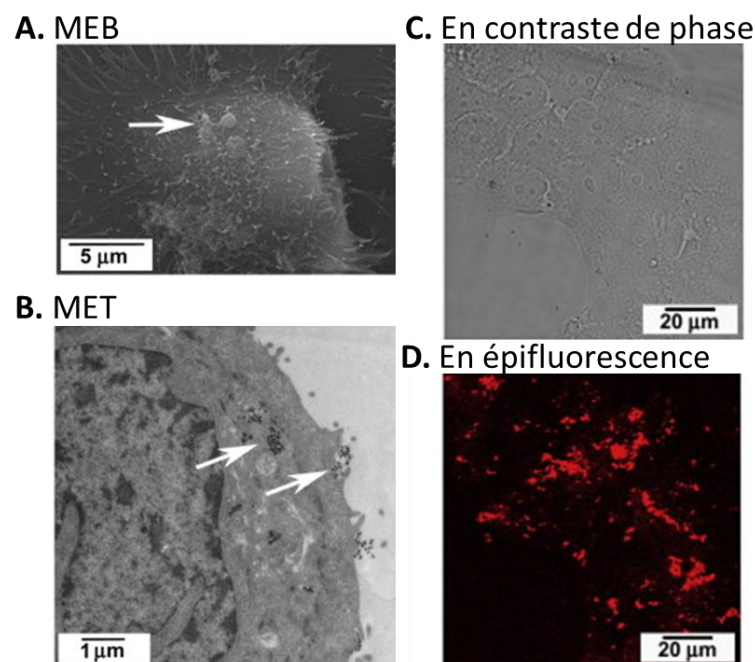


Figure 18 – Observation microscopique de figures de macropinocytose précoce par (A) microscopie électronique à balayage, (B) microscopie électronique à transmission, (C) microscopie photonique et (D) microscopie à épifluorescence (les nanoparticules émettent une fluorescence rouge) (D'après Rima *et al.*, 2013).

III.2. La dégradation des nanoparticules par la cellule

Une fois la nanoparticule internalisée, des mécanismes cellulaires de dégradation vont être activés. Pendant cette phase, les phagosomes fusionnent avec les lysosomes, organites intracellulaires de diamètre de 250 à 500 nm possédant une activité enzymatique lytique. Les phagosomes sont considérés comme le « système digestif » de la cellule. La vésicule résultant de cette fusion est appelée phagolysosome et assure la dégradation et le tri des éléments phagocytés.

III.2.1. Les enzymes lytiques

Les enzymes lytiques des lysosomes appartiennent toutes au groupe des hydrolases acides. Celles-ci peuvent être des protéases, des nucléases, des phosphatases, des lipases, des phospholipases, des glycosidases ou des sulfases et sont présentes en quantité variable selon les types cellulaires. L'acidité intralysosomiale augmente progressivement grâce à un système de transport actif utilisant l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP. Durant cette étape les ions H⁺ sont pompés à l'intérieur du lysosome. Alors que le pH intracellulaire se situe autour de 7, le pH d'activité du lysosome se situe en dessous de 5 et celui du phagolysosome autour de 4 (Miksa *et al.*, 2009 ; Aderem et Underhill, 1999). La membrane des lysosomes, normalement imperméable à ces enzymes ainsi qu'aux ions, représente un système fermé à l'intérieur du cytoplasme sans risque pour les autres composants cellulaires.

Les lysosomes primaires peuvent aussi fusionner avec des vésicules d'endocytose à récepteurs ou des vésicules de pinocytose formant alors des lysosomes secondaires. Ils prennent un aspect classique à contenu hétérogène, ou alors celui de corps multivésiculaires, c'est-à-dire de larges vésicules d'hydrolyse renfermant les vésicules d'endocytose.

La figure 19 ci-dessous présente ces différentes activités lysosomales.

III.2.2. L'étude de l'hydrolyse

Les sondes fluorescentes spécifiques d'un pH permettent d'étudier ces compartiments intracellulaires acides et peuvent également être utilisées pour suivre les modifications du pH des organites lors des contacts nanoparticules/cellules (Bassoe *et al.*, 2003). D'après la littérature, la sonde LysoTracker®red permet le marquage des vésicules acides comme les lysosomes (Peng *et al.*, 2007). D'autres sondes telles que les PEBBLEs (Lee et Kopelman, 2012) et les micro-sondes fluorescentes comme les SNARF-1 (Nakata *et al.*, 2010), permettent de distinguer différents pH et donc différents processus cellulaires régulés par le pH intracellulaire comme par exemple, l'apoptose, la phagocytose et la croissance cellulaire (Ramshesh et Lemasters, 2012). De la même manière, Leclerc *et al.*, ont développé des particules submicroniques contenant deux fluorophores : le FITC, émettant une fluorescence verte à pH extracellulaire, et le pHrodo™, émettant une fluorescence rouge à pH acide. Ainsi, les particules initialement vertes à l'extérieur de la cellule devenaient jaunes

par superposition des émissions verte et rouge lors de leur phagocytose par les cellules (Leclerc et al., 2012). Les analyses sont en général réalisées en cytométrie en flux (CMF) et en microscopie confocale.

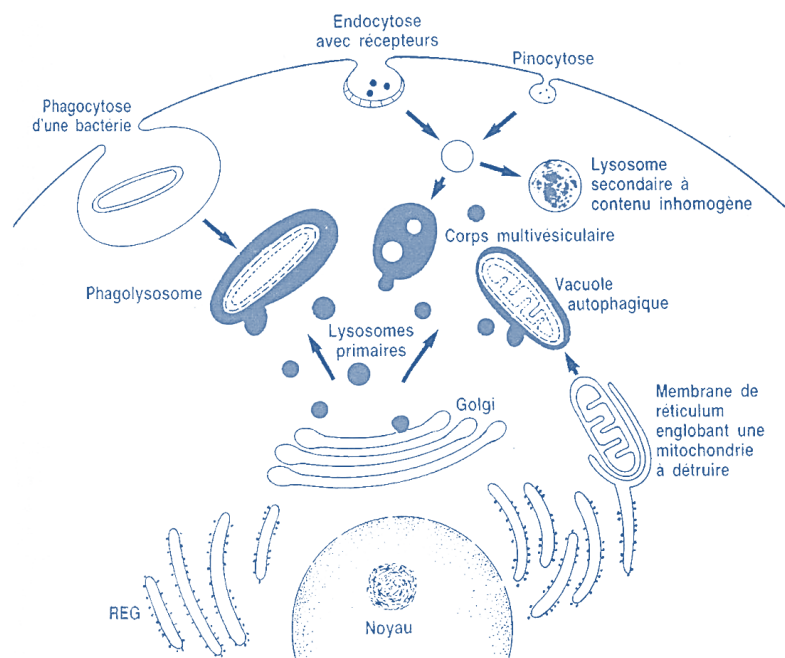


Figure 19 - Schéma récapitulatif des activités lytiques des lysosomes (Histologie, Jean Pierre DADOUNE, Médecine-Sciences Flammarion).

III.2.3. Le rejet des débris issus de la dégradation des nanoparticules

Le rejet des débris issus de la dégradation de certaines nanoparticules organiques par les lysosomes secondaires se fait de façon passive : les molécules de faible poids moléculaire qui en résultent traversent la membrane lysosomale et seront réutilisées par la cellule. Elles jouent alors un rôle dans le renouvellement des constituants cellulaires.

Les corps résiduels non utilisés par la cellule sont rejetés dans le milieu extracellulaire par exocytose. Or dans le cas de certaines particules, il semble que celles-ci ne peuvent pas être correctement dégradées par la cellule. Il en résulte la formation de résidus pro-inflammatoires potentiellement cytotoxiques, avec la possibilité d'accumulation intracellulaire pouvant aboutir à terme à une lyse cellulaire. C'est le cas par exemple pour les macrophages « à poussières » au niveau des poumons de fumeurs chargés en particules de goudron ou des poumons de mineurs chargés en particules de charbon (Thiberville *et al.*, 2009 ; Blidberg *et al.*, 2012).

D'autre part, certaines nanoparticules, notamment les nanoparticules inorganiques ou certaines molécules issues de leur dégradation, ne sont pas métabolisables et persistent dans les lysosomes. L'hypothèse la plus probable pour l'élimination de ces particules passe par l'élimination de la cellule

entière par l'organisme comme c'est le cas pour les macrophages alvéolaires expulsés par l'appareil muco-ciliaire lors de la déglutition/expectoration ou bien leur passage dans l'appareil digestif mais, malgré ces mécanismes, certaines nanoparticules s'accumulent dans l'organisme (Akiyama *et al.*, 2003 ; Geiser, 2010).

III.3. Les paramètres modifiant les capacités d'internalisation cellulaire des nanoparticules

Au-delà du type cellulaire, qui conditionne les fonctions même de la cellule et ses capacités d'internalisation et de digestion (Chung *et al.*, 2007), les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules mises en évidence dans le cadre de la nanotoxicologie peuvent aussi jouer un rôle au moment de l'adhésion et de la reconnaissance cellulaire (Ma *et al.*, 2013 ; Yu *et al.*, 2012 ; Greish *et al.*, 2012).

III.3.1. Les caractéristiques physiques

III.3.1.1. La taille des nanoparticules

La taille des nanoparticules serait un paramètre déterminant au regard des phénomènes d'internalisation intracellulaire et de la taille des vésicules formées (Clift *et al.*, 2008 ; He *et al.*, 2010). Bien que la majorité des nanoparticules puissent être internalisées par des cellules, différentes études tendent à démontrer que ces dernières privilégient l'internalisation des nanoparticules dont le diamètre est autour de 20-50 nm.

Chithrani *et al.* ont montré, par spectrométrie à torche plasma, que les cellules HeLa privilégient l'internalisation de nanoparticules d'or de 50 nm de diamètre par rapport aux nanoparticules de 14 et 74 nm de diamètre (Chithrani *et al.*, 2006). L'étude de Huang *et al.*, par imagerie à résonance magnétique, a également montré que l'internalisation de nanoparticules de Polyvinylpyrrolidone par des macrophages (RAW 264.7) est plus importante pour des nanoparticules de 37 nm de diamètre que pour des nanoparticules de 8 ou 65 nm (Huang *et al.*, 2010).

Ainsi, l'internalisation cellulaire des nanoparticules est multifactorielle. Cependant, bien qu'en général les dimensions des nanoparticules considérées correspondent au diamètre géométrique de la nanoparticule, mesuré directement par microscopie électronique à transmission ou à balayage (MET ou MEB), en milieu aqueux la nanoparticule est recouverte d'une couche de solvatation. En effet, des espèces agissent comme solvant selon la charge et la taille de la nanoparticule mais également la nature des solutés. Cette couche influence le mouvement brownien de la nanoparticule, c'est-à-dire le mouvement aléatoire de la particule lors de l'immersion dans un fluide, et est prise en compte dans le calcul du diamètre hydrodynamique. Le diamètre hydrodynamique correspond ainsi au diamètre d'une sphère théorique qui aurait le même coefficient de diffusion que la particule considérée. Il est

évalué grâce à la technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS – Dynamic Light Scattering) et correspond davantage à la taille de la nanoparticule que va appréhender la cellule.

III.3.1.2. La forme des nanoparticules

La forme des nanoparticules (sphériques, fibreuses, tubulaires, circulaires et planes) semble également conditionner leurs effets biologiques (Arnida *et al.*, 2011).

Une étude de Champion et Mitragotri a montré que des particules de polystyrène sphériques sont plus internalisées par des macrophages NR8383 que des particules en forme de bâtonnets (Champion et Mitragotri, 2009). Cette étude suggère que la forme des nanoparticules influence leur capacité à adhérer à la cellule selon le rayon de courbure du matériau et influence donc leur internalisation par la cellule. Ce résultat est soutenu par l'étude de Herd *et al.* sur trois types de nanoparticules de silice, en cylindre, en zig-zag et sphériques qui a montré que les macrophages (RAW 264.7) et les cellules d'épithélium pulmonaire (A549) internalisent les particules sphériques par endocytose clathrine-dépendante tandis que les autres types de particules étaient internalisées principalement par macropinocytose ou mécanismes phagocytaires (Herd *et al.*, 2013).

L'étude de Chithrani *et al.* citée plus haut a également montré que les cellules ont internalisé davantage les nanoparticules sphériques de 74 et 14 nm que les bâtonnets de dimension 74x14 nm. Cependant, les résultats de cette étude suggèrent que cette différence pourrait être due aux solvants différents utilisés pour les synthèses dont résultent les formes différentes, ainsi la conclusion de cette étude reste incertaine (Chithrani *et al.*, 2006).

III.3.2. Les caractéristiques chimiques

Pour les mêmes raisons de capacité d'interaction avec la membrane cellulaire, la fonctionnalisation chimique de la surface de la nanoparticule pourrait moduler la pénétration des nanoparticules au travers des membranes cellulaires (Cho *et al.*, 2009) (Leclerc *et al.*, 2010).

III.3.2.1. La fonctionnalisation de surface des nanoparticules

La fonctionnalisation de surface des nanoparticules, par différents groupements chimiques, leur confère un potentiel de surface spécifique. Seulement, actuellement il n'est pas possible de mesurer le potentiel de surface des nanoparticules à cause des couches ioniques qui les entourent en solution. Cependant, leur charge électrique globale, caractérisée par le potentiel zêta de la suspension de nanoparticules au niveau de la couche de cisaillement délimitant le milieu qui suit la particule, peut être mesuré (Annexe I). Le potentiel zêta est relié à la mobilité électrophorétique des nanoparticules en solution ce qui permet de le mesurer, comme la taille de la nanoparticule, par la technique de diffusion dynamique de la lumière (en anglais Dynamic Light Scattering, DLS). Il peut avoir un impact sur la capacité des nanoparticules à être internalisées par la cellule, car il modifie les interactions électrostatiques entre une nanoparticule et la cellule.

III. Les interactions nanoparticules/cellules

Chung *et al.* ont montré que des nanoparticules de silice fonctionnalisées avec des alkyles, donc de potentiel zêta négatif, étaient moins internalisées par les cellules adipeuses (3T3-L1) que lorsqu'elles sont fonctionnalisées par des groupements amines leur conférant un potentiel zêta positif (Chung *et al.*, 2007). De la même façon, Ge *et al.* ont montré que des nanoparticules d'oxyde de fer étaient davantage internalisées par les cellules de carcinome squameux (KB) lorsqu'elles présentent des chitosanes et un potentiel zêta positif (Ge *et al.*, 2009). Ces deux études suggèrent que les nanoparticules présentant des groupements de surface induisant un potentiel zêta positif interagissent plus facilement avec les membranes cellulaires de potentiel de surface électrostatiquement négatif indépendamment du matériau composant la nanoparticule. De la même manière, Kralj *et al.* ont montré que des nanoparticules super-paramagnétiques enrobées de silice et mises au contact des cellules issues de cancers du sein (MCF10A) et de prostate (PC-3) n'étaient pas internalisées lorsqu'elles étaient fonctionnalisées avec des groupements carboxyles tandis qu'elles l'étaient lorsqu'elles étaient fonctionnalisées avec des groupements amines (Kralj *et al.*, 2012).

De plus, une étude de Yue *et al.*, réalisée par microscopie confocale, a montré que la charge globale de surface peut moduler le parcours intracellulaire de nanoparticules. Ainsi, les particules de potentiel zêta positif ont été retrouvées autour du noyau de la cellule tandis que les particules de potentiel neutre et négatif ont été détectées dans les lysosomes (Yue *et al.*, 2011). En effet, la fonctionnalisation de surface des nanoparticules est importante pour garantir leur hydrophilie et ainsi conditionner leur dispersibilité et interactivité cellulaire notamment pour des applications en nanomédecine.

III.3.2.2. Les types cellulaires

A l'inverse une étude de Kemp *et al.*, a montré que des cellules humaines alvéolaires immortalisées ont privilégié l'internalisation de nanoparticules de latex de 50 nm de diamètre chargées négativement par des groupements carboxyles par rapport aux mêmes nanoparticules chargées positivement par des groupements amines (Kemp *et al.*, 2008). La variation entre cette étude et les précédentes met en évidence l'influence du type cellulaire sur la capacité d'internalisation des nanoparticules en fonction de leur fonctionnalisation de surface. En complément, une étude de Lunov *et al.*, sur des nanoparticules de polystyrène de 100 nm de diamètre, a montré que des monocytes non phagocytaires (THP-1) ingèrent bien préférentiellement les nanoparticules cationiques, mais qu'à l'inverse ces cellules différenciées en macrophages phagocytaires ingèrent préférentiellement les nanoparticules anioniques (Lunov *et al.*, 2011). Ainsi, la nature de la cellule semble conditionner les interactions avec les nanoparticules.

Des équipes tentent de caractériser l'importance relative de ces paramètres physico-chimiques, comme l'équipe de Nowacek *et al.* qui a déterminé, en étudiant des formulations nanométriques de médicaments antirétroviraux, que la forme de la particule a plus d'impact que sa charge ou encore sa taille sur l'internalisation par des macrophages (MDM) (Nowacek *et al.*, 2011). Cependant, des caractéristiques secondaires non maîtrisables semblent intervenir également.

III.3.3. Les caractéristiques secondaires

Le degré d'agglomération des nanoparticules, généralement imputé aux forces de Van der Waals, est lié aux forces électrostatiques et aux tensions de surface de la nanoparticule dues à la composition du milieu environnant (Limbach *et al.*, 2008 ; Lynch *et al.*, 2007). Ainsi, les nanoparticules tendent plus ou moins à s'agglomérer entre elles en fonction de leur forme et des groupements chimiques fixés à leur surface (Fubini *et al.*, 2010). Les nanoparticules peuvent également s'agréger entre elles sous l'action de forces plus importantes, rendant ainsi leur séparation plus difficile. Les phénomènes d'agglomération et d'agrégation des nanoparticules peuvent laisser supposer une interaction différente avec les cellules du fait de la modification de leur diamètre géométrique et de leur potentiel zêta (Kendall *et al.*, 2011).

Les nanoparticules ont aussi tendance à former des agrégats en milieu biologique avec les autres constituants du milieu comme les protéines (Drescher *et al.*, 2011).

III.3.3.1. La corona protéique formée à la surface des nanoparticules

Ces observations, reliées aux résultats de tests *in vitro* et *in vivo* parfois contradictoires, ont récemment soulevé de nouvelles questions concernant les caractéristiques physico-chimiques de la nanoparticule « réellement » perçues par les cellules. En effet, il existe des interactions biomolécules/nanoparticules (lipides, peptides ...), plus particulièrement protéines/nanoparticules, dans les milieux de culture cellulaire complétés avec du sérum utilisés dans les études *in vitro*. Les protéines sont des polypeptides ayant une conformation et une charge de surface dépendantes du pH et du milieu environnant. L'adsorption de protéines à la surface des nanoparticules est facilitée par plusieurs forces telles que des liaisons hydrogène, les forces de solvatation, et les interactions de Van der Waals. Ainsi un recouvrement protéique s'établit autour de la nanoparticule : la « corona protéique » (Lynch *et al.*, 2007 ; Lundqvist *et al.*, 2008). La corona est caractérisée par la couche dynamique de protéines qui se crée naturellement autour de la nanoparticule en milieu biologique jusqu'à la recouvrir entièrement. Elle est « l'identité biologique » de la nanoparticule car c'est le premier élément de la nanoparticule en contact avec les cellules (Walkey et Chan, 2012 ; Podila *et al.*, 2012). De plus elle influence la réponse biologique (hémolyse, activation plaquettaire et mort cellulaire...) davantage que le type de matériau étudié (Monopoli *et al.*, 2012 ; Tenzer *et al.*, 2013). Par exemple, la quantité de protéines du sérum adsorbées sur des nanoparticules peut être corrélée avec la capacité des nanoparticules à entrer dans la cellule (Qiu *et al.*, 2010). Il apparaît même une notion très importante d'artefacts qui pourraient exister dans les résultats d'évaluations biologiques dues à ces phénomènes d'adsorption (Nel *et al.*, 2009 ; Val *et al.*, 2009). Certaines études soulignent aussi l'importance d'utiliser un sérum pour la culture cellulaire proche de la composition du sang humain pour prédire les interactions nanoparticules/cellules dans l'organisme humain (Merhi *et al.*, 2012).

Plusieurs études ont été réalisées au sujet de l'adsorption de molécules à la surface des nanoparticules. L'association de techniques telles que la chromatographie haute résolution en phase

III. Les interactions nanoparticules/cellules

liquide et la spectrométrie de masse permet l'identification des protéines de la corona pour autant que les protéines soient répertoriées dans les bases de données. Ainsi, il a été montré que le ratio des protéines adsorbées à la surface de la nanoparticule n'est pas représentatif du milieu mais bien spécifique de la nanoparticule, de sa chimie de surface et du temps pendant lequel la nanoparticule a été incubée dans le milieu (Mortensen *et al.*, 2013 ; Walkey *et al.*, 2012). Cependant, l'analyse de la corona protéique par cette méthode reste difficile à réaliser (difficulté à s'affranchir des protéines restées libres dans le milieu de dilution lors du lavage des nanoparticules, difficulté de séparer les protéines de la nanoparticule surtout lorsqu'elles sont agrégées, difficulté de trier les protéines également agglomérées et nécessité d'utiliser de grandes quantités de nanoparticules pour palier à la sensibilité limitée de l'appareil de spectrométrie) et nécessite encore des mises au point et une standardisation (Lynch *et al.*, 2007).

Les premières études ont montré que cette « identité biologique » dépend des caractéristiques physico-chimiques de la nanoparticule (Wang *et al.*, 2011 ; Cedervall *et al.*, 2007). En effet, l'étude de Dobrovolskaia *et al.*, sur des nanoparticules d'or a montré que les nanoparticules fonctionnalisées avec des polysorbates ont été principalement recouvertes d'apolipoprotéines, tandis que les mêmes nanoparticules non traitées ont été majoritairement recouvertes d'albumine (Dobrovolskaia *et al.*, 2009).

De plus, les études montrent que la corona protéique est constituée de deux couches de dynamiques différentes qui se forment successivement au cours du temps. Une première couche de protéines fixée fermement à la surface de la nanoparticule formant la « hard » corona aux temps courts. La « hard » corona est irréversible tant que la nanoparticule est maintenue dans le même milieu (Monopoli *et al.*, 2011 ; Lundqvist *et al.*, 2008). Autour de cette première couche, une seconde couche de protéines moins stable, la « soft » corona, se forme (Barrán-Berdón *et al.*, 2013 ; Dell'Orco *et al.*, 2010). Ainsi, les différentes couches de protéines de la « soft » corona pourraient permettre de retracer le parcours de la nanoparticule dans l'organisme (Milani *et al.*, 2012 ; Treuel et Nienhaus, 2012). Excepté dans le cas de nanoparticules de taille équivalente à la dimension des protéines. Comme montré dans l'étude de Liu *et al.*, pour des nanoparticules d'oxyde de cérium de dimension inférieure à 10 nm, se forment uniquement des hétéro-agrégats de protéines et de nanoparticules mais pas de corona protéique reproductible (Liu *et al.*, 2013).

III.3.3.2. L'encombrement stérique à la surface des nanoparticules

Cependant, la corona protéique peut être limitée par un fort encombrement stérique de la surface de la nanoparticule (Natte *et al.*, 2013 ; Dai *et al.*, 2014 ; Sacchetti *et al.*, 2013 ; Faunce *et al.*, 2008). Ainsi, les nanoparticules revêtues de longues chaînes de polysaccharides, polyéthylène glycol (« pégylation », PEG) ou dextran et autres polymères de revêtements, ont tendance à former des suspensions homogènes peu modifiées par les protéines du milieu de culture en raison de l'attraction dipolaire anisotrope entre les groupements (Vonarbourg *et al.*, 2006). De plus, cette stratégie,

bloquant les sites de liaison des protéines à la surface de la nanoparticule, réduit l'agrégation des nanoparticules et améliore leur rémanence vasculaire (Satulovsky *et al.*, 2000).

D'autre part, les nanoparticules recouvertes par ces groupements sont internalisées en proportion différente par les cellules. Par exemple, l'équipe de Hu *et al.* a étudié, par fluorescence, l'interaction des cellules de carcinome de foie humain avec des nanoparticules recouvertes de PEG et des nanoparticules revêtues de dextran de même diamètre entre 20 et 90 nm. Dans cette étude, les cellules privilégiaient l'internalisation des nanoparticules avec un recouvrement de PEG à leur surface (Hu *et al.*, 2007).

L'ensemble de ces observations montre bien que chaque évaluation est spécifique du type de nanoparticules, d'où la nécessité de développer des nanoparticules modèles bien caractérisées. Elle est tout autant spécifique du modèle d'étude, d'où la nécessité de développer un consensus en nanotoxicologie, (Tsuji *et al.*, 2006). Il en découle également une grande difficulté de se rapprocher d'un modèle exhaustif représentant l'interaction nanoparticules/cellules dans l'organisme humain.

Au vu des données de la littérature, il semble indispensable d'étudier la relation entre les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules, la quantité précise de nanoparticules internalisées par les cellules et les effets bio-toxiques générés. L'utilisation de nanoparticules modèles, synthétisées à façon avec des caractéristiques physico-chimiques contrôlées, peut permettre d'étudier spécifiquement l'impact d'une caractéristique définie comme la taille ou la fonctionnalisation de surface de la nanoparticule.

APPROCHE EXPERIMENTALE

Ces travaux s'inscrivent dans le cadre des études de bio-toxicité du Laboratoire Interdisciplinaire d'étude des Nanoparticules Aérosolisées (LINA, EA 4624). Ils font suite aux travaux de Lara Leclerc portant sur la corrélation entre l'activité biologique de particules modèles micrométriques à submicroniques (de 2000 à 150 nm de diamètre) et leurs caractéristiques physico-chimiques. L'étude de leur internalisation cellulaire y a été investiguée par des observations microscopiques conjuguées à une approche quantitative par fluorimétrie, en parallèle de l'étude de leur toxicité *in vitro*. Le présent travail de thèse poursuit l'ensemble de ces développements à l'échelle nanométrique (50 à 130 nm de diamètre).

Dans cette approche expérimentale, les nanoparticules de silice amorphe ont été mises en contact avec des macrophages murins. En effet, les macrophages sont des cellules du système immunitaire très présentes au niveau des tissus et des muqueuses et tout particulièrement en surface de l'épithélium alvéolaire. Ils constituent ainsi la première cible potentielle des nanoparticules inhalées. De plus, ces cellules, spécialisées dans l'activité de phagocytose des particules exogènes, sont un modèle privilégié pour les études de nanotoxicologie. Afin de disposer de conditions expérimentales reproductibles et d'un matériel cellulaire en quantité adéquate, un modèle de référence a été utilisé : la lignée de macrophages murins RAW 264.7. En effet, cette lignée, immortalisée par le virus de la leucémie murine d'Abelson, permet de maintenir une culture stable, ce qui est difficile avec des cultures primaires de macrophages issus de lavages broncho-alvéolaires (LBA) (avec des niveaux de viabilité cellulaire relativement aléatoires). Par ailleurs, ces derniers sont obtenus dans un contexte pathologique avec les risques de contamination associés.

Les nanoparticules, synthétisées à façon par procédé sol-gel, ont permis d'évaluer indépendamment le rôle des paramètres de fonctionnalisation de surface et de taille sur leur activité biologique *in vitro* comme présenté dans la figure 20 ci-dessous.

Afin de répondre à cette problématique le chapitre a été structuré en trois parties :

- Dans un premier temps, l'impact de la fonctionnalisation de surface des nanoparticules de silice sur leur activité biologique au contact des macrophages a été évalué *in vitro*. Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe FENNEC (Formation Elaboration de NaNomatériaux et Cristaux) de l'Institut Lumière Matière (ILM) de Lyon, des nanoparticules de 50-70 nm de diamètre ont été synthétisées. Les nanoparticules étaient fonctionnalisées par des groupements chimiques différents (groupements carboxyliques et groupements amines), et à différentes densités, afin de leur conférer des natures chimiques de surface différentes, donc des charges de surface différentes. Des mises au point des techniques de détection et d'évaluation de la cytotoxicité à cette échelle ont été nécessaires.

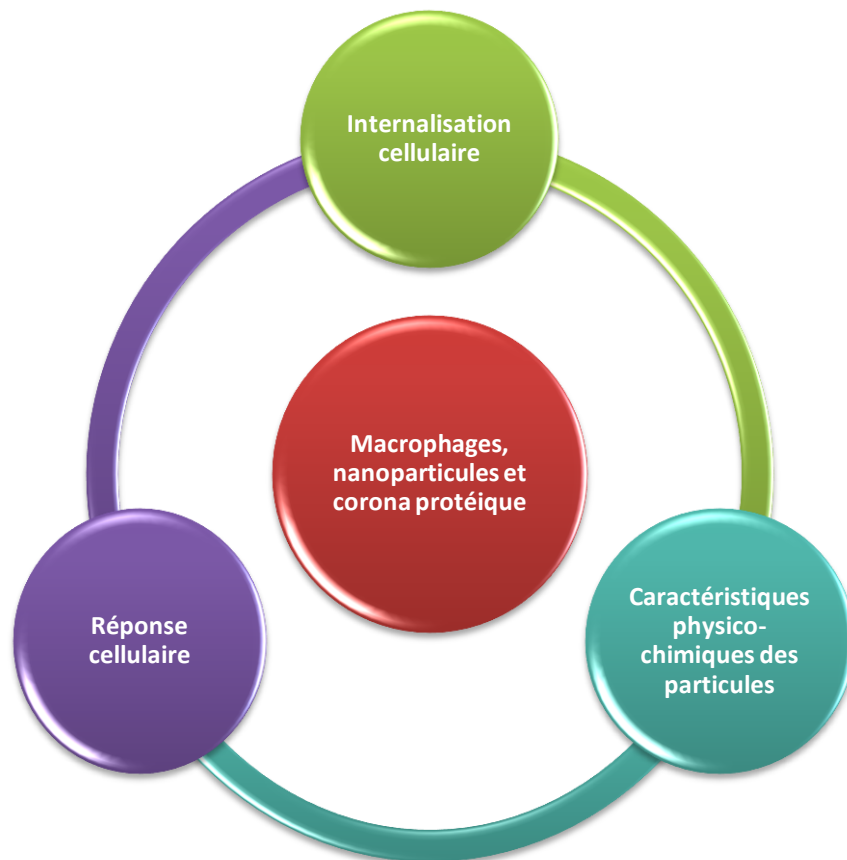


Figure 20 - Diagramme représentant les liens à établir au cours de ce travail de thèse.

- Dans un second temps une méthode de détection de la phagocytose des nanoparticules lors des contacts *in vitro* avec les macrophages a été développée. Elle était basée sur les fluctuations de pH au sein du phagolysosome. Des particules fluorescentes de silice amorphe à l'échelle nanométrique, de 50-70 nm de diamètre, et à l'échelle submicronique, de 130-150 nm de diamètre, ont ainsi été développées à façon en collaboration avec la société Nano-H. Les particules comportaient une sonde fluorescente sensible aux variations de pH intracellulaire. Elles ont ainsi permis de déterminer leur devenir intracellulaire en distinguant les nanoparticules présentes au sein des vésicules de phagocytose par rapport à celles dans le cytoplasme ou adsorbées en surface de la cellule. Différentes méthodes de microscopie et de fluorimétrie ont été associées afin de détecter et quantifier l'internalisation des particules.
- Enfin il est apparu nécessaire de s'intéresser à l'influence de l'adsorption des protéines, et autres éléments du milieu de culture, à la surface des nanoparticules. En effet, la corona protéique peut masquer les groupements de surface des nanoparticules et leur conférer de nouvelles caractéristiques physico-chimiques. Des nanoparticules de silice de 50-70 nm de diamètre avec des groupements chimiques de surface contrôlés (groupements carboxyliques et groupements amines) et en présence ou non de PEG ont été développées en collaboration avec l'équipe FENNEC. Le but était d'étudier l'impact de la nature chimique de surface des nanoparticules, et en particulier de la gêne stérique due à leur pégylation, sur leur activité biologique. En complément, une collaboration avec l'Institut Albert Bonniot (IAB) de

Grenoble a permis d'apporter des résultats préliminaires sur l'analyse des protéines de la corona de ces échantillons de nanoparticules.

Chacune de ces parties a conduit à la rédaction d'une publication présentée dans les chapitres suivants. Pour finir, une conclusion générale et des propositions de perspectives sont présentées.

I. Effet de la fonctionnalisation de surface des nanoparticules de silice sur leur adsorption à la surface de la cellule, leur internalisation et leur cytotoxicité

I.1. Introduction et méthodologie

En collaboration avec l'ILM, des mises au point concernant une méthode de synthèse de nanoparticules de charges de surface différentes, par fonctionnalisation avec des groupements amines ou des groupements carboxyliques à différentes densités, ont été réalisées. Les échantillons devaient être stables pour comparer la bio-toxicité induite par les nanoparticules. D'autre part, des mises au point complémentaires ont été nécessaires pour obtenir une intensité de fluorescence suffisante pour l'étude de l'internalisation des nanoparticules par les cellules en fluorimétrie. Cinq types de nanoparticules composées d'un cœur d'or et d'une coquille de silice amorphe fluorescente ont été étudiés et sont décrits dans la publication suivante soumise à *Journal of Nanoparticle Research* en mai 2014.

La méthode de caractérisation physico-chimique (Annexe I) des nanoparticules en termes de diamètre hydrodynamique et de potentiel zêta est détaillée en annexe.

Les méthodes utilisées couramment au laboratoire pour l'étude de particules à l'échelle micrométrique et submicronique ont été adaptées pour les nanoparticules. La méthode pour la quantification du processus de phagocytose au Bleu Trypan, expliquée dans la publication, est résumée en figure 21 et les tests commerciaux de cytotoxicité sont détaillés en annexe (Annexe II). De plus, pour ces derniers, impliquant des réactions de colorimétrie ou de fluorimétrie indirectes, l'absence d'artefact dû aux nanoparticules a été vérifiée (Annexe II).

L'adhérence des macrophages, cellules semi-adhérentes, à leur support est nécessaire pour induire leur activation. Ainsi, une étude préalable pour déterminer le temps minimum d'adhérence des macrophages a été réalisée par simple observation à la loupe binoculaire. Il a été établi qu'après 4 heures de culture, une agitation délicate du milieu à la pipette n'induit plus de détachement des cellules. D'autre part, une cinétique d'internalisation des nanoparticules par les macrophages a été réalisée sur 24 heures afin de déterminer le temps de contact suffisant entre les cellules et les nanoparticules pour étudier leurs interactions. Il a été établi que l'internalisation cellulaire mesurée par fluorimétrie atteint un plateau significatif après 15 heures de contact et n'évolue pas dans les 10 heures suivantes. Pour des raisons techniques le temps de contact nanoparticules/cellules a été fixé à 20 heures après les 4 heures nécessaires à l'adhérence des cellules seules au fond des puits de culture.

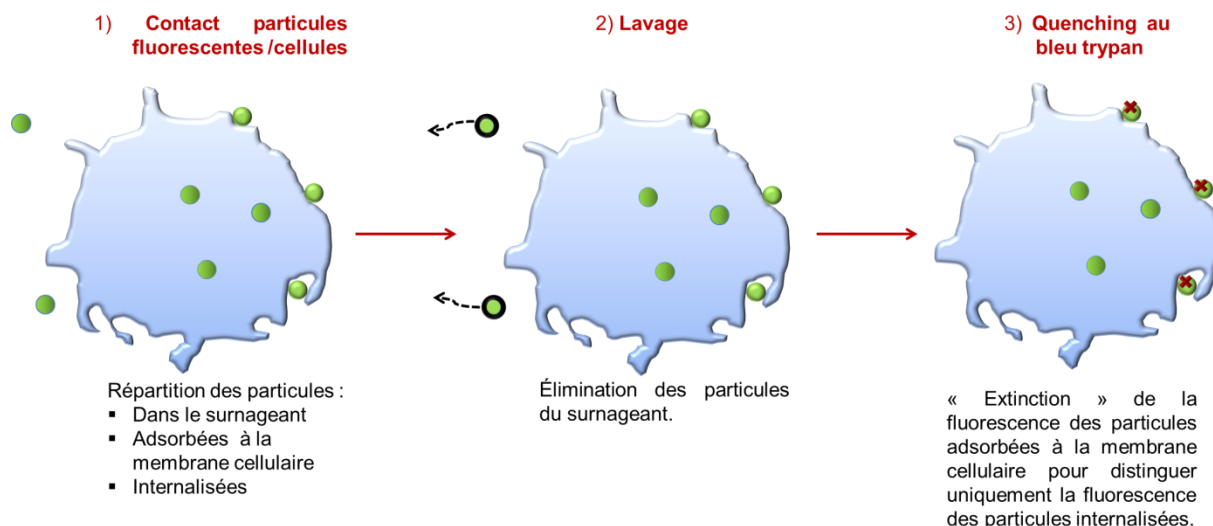


Figure 21 - Principe de la quantification de la phagocytose par quenching au bleu trypan (D'après Leclerc et al., 2010).

A ce jour il n'existe pas de normalisation concernant les doses pertinentes de nanoparticules à mettre au contact des macrophages, de plus la littérature est assz hétérogène pour ce paramètre, les doses étudiées ont donc été déterminées en vue de détecter un signal d'internalisation significatif et permettre la comparaison entre les différents types de nanoparticules. Pour cela des essais préliminaires, de quantification de la phagocytose et de dosage de la production du signal pro-inflammatoire TNF- α , ont été menés sur une gamme de doses semi-logarithmiques (5 - 10 - 20 - 50 - 100 - 300 - 500 - 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour microgramme de nanoparticules par millilitre de milieu de culture). Les doses 5 et 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ont été choisies car elles induisaient des effets significativement différent, de plus elles correspondent aux doses utilisées majoritairement dans les études *in vivo* et. La forte dose de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a également été retenue, bien qu'elle soit sans doute peu comparable à une exposition réelle, car elle induisait un signal significatif pour l'ensemble des nanoparticules étudiées ce qui a facilité les mises au point des techniques.

Différentes techniques de microscopie ont permis d'observer qualitativement les interactions nanoparticules/cellules : les méthodes de microscopie photonique après coloration de May-Grünwald Giemsa (Annexe III) et microscopie électronique après fixation des échantillons (Annexe IV) sont détaillées en annexes.

I.2. Publication I – Acceptée

ADSORPTION AT CELL SURFACE AND CELLULAR UPTAKE OF SILICA NANOPARTICLES WITH DIFFERENT SURFACE CHEMICAL FUNCTIONALIZATIONS: IMPACT ON CYTOTOXICITY

Andréa Kurtz-Chalot, Jean-Philippe Klein, Jérémie Pourchez, Delphine Boudard, Valérie Bin, Gustavo B. Alcantara, Matteo Martini, Michèle Cottier and Valérie Forest.

A. Kurtz-Chalot (*Corresponding author: kurtz-chalot@emse.fr*), J. Pourchez, V. Forest
École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, 158 cours Fauriel, CS62362, 42023 Saint-Etienne cedex 2, France.

J.P Klein, D. Boudard, V. Bin, M. Cottier
LINA Laboratoire Interdisciplinaire d'étude des Nanoparticules Aérosolisées (EA 4624) Faculté de Médecine Jacques Lisfranc, 15 rue Ambroise Paré, 42023 Saint-Étienne Cedex 2, France.

G.B. Alcantara
PRES Lyon, Centre de Microscopie Confocale Multiphotonique, INSA de Lyon, Bâtiment Blaise Pascal 7 avenue Jean Capelle, 69621 Villeurbanne Cedex, France.

M. Martini
ILM, Institut Lumière Matière, UMR 5603 CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Bâtiment Kastler 10 rue Ada Byron, 69622 Villeurbanne cedex, France.

Abstract Silica nanoparticles are particularly interesting for medical applications because of the high inertness and chemical stability of silica material. However, at the nanoscale their innocuousness must be carefully verified before clinical use. The aim of this study was to investigate the *in vitro* biological toxicity of silica nanoparticles depending on their surface chemical functionalization. To that purpose, three kinds of 50 nm fluorescent silica-based nanoparticles were synthesized: 1) sterically stabilized silica nanoparticles coated with neutral polyethylene glycol (PEG) molecules, 2) positively charged silica nanoparticles coated with amine groups and 3) negatively charged silica nanoparticles coated with carboxylic acid groups. RAW 264.7 murine macrophages were incubated for 20 hours with each kind of nanoparticles. Their cellular uptake and adsorption at the cell membrane were assessed by a fluorimetric assay and cellular responses were evaluated in terms of cytotoxicity, pro-inflammatory factor production and oxidative stress. Results showed that the highly positive charged nanoparticle, were the most adsorbed at cell surface and triggered more cytotoxicity than other nanoparticles types. To conclude, this study clearly demonstrated that silica nanoparticles surface functionalization represents a key parameter in their cellular uptake and biological toxicity.

Key words Silica nanoparticles, macrophages, surface functionalization, uptake, pro-inflammatory effect, cytotoxicity.

INTRODUCTION

Because amorphous silica is characterized by chemical stability and inertness independently of pH and temperature, it is used for biomedical applications like dental fillings, gel-catheters, biosensors and bioengineering of bone (Auffinger et al. 2013; Colilla et al. 2008; Vallet-Regi and Balas 2008). Recently amorphous silica has encompassed the emerging field of nanotechnology (as anti-caking agents in food, as nano-abrasive in cosmetics, as reinforcing fillers in rubber...)(Napierska et al. 2010). It is also of particular interest for nanomedicine because of the advantages silane chemistry offers (Slowing et al. 2008; Mignot et al. 2013). Indeed, the surface of silica nanoparticles can be modified with chemical functional groups like addition of specific antibodies or fluorescent labels for specific drug delivery (targeting of cancer cells) or specific diagnosis (tumor labeling)(Chandolu and Dass 2013). As an example dye-doped fluorescent (Cyanine-5) silica nanoparticles (8 nm in diameter), known as “Cornell dots”, have been approved in 2011 by the US Food and Drug Administration (FDA) for human stage I molecular imaging of cancer (Benezra et al. 2011). Those confirm the importance of future clinical potentials of silica-based nanoparticles as effective and specific medical tools. However, those objects exhibiting novel and significantly improved physical and chemical properties due to the nanoscale, consequently exhibit a novel biological activity in human body (Lidén 2011; Riehemann et al. 2009). This is why current *in vivo* and *in vitro* researches are ongoing for a better knowledge of nanoparticles fate and to provide safer uses (Seaton and Donaldson 2012).

Nanoparticles whose size is close to that of cellular components, may interact specifically with cells (Huang et al. 2005). They can adhere to the cell membrane or be entirely engulfed by different pathways, especially by macrophage cells due to their phagocytic capacity (Leclerc et al. 2012). In order to better understand these interactions, fluorescent labeled nanoparticles may be used and tracked through the cells. Literature highlights that the uptake of nanoparticles (pathway and rate) strongly depends on cell type (Sohaebuddin et al. 2010) and on the nanoparticle physico-chemical features (Musyanovych et al. 2011; Chung et al. 2007; Hu et al. 2007). It is well admitted that these latter may play a role in nanoparticle cytotoxicity (Greish et al. 2011; Yu et al. 2011; Chung et al. 2007), and several parameters to take into consideration to engineer safer nanoparticles were defined by ISO TS/13014 (2012a) (“safer by design” approach): size, shape, surface functionalization, state of agglomeration and aggregation, composition, solubility, dispersibility, specific surface area, density of surface groups and surface chemistry (Frohlich 2012; Duffin et al. 2007; Albanese et al. 2012). This study will focus on nanoparticle surface functionalization.

Greish et al. already demonstrated that surface charge of silica nanoparticles (coated with amine or hydroxyl groups) significantly influenced their biodistribution in mice. But toxicity evaluated by animal weight loss did not seem to be influenced by the surface charge of the nanoparticles (Greish et al. 2011). Landsiedel et al. showed that during short-term inhalation of silica particles (coated with amine or PEG) by rats, surface modifications changed the toxicity of the core material in terms of cytokine production in broncho-alveolar lavage fluid (BALF) (Landsiedel et al. 2014). In a complementary way, *in vitro* assays are informative on the direct interactions between immune cells and nanoparticles. For example, Nabeshi et al., incubated unmodified or modified (with amine or hydroxyl groups) silica nanoparticles with murine

macrophages and revealed that the cell proliferation decreased when cells were incubated with unmodified silica nanoparticles; they concluded that the surface functionalization by both amino and hydroxyl groups decreased their toxicity (Nabeshi et al. 2011). In the same way, Lankoff et al., showed that, in contrast to unmodified silica nanoparticle, positively charged nanoparticles with aminopropyl/vinyl coating expressed no cytotoxicity on lymphocytes (cell viability, apoptosis/necrosis...) (Lankoff et al. 2013). Thus, nanoparticle coating may allow safer nanomedicine and number of studies point out the importance of surface functionalization of nanoparticles on their interaction with cells and biological responses (Dausend et al. 2008; El Badawy et al. 2011; Mura et al. 2011).

However, one of the particularities of nanoparticles to consider is that they are changing objects. Their “biological identity” evolves in biological media over time (Faunce et al. 2008; Dell’Orco et al. 2010). Proteins are adsorbed and desorbed from the nanoparticle surface. This so called “corona” becomes the first element of the nanomaterial in contact with the cells. It is difficult to determine precisely, therefore, it is important to characterize again nanoparticles in culture media in terms of surface charge and size (Walkey and Chan 2012).

The aim of the present study was to investigate the relationship between surface functionalization of silica nanoparticles and their cellular uptake and toxicity. For that purpose, three kinds of 50 nm fluorescent (fluorescein isothiocyanate - FITC) silica-based nanoparticles were synthesized at the laboratory scale: 1) sterically stabilized nanoparticles coated with neutral polyethylene glycol (PEG) molecules, 2) positively charged nanoparticles coated with amine groups and 3) negatively charged nanoparticles coated with carboxylic acid groups. Nanoparticles were incubated with murine macrophages as these cells represent the first line of defense against inhaled exogenous elements and are an *in vitro* reference model in nanotoxicology. Cellular uptake and adsorption at cell membrane was then assessed by fluorimetry and the cellular response was evaluated in terms of cytotoxicity: loss of cell membrane integrity (determined by the Lactate DeHydrogenase (LDH) assay), pro-inflammatory effect (TNF- α production) and oxidative stress (Reactive Oxygen Species (ROS) generation).

MATERIALS AND METHODS

Nanoparticles synthesis

Silica-based nanoparticles, called NP, were prepared according to a previous method developed by Martini *et al.* (Martini et al. 2009). The fluorescence of FITC was increased by the gold core by Förster resonance energy homo-transfer (homo-FRET) non radiative.

Five kinds of nanoparticles were produced and referred according to charges profile of their surface chemical groups. Sterically stabilized were referred to as NP(0), positively charge stabilized nanoparticles were coated with a variable amount of amine groups: NP(++) and NP(+), negatively charge stabilized nanoparticles with a variable amount of carboxylic acid groups: NP(--) and NP(-).

The water/oil (W/O) microemulsion procedure was considered the best way to produce homogeneous and reproducible core-shell samples for systematic biological assays. Indeed, each reverse micelle (aqueous droplets sized ~10 nm) acts as template for the controlled-growth of core-shell structures. Quaternary W/O

microemulsions were prepared by mixing Triton X-100 (surfactant), n-hexanol (co-surfactant) and cyclohexane (oil), followed by sequential additions of specific polar-like precursors. An inclusion of gold clusters at the center of each particle was obtained by the reduction of gold salt in presence of ligands and NaBH_4 . The formation of polysiloxane matrix arised from the base-catalyzed hydrolysis and condensation of two silica precursors: 92 %w TEOS (tetraethoxysilane) and 8 %w dye conjugated-APTES ((3-aminopropyl)triethoxysilane). APTES conjugates ensured a covalent bonding of dyes (Fluorescein molecules FITC) and their random distribution within nanoparticles. The colloidal stabilization was then achieved by the final addition of specific silane precursors that leads the specific surface charge for further biological assays (Table 1). In order to obtain an average number of negative charge per surface unit equal to $2/\text{nm}^2$ (NP(--)), a controlled amount of 3-(Triethoxysilyl)propylsuccinic anhydride (Si-COOH) has been added, whereas for the positive charged nanoparticles (NP(++)), N-(2-Aminoethyl)-3-aminopropylmethyldimethoxysilane was chosen as precursor. Neutral particles, NP(0), exhibit $1/\text{nm}^2$ N-(3-Triethoxysilylpropyl)gluconamide molecules as well as $1/\text{nm}^2$ mPEG-silane 2kDa at their surface, giving an additional steric contribution to the colloidal stability. Thereafter, all solvents were eliminated by the addition of acetone followed by several cycles of vortexing and centrifuging. Unreacted dyes and precursors were removed by ultrafiltration using 300 kDa PES membranes (with a purification rate higher than 108). Particles were dispersed in aqueous solution (2g/L) and stored at 4°C .

Physico-chemical characterization of nanoparticles

The detailed structural and morphological characterization of the samples was carried out by Scanning Electron Microscopy (SEM) using an ESEM XL30-FEI microscope equipped with a thermal field emission gun (FEG) and Transmission Electron Microscopy (TEM) using a Philips CM200 microscope. The samples were prepared by depositing a drop of diluted colloidal solution onto a carbon grid (200 meshes) and allowing the solvent to evaporate at room temperature. The direct measurement of hydrodynamic size as well as zeta potential was performed by Dynamic Light Scattering (Zetasizer NanoZS, Malvern). The monoexponential correlation function obtained allowed determining the hydrodynamic size, and zeta potential values for nanoparticles dispersed at dose of $100\mu\text{g}/\text{mL}$ in MilliQ water or cell culture medium Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% of fetal calf serum (Invitrogen) and 1% penicillin-streptomycin (penicillin 10,000 units/mL, streptomycin 10 mg/mL; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) (DMEMc). Measurements were performed in triplicate at room temperature of 25°C . Refractive index (RI) and viscosity values were applied for water and cell culture medium (1.3 mPa.s viscosity for culture medium and 0.8 mPa.s viscosity for water).

Cell culture

RAW 264.7 cell line derived from mice peritoneal macrophages transformed by the Abelson murine leukemia virus and was provided by ATCC Cell Biology Collection (Promochem, LGC, Molsheim, France). Cells were cultured in DMEMc at 37°C and under a 5% carbon dioxide humidified atmosphere

Cells/nanoparticles contacts

For cell morphology analysis, RAW 264.7 cells were seeded in a 12-well plate (1 million cells per well) and were allowed to attach for 4h. Cells were incubated with 50 or 300 µg/mL of nanoparticles suspension for 20h. Cells were harvested and 100µL of cell suspension were used to prepare cytospin after cytocentrifugation (cytospin IV Shandon, Thermo electric, France). Cells were stained by May-Grünwald Giemsa method and observed under camera microscope (NIS-elements, Nikon, France). A semi-quantitative analysis was conducted after the observation of 100 cells in order to determine the amount of activated macrophages.

Because in vitro experimental researches are not normalized in term of nanoparticles dose (Bhattacharjee et al. 2010; Yu et al. 2011; DeLoid et al. 2014) and a significant cell response is needed to compare the effects of the differently designed nanoparticles, the dose range was chosen after a preliminary study on a logarithmic scale as 5, 50 and 300 µg/mL.

For cellular uptake and cytotoxicity assays, macrophages were seeded in 96-well plates (100 000 cells in 200µL of medium per well) and were allowed to adhere for 4 h. Nanoparticles were diluted in cell culture medium to reach the following final concentrations: 5, 50, and 300 µg NP/mL. Nanoparticles were added to cells and incubation lasted 20h.

Cellular uptake assessment

Nanoparticle uptake was quantified using a fluorometer (Fluoroskan Ascent, ThermoLabSystems, France). FITC labeled nanoparticles have an excitation peak at 485 nm and an emission peak at 538 nm (green fluorescence) with a large spectrum. Total nanoparticles fluorescence was measured at each dose in order to obtain a calibration curve. Then the fluorescence of nanoparticles in supernatant, adsorbed to cell membrane and internalized by cells were discriminated by a “trypan blue quenching” (TB) method previously developed by Leclerc et al. from flow cytometry techniques (Van Amersfoort and Van Strijp 1994; Nuutila and Lilius 2005; Leclerc et al. 2010). In addition to its principal function as an exclusion dye of dead cells, TB is known for its ability to “turn off” the green fluorescence emitted by FITC labeled particles outside the cells (Leclerc et al. 2012). This process allowed us to distinguish internalized nanoparticles from those just adhering to the plasma membrane (Gratton et al. 2008). After 20 hours of contact between nanoparticles and macrophages, the fluorescence of nanoparticles remained in cell supernatant was measured as well as the fluorescence of nanoparticles adsorbed at the cell surface and the fluorescence of the nanoparticles uptaken by cells. For each condition, nanoparticles fluorescence was measured independently. Control wells without nanoparticles were used to assess the autofluorescence of cells in culture medium.

Cellular uptake of nanoparticles was also observed using transmission electron microscopy (TEM). TEM images were obtained using a JEOL 2010F FEG microscope at a 200 kV accelerating voltage. Samples were prepared by dropping sample suspension on a carbon-coated holey film supported on a 3 mm mesh copper grid.

Cytotoxicity assays

Membrane integrity

The release in the cell culture supernatant of the cytoplasmic lactate dehydrogenase (LDH) from cells with damaged membranes was assessed using the CytoTox-96™ Homogeneous Membrane Integrity Assay (Promega, Charbonnières les bains, France) according to the manufacturer's instructions. The optical density of the samples was determined using a microplate reader (Multiskan RC; Thermolabsystems, Helsinki, Finland) set to 450 nm. The activity of the released LDH was reported to that of total cellular LDH (measured after control cell lysis) and was expressed as a percent of the control lysed cells. Each experiment was repeated independently three times for each sample.

As nanoparticles could potentially interfere with the different kit reagents, it was verified that there was no artifact in the measure. To that purpose, nanoparticles were incubated with cells for 20h and the LDH assay was performed. Then the samples were lysed and the LDH assay was carried out again. No significant difference was detected between lysed cells incubated with or without nanoparticles, showing the reliability of the assay.

Pro-inflammatory effect

After incubation with nanoparticles, the production of TNF- α was assessed in the supernatant using a commercial ELISA Kit (Quantikine® Mouse TNF- α Immunoassay; R&D Systems, Lille, France) according to the manufacturer's instructions. The optical density of each sample was determined using a microplate reader (Multiskan RC; Thermolabsystems, Helsinki, Finland) set to 450 nm. A standard curve was established, and results were expressed in picograms per milliliter of TNF- α . Each experiment was repeated independently three times for each sample and included controls: cells alone (negative control) and DQ12 quartz (toxicological positive control) (Bruch et al. 2004; Fubini et al., 2004).

In order to verify the absence of any artifact caused by the presence of the nanoparticles, the concentration of a standard solution of TNF- α was assessed with the ELISA test (in cell free conditions). Particles were then added to this solution and the TNF- α concentration was assessed again. No significant difference in TNF- α concentration was observed between the sample with and the sample without nanoparticles indicating that no artifacts occurred in the assessment due to the nanoparticles.

Oxidative stress

A large array of reactive oxygen species (ROS) activity can be assessed with the OxiSelect™ ROS Assay Kit (Euromedex, Mundolsheim, France). The assay uses the conversion of a non-fluorescent substrate, 2,2'-dichlorodihydrofluorescein diacetate that can easily diffuse through cell membranes and be converted into a fluorogenic molecule 2,2'-dichlorodihydrofluorescein (DCF) in the presence of ROS and which fluorescence is proportional to total ROS level. DCF production was detected using a Fluoroskan Ascent fluorometer (Thermolabsystems) using excitation and emission wavelengths of 480 and 530 nm respectively, and the generation of ROS was expressed as nanomolar. Each experiment was repeated independently three times for each sample.

In order to verify that no artifact was induced by the nanoparticles, a standard solution of DCFHDA was assessed either in presence or in absence of nanoparticles. No significant difference was detected between the samples indicating that no artifacts were involved.

Statistical analysis

Analysis and graphics were performed on Prism 5.0 software (GraphPad, San Diego, CA). Significance was established with two-way-ANOVA test (compared to negative control: cells alone) or one-way-ANOVA (compared to each other) and data considered significant with $p < 0.05$ are marked with an asterisk (*) sign. Each data point represents the mean of three independent experiments ($n = 3$) and is presented with the arithmetic standard error means (\pm s.e.m.).

RESULTS

Nanoparticles characterization

In Fig.1, the spherical shape was clearly observed by SEM. The dark gold core and the grey silica shell can easily be observed using TEM. Geometric diameters were measured from electron microscopy. Hydrodynamic diameters and zeta potential were measured using DLS. These data are reported in Table 1. In water and for each type of nanoparticles, the hydrodynamic diameter was correlated with the geometric diameter, whereas in DMEMc it was significantly increased. Similarly, zeta-potentials of the five kinds of nanoparticles were distinct in water but in DMEMc all zeta-potentials became negative, with the most important decrease in surface charges observed for the nanoparticles exhibiting the highest initial charges: NP(--) and NP(++).

Cellular uptake

Cellular uptake was then quantified using a quantitative assessment by fluorimetry as reported in Fig.2. The amounts of nanoparticles in supernatant, adsorbed at cell membrane or uptaken were determined. It clearly appeared that nanoparticles mainly remained in the supernatant whatever the surface functionalization. Moreover uptake and adsorption were found to be dose-dependent irrespective of the nanoparticle type. Therefore, at the same dose, the amount of nanoparticles uptaken and adsorbed at the cell surface was surface charge-dependent: the uptake was more important for the nanoparticles exhibiting negative charges: NP(--), NP(-) or neutral charges NP(0). Almost no uptake was detected for positively charged NP(+) and NP(++). In contrast, a higher adsorption at cell membrane was observed for the positively charged nanoparticles NP(++), and then NP(+).

Cellular uptake was also investigated by TEM. Similar patterns of cellular uptake were observed for the different types of nanoparticles. An illustration is given in Fig.3 for control cells and cells incubated with 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of NP(0) or NP(++). The observations were in good accordance with the quantitative uptake presented in Fig.2 except for NP(++). Indeed, no uptake of NP(++), was detected by fluorescence even at the high dose of 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ while uptake of NP(++), by microscopy was actually observed.

Cytotoxicity

Cell morphology

Fig.4 shows the global morphology of cells after a 20h contact with NP(0) and the nanoparticles exhibiting the highest charges: NP(--) and NP(++). Two concentrations of nanoparticles were tested: 50 and 300 µg/mL. At low dose, large vesicles clearly appeared in cytoplasm of cells in contact with NP(++), suggesting the macrophages activation (Luzio et al. 2003). At high dose, the amount of vesicles was increased in cells incubated with each type of nanoparticles. Similarly, cells with a lysed membrane and condensed nucleus, called “ghost” cells, were clearly identified demonstrating advanced cytotoxicity, especially with NP(++).

Table 2 is a semi-quantification of the cell morphology evolution. It took a high dose of NP(--) and NP(0) to activate macrophages without inducing a significant mortality (5 and 16% of ghost cells respectively). On the contrary, at low dose NP(++), activated much more macrophages (79%) and provided a high level of mortality at high dose (77% of ghost cells) suggesting that NP(++), were the most cytotoxic nanoparticles.

Membrane integrity

Quantitative results for membrane integrity assay are shown in Fig.5. The LDH release triggered by NP(-), NP(0) and NP(+) was not significantly different from that of control cells (incubated without nanoparticles). On the opposite, NP(++), were found to be cytotoxic at doses as low as 5 µg/mL and NP(--) became significantly cytotoxic at the highest concentration (300 µg/mL). A dose-dependent effect appeared for those two types of nanoparticles.

TNF-α pro-inflammatory production

Pro-inflammatory effects of the nanoparticles were determined by the TNF-α assay. Results are shown in Fig.6. Basal level of TNF-α production was increased by the presence of nanoparticles for the five types of nanoparticles only at high doses. The inflammatory effect was dose-dependent and nanoparticles biological effect exceeded the positive control DQ12 signal at high doses of 300 µg/mL. NP(++), induced the highest pro-inflammatory signal from doses of 50 µg/mL.

Oxidative stress

No significant oxidative stress was detected when cells were incubated with the different types of nanoparticles. Relative quantification of ROS probe DCF in cells in contact with each kind of nanoparticles was around 45 nM (data not shown) and was not statistically different from 48 nM detected for control cells.

DISCUSSION

This study aimed at understanding the relationship between the surface chemical functionalization of 50 nm silica-based nanoparticles, their toxicity and ability to be uptaken by cells. A series of fluorescent nanoparticles constituted by a polysiloxane-coated gold cluster that encapsulates FITC were prepared by a

microemulsion method. SEM analysis confirmed the presence of well-organized film of nanoparticles with spherical shape (Fig.1(A)). TEM images revealed gold/polysiloxane nanoparticles with an average size of 54 nm and a standard deviation value less than 2 nm (Fig.1(B)). A thorough physico-chemical characterization of the nanoparticles was carried out in water and in cell culture medium DMEMc by dynamic light scattering instrument. It was observed that the hydrodynamic diameter and the zeta potential of the nanoparticles exhibiting the highest charges (i.e. NP(--) and NP(++)) were the most evolving in DMEMc. Both diameters became superior to 100 nm and zeta potentials decreased to about -95mV due to the buffered culture medium. Those changes between water and culture medium are very likely due to the adsorption of proteins from the culture medium at the nanoparticles surface forming the so-called "corona" (Cedervall et al. 2007). Therefore, chemical groups initially grafted onto the nanoparticle surface are hidden by proteins and nanoparticle surface charge is rather related to the nature of the adsorbed proteins. Thus, initially positively charged and initially negatively charged nanoparticles may exhibit a similar global negative zeta potential in cell culture medium. Moreover it does not imply an equivalent protein corona (Lundqvist et al. 2008; Tenzer et al. 2013). This difference in protein corona composition may consequently mediate different interactions with cells. And indeed, we observed that initially positively charged nanoparticle were less uptaken than initially negatively charged nanoparticles (Fig.2). The initial nanoparticle charge can thus indirectly influence the interactions with cells through the chemical nature of the corona. Qiu et al. showed as well that proteins quickly adsorbed onto gold nanorods of different surfaces and turned the nanoparticles surface charges negatively. When incubated with a human breast adenocarcinoma cell line (MCF-7) it resulted that surface charge of nanoparticles may not directly affect the cellular uptake, but the amount of serum proteins adsorbed on the nanoparticles was positively correlated with the capacity of nanoparticles to enter into cells (Qiu et al. 2010).

Hydrodynamic diameter and zeta potential of NP(-) and NP(+) did not evolve much certainly due to a poor density of charged surface groups. Similarly, NP(0) coated with PEG did not significantly vary in the transition from water to DMEMc. This was consistent with literature data as it is admitted that « PEGylation », i.e. the grafting of linear chains of PEG at nanomaterial surface, allows reducing protein adsorption by blocking protein-binding sites and creating a steric hindrance (Walkey et al. 2012).

Nanoparticles were incubated with macrophages and their uptake was assessed before the evaluation of their in vitro toxicity. Concerning the uptake of NP(++), results from TEM and fluorimetry analyses seemed contradictory at first sight. However it should be kept in mind that these two techniques were performed with a different aim and can hardly be directly compared. Indeed, TEM images were used to verify the presence (or not) of nanoparticles in cells (Gratton et al. 2008). They also allowed obtaining information on the subcellular localization of nanoparticles within cells. Indeed, TEM visualization confirmed the cellular uptake of the five kinds of studied nanoparticles with an accurate localization in vesicles (Fig.3). However, this method, takes into account only survival cells and was not representative to all cells initially in contact with nanoparticles. Besides, this technique is essentially qualitative and does not permit to rigorously quantify the number of nanoparticles uptaken. Moreover, the preparation of the samples and the technique itself are too heavy to perform enough analyses to get statistically relevant

results. On the opposite, fluorimetry was used to obtain quantitative data and to compare the capacity of different types of nanoparticles to be uptaken by cells. Furthermore, this method, combined with the use of the Trypan Blue dye, allows to distinguish FITC fluorescent nanoparticles uptaken from nanoparticles adsorbed (Nuutila and Lilius 2005) at the cell membrane by quenching the fluorescence of nanoparticles outside cells. Those data were expressed as means of detected fluorescence per cell related to the total amount of previously seeded cells in each well. It should be noted that FITC fluorescence might be altered in endocytosis vesicles because of their high acidity (Munkholm et al. 1990; Ohkuma and Poole 1978). Thus, the number of nanoparticles per cell could be slightly underestimated but it allowed to compare the ability of each type of nanoparticles to be uptaken by cells.

Interestingly, NP(++) was the kind of nanoparticles the most adsorbed at the cell surface. Many authors already reported that high adsorption of positive nanoparticles may be related to electrostatic interactions with the negatively charged cell surface (Ge et al. 2009; El Badawy et al. 2011). But, as previously mentioned, initially positively charged nanoparticles exhibited a negative zeta potential in cell culture medium due to the formation of a protein corona. This suggests that the assumption of a high adhesion of positive nanoparticles to cell membrane through electrostatic interactions should be revisited in favor of an indirect effect due to the protein corona. These interactions need further investigations to be better understood.

Similarly, it is commonly accepted in the literature that positively charged nanoparticles are more uptaken than other kinds of nanoparticles (Chung et al. 2007; Yue et al. 2011). For instance Guarnieri et al. reported that (25 to 115 nm) particles surface functionalized with positively charged groups were more uptaken than those functionalized with negatively charged groups (Guarnieri et al. 2014). Likewise, Rancan et al. reported that the functionalization of the particle surface with positively charged groups enhanced the in vitro cellular uptake (Rancan et al. 2012). These data appear in contradiction with our results, showing that NP(++) and NP(+) were less uptaken than NP(0) or NP(--) and NP(-). This could be due to a difference of functionalization in group types and density as suggested by Graf et al. Indeed, they discussed that one type of (55 nm) positively charged particle (AHAPS) was easily internalized by macrophages, while another type of positively charged particle (short alkyl chain aminosilanes) was uptaken by cells in a lower amount (Graf et al. 2012).

These studies also established a link between a low uptake and particles aggregation. In particular, Guarnieri et al. demonstrated that the fact that positive nanoparticles were more internalized than negative nanoparticles was contrasted by the tendency of particles to form agglomerates leading to lower internalization efficiency. This could explain our observations. In fact, among the DLS data, size measurements showed several peaks corresponding to different hydrodynamic diameters were represented, which is a characteristic of a polydisperse suspension. For example, for the sample of NP(0) in DMEMc, peaks of 10 nm, 88 nm and 450 nm in diameter were observed. For each sample, the assumption was made that the peak with the closest value to the nanoparticle geometric diameter (measured on TEM images) corresponded to the nanoparticle population and indicated its hydrodynamic diameter. For example, NP(0)

hydrodynamic diameter was determined as being 88 nm (the 10 nm population was certainly debris and the 450 nm population was certainly aggregates of proteins and nanoparticles). Moreover, the DLS data indicated for each peak a distribution rate, which was assumed to be equivalent to the percentage of monodispersed nanoparticles. This led to estimate that 5% of NP(++) were monodispersed against 40 and 30 % for NP(0) and NP(--) respectively. Therefore, NP(++) were less internalized than NP(0) and NP(-) possibly in relation to their agglomeration state.

Discrepancies between our results and that of Guanieri et al. can also be explained by the fact that experiments were carried out using different cell models. This hypothesis is supported by Chung et al. study (Chung et al. 2007) where the surface charge of mesoporous silica nanoparticles varied by the degree of surface modification with N-trimethoxysilylpropyl-N,N,N-trimethylammonium chloride and their uptake was detected by flow cytometry in different cell lines (3T3-L1 and human mesenchymal stem cells). Results showed that particle uptake by human mesenchymal stem cells can be regulated by a threshold of positive surface charge but also implied that the modulation of surface charge on nanoparticles uptake was specific to cell type.

Nevertheless, those quantitative results may be differently interpreted considering morphological May-Grünwald Giemsa microscopic images (Fig.4). Taken together, fluorescent uptake quantification and morphology images of cells in contact with NP(++) showed that NP(++) exhibited the lowest uptake and the highest cytotoxicity. Considering those results, two assumptions could be made: (1) A simple contact between nanoparticles and the cell membrane is sufficient to induce the cytotoxicity. In other words, NP(++) do not need to be uptaken to be cytotoxic. (2) The low amount of internalized NP(++) might not necessarily be related to a lower uptake but could be due to an important release of the nanoparticles outside of the cell in relation to their high cytotoxicity, precluding the detection of previously engulfed nanoparticles and a very important ghost morphology. Consistent with this hypothesis is the fact that NP(++) induced a significant loss of membrane integrity (LDH release) from the lowest doses (5 and 50 $\mu\text{g/mL}$) and a significant pro-inflammatory effect from low dose (50 $\mu\text{g/mL}$) while no cytotoxicity is detected for other nanoparticles types. Moreover, this second assumption could explain contradictory results obtained from TEM and fluorimetry analyses for NP(++). As a matter of fact, TEM images mainly showed intracellular nanoparticles in observed cells while fluorimetry quantification method showed very low content of internalized NP(++). If we consider that NP(++) induce a high level of loss of membrane integrity that lead to a high release of NP(++), we deduced that only the few surviving cells and cells containing NP(++) were not representative of the high amount of cells put in contact with nanoparticles. Besides, the relative lower detection limit of the fluorimetry method does not allowed to detect this very low uptake.

Results from cytotoxicity assessments also showed that nanoparticles exhibiting a poorly negative or a poorly positive surface charge may exhibit the same cytotoxic profile than neutral nanoparticles. Indeed, NP(0), NP(-) and NP(+) did not show a significant loss of membrane integrity but provided pro-inflammatory effect at high dose (300 $\mu\text{g/mL}$). No significant oxidative stress was detected which is

consistent with a similar study carried out by Panas et al. where the same RAW264.7 macrophages were incubated with engineered silica nanoparticles of 25 nm diameter (Panas et al. 2013).

CONCLUSION

The present study clearly demonstrated that surface chemical functionalization plays a key role in the interactions between silica-based nanoparticles and cells with a significant impact on their uptake and biological in vitro toxicity. The highly positively charged nanoparticles were the most adsorbed at cell surface but were negligibly uptaken and triggered more cytotoxicity than other nanoparticles types. The highly negatively charged nanoparticle, were the most uptaken by cells and triggered cytotoxicity only at high dose. Neutrally charged nanoparticles and poorly, positively or negatively, charged nanoparticles expressed the same cytotoxic profile with a pro-inflammatory effect at high dose. Importantly, our findings suggest that nanoparticles adsorption at the cell membrane seems to play a more important role in cytotoxicity than nanoparticles uptake. Further investigations are needed to better understand how nanoparticle surface charge may impact biological responses in order to provide a “safer by design” approach for the engineering of new nano-objects.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to acknowledge the financial support of the Région Rhône-Alpes and the Conseil Général de la Loire.

REFERENCES

- Albanese, A., Tang, P.S., and Chan, W.C.W. (2012). The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu Rev Biomed Eng* 14, 1–16.
- Van Amersfoort, E.S., and Van Strijp, J.A. (1994). Evaluation of a flow cytometric fluorescence quenching assay of phagocytosis of sensitized sheep erythrocytes by polymorphonuclear leukocytes. *Cytometry* 17, 294–301.
- Auffinger, B., Morshed, R., Tobias, A., Cheng, Y., Ahmed, A.U., and Lesniak, M.S. (2013). Drug-loaded nanoparticle systems and adult stem cells: a potential marriage for the treatment of malignant glioma? *Oncotarget* 4, 378–396.
- Benezra, M., Penate-Medina, O., Zanzonico, P.B., Schaer, D., Ow, H., Burns, A., DeStanchina, E., Longo, V., Herz, E., Iyer, S., et al. (2011). Multimodal silica nanoparticles are effective cancer-targeted probes in a model of human melanoma. *J Clin Invest* 121, 2768–2780.
- Bhattacharjee, S., de Haan, L.H.J., Evers, N.M., Jiang, X., Marcelis, A.T.M., Zuilhof, H., Rietjens, I.M.C.M., and Alink, G.M. (2010). Role of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity of organic monolayer-coated silicon nanoparticles towards macrophage NR8383 cells. *Part Fibre Toxicol* 7, 25.
- Bruch, J., Rehn, S., Rehn, B., Borm, P.J.A., and Fubini, B. (2004). Variation of biological responses to different respirable quartz flours determined by a vector model. *Int J Hyg Environ Health* 207, 203–216.
- Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggård, T., Thulin, E., Nilsson, H., Dawson, K.A., and Linse, S. (2007). Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 2050–2055.
- Chandolu, V., and Dass, C.R. (2013). Treatment of lung cancer using nanoparticle drug delivery systems. *Curr Drug Discov Technol* 10, 170–176.

- Chung, T.-H., Wu, S.-H., Yao, M., Lu, C.-W., Lin, Y.-S., Hung, Y., Mou, C.-Y., Chen, Y.-C., and Huang, D.-M. (2007). The effect of surface charge on the uptake and biological function of mesoporous silica nanoparticles in 3T3-L1 cells and human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 28, 2959–2966.
- Colilla, M., Manzano, M., and Vallet-Regí, M. (2008). Recent advances in ceramic implants as drug delivery systems for biomedical applications. *Int J Nanomedicine* 3, 403–414.
- Dausend, J., Musyanovych, A., Dass, M., Walther, P., Schrezenmeier, H., Landfester, K., and Mailänder, V. (2008). Uptake mechanism of oppositely charged fluorescent nanoparticles in HeLa cells. *Macromol Biosci* 8, 1135–1143.
- Dell’Orco, D., Lundqvist, M., Oslakovic, C., Cedervall, T., and Linse, S. (2010). Modeling the time evolution of the nanoparticle-protein corona in a body fluid. *PLoS ONE* 5, e10949.
- DeLoid, G., Cohen, J.M., Darrah, T., Derk, R., Rojanasakul, L., Pyrgiotakis, G., Wohlleben, W., and Demokritou, P. (2014). Estimating the effective density of engineered nanomaterials for in vitro dosimetry. *Nat Commun* 5.
- Duffin, R., Mills, N.L., and Donaldson, K. (2007). Nanoparticles-a thoracic toxicology perspective. *Yonsei Med. J.* 48, 561–572.
- El Badawy, A.M., Silva, R.G., Morris, B., Scheckel, K.G., Suidan, M.T., and Tolaymat, T.M. (2011a). Surface Charge-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 45, 283–287.
- El Badawy, A.M., Silva, R.G., Morris, B., Scheckel, K.G., Suidan, M.T., and Tolaymat, T.M. (2011b). Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 45, 283–287.
- Faunce, T.A., White, J., and Matthaehi, K.I. (2008). Integrated research into the nanoparticle-protein corona: a new focus for safe, sustainable and equitable development of nanomedicines. *Nanomedicine (Lond)* 3, 859–866.
- Frohlich, E. (2012). The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 7, 5577–5591.
- Fubini, B., Fenoglio, I., Ceschino, R., Ghiazza, M., Martra, G., Tomatis, M., Borm, P., Schins, R., and Bruch, J. (2004). Relationship between the state of the surface of four commercial quartz flours and their biological activity in vitro and in vivo. *Int J Hyg Environ Health* 207, 89–104.
- Ge, Y., Zhang, Y., Xia, J., Ma, M., He, S., Nie, F., and Gu, N. (2009). Effect of surface charge and agglomerate degree of magnetic iron oxide nanoparticles on KB cellular uptake in vitro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 73, 294–301.
- Graf, C., Gao, Q., Schütz, I., Noufele, C.N., Ruan, W., Posselt, U., Korotianskiy, E., Nordmeyer, D., Rancan, F., Hadam, S., et al. (2012). Surface functionalization of silica nanoparticles supports colloidal stability in physiological media and facilitates internalization in cells. *Langmuir* 28, 7598–7613.
- Gratton, S.E.A., Ropp, P.A., Pohlhaus, P.D., Luft, J.C., Madden, V.J., Napier, M.E., and DeSimone, J.M. (2008). The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 11613–11618.
- Greish, K., Thiagarajan, G., Herd, H., Price, R., Bauer, H., Hubbard, D., Burckle, A., Sadekar, S., Yu, T., Anwar, A., et al. (2011). Size and surface charge significantly influence the toxicity of silica and dendritic nanoparticles. *Nanotoxicology*.
- Guarnieri, D., Malvindi, M.A., Belli, V., Pompa, P.P., and Netti, P. (2014). Effect of silica nanoparticles with variable size and surface functionalization on human endothelial cell viability and angiogenic activity. *J Nanopart Res* 16, 1–14.
- Hu, Y., Xie, J., Tong, Y.W., and Wang, C.-H. (2007). Effect of PEG conformation and particle size on the cellular uptake efficiency of nanoparticles with the HepG2 cells. *Journal of Controlled Release* 118, 7–17.
- Huang, D.-M., Hung, Y., Ko, B.-S., Hsu, S.-C., Chen, W.-H., Chien, C.-L., Tsai, C.-P., Kuo, C.-T., Kang, J.-C., Yang, C.-S., et al. (2005). Highly efficient cellular labeling of mesoporous nanoparticles in human mesenchymal stem cells: implication for stem cell tracking. *FASEB J.* 19, 2014–2016.

- ISO - International Organization for Standardization, 2012, ISO/TR 13014:2012 - Nanotechnologies - Guidance on physico-chemical characterization of engineered nanoscale materials for toxicologic assessment. Available at: http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=52334
- Landsiedel, R., Ma-Hock, L., Hofmann, T., Wiemann, M., Strauss, V., Treumann, S., Wohlleben, W., Gröters, S., Wiench, K., and Ravenzwaay, B. van (2014). Application of short-term inhalation studies to assess the inhalation toxicity of nanomaterials. *Particle and Fibre Toxicology* 11, 16.
- Lankoff, A., Arabski, M., Wegierek-Ciuk, A., Kruszewski, M., Lisowska, H., Banasik-Nowak, A., Rozga-Wijas, K., Wojewodzka, M., and Slomkowski, S. (2013). Effect of surface modification of silica nanoparticles on toxicity and cellular uptake by human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Nanotoxicology* 7, 235–250.
- Leclerc, L., Boudard, D., Pourchez, J., Forest, V., Sabido, O., Bin, V., Palle, S., Grosseau, P., Bernache, D., and Cottier, M. (2010). Quantification of microsized fluorescent particles phagocytosis to a better knowledge of toxicity mechanisms. *Inhal Toxicol* 22, 1091–1100.
- Leclerc, L., Boudard, D., Pourchez, J., Forest, V., Marmuse, L., Louis, C., Bin, V., Palle, S., Grosseau, P., Bernache-Assollant, D., et al. (2012a). Quantitative cellular uptake of double fluorescent core-shelled model submicronic particles. *J Nanopart Res* 14, 1–13.
- Leclerc, L., Rima, W., Boudard, D., Pourchez, J., Forest, V., Bin, V., Mowat, P., Perriat, P., Tillement, O., Grosseau, P., et al. (2012b). Size of submicrometric and nanometric particles affect cellular uptake and biological activity of macrophages in vitro. *Inhal Toxicol* 24, 580–588.
- Lidén, G. (2011). The European commission tries to define nanomaterials. *Ann Occup Hyg* 55, 1–5.
- Lundqvist, M., Stigler, J., Elia, G., Lynch, I., Cedervall, T., and Dawson, K.A. (2008). Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *PNAS* 105, 14265–14270.
- Luzio, J.P., Poupon, V., Lindsay, M.R., Mullock, B.M., Piper, R.C., and Pryor, P.R. (2003). Membrane dynamics and the biogenesis of lysosomes. *Mol. Membr. Biol.* 20, 141–154.
- Martini, M., Perriat, P., Montagna, M., Pansu, R., Julien, C., Tillement, O., and Roux, S. (2009). How Gold Particles Suppress Concentration Quenching of Fluorophores Encapsulated in Silica Beads. *J. Phys. Chem. C* 113, 17669–17677.
- Mignot, A., Truillet, C., Lux, F., Sancey, L., Louis, C., Denat, F., Boschetti, F., Bocher, L., Gloter, A., Stéphan, O., et al. (2013). A top-down synthesis route to ultrasmall multifunctional Gd-based silica nanoparticles for theranostic applications. *Chemistry* 19, 6122–6136.
- Munkholm, C., Parkinson, D.R., and Walt, D.R. (1990). Intramolecular fluorescence self-quenching of fluoresceinamine. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 2608–2612.
- Mura, S., Hillaireau, H., Nicolas, J., Le Droumaguet, B., Gueutin, C., Zanna, S., Tsapis, N., and Fattal, E. (2011). Influence of surface charge on the potential toxicity of PLGA nanoparticles towards Calu-3 cells. *Int J Nanomedicine* 6, 2591–2605.
- Musyanovych, A., Dausend, J., Dass, M., Walther, P., Mailänder, V., and Landfester, K. (2011). Criteria impacting the cellular uptake of nanoparticles: A study emphasizing polymer type and surfactant effects. *Acta Biomaterialia* 7, 4160–4168.
- Nabeshi, H., Yoshikawa, T., Arimori, A., Yoshida, T., Tochigi, S., Hirai, T., Akase, T., Nagano, K., Abe, Y., Kamada, H., et al. (2011). Effect of surface properties of silica nanoparticles on their cytotoxicity and cellular distribution in murine macrophages. *Nanoscale Research Letters* 6, 93.
- Napierska, D., Thomassen, L.C., Lison, D., Martens, J.A., and Hoet, P.H. (2010). The nanosilica hazard: another variable entity. *Particle and Fibre Toxicology* 7, 39.
- Nuutila, J., and Lilius, E.-M. (2005). Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells. *Cytometry A* 65, 93–102.

- Ohkuma, S., and Poole, B. (1978). Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 3327–3331.
- Panas, A., Marquardt, C., Nalcaci, O., Bockhorn, H., Baumann, W., Paur, H.-R., Mülhopt, S., Diabaté, S., and Weiss, C. (2013). Screening of different metal oxide nanoparticles reveals selective toxicity and inflammatory potential of silica nanoparticles in lung epithelial cells and macrophages. *Nanotoxicology* 7, 259–273.
- Qiu, Y., Liu, Y., Wang, L., Xu, L., Bai, R., Ji, Y., Wu, X., Zhao, Y., Li, Y., and Chen, C. (2010). Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. *Biomaterials* 31, 7606–7619.
- Rancan, F., Gao, Q., Graf, C., Troppens, S., Hadam, S., Hackbarth, S., Kembuan, C., Blume-Peytavi, U., Rühl, E., Lademann, J., et al. (2012). Skin Penetration and Cellular Uptake of Amorphous Silica Nanoparticles with Variable Size, Surface Functionalization, and Colloidal Stability. *ACS Nano* 6, 6829–6842.
- Riehemann, K., Schneider, S.W., Luger, T.A., Godin, B., Ferrari, M., and Fuchs, H. (2009). Nanomedicine--challenge and perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48, 872–897.
- Seaton, A., and Donaldson, K. (12). Nanoscience, nanotoxicology, and the need to think small. *The Lancet* 365, 923–924.
- Slowing, I.I., Vivero-Escoto, J.L., Wu, C.-W., and Lin, V.S.-Y. (2008). Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 1278–1288.
- Sohaebuddin, S.K., Thevenot, P.T., Baker, D., Eaton, J.W., and Tang, L. (2010). Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Part Fibre Toxicol* 7, 22.
- Tenzer, S., Docter, D., Kuharev, J., Musyanovych, A., Fetz, V., Hecht, R., Schlenk, F., Fischer, D., Kiouptsi, K., Reinhardt, C., et al. (2013). Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat Nanotechnol* 8, 772–781.
- Vallet-Regi, M., and Balas, F. (2008). Silica Materials for Medical Applications. *Open Biomed Eng J* 2, 1–9.
- Walkey, C.D., and Chan, W.C.W. (2012). Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chem Soc Rev* 41, 2780–2799.
- Walkey, C.D., Olsen, J.B., Guo, H., Emili, A., and Chan, W.C.W. (2012). Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 2139–2147.
- Yu, T., Malugin, A., and Ghandehari, H. (2011). Impact of silica nanoparticle design on cellular toxicity and hemolytic activity. *ACS Nano* 5, 5717–5728.
- Yue, Z.-G., Wei, W., Lv, P.-P., Yue, H., Wang, L.-Y., Su, Z.-G., and Ma, G.-H. (2011). Surface charge affects cellular uptake and intracellular trafficking of chitosan-based nanoparticles. *Biomacromolecules* 12, 2440–2446.

FIGURES

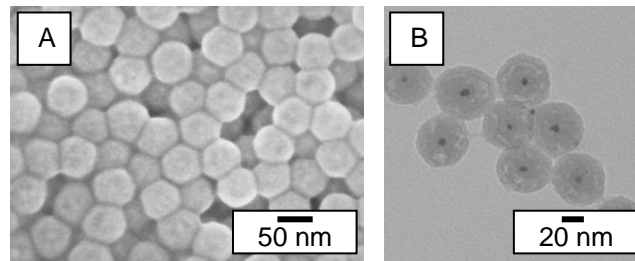
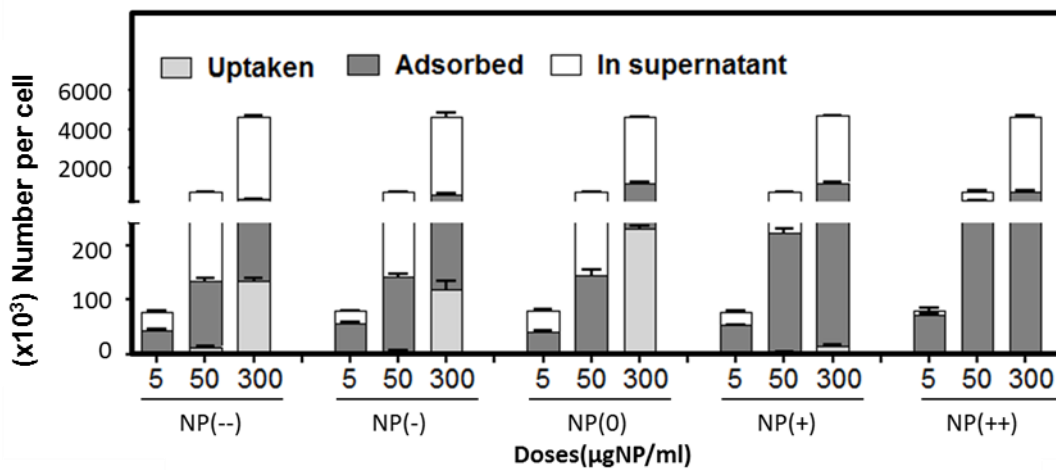


Figure 1 . Images of sterically stabilized silica nanoparticles NP(0) by (A) Scanning electron microscopy and (B) Transmission electron microscopy.



		NP(--)			NP(-)			NP(0)			NP(+)			NP(++)		
Doses (µg/ml)		5	50	300	5	50	300	5	50	300	5	50	300	5	50	300
%	In supernatant	44	82	91	29	81	86	48	81	73	28	72	90	12	56	59
	Adsorbed	56	15	6	71	17	11	52	18	22	70	26	9	98	44	41
	Uptaken	0	3	3	0	2	3	0	1	5	2	2	1	0	0	0

Figure 2 . Fluorescent (FITC) silica nanoparticles with different surface stabilizations: NP (0), NP(+), NP(++), NP(-) and NP(--)) were incubated for 20h with RAW264.7 macrophages and the distribution of NP was assessed by fluorimetry and Trypan Blue quenching. Results are presented in number per cell. In order to facilitate the comprehension, the percentage refers to the total initial dose of NP in contact with cells. (n=3)

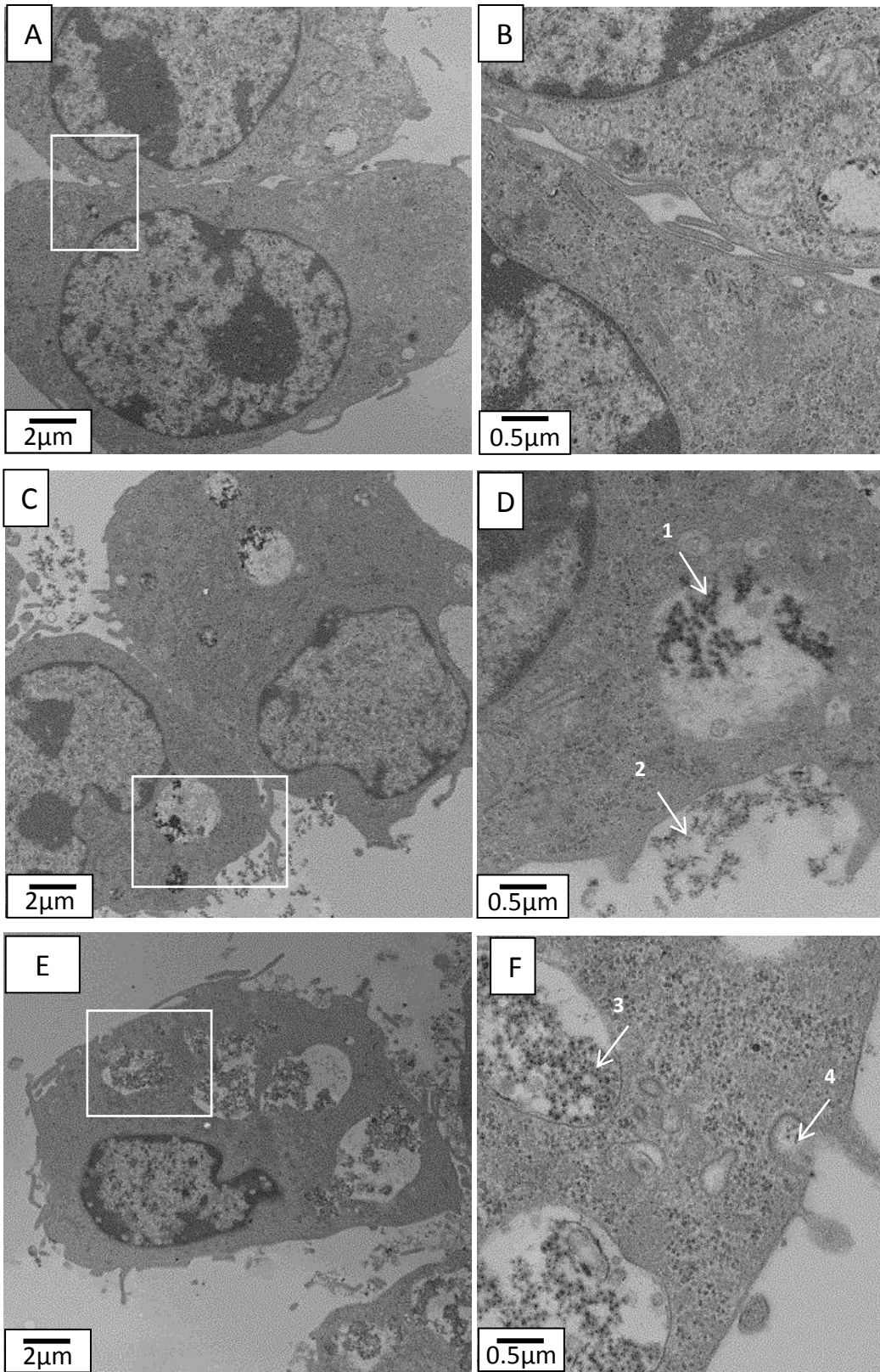


Figure 3 .Cellular uptake of NP(0) and NP(++) by RAW 264.7 macrophages after a 20h incubation (300μgNP/mL) using transmission electron microscopy. (A) Control cell without nanoparticle. (B) Expansion of area within square of (A). (C) Cell after incubation with nanoparticles NP(0). (D) Expansion of area within square of (C): (1) nanoparticles are in a vesicle and (2) nanoparticles are adhering to the cell membrane in a potential figure of phagocytosis pseudopodia. (E) Cell after incubation with nanoparticles NP(++). (F) Expansion of area within square of (E): (3) nanoparticles are in a vesicle and (4) nanoparticles are adhering to the cell in a potential membrane figure of endocytosis.

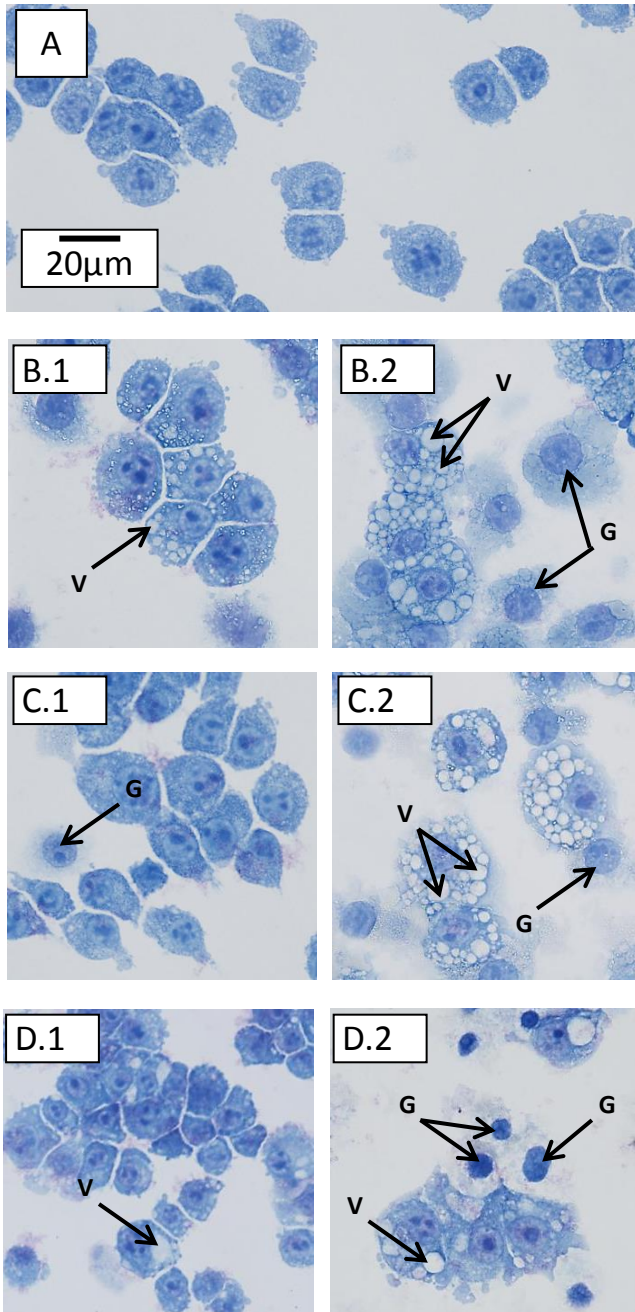


Figure 4 . Morphology of macrophages observed after 20h incubation with nanoparticles and May Grünwald Giemsa staining (x600). (A) Control cells are macrophages incubated alone. (B) (C) and (D) images are macrophages incubated 20h in presence of nanoparticles NP(--), NP(0) and NP(++) respectively. Two different doses were used, 50 and 300 µg/mL, corresponding to images (.1) and (.2) respectively. "G." mark ghost cells and "V." mark vacuoles.

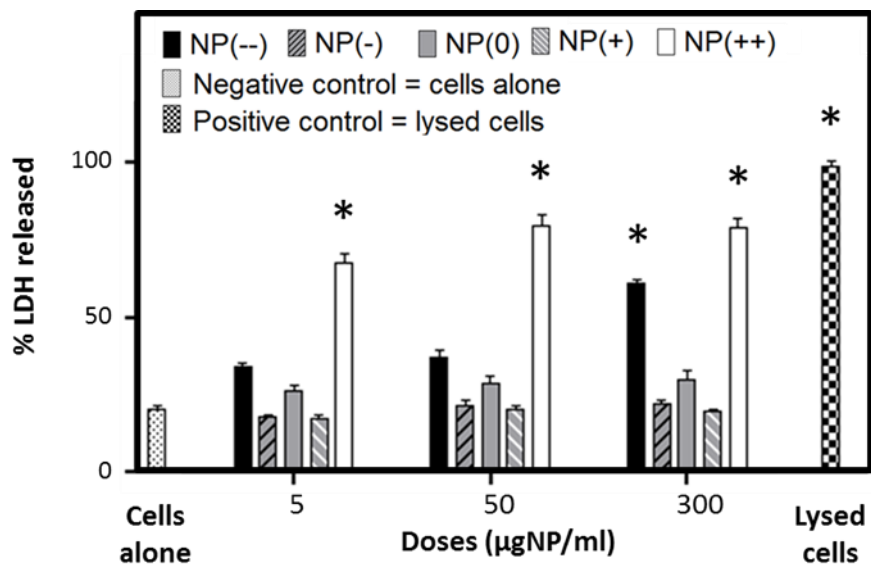


Figure 5 . Cytotoxicity of five different nanoparticles investigated using the LDH assay in RAW 264.7 macrophages. Data considered significant with $p < 0.05$ are marked with an asterisk sign (*). (n=3)

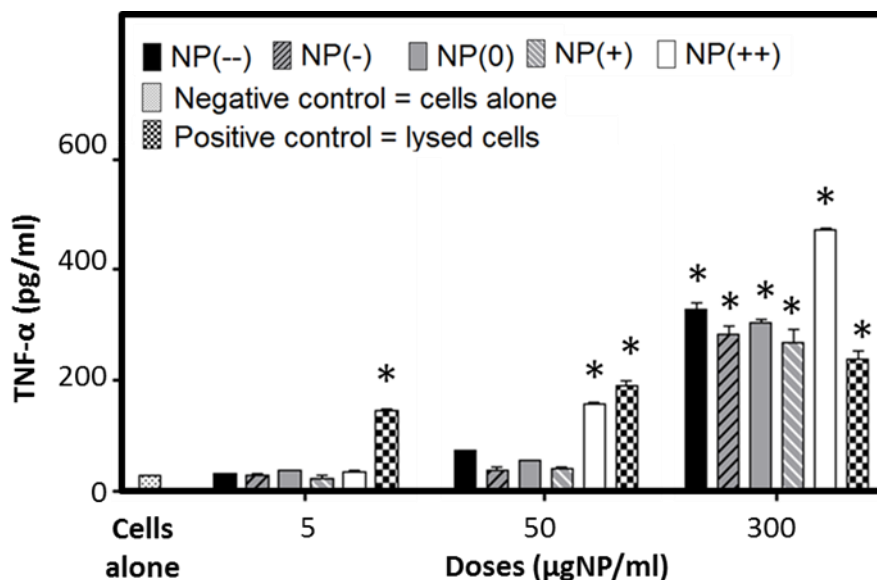


Figure 6 . Pro-inflammatory effect of five different nanoparticles investigated using the TNF- α assay in RAW 264.7 macrophages. Data considered significant with $p < 0.05$ are marked with an asterisk sign (*). (n=3)

TABLES

Table 1 - Characteristics of the nanoparticles used in the present study.

	Function- alization	Zeta potential in water (pH7-8)	Zeta potential in DMEMc (pH7-8)	Geometric diameter (SEM)	Hydro- dynamic diameter (DLS) in water	Hydro- dynamic diameter (DLS) in DMEMc
NP (--)	Si- COOH	-30 mV	-96 mV	52±2 nm	82±1 nm	104±4 nm
NP(-)	Si- COOH	-25 mV	-13 mV	50±5 nm	62±5nm	85±3 nm
NP (0)	Si- PEG200	0 mV	-11 mV	52±3 nm	76±7 nm	88±5 nm
NP(+)	Si- NH ₂	5 mV	-20 mV	62±2 nm	75±5 nm	90±5 nm
NP (++)	Si- NH ₂	12 mV	-94 mV	66±7 nm	89±2 nm	111±10 nm

Table 2 - Evolution of cell morphology after incubation with NP(--), NP(0) and NP(++) at 50 or 300 µg/mL: macrophages initially have a normal morphology with homogeneous cytoplasm. Activated macrophages cytoplasm contains vesicles, and then close to death, cell without defined cytoplasm but a condensed nucleus and a lysed membrane are called "ghost". 100% of control cells exhibit a normal morphology.

Cell morphology evolution depending on type and dose of nanoparticles	NP(--)	NP(0)	NP(++)
50 µg/mL	86% normal 9% activated 5% ghost	96% normal 1% activated 3% ghost	17% normal 79% activated 4% ghost
300 µg/mL	63% normal 32% activated 5% ghost	12% normal 58% activated 16% ghost	4% normal 19% activated 77% ghost

I.3. Données complémentaires et perspectives d'études

I.3.1. Les biais de la technique de « quenching au bleu trypan »

Dans cette étude, la fluorimétrie a permis de mesurer la fluorescence verte du FITC (longueur d'onde d'excitation : 485 nm et d'émission : 538 nm) émise par l'ensemble des nanoparticules au contact de la cellule, qu'elles soient dans le surnageant, adsorbées à la surface cellulaire ou contenues dans la cellule après internalisation. Puis, le surnageant de culture a été prélevé et les cellules ont été rincées afin d'isoler la fluorescence émise par les nanoparticules du surnageant. Enfin, le bleu trypan a été utilisé pour « quencher » le spectre d'émission des nanoparticules adsorbées à la surface de la cellule. En effet, il s'agit d'un colorant vital qui ne s'accumule pas dans les cellules vivantes. Ce colorant a donc accès uniquement aux nanoparticules libres à l'extérieur de la cellule, s'accumule à leur surface et absorbe leur fluorescence FITC car elle appartient à son spectre d'absorption compris entre 500 et 650 nm (Avelar-Freitas *et al.*, 2014). La fluorescence verte obtenue après « quenching » est donc uniquement celle des nanoparticules internalisées.

La limite de cette technique réside dans les variations d'intensité d'émission de fluorescence du fluorochrome FITC. En effet, la méthode, détaillée ci-dessus, utilise une courbe de corrélation linéaire reliant la dose de nanoparticules à l'émission de fluorescence verte. Cependant, lors de l'agglomération des nanoparticules dans les vésicules d'endocytose, les interactions des fluorochromes entre eux provoquent un auto-quenching et l'acidité du milieu intracellulaire entraîne une diminution de l'intensité de fluorescence du FITC par photo-bleaching (Ohkuma et Poole, 1978 ; Munkholm *et al.*, 1990). La figure 22 montre les courbes de corrélation obtenues en milieu de culture à pH8 et en milieu de culture additionné d'acide chlorhydrique pour obtenir le pH4. La linéarité de la courbe est conservée mais le coefficient directeur diminue fortement de pH8 à pH4.

Ainsi, les quantités de nanoparticules internalisées calculées pourraient être sous-estimées bien qu'elles permettent effectivement (1) de vérifier l'internalisation effective des nanoparticules fluorescentes par les cellules, ce qui a été confirmé par les images de MET, et (2) de comparer entre elles les quantités internalisées des différents types de nanoparticules étudiés.

De ce fait, la méthode de quantification de l'internalisation des nanoparticules par quenching au bleu trypan, qui repose sur la mesure de la fluorescence des nanoparticules, pourrait être affinée en étant couplée à des méthodes de quantification reposant sur d'autres paramètres moins variables des nanoparticules. Par exemple la quantification par spectrométrie d'émission à torche plasma (en anglais Inductively Coupled Plasma spectrometry, ICP) consiste à faire passer l'échantillon dans un plasma d'argon ou d'hélium afin de l'étudier sous forme d'ions. Ainsi, les ions peuvent être analysés en nombre d'éléments par spectrométrie d'émission atomique ou optique (ICP-AES, ou ICP-OES, pour Inductively Coupled Plasma Atomic Emission, ou Optical Emission, Spectrometry en anglais), car les électrons des atomes ainsi ionisés émettent un photon d'énergie caractéristique (longueur d'onde

spécifique) lorsque l'élément retourne à l'état fondamental (Mehravi *et al.*, 2013). La spectrométrie de masse dérivée de l'ICP (ICP-MS pour Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry), permet également d'analyser la masse des éléments, car les ions peuvent être séparés les uns des autres, en fonction de leur masse atomique, de leur charge électrique et de leur vitesse, par application d'un champ électromagnétique (He *et al.*, 2014). Pour les nanoparticules utilisées dans cette étude, deux types d'ions pourraient être quantifiés : les ions or du cœur et les ions silice de la coquille de la nanoparticule.

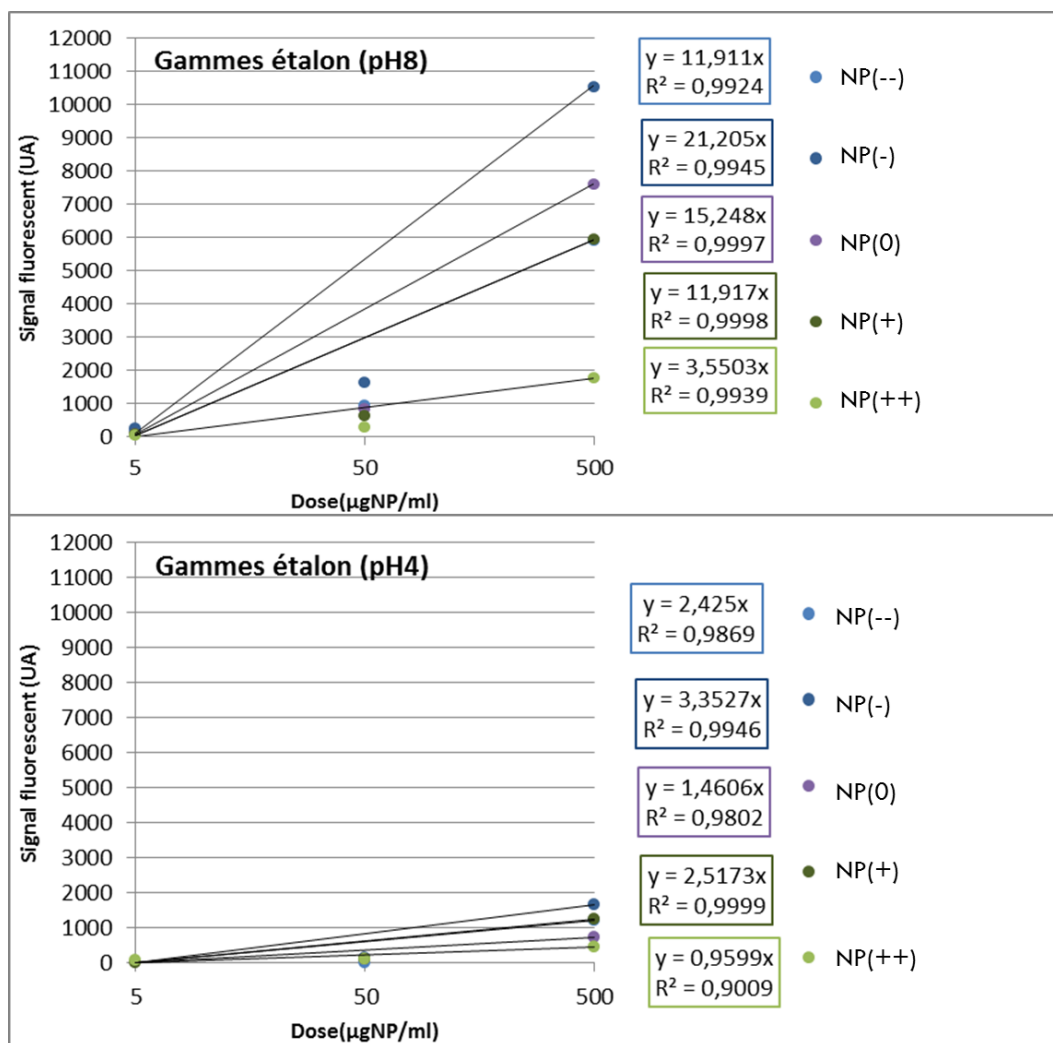


Figure 22 - Evolution des courbes d'étalonnage de l'intensité de fluorescence des nanoparticules en fonction de la dose lors de la variation de pH de 8 à 4.

Toutefois, les techniques d'ICP –AES et –MS nécessitent une quantité de matière minimum de 5 mg/L et 1 mg/L (1 mg/L correspondant à 1 ppm, partie par million, ce qui correspond à 1 milligramme d'élément recherché par litre de milieu). Or, la quantification par « quenching au bleu trypan » dans cette étude a révélé une internalisation cellulaire limitée à 2% de l'échantillon de nanoparticules testé pour la dose intermédiaire de 50 µg/mL, soit 1 mg/L de silice. En outre, ces techniques

nécessitent une quantité de suspension cellulaire de 2 mL environ soit bien plus que les 200µL étudiés en plaque 96-puits, ce qui implique d'utiliser des quantités d'échantillons de nanoparticules importantes et donc d'adapter la méthode de synthèse des nanoparticules en conséquence. Cependant, une gamme test de NP(0) a été analysée en silice et en or par ICP-AES pour un autre projet du laboratoire, voir figure 23 ci-dessous où 1/10000° correspond à peu près à 1 mg/L en silice, et ouvre une perspective prometteuse.

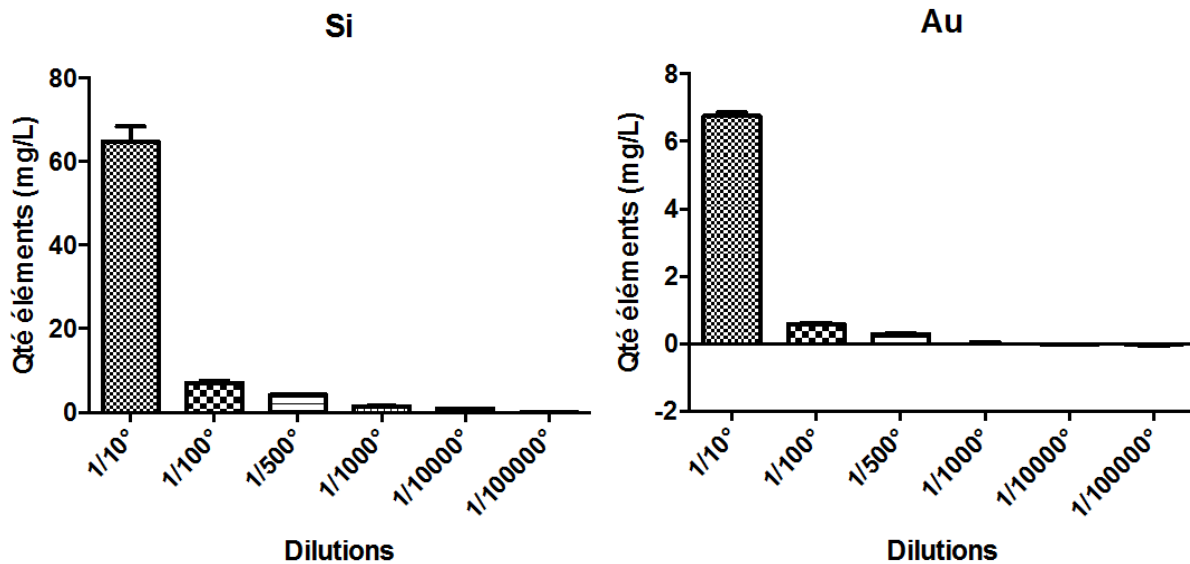


Figure 23 - Mesures en silice et en or par ICP-AES d'une gamme étalon de NP(0) diluées dans l'eau MilliQ à partir d'une solution stock à 20g/L.

1.3.2. Les mécanismes de mort cellulaire induits par les nanoparticules

La perte d'intégrité membranaire des macrophages révélée par le test LDH, après contact avec les NP(++) dès la plus petite dose et les NP(--) uniquement à forte dose, démontre bien une cytotoxicité de ces nanoparticules mais pose la question du type de mécanisme enclenché. En effet, la mort cellulaire se caractérise par l'arrêt définitif du métabolisme et des fonctions vitales de la cellule, entraînant sa destruction. Cependant, il existe deux voies principales distinctes de mort cellulaire : la nécrose et l'apoptose (Majno et Joris, 1995 ; Dive *et al.*, 1992) représentées dans la figure 24 ci-dessous. La nécrose cellulaire, qui apparaît généralement après une lésion cellulaire d'origine chimique ou physique, résulte d'un processus dégénératif. Lors de la nécrose cellulaire, se produisent successivement, un gonflement de la cellule et des organites, une fragmentation de la chromatine nucléaire en amas compact, puis un éclatement cellulaire irréversible accompagné de la libération du contenu cellulaire, dont l'enzyme LDH, dans le milieu extracellulaire. L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, qui est un processus actif dépendant de l'expression de gènes spécifiques, conduit à l'autodestruction cellulaire. Lors de l'apoptose la chromatine devient très dense et le cytoplasme se condense, puis les membranes plasmiques et nucléaires forment des bourgeonnements qui vont

conduire à la formation des fragments cytoplasmiques, appelés corps apoptotiques, tandis que les organites présents au sein des corps apoptotiques semblent intacts. Ainsi, dans un tissu, les corps apoptotiques sont rapidement phagocytés par les cellules voisines ou les macrophages, ce qui se traduit par une absence totale de développement de processus inflammatoires. Cependant, en conditions de stress (une carence de nutriments, de facteurs de croissance ou en hypoxie) l'autophagie peut également survenir (Seglen *et al.*, 1990). En effet, l'autophagie ou autophagocytose participe à l'adaptation et la survie des cellules par dégradation d'une partie de son cytoplasme. Elle débute par la formation d'une vésicule. Cette vésicule va s'agrandir par fusion avec d'autres compartiments cellulaires (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi ...) et séquestrer de façon non sélective des constituants défailants ou altérés du cytoplasme. Enfin l'autophagosome fusionne avec les lysosomes de la cellule pour permettre la dégradation de son contenu.

Dans cette étude, la perte d'intégrité membranaire est étudiée par le relargage de la LDH, une enzyme présente naturellement dans le cytoplasme de la cellule. Le relargage significatif de LDH, associé à l'apparition de cellules « fantômes » observées dans les images MGG, laisse penser que le processus de mort cellulaire enclenché est celui de la nécrose. Cependant, afin de vérifier ces hypothèses, des tests complémentaires spécifiques pourraient être menés.

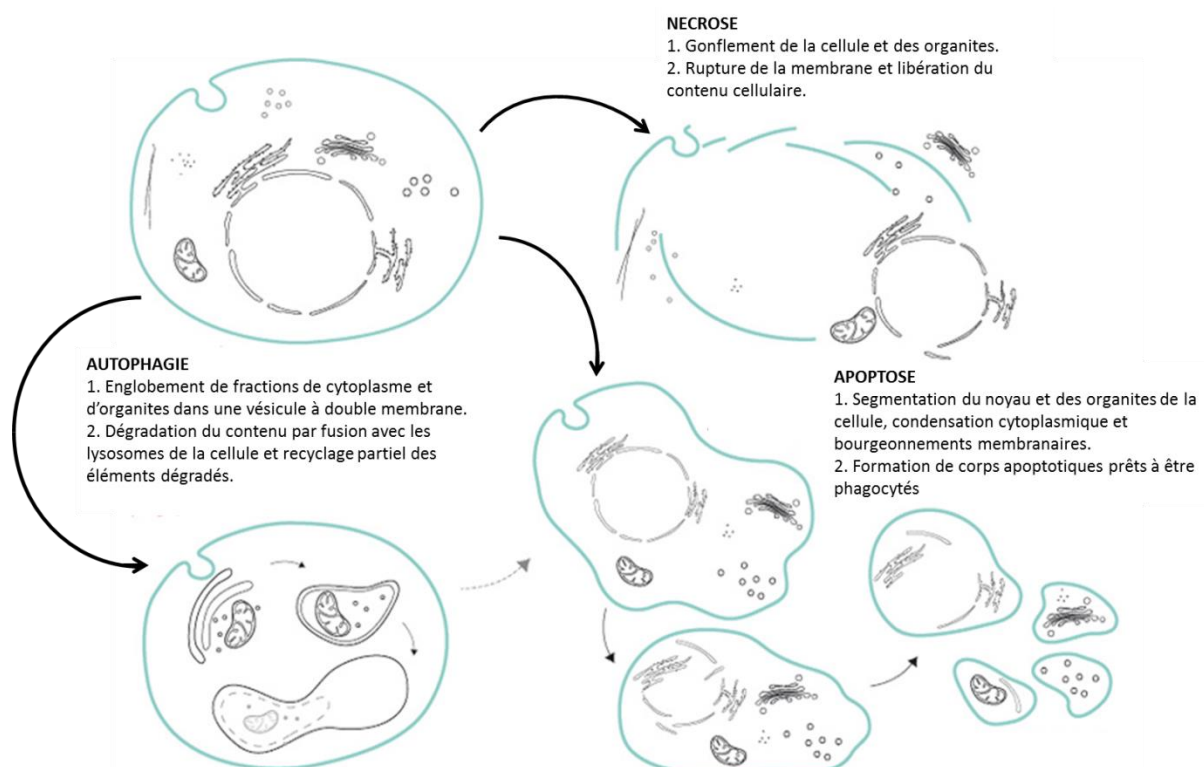


Figure 24 - Représentation schématique de la mort cellulaire par les voies de la nécrose, de l'apoptose et de l'autophagie (Librement inspiré des supports de formation de Louvain Coopération)

Ainsi, le dosage immuno-enzymatique de l'activité de la caspase-3, une protéase à cystéine, qui représente l'effecteur clé de l'apoptose, induisant notamment le clivage des substrats cellulaires spécifiques nécessaires à la formation des corps apoptotiques (Jänicke *et al.*, 1998), a été réalisé sur le lysat des macrophages après 20 heures de contact avec les nanoparticules (Park et Park, 2009). A ce lysat cellulaire a été ajouté un peptide présentant le site de clivage spécifique de la caspase-3 (la séquence DEVD), ce peptide est conjugué à une molécule reporteur, la p-nitroaniline (pNA). Le clivage du peptide par la caspase-3 libère le chromophore pNA qui peut être dosé par spectrophotométrie à la longueur d'onde 405 nm. L'activité enzymatique de la caspase-3 sera ainsi proportionnelle à la réaction colorimétrique. L'absorbance des échantillons est présentée en figure 25 ci-dessous. Ce test n'a pas permis de détecter une activité significative de caspase-3.

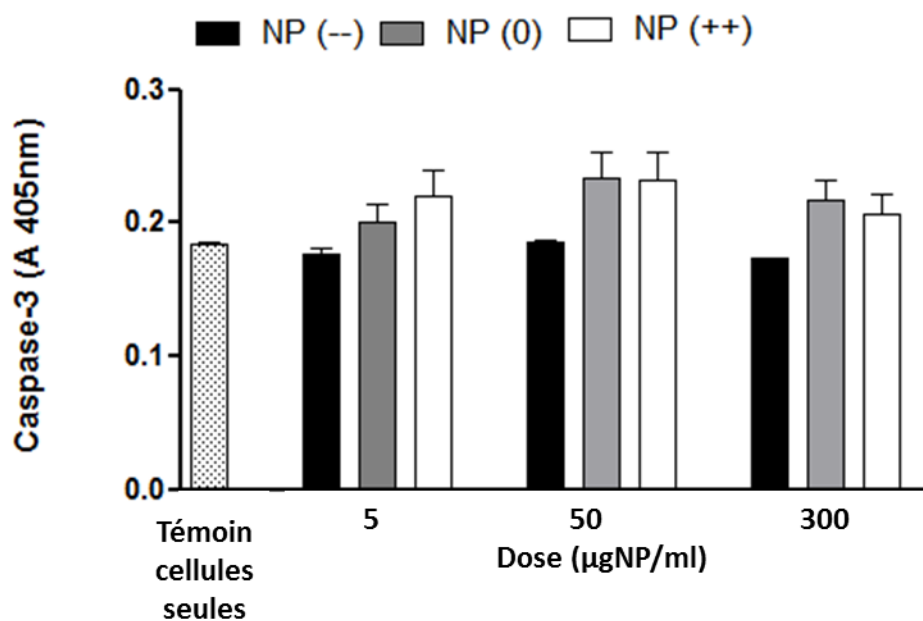


Figure 25 - Etude de l'activité de la Caspase-3 chez des macrophages RAW 264.7 après 20 heures de contact avec les nanoparticules de silice NP(-), NP(0) et NP(++).

Ce test a été choisi pour la facilité de sa réalisation avec les outils disponibles au laboratoire mais pourrait ne pas être assez sensible. En perspective et pour être exhaustif des tests de marquage de l'apoptose précoce comme la détection du marqueur annexin-V par cytométrie en flux (Vermes *et al.*, 1995) ou la détection de processus amplifiés pendant l'apoptose par le test TUNEL (Terminal-deoxynucleotidyl-transférase dUTP Nick End Labeling) (Coccini *et al.*, 2013) pourraient être étudiés. De la même manière l'étude par marqueurs spécifiques de l'autophagie comme la monodansylcadaverine, l'étude des ratios des protéines LC3-I/LC3-II et de Apg8/Apg8-PE évoluant au cours de l'autophagie, ou encore des observations de figures cytoplasmiques spécifiques pourraient être employées (Yu *et al.*, 2014) (Nowak *et al.*, 2014).

I.4. Bilan

Les nanoparticules modèles étudiées composées d'un cœur d'or et d'une coquille de silice amorphe fluorescente, associées aux méthodes développées, ont permis d'étudier l'impact de la fonctionnalisation de surface des nanoparticules sur leur internalisation par les macrophages et la réponse cellulaire induite à leur contact :

- Les nanoparticules NP(++) de nature de surface positivement chargée (groupements amines denses, $-NH_2$) étaient les plus adsorbées à la surface des cellules et étaient très faiblement internalisées. Elles induisaient une cytotoxicité plus importante que les autres types de nanoparticules.
- Les nanoparticules NP(--) de nature de surface négativement chargée (groupements carboxyliques denses, $-COOH$) étaient fortement adsorbées à la surface des cellules et beaucoup plus internalisées dans les cellules que les nanoparticules hautement chargées positivement. Elles induisaient une cytotoxicité uniquement à forte dose.
- Les nanoparticules NP(0) de nature chimique de surface neutre étaient fortement adsorbées à la surface des cellules et plus internalisées que les nanoparticules de nature chimique chargée. Elles induisaient uniquement une pro-inflammation et uniquement à forte dose.
- Les nanoparticules NP(+) et NP(-) de nature de surface faiblement chargée avaient des profils d'internalisation similaires aux nanoparticules NP(++) et NP(--) respectivement. Cependant, leurs profils de cytotoxicité étaient similaires à celui des nanoparticules NP(0).
- Les essais ont permis d'observer une activité cellulaire dépendante de la dose de nanoparticules utilisée indépendamment de leur fonctionnalisation de surface.

Les résultats à la dose intermédiaire de 50 $\mu g/mL$ de nanoparticules sont résumés sous forme de schéma dans la figure 26.

Ces résultats ont montré que la cytotoxicité des nanoparticules pourrait être corrélée à la quantité de nanoparticules adsorbées à la surface cellulaire. Ainsi, deux hypothèses peuvent être formulées : soit (1) l'adsorption des nanoparticules à la membrane cellulaire, en lien avec leur fonctionnalisation de surface, peut jouer un rôle sur la cytotoxicité des nanoparticules, soit (2) la quantification de l'internalisation des nanoparticules au bout de 20 heures de contact avec les cellules n'est pas représentative de son effet initial. En effet, les nanoparticules ont pu être relarguées dans le surnageant suite à la perte d'intégrité membranaire des macrophages.

Une étude cinétique de l'internalisation des nanoparticules aux temps initiaux pourrait permettre d'appuyer une des hypothèses, mais la méthode de quantification de l'internalisation des nanoparticules par fluorimétrie aux doses testées ne permet pas une étude aux temps courts, car cette dernière s'est révélée ne pas être assez sensible à très faibles doses. Une autre méthode plus sensible mais semi-quantitative est développée dans la partie suivante.

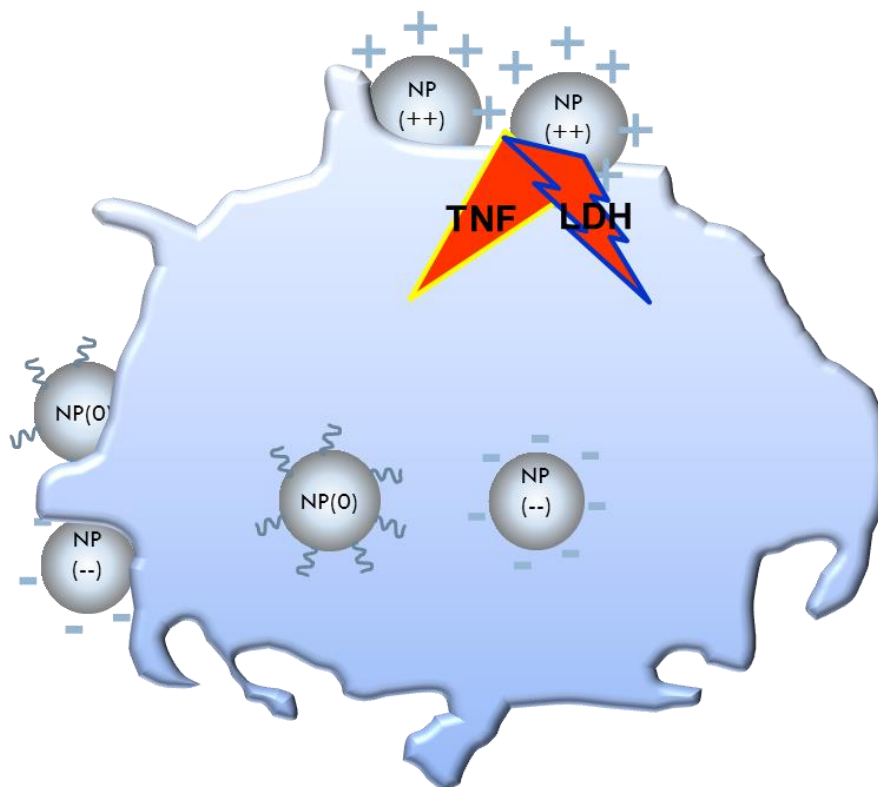


Figure 26 - Schéma récapitulatif de l'effet de la fonctionnalisation de surface des nanoparticules de silice (pour la dose de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sur leur adsorption à la surface du macrophage, leur internalisation et leur cytotoxicité.

D'autre part, la présence des différents types de nanoparticules se caractérise par des réponses biologiques différentes bien que les potentiels zêtas mesurés en DLS en milieu de culture cellulaire tendent vers des valeurs similaires et négatives. Ainsi, la fonctionnalisation de surface des nanoparticules semble avoir un impact indirect plus important que celui de la charge globale de surface des nanoparticules dans le milieu de culture. L'évolution des potentiels zêtas pourrait être due à la fixation des protéines présentes dans le milieu de culture (riche en sérum de veau et donc en facteurs de croissance, acides aminés, vitamines et hormones...) à la surface de la nanoparticule, formant la « corona », comme expliqué dans la synthèse bibliographique au paragraphe III.3.3.1 (p.51) Ce recouvrement, bien que différent pour chaque type de nanoparticule, conférerait des potentiels zêta similaires aux nanoparticules mais générerait des profils d'interaction différents avec la cellule. Ainsi, une étude plus approfondie de la corona protéique s'avère nécessaire et fait l'objet de la troisième partie de l'approche expérimentale.

II. Adaptation d'une méthode innovante pour la quantification de la phagocytose de nanoparticules à double fluorescence sensibles au pH

II.1. Introduction et méthodologie

En collaboration avec la société Nano-H, des mises au point concernant une méthode de synthèse de particules de silice comportant un cœur fluorescent contenant le fluorophore FITC et une coquille fluorescente contenant la sonde pHrodo ont été réalisées. Les échantillons devaient contenir de particules de taille homogène avec des intensités de fluorescences suffisantes pour l'étude par microscopie. Deux types de particules de silice amorphe, des nanoparticules d'une part et des particules sub-microniques d'autre part, ont été étudiés et sont décrits dans la publication suivante soumise à *Nano Research* en juillet 2014. Les caractéristiques structurales de ces particules sont représentées en figure 27, et leur principe de fonctionnement en figure 28.

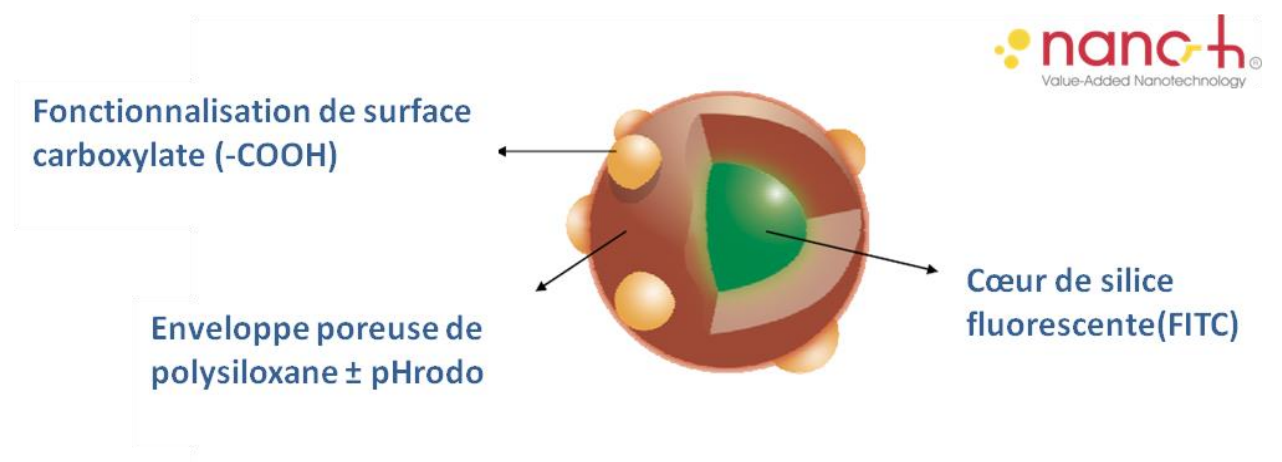


Figure 27 - Structure schématique des nanoparticules développées.

1- Cœur à base de silice luminescente et de molécules de type FITC.

2- Enrobage contrôlé de surface permettant l'incorporation de la sonde sensible au pH : pHrodo.

3- Post-fonctionnalisation avec des acides carboxyliques pour assurer une stabilisation de surface.

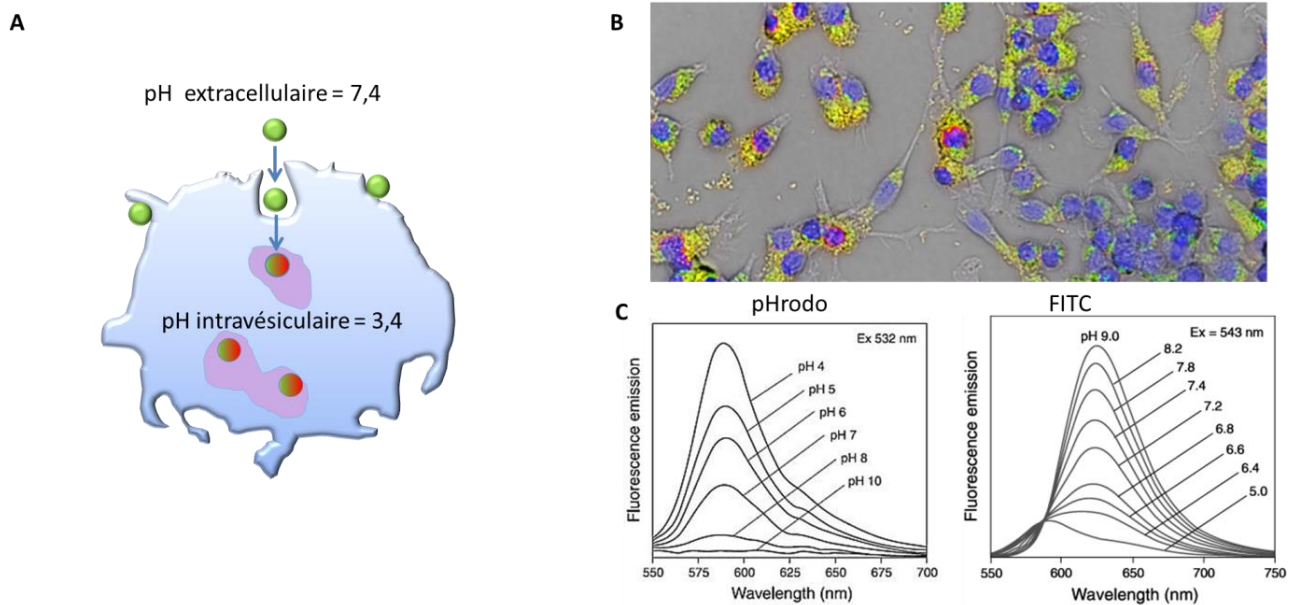


Figure 28 - Principe de fonctionnement de la particule à double fluorescence FITC/pHrodo. (A) Principe d'évolution de la couleur de la particule en fonction de son interaction avec la cellule. (B) Image illustrative de l'internalisation par des macrophages RAW 264.7 (noyaux marqués en bleu au Hoechst) de particules submicroniques (en jaune du à la superposition des fluorescences rouge et verte) réalisée en microscopie à épifluorescence. (C) Spectres d'émission du pHrodo et du FITC en fonction du pH (D'après Leclerc et al., 2012).

Pour réaliser une observation dynamique de la phagocytose, la méthode choisie a été la vidéo-microscopie. Cette technique a permis des prises d'images régulières du champ de cellules étudié par différents filtres de fluorescence. Cette technique est décrite dans la publication suivante et les mises aux points sont discutées en données complémentaires de cette partie.

La méthode de caractérisation physico-chimique des particules est la même que dans la partie précédente (Annexe I). Les méthodes utilisées pour la quantification du processus de phagocytose par fluorimétrie et les tests commerciaux de cytotoxicité ainsi que les mises au point sont également similaires à ceux de la partie précédente (Annexe II).

II.2. Publication II - Soumise

QUANTIFICATION OF NANOPARTICLES PHAGOCYTOSIS BASED ON DOUBLE FLUORESCENT PH-SENSITIVE NANOPARTICLES

Andréa Kurtz-Chalot, Jean-Philippe Klein, Jérémie Pourchez, Delphine Boudard, Valérie Bin, Odile Sabido, Laurence Marmuse, Michèle Cottier and Valérie Forest.

A. Kurtz-Chalot (*Corresponding author: kurtz-chalot@emse.fr*), J. Pourchez, V. Forest
École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, 158 cours Fauriel, CS62362, 42023 Saint-Etienne cedex 2, France.

J.P Klein, D. Boudard, O. Sabido V. Bin, M. Cottier
LINA Laboratoire Interdisciplinaire d'étude des Nanoparticules Aérosolisées (EA 4624) Faculté de Médecine Jacques Lisfranc, 15 rue Ambroise Paré, 42023 Saint-Étienne Cedex 2, France.

L. Marmuse
Nano-H, 2 place de l'Europe Bat. A Parc d'activité GVIO, 38070 Saint Quentin Fallavier, France

Abstract Amorphous silica is particularly interesting in the nanomedicine field because of its inertness and chemical stability but, as a nano-object, its innocuousness must be carefully investigated. The relationship between nanoparticles physicochemical features, their uptake by cells and their biological activity represents a crucial issue, especially for the development of nanomedicine. This work aimed at adapting a method for quantification of nanoparticles phagocytosis based on double fluorescent particles that could be spotted inside phagolysosomes. Silica nanoparticles contained two different fluorophores (FITC, pHrodo™) emitting their fluorescence alternatively on pH scale and allowed detecting phagocytosis. Using this model, the phagocytosis of 60 nm nanoparticles incubated with the RAW 264.7 macrophages was quantified using time-lapse microscopy and compared to that of 130 nm submicronic particles. The amount of internalized particles was also evaluated by fluorimetry. The biological impact of the particles (cytotoxicity, pro-inflammatory cytokine production and oxidative stress) was also investigated. Results clearly demonstrated that nanoparticles were more uptaken and more reactive than submicronic particles. Moreover, we validated a method of phagocytosis quantification.

Key words Silica particles, macrophages, size, uptake, pro-inflammation, cytotoxicity.

INTRODUCTION

Amorphous silica is used for many applications because of its chemical stability, its inertness independently of pH and temperature and its insolubility in water (Merget et al., 2002). The use of amorphous silica has been particularly extended to biomedical applications (Colilla et al., 2008), (Santra et al., 2001). And more recently the potential applications of amorphous silica have encompassed the emerging field of nanomedicine (1 to 100 nm) (Fang et al., 2011). The great advantage with this material lies in the silane chemistry, allowing versatile surface modifications like addition of specific antibodies or fluorescent probes, resulting in new applications for diagnosis (tumor labeling) (Chandolu and Dass, 2013), drug delivery (targeting of cancer cells) (Benezra et al., 2011) or gene transfer (Roy et al., 2005). The new physico-chemical properties conferred by the nanometric scale can potentially trigger a change in the biological behaviour of the nano-objects (Mamaeva et al., 2013), (Riehemann et al., 2009). Indeed, at this scale nanoparticles might interact more with cells and consequently be more reactive than bulk material. In vivo studies on mice show that materials classically considered as biologically inert (e.g. titanium dioxide, gold or silica) have been reported to cause exacerbated biological responses such as lung inflammation when used at the nanoscale (Kaewamatawong et al., 2005), (Oberdörster et al., 2005). More specifically, a study from Cho et al. on the impact of 14 nm amorphous silica nanoparticles on lung has shown severe inflammation in mice with, among others, an enhancement of interleukin-6, interleukin-8 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) expressions (Cho et al., 2007). These results are reinforced by in vitro toxicological studies. For example Gazzano et al. have shown a more severe cytotoxicity of 7 and 40 nm amorphous silica nano-spheres compared to silica micro-spheres on macrophages (MH-S) associated with an enhancement of reactive oxygen species and TNF- α production (Gazzano et al., 2012). Nevertheless, previous studies have concluded that cytotoxicity should be studied in parallel to the particles/cells interaction and the intensity of the biological response may be influenced by the amount of internalized particles (Clift et al., 2008). Cellular internalization processes are known to occur through passive or active transport. As specified in Zhao et al. review, nanomaterials uptake by cells occurs potentially through endocytosis, a general form of active transport in which cytoplasmic membrane engulfs extracellular objects (Zhao et al., 2011). Endocytosis includes pinocytosis, caveolae-dependent or clathrin-mediated endocytosis and phagocytosis. Although all cell types are potentially able to perform phagocytosis, this process is mainly conducted by specialized cells. In toxicological evaluation, regardless of the route of exposure (skin, digestive tract, respiratory tract, or by injection), phagocytic cells are a model widely used because they are sentinel cells of the immune system. A particularity of phagocytosis is that foreign particles are internalized by vesicles called phagosomes, which fuse with lysosomes, another type of intracellular acidic vesicles, to form phagolysosomes. The pH is around 6 in a phagosome and decreases to 4.5 in a fully matured phagolysosome (Griffiths, 2004).

The aim of the present in vitro study was to adapt a method to quantify phagocytosis of particles at the nano-scale (Leclerc et al., 2012). Silica particles contained two different fluorophores emitting their fluorescence alternatively on pH scale and allowed to detect phagocytosis: (1) Fluorescein isothiocyanate (FITC) emitted a green fluorescence at physiological pH (Ohkuma and Poole, 1978), and (2) pHrodoTM

emitted a red fluorescence more intense with acidification and which accurately indicates phagolysosomal localization (Miksa et al., 2009). Because many characteristics of particles may be affected by the chemistry of their surroundings and the presence of inorganic and biological components (Puddu and Perry, 2014), (Sabuncu et al., 2012), in this study, particles (complying with very strict and standardized guidelines) were sourced from single batches and were considered of similar surface functionalization. The originality of this method has been previously developed by our laboratory with particles size of 250 and 500 nm. In the present study, the method is adapted in order to investigate the phagocytosis of 60 nm (P60) nanoparticles incubated with the RAW 264.7 macrophages compared to that of 130 nm (P130) submicronic particles. Those dimensions imply to give up previous techniques not enough sensitive and develop a new approach. Particles phagocytosis was quantified using time-lapse microscopy that furthermore allowed a kinetic approach. The amount of internalized particles was also evaluated by fluorimetry using Trypan Blue quenching (Leclerc et al., 2010). Finally, cellular response was investigated in terms of loss of cell membrane integrity (determined by the Lactate DeHydrogenase (LDH) assay), pro-inflammatory effect (TNF- α) production) and oxidative stress (Reactive Oxygen Species (ROS) production).

EXPERIMENTAL

Reagents

Tetraethyl orthosilicate ($\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$, TEOS, $\geq 99\%$) (3-aminopropyl)triethoxysilane ($\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$, APTES, 99%), isopropanol ($(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$, $\geq 99,5\%$), triethylamine ($(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$, $\geq 99,5\%$), dimethyl sulfoxide anhydrous ($(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, DMSO, $\geq 99,9\%$), Fluoresceine isothiocyanate Isomere I ($\text{C}_{21}\text{H}_{11}\text{NO}_5\text{S}$, FITC, $\geq 90\%$), sodium hydroxyde (NaOH) were purchased from Aldrich chemical (Sigma-Aldrich Chimie, Lyon, France). Diethylenetriamine pentaacetic dianhydride ($\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_8$, DTPA-ba, $> 98.0\%$) was purchased from TCI Europe (Zwijndrecht, Belgium). pHrodo™ succinimidyl ester (pHrodo, SE) was purchased from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Ethanol and other organic solvents (reagent grade) were purchased from SDS (France) and used as received.

Particles synthesis

The particles were composed of pure silica core doped with FITC grafted by covalent bonds, as described by Van Blaaderen et al. and Wang et al. (Van Blaaderen and Vrij, 1992), (Wang et al., 2003). Then a controlled polysiloxane shell (SiO_x) with pHrodo™ probe was added at the core surface, by reacting firstly pHrodo™ succinimidyl ester with APTES in DMSO. Afterward the resulting product was added to the reaction of hydrolysis condensation including APTES/TEOS as organosilane reagent using isopropanol as solvent in the presence of a catalytic amount of triethylamine (Fizet et al., 2009). Finally the particles were stabilized by introducing carboxylic surface groups (COOH) via diethylenetriamine pentaacetic dianhydride reagent as described in a previous study (Leclerc et al., 2012). Briefly into a suspension of a DTPA-ba in dry DMSO was added a colloidal solution (DMSO) of hybrid particles. The reaction was carried out during 18 hours at room temperature. In order to remove salt and impurities from the suspension, samples were purified against ultrapure water. After an initial centrifugation two series of purification steps composed by subsequent centrifugation and redispersion runs were realised in ethanol and ultrapure water MilliQ H₂O.

II. Adaptation d'une méthode innovante pour la quantification de la phagocytose de nanoparticules

Finally particles were resuspended in MilliQ H₂O at 20 g.L⁻¹ in SiO₂, concentration was controlled by a dry matter measurement. The amorphous and porous properties of the polysiloxane shell allowed the probe accessibility to the environmental pH variations. The fluorescence change of each type of particle was assessed in buffer solutions at pH 2, 6 and 10 by fluorimetry. The particles characteristics are summarized in Table 1.

Physico-chemical characterization of the particles

Scanning electron microscopy (SEM) images of particles were performed using an ESEM XL30-FEI microscope equipped with a thermal field emission gun (FEG). Dynamic light scattering (DLS) method (nano Zetasizer, Malvern) allowed determining the zeta potential (ξ) and the size distribution of particles. Measures were performed both in distilled water and in the complemented medium DMEMc used for cell culture: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% of fetal calf serum (Invitrogen), 1% penicillin–streptomycin (penicillin 10,000 units/mL, streptomycin 10 mg/mL, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

Cell culture

RAW 264.7 cell line derived from mice peritoneal macrophages transformed by the Abelson murine leukemia virus and was provided by ATCC Cell Biology Collection (Promochem, LGC, Molsheim, France). Cells were cultured in DMEMc at 37°C and under a 5% carbon dioxide humidified atmosphere.

Cellular uptake assessment

Time-Lapse microscopy

Macrophages were seeded in a 6-wells plate (1 million cells per well) and were allowed to attach for 4h. Cell nuclei were stained with 0.1 μ M of Hoechst 33342 solution (Sigma) for 15 min and rinsed with PBS. Suspensions of P60 and P130 were added at concentration of 30 and 300 μ g/mL for 1 hour. Then particles were washed in order to reduce background noise. Cells were maintained at 37°C and under a 5% carbon dioxide humidified atmosphere (Heating Unit XL S Zeiss and CO₂, O₂ Module). Time-lapse video was performed during 20 hours (with photography every 30 minutes on selected regions) on a numeric inverse microscope platform (Axiovert observer Z1) combined with a fluorescence imaging system. Images were obtained from the fluorescence (excitation, emission) emitted by FITC (488 nm, 495–550 nm), pHrodo (532, 560–650 nm), and Hoechst (350, 408–443 nm) with a HXP 120 lamp and 3 filters (Cy3, GFP, CFP, through COLIBRI mode). A semi-quantitative analysis was conducted after the observation of 30 cells in order to determine the particles localization within cells and the amount of dying macrophages over time. The percentage of dead cells took into account the cells detached from the well surface.

Analyses were performed with the Fiji distribution of the ImageJ software (Schindelin et al., 2012). The video was used as a stack of images taken over time. The FITC/pHrodo ratio changes over time were calculated using a two-step process: (1) A region of interest containing one isolated cell was selected on the first image of the stack as shown in Fig.2(A). (2) Images were splitted in four channels: phase contrast, red,

green and blue. The means of green and red intensities (Fig.2 (B)) for the region of interest were measured, and then the green per red ratio, FITC/pHrodo ratio, was calculated.

Fluorimetric analysis

Macrophages were seeded in 96-well plates with 100 000 cells in 200 μ L of media per well. Cells were allowed to adhere for 4 hours and were incubated with 10, 30, 60 and 300 μ g/mL of suspension of P60 or P130 for 20 hours. Particle uptake was quantified using a fluorometer (Fluoroskan Ascent, Thermolabsystems, France). Only green fluorescence of FITC was measured. Total particles fluorescence was measured at each dose in order to obtain a standard curve reporting the fluorescence intensity depending on the particles concentration. Then the fluorescence of nanoparticles in supernatant, adsorbed to cell membrane and internalized by cell were discriminated by a “trypan blue quenching” (TB) method previously developed by Leclerc et al. from flow cytometry techniques 21. In addition to its principal function as an exclusion dye of dead cells, TB is known for its ability to “turn off” the green fluorescence emitted by FITC labeled particles outside the cells (Van Amersfoort and Van Strijp, 1994),(Nuutila and Lilius, 2005). This process allowed us to distinguish the fluorescence of internalized particles from those of particles just adhering to the plasma membrane. After 20 hours of contact between particles and macrophages, the fluorescence of particles remained in cell supernatant was measured as well as the fluorescence of particles adsorbed at the cell surface and the fluorescence of the particles uptaken by cells. For each condition, particles fluorescence was measured independently and particles concentration was calculated with the standard curve. Control wells without particles were used to assess the autofluorescence of cells in culture media.

Cytotoxicity assays

Each experiment was repeated independently three times for each sample.

Cell/particles contacts

For LDH, TNF- α and ROS assays, macrophages were seeded in 96-well-plates with 100 000 cells in 200 μ L of media per well. Then cells were allowed to adhere for 4 h and were incubated with 10, 30, 60 and 300 μ g/mL of particles suspension for 20h excepted for ROS, that is an early reaction (Chen et al., 2011), for which cells were incubated with particles suspension for 90 min.

Cell membrane integrity

The release in the cell culture supernatant of the cytoplasmic lactate dehydrogenase (LDH) from cells with damaged membranes was assessed using the CytoTox-96™ Homogeneous Membrane Integrity Assay (Promega, Charbonnières les Bains, France) according to the manufacturer’s instructions. The optical density of the samples was determined using a microplate reader (Multiskan RC; Thermolabsystems, Helsinki, Finland) set to 450 nm. The activity of the released LDH was reported to that of total cellular LDH (measured after control cells lysis) and was expressed as a percent of the control.

Pro-inflammatory effect

II. Adaptation d'une méthode innovante pour la quantification de la phagocytose de nanoparticules

After incubation with particles, the production of TNF- α was assessed in the supernatant using a commercial ELISA Kit (Quantikine® Mouse TNF- α Immunoassay; R&D Systems, Lille, France) according to the manufacturer's instructions. The optical density of each sample was determined using a microplate reader (Multiskan RC; Thermolabsystems, Helsinki, Finland) set to 450 nm. A standard curve was established, and results were expressed in picograms per milliliter of TNF- α . Each experiment included controls: cells alone (negative control) and DQ12 quartz (toxicological positive control) (Bruch et al., 2004).

Oxidative stress

A large array of reactive oxygen species (ROS) activity can be assessed with the OxiSelect™ ROS Assay Kit (Euromedex, Mundolsheim, France). The assay uses the conversion of a non-fluorescent substrate, 2,7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate that can easily diffuse through cell membranes and be converted into a fluorogenic molecule 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF) in presence of ROS and which fluorescence is proportional to total ROS level. DCF production was detected using a Fluoroskan Ascent fluorometer (Thermolabsystems) using excitation and emission wavelengths of 480 and 530 nm respectively, and the generation of ROS was expressed as nanomolar.

Expression of the results

For nanoparticle distribution determined by fluorimetry, the LDH and TNF- α assays, particles doses were expressed either using mass or surface doses. Surface doses were calculated from mass doses. We knew that the number of particles per milliliter of solution (initial concentration) was 2g/l. This concentration corresponded to 8×10^{13} particles/mL for P60 and 6×10^{12} particles for P130 (data provided by the chemists who synthesized the particles). From these data we could calculate the weight of one particle, for instance one P60 weighted 2.5×10^{-10} μg . Then, we considered particles as spherical and we calculated their surface area, using the formula $4\pi r^2$, where r was determined from SEM measurement. For example, for P60, the diameter measured using SEM was 62 nm, therefore, $r = 31\text{nm}$. Surface area = $4\pi(31)^2 \pi 12000 \text{ nm}^2$.

10 $\mu\text{g/mL}$ (the first tested mass dose) contained 4×10^{10} particles. As each particle had a surface area about 12000 nm^2 , the total particle surface area in this sample was $4 \times 10^{10} \times 12000 = 48 \times 10^{13} \text{ nm}^2/\text{mL}$. As a well contained 200 μL , the surface dose was $9.6 \times 10^{13} \text{ nm}^2/\text{well} \pi 1 \text{ cm}^2/\text{well}$.

These calculations were made similarly for each dose. Finally to compare comparable surface doses between P60 and P130, the mass dose of 10 $\mu\text{g/mL}$ for P60 was compared to the mass dose of 30 $\mu\text{g/mL}$ for P130, each corresponding to a surface dose of 1 cm^2/well . In the same way, 30 $\mu\text{g/mL}$ P60 was compared to 60 $\mu\text{g/mL}$ P130, as these two mass doses corresponded to a surface dose of 3 cm^2/well .

Statistical analysis

Analysis and graphics were performed on Prism 5.0 software (GraphPad, San Diego, CA). Significance was established with Bonferroni's Multiple Comparison Test, (1) Two-way-ANOVA test (compared to negative control: cells alone) and data considered significant with $P < 0.05$ are marked with an asterisk (*) sign, and

(2) One-way-ANOVA (particle compared with each other) and data considered significant with $P < 0.05$ are marked with a sign as specified in each legend. Each data point represents the mean of three independent experiments ($n = 3$) and is presented with the arithmetic standard error of the means (\pm s.e.m.).

RESULTS

Particles characterization

Geometric diameters were measured from SEM and hydrodynamic diameters were measured using DLS. These data including zeta potential are reported in Table 2.

The hydrodynamic diameter of P60 and P130 measured in DMEMc was correlated with the geometric diameter but small agglomerates clearly appeared in water. Zeta-potentials of the two kinds of particles were similar in water and in DMEMc.

Phagocytosis

Time-lapse microscopy

Particle dose of $30\mu\text{g/mL}$ did not allow detecting particles fluorescence. Images for particle dose of $300\mu\text{g/mL}$ are given in Fig.1. Images showed the expected changes of colours due to particles with the two different fluorophores emitting their fluorescence alternatively on pH scale (green FITC and red pHrodo). Uptake of particles by cells was determined by the colour of fluorescence emission. Initially particles were outside the cells and only a green fluorescence was emitted. Then particles were uptaken and pHrodo emitted a red fluorescence more intense within acidic vesicles. Macrophages appeared yellow due to the merge of green and red fluorescences. Because phagolysosomes are more acidic than phagosomes, macrophages clearly became orange to red depending on the process stage of uptake and acidification of medium around particles. These observations confirm that macrophages engulfed P60 and P130 through phagocytosis. For both particles, the colour change was found to be reversible as released particles after cell death and loss of membrane integrity became green again.

A semi-quantification of cell profiles is reported in Table 3. T2, T8, T15 and T20 were respectively the 2nd, 8th, 15th and 20th hours after particles/cells contact. Cells morphology and particles colour allowed determining the stage of particle phagocytosis. Activated cells presented cytoplasmic extensions. Dying cells became spherical and did not adhere to the bottom of the well. Globally cell viability decreased faster after contact with P60 (63%, 20% and 10% of living cells at T8, T15 and T20 respectively) than after contact with P130 (82%, 70% and 56% of living cells at T8, T15 and T20 respectively). P60 emitted red fluorescence earlier (around T2) than P130 (around T8) and seemed homogeneously distributed in cell cytoplasm. Macrophages after contact with P130 appeared filled of green and yellow to orange vesicles but vesicles did not become clearly red certainly due to the particles intrinsic property as shown in graphics of Table1 (right column).

A quantification of those colour changes is given in Fig.2(C). The FITC/phrodo ratio was measured for one isolated cell during 20 hours after incubation with particles. Both ratios decreased at early time due to the particle phagocytosis, and then ratios increased due to the particle release. Consistent with cell viability,

II. Adaptation d'une méthode innovante pour la quantification de la phagocytose de nanoparticules

P130 ratio increase began after 8 hours of particles/cells contact, later than that of P60 (after 6 hours) suggesting that cell death occurred earlier after contact with P60 than after contact with P130.

Because the cells did not die precisely at the same moment, it was not pertinent to calculate an average FITC/pHrodo ratio over the 20 studied hours. Nonetheless, mean of FITC/pHrodo ratios measured for 5 isolated cells during the cellular loss of membrane integrity is given in Fig.3. Black and grey curves correspond to ratio measured for dying cells after contact with P130 (between T8 and T15) and P60 (between T6 and T13) respectively. It confirmed the ratio increase during particles release.

Fluorimetry

Cellular uptake was then quantified using fluorimetry as reported in Fig 4. The amount of nanoparticles in supernatant, adsorbed at cell surface or uptaken by cells were determined at different doses.

In Fig.4(A) results are expressed depending on particle mass ($\mu\text{g/ml}$). It appeared that particles mainly remained in the supernatant whatever the size. Moreover uptake was found to be dose-dependent irrespective of the particle size and the amount of uptaken P60 was significantly higher than that of P130 at each dose. For both particles, adsorption of particles at the cell membrane was found to be globally constant and the amount of P60 adsorbed at the cell surface was significantly higher than the amount of adsorbed P130 at each dose.

As reported in Fig.4(B), same conclusions were reached when results were expressed depending on particle surface area per well (cm^2/well).

Cytotoxicity

Cell membrane integrity

Cytotoxicity depending on particle mass ($\mu\text{g/mL}$) is reported in Fig.5(A). The LDH release triggered by P60 was significantly different from that of control cells (incubated without nanoparticles) from the dose of 60 $\mu\text{g/mL}$, while the LDH release triggered by P130 was significantly different from that of control cells only at the highest dose of 300 $\mu\text{g/mL}$. At this dose the LDH release triggered by P60 and P130 were similar.

In Fig.5(B) results are expressed depending on particle surface area per well (cm^2/well) and show no cytotoxicity at the tested doses.

Pro-inflammatory effect

The pro-inflammatory effect induced by the particles is shown in Fig.6.

In Fig. 6(A) results are expressed depending on particle mass ($\mu\text{g/mL}$). Basal level of TNF- α production was increased in a dose-dependent manner by the presence of positive control (quartz DQ12). The TNF- α production triggered by P60 was dose-dependent and significantly different from that of control cells (incubated without nanoparticles) from the dose of 60 $\mu\text{g/mL}$. TNF- α production triggered by P130 was also dose-dependent and significantly different from that of control cells only at the highest dose of 300 $\mu\text{g/mL}$. At this dose TNF- α production triggered by P60 was higher than that triggered by P130 and DQ12.

In Fig.6(B) results are expressed depending on particle surface area per well (cm²/well) and show a dose-dependent pro-inflammatory response similar between P60 and P130.

Oxidative stress

No significant oxidative stress was detected when cells were incubated with the different types of nanoparticles. Relative quantification of ROS probe DCF in cells in contact with P60 or P130 was around 77±16 nM (data not shown) and is not statistically different from 62±11 nM detected for control cells.

DISCUSSION

This work aimed at adapting a method to quantify phagocytosis of particles at the nano-scale in parallel to the assessment of their potential cytotoxicity.

Many toxicological studies on silica particles have been reported, however, the literature often shows contradictory conclusions (Stark, 2011). This is mainly due to a lack of sufficient particles characterization. Many characteristics of particles may be affected by the chemistry of their surroundings and the presence of inorganic and biological components [22, 23]. This is why, in this study, particles (complying with very strict and standardized guidelines) were considered of similar surface functionalization and were sourced from single batches. A thorough physico-chemical characterization of the particles was carried out in water and in cell culture medium DMEMc by dynamic light scattering instrument (Table 2).

Absence of agglomeration in DMEMc supplemented with serum may be due to the formation of a protein corona around particles causing steric hindrance. This hypothesis was already demonstrated by Sabuncu et al. comparing agglomeration of 10 nm gold nanoparticles (functionalized with carboxylic acid groups) in water and DMEM with and without serum (Sabuncu et al., 2012), (Barrán-Berdón et al., 2013).

Particles with a double fluorescence and sensitive to environmental pH changes were developed to take advantage of the property of acidification of phagocytic vesicles. Existing system described in the literature such as PEBBLES and capsules (fluorescent microcapsules) detecting different cellular processes (e.g., apoptosis, phagocytosis, cell growth, and metabolism) regulated by intracellular pH were not appropriate for this study (Peng et al., 2007) (Lee and Kopelman, 2012). The crucial difference between those existing systems and the particles developed here is that FITC/pHrodo particles does not have to be coupled with pH sensors such as SNARF dye and are directly detected once engulfed in phagolysosomes (Ramshesh and Lemasters, 2012), (Nakata et al., 2010). Thus, they are appropriate to localize particles in any type of acidic compartment during phagocytosis. Furthermore, the aim of this study was not to monitor precise pH changes, but rather to understand nanoparticle fate inside cells depending of its physico-chemical features. This is why it was important to test different particles sizes that are characteristics difficult to manage for PEBBLES.

The double fluorescent FITC/pHrodo particles have already been developed in our laboratory but they were not nano-sized 18. Particle synthesis was optimised in order to compare nanoparticles of 60 nm and

II. Adaptation d'une méthode innovante pour la quantification de la phagocytose de nanoparticules

submicronic particles of 130 nm. Those dimensions are below the previously tested dimensions and are around the 100 nm of the “nanoparticle” definition. The synthesis of particles with such dimensions was a part of the technical challenge. Moreover those dimensions imply to give up previous techniques not enough sensitive and face a new technologic complexity in order to quantify nanoparticle phagocytosis. In this study an original qualitative observation based on time-lapse microscopy (Fig.1) confirmed the phagocytosis by macrophages of both studied particles at high dose of 300 µg/L. However, once engulfed P60 emitted a clearly red fluorescence while P130 emitted an orange fluorescence. It was certainly due to intrinsic property of particles shown in Table 1. Indeed under pH 4 FITC/pHrodo ratio for P60 decreased allowing a red colour, while FITC/pHrodo ratio for P130 stabilized allowing only orange colour at low pH. A quantitative approach based on FITC/pHrodo ratio was used to define profiles of phagocytosis of particles (Fig.2). Interestingly, P60 and P130 did not exhibit the same phagocytosis profiles and P60 triggered an early death of cells. Moreover P60 appeared homogeneously distributed in cell cytoplasm while macrophages appeared filled of vesicles after contact with P130. This difference might suggest that other factors may play a role in particles fate within the cell depending on the size of the particles. Nonetheless results show that, once engulfed, particles were in acidic medium that is specific of phagocytosis. Another hypothesis could be that bigger particles were certainly engulfed in bigger vesicles more observable. Profiles of particles release after loss of membrane integrity and cell death were similar between P60 and P130 (Fig.3).

In order to quantify the amount of phagocytised particles a trypan blue quenching method was used. This method allowed distinguishing FITC fluorescent particles uptaken from particles adsorbed at the cell membrane (Fig.4). Interestingly, P60 and P130 did not exhibit the same uptake profiles. P60 were the particles the most adsorbed at the cell surface and the most uptaken. For both particles uptake was dose-dependent while adsorption at cell surface was constant at low doses and strongly increased at high dose of 300 µg/mL. Table 3 revealed that cell viability was extremely lower after 15 hours contact with P60 than with P130. Consistent with this hypothesis was the fact that P60 induced a significant loss of membrane integrity (Fig.5(A)) and a production of TNF- α (Fig.6(A)) higher than P130 at the highest dose of 300 µg/mL even if both particles induced a dose-dependent cell response. Results highlight that nanoparticles are more uptaken by cells and more cytotoxic than sub-micronic particles. Complementary studies should deepen with the potential relationship between the amount of uptaken particles and the cellular response.

No significant oxidative stress was detected which is consistent with a similar study carried out by Panas et al. where the same cell type RAW264.7 macrophages were incubated with engineered silica nanoparticles of 25 nm diameter (Panas et al., 2013).

Those results are consistent with literature data showing that in “safer by design” approaches in nanomedicine, particle size is to take into consideration to understand particle fate inside cells (Clift et al., 2008)], (Greish et al., 2012), (Albanese et al., 2012).

Nonetheless, results expressed depending on particles surface area revealed that P60 were more adsorbed at cell surface but profiles of particles uptake (Fig.4(B)), cytotoxicity (Fig.5(B)) and pro-inflammatory effect (Fig.6(B)) were similar for both particles at the same dose.

As size is related to surface area of particle, for a given mass of particles the total surface area increases with decreasing particle diameter. Particle size is thereby an essential determinant of the fraction of reactive groups on particle surface (Van Amersfoort and Van Strijp, 1994). For those reasons SCENIHR committee (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) suggests another definition of nanoparticle than the ISO referential by volume specific surface area above 60 m²/cm³ independent of the density or size distribution of the material. Finally it appears that data comparison is made more difficult depending on the choice of metric, a crucial point when analysing nanoparticle size impact (Oberdörster et al., 2005). For example, a study from Water et al., conducted on a whole genome microarray analysis after a 10 and 500 nm particles exposure, concluded that the magnitude of change for the majority of genes affected correlated more tightly with particle surface area than either particle mass or number (Waters et al., 2009).

CONCLUSION

This study aimed at developing double fluorescent particles pH-sensitive for biological investigations of phagocytosis. We presented a proof-of-concept that was validated in cellular conditions. These particles, which physico-chemical characteristics were well-defined and controlled (fluorescence, size, surface coating, and state of agglomeration), induced different cellular responses. Compared by mass, submicronic particles were the less cytotoxic particles and the less significantly uptaken, suggesting that nanoparticles cytotoxicity might be related to their uptake. Importantly, our findings expressed by surface area instead of mass suggest that biological activity of particles might be related to the particle specific surface. But both particles were cytotoxic at the highest dose.

Further investigations are needed to better understand how nano-scale may impact biological responses of silica particles in order to provide a “safer by design” approach for the engineering of new nano-objects. This model of particles may be helpful for a better understanding of uptake mechanisms, a key issue of nanotoxicology.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to acknowledge the financial support of the Région Rhône-Alpes and the Conseil Général de la Loire.

REFERENCES

- Albanese, A., Tang, P.S., and Chan, W.C.W. (2012). The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 14, 1–16.
- Van Amersfoort, E.S., and Van Strijp, J.A. (1994). Evaluation of a flow cytometric fluorescence quenching assay of phagocytosis of sensitized sheep erythrocytes by polymorphonuclear leukocytes. *Cytometry* 17, 294–301.

II. Adaptation d'une méthode innovante pour la quantification de la phagocytose de nanoparticules

- Benezra, M., Penate-Medina, O., Zanzonico, P.B., Schaer, D., Ow, H., Burns, A., DeStanchina, E., Longo, V., Herz, E., Iyer, S., *et al.* (2011). Multimodal silica nanoparticles are effective cancer-targeted probes in a model of human melanoma. *J. Clin. Invest.* 121, 2768–2780.
- Van Blaaderen, A., and Vrij, A. (1992). Synthesis and characterization of colloidal dispersions of fluorescent, monodisperse silica spheres. *Langmuir* 8, 2921–2931.
- Bruch, J., Rehn, S., Rehn, B., Borm, P.J.A., and Fubini, B. (2004). Variation of biological responses to different respirable quartz flours determined by a vector model. *Int J Hyg Environ Health* 207, 203–216.
- Chandolu, V., and Dass, C.R. (2013). Treatment of lung cancer using nanoparticle drug delivery systems. *Curr. Drug Discov. Technol.* 10, 170–176.
- Chen, B., Liu, Y., Song, W.M., Hayashi, Y., Ding, X.C., and Li, W.H. (2011). *In vitro* evaluation of cytotoxicity and oxidative stress induced by multiwalled carbon nanotubes in murine RAW 264.7 macrophages and human A549 lung cells. *Biomed. Environ. Sci.* BES 24, 593–601.
- Cho, W.-S., Choi, M., Han, B.S., Cho, M., Oh, J., Park, K., Kim, S.J., Kim, S.H., and Jeong, J. (2007). Inflammatory mediators induced by intratracheal instillation of ultrafine amorphous silica particles. *Toxicol. Lett.* 175, 24–33.
- Clift, M.J.D., Rothen-Rutishauser, B., Brown, D.M., Duffin, R., Donaldson, K., Proudfoot, L., Guy, K., and Stone, V. (2008). The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 232, 418–427.
- Colilla, M., Manzano, M., and Vallet-Regí, M. (2008). Recent advances in ceramic implants as drug delivery systems for biomedical applications. *Int. J. Nanomedicine* 3, 403–414.
- Fang, J., Nakamura, H., and Maeda, H. (2011). The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63, 136–151.
- Fizet, J., Rivière, C., Bridot, J.L., Charvet, N., Louis, C., Billotey, C., Raccurt, M., Morel, G., Roux, S., Perriat, P., *et al.* (2009). Multi-luminescent hybrid gadolinium oxide nanoparticles as potential cell labeling. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 9, 5717–5725.
- Fubini, B., Fenoglio, I., Ceschino, R., Ghiazza, M., Martra, G., Tomatis, M., Borm, P., Schins, R., and Bruch, J. (2004). Relationship between the state of the surface of four commercial quartz flours and their biological activity in vitro and in vivo. *Int J Hyg Environ Health* 207, 89–104.
- Gazzano, E., Ghiazza, M., Polimeni, M., Bolis, V., Fenoglio, I., Attanasio, A., Mazzucco, G., Fubini, B., and Ghigo, D. (2012). Physicochemical determinants in the cellular responses to nanostructured amorphous silicas. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 128, 158–170.
- Greish, K., Thiagarajan, G., Herd, H., Price, R., Bauer, H., Hubbard, D., Burckle, A., Sadekar, S., Yu, T., Anwar, A., *et al.* (2012). Size and surface charge significantly influence the toxicity of silica and dendritic nanoparticles. *Nanotoxicology* 6, 713–723.
- Griffiths, G. (2004). On phagosome individuality and membrane signalling networks. *Trends Cell Biol.* 14, 343–351.
- Kaewamatawong, T., Kawamura, N., Okajima, M., Sawada, M., Morita, T., and Shimada, A. (2005). Acute pulmonary toxicity caused by exposure to colloidal silica: particle size dependent pathological changes in mice. *Toxicol. Pathol.* 33, 743–749.
- Leclerc, L., Boudard, D., Pourchez, J., Forest, V., Sabido, O., Bin, V., Palle, S., Grosseau, P., Bernache, D., and Cottier, M. (2010). Quantification of micro-sized fluorescent particles phagocytosis to a better knowledge of toxicity mechanisms. *Inhal. Toxicol.* 22, 1091–1100.
- Leclerc, L., Boudard, D., Pourchez, J., Forest, V., Marmuse, L., Louis, C., Bin, V., Palle, S., Grosseau, P., Bernache-Assollant, D., *et al.* (2012). Quantitative cellular uptake of double fluorescent core-shelled model submicronic particles. *J. Nanoparticle Res.* 14, 1–13.
- Lee, Y.-E.K., and Kopelman, R. (2012). Nanoparticle PEBBLE sensors in live cells. *Methods Enzymol.* 504, 419–470.
- Mamaeva, V., Sahlgren, C., and Lindén, M. (2013). Mesoporous silica nanoparticles in medicine—recent advances. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 689–702.

- Maynard, A.D., Aitken, R.J., Butz, T., Colvin, V., Donaldson, K., Oberdörster, G., Philbert, M.A., Ryan, J., Seaton, A., Stone, V., *et al.* (2006). Safe handling of nanotechnology. *Nature* 444, 267–269.
- Merget, R., Bauer, T., Küpper, H., Philippou, S., Bauer, H., Breitstadt, R., and Bruening, T. (2002). Health hazards due to the inhalation of amorphous silica. *Arch. Toxicol.* 75, 625–634.
- Miksa, M., Komura, H., Wu, R., Shah, K.G., and Wang, P. (2009). A novel method to determine the engulfment of apoptotic cells by macrophages using pHrodo succinimidyl ester. *J. Immunol. Methods* 342, 71–77.
- Nakata, E., Yukimachi, Y., Nazumi, Y., Uto, Y., Maezawa, H., Hashimoto, T., Okamoto, Y., and Hori, H. (2010). A newly designed cell-permeable SNARF derivative as an effective intracellular pH indicator. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 46, 3526–3528.
- Nuutila, J., and Lilius, E.-M. (2005). Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 65, 93–102.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., and Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113, 823–839.
- Ohkuma, S., and Poole, B. (1978). Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 3327–3331.
- Panas, A., Marquardt, C., Nalcaci, O., Bockhorn, H., Baumann, W., Paur, H.-R., Mühlhopt, S., Diabaté, S., and Weiss, C. (2013). Screening of different metal oxide nanoparticles reveals selective toxicity and inflammatory potential of silica nanoparticles in lung epithelial cells and macrophages. *Nanotoxicology* 7, 259–273.
- Peng, J., He, X., Wang, K., Tan, W., Wang, Y., and Liu, Y. (2007). Noninvasive monitoring of intracellular pH change induced by drug stimulation using silica nanoparticle sensors. *Anal. Bioanal. Chem.* 388, 645–654.
- Puddu, V., and Perry, C.C. (2014). Interactions at the Silica–Peptide Interface: The Influence of Particle Size and Surface Functionality. *Langmuir* 30, 227–233.
- Ramshesh, V.K., and Lemasters, J.J. (2012). Imaging of mitochondrial pH using SNARF-1. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 810, 243–248.
- Riehemann, K., Schneider, S.W., Luger, T.A., Godin, B., Ferrari, M., and Fuchs, H. (2009). Nanomedicine—challenge and perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 48, 872–897.
- Roy, I., Ohulchanskyy, T.Y., Bharali, D.J., Pudavar, H.E., Mistretta, R.A., Kaur, N., and Prasad, P.N. (2005). Optical tracking of organically modified silica nanoparticles as DNA carriers: a nonviral, nanomedicine approach for gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 279–284.
- Santra, S., Zhang, P., Wang, K., Tapeç, R., and Tan, W. (2001). Conjugation of biomolecules with luminophore-doped silica nanoparticles for photostable biomarkers. *Anal. Chem.* 73, 4988–4993.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., *et al.* (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682.
- Stark, W.J. (2011). Nanoparticles in Biological Systems. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 1242–1258.
- Villota, R., and Hawkes, J.G. (1986). Food applications and the toxicological and nutritional implications of amorphous silicon dioxide. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 23, 289–321.
- Wang, W., Gu, B., Liang, L., and Hamilton, W. (2003). Fabrication of Two- and Three-Dimensional Silica Nanocolloidal Particle Arrays. *J. Phys. Chem. B* 107, 3400–3404.
- Waters, K.M., Masiello, L.M., Zangar, R.C., Tarasevich, B.J., Karin, N.J., Quesenberry, R.D., Bandyopadhyay, S., Teeguarden, J.G., Pounds, J.G., and Thrall, B.D. (2009). Macrophage Responses to Silica Nanoparticles are Highly Conserved Across Particle Sizes. *Toxicol. Sci.* 107, 553–569.

FIGURES

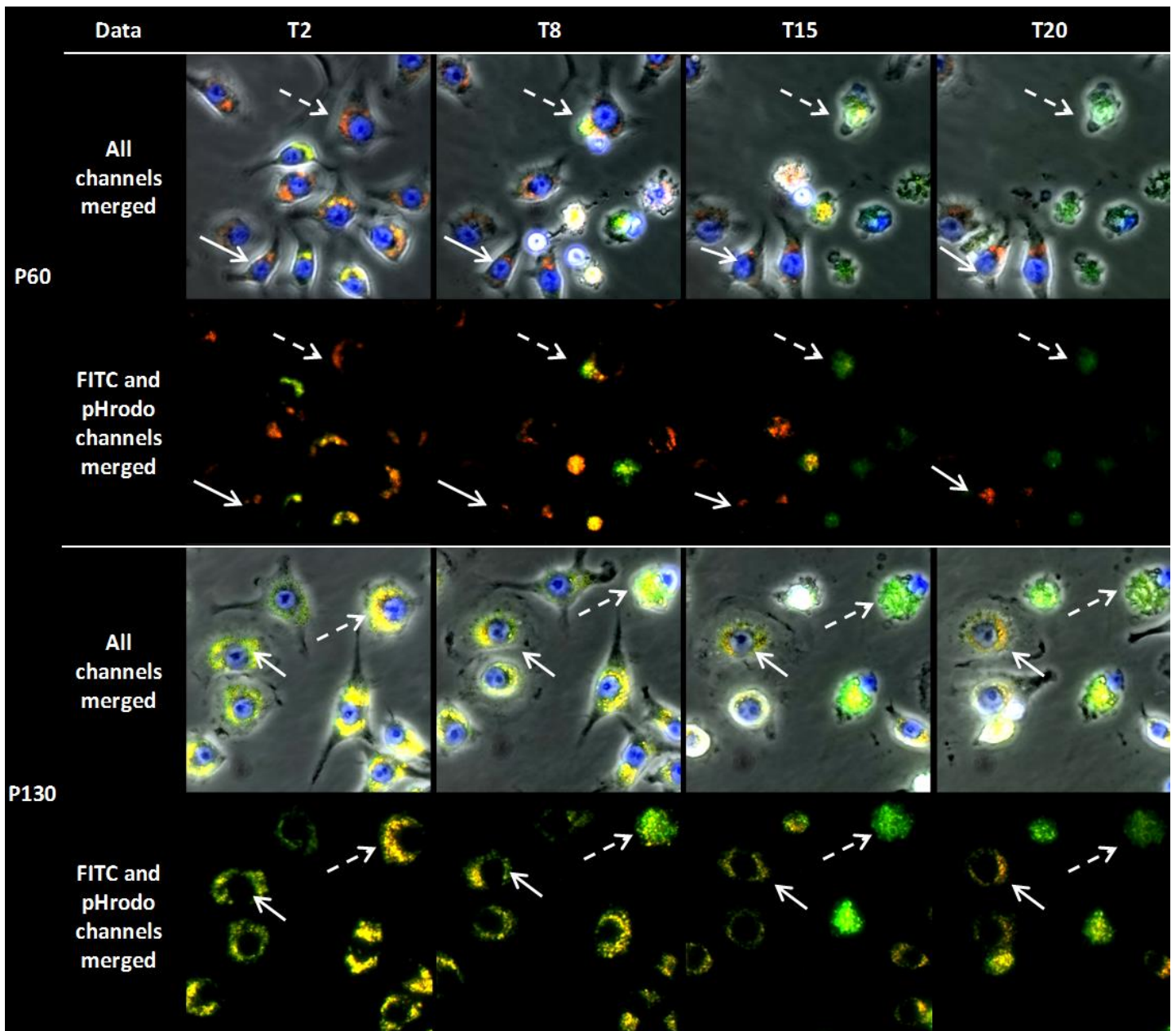


Figure 1 . 20 hours automated time-lapse microscopy imaging of a RAW 264.7 cell line after incubation with P60 and P130 at 300µg/ml. Cell morphology (membrane integrity and Hoechst blue labelled nuclei), particle adsorption to cell surface (green) and cellular uptake of particles (yellow and red depending on the vesicles pH) was assessed by time-lapse microscopy. Continue arrows indicate living cell and dotted arrows point cell with a loss of membrane integrity.

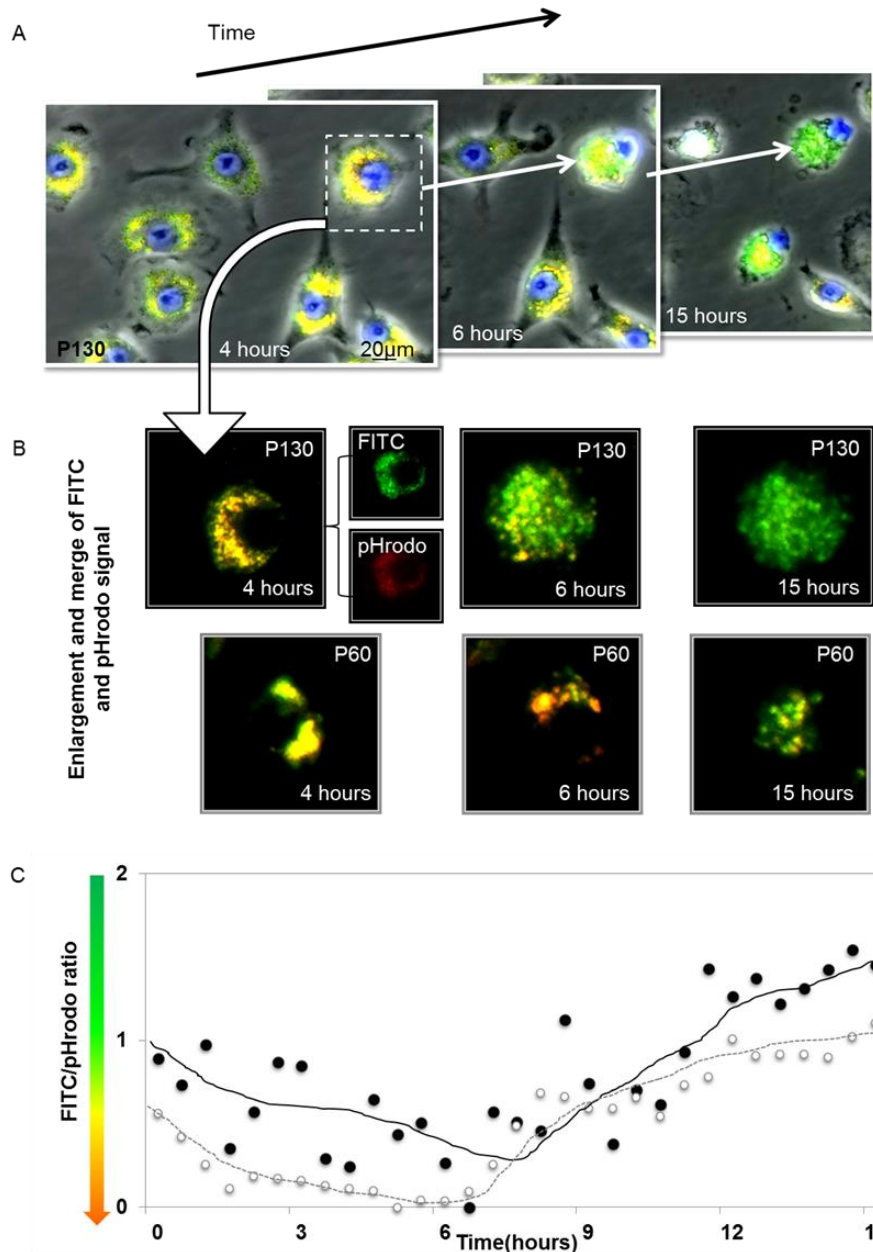


Figure 2 . (A) Automated time-lapse microscopy imaging of RAW 264.7 cells after incubation with P130 at 300µg/mL. The selected images show approximately 1% of the full movie. (B) Black squares are the enlargement of the dotted square containing a single cell above and orange squares are from microscopy of cells after incubation with P60. The view only with merge of FITC and pHrodo signal, allows distinguishing phagocytosed particles (yellow due to the merge of green and red fluorescences) and their release outside the cell (green due to the lack of red signal pHrodo) during the cell death and loss of membrane integrity. (C) Automated measurement of FITC/pHrodo ratio changes during 20 hours by software. The Black and the grey curves are referred to cell after incubation with P130 and P60 respectively.

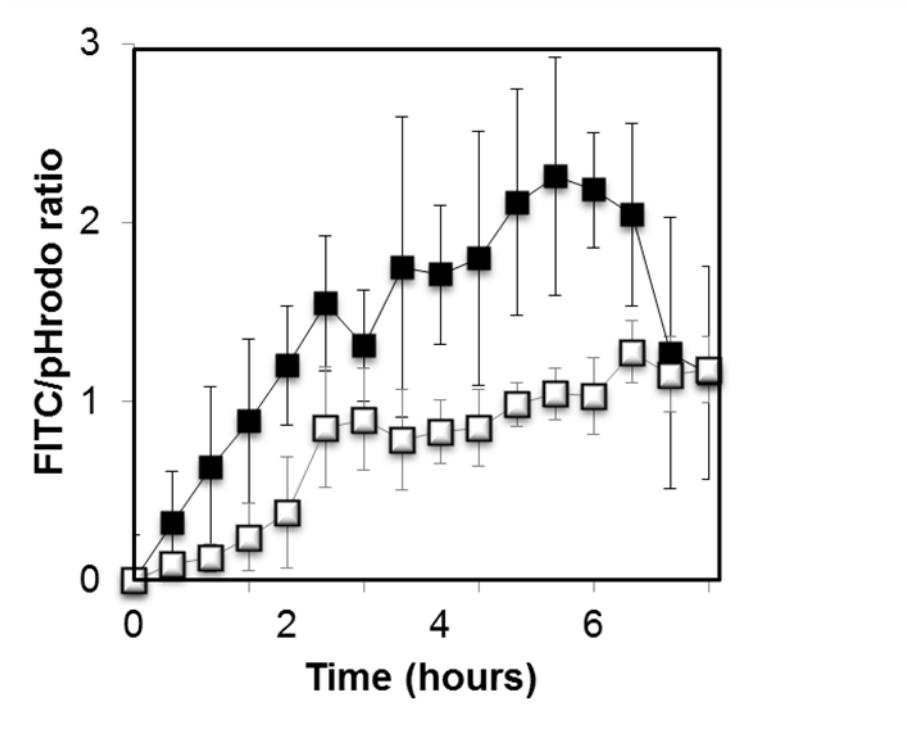
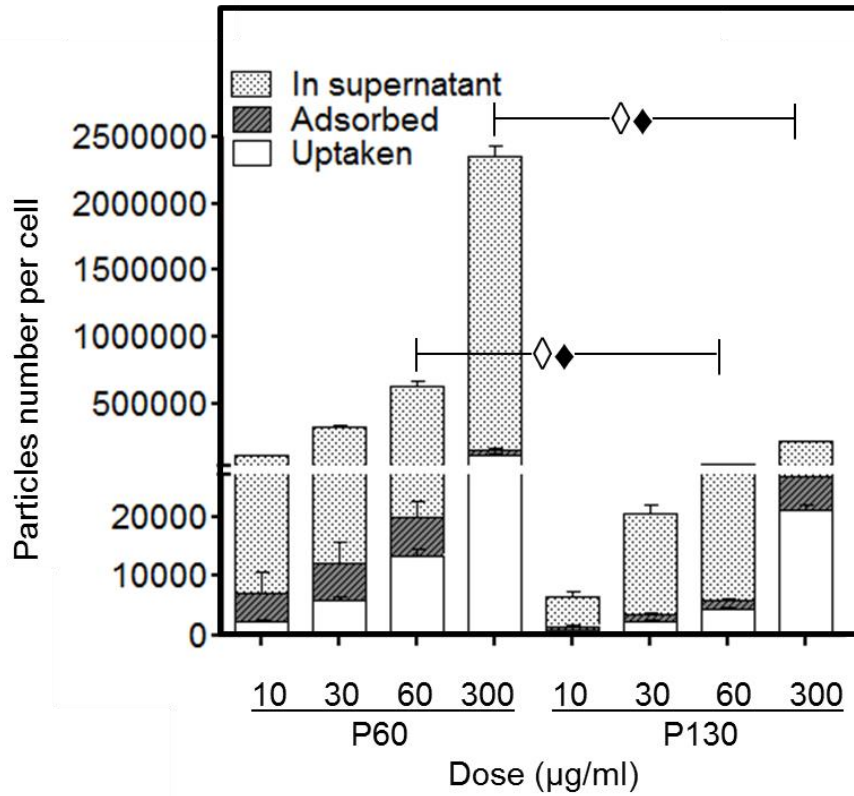


Figure 3 . Detailed FITC/pHrodo ratio changes during the cellular loss of membrane integrity. Black (black tags) and the grey curves (white tags) correspond to cells after contact with P130 and P60 respectively. (Ratios average of 5 regions of interest containing one isolated cell)

A



B

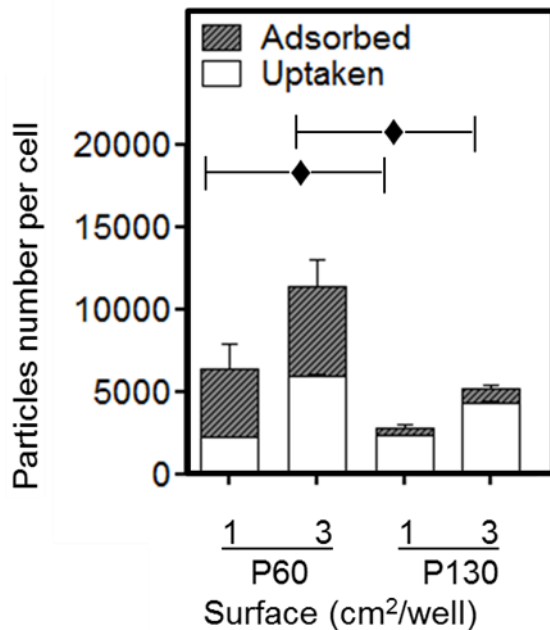
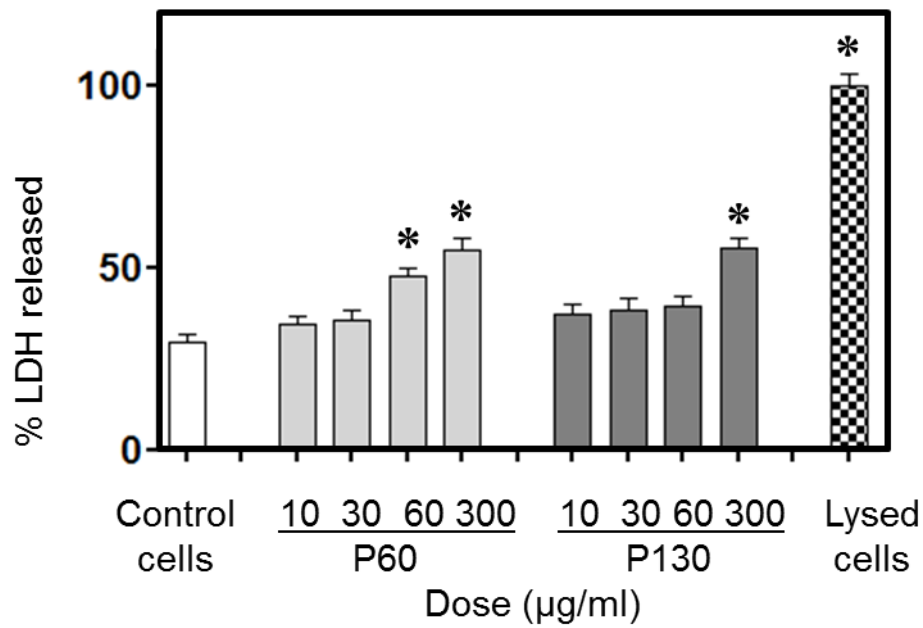


Figure 4 . P60 and P130 were incubated for 20h with RAW264.7 macrophages and the distribution of particles was assessed by fluorimetry and Trypan Blue quenching. Results are presented using different metrics: (A) particle mass ($\mu\text{g/mL}$) and (B) particle surface area per well (cm^2/well). The doses of 1 and 3 cm^2/well correspond to the doses of 10 and 30 $\mu\text{g/mL}$ for P60 and 30 and 60 $\mu\text{g/mL}$ for P130 respectively. ($n=3$) (\diamond and \blacklozenge indicate statistical differences in particle uptake and adsorption at cell surface respectively.)

A



B

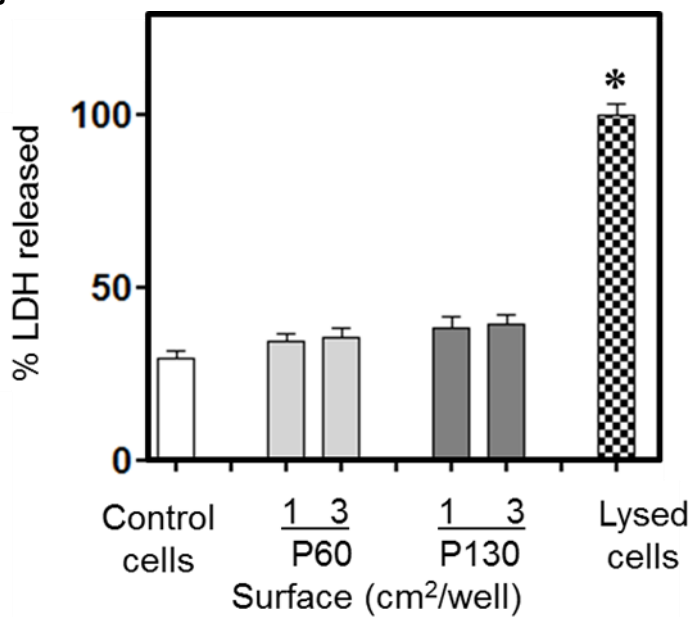
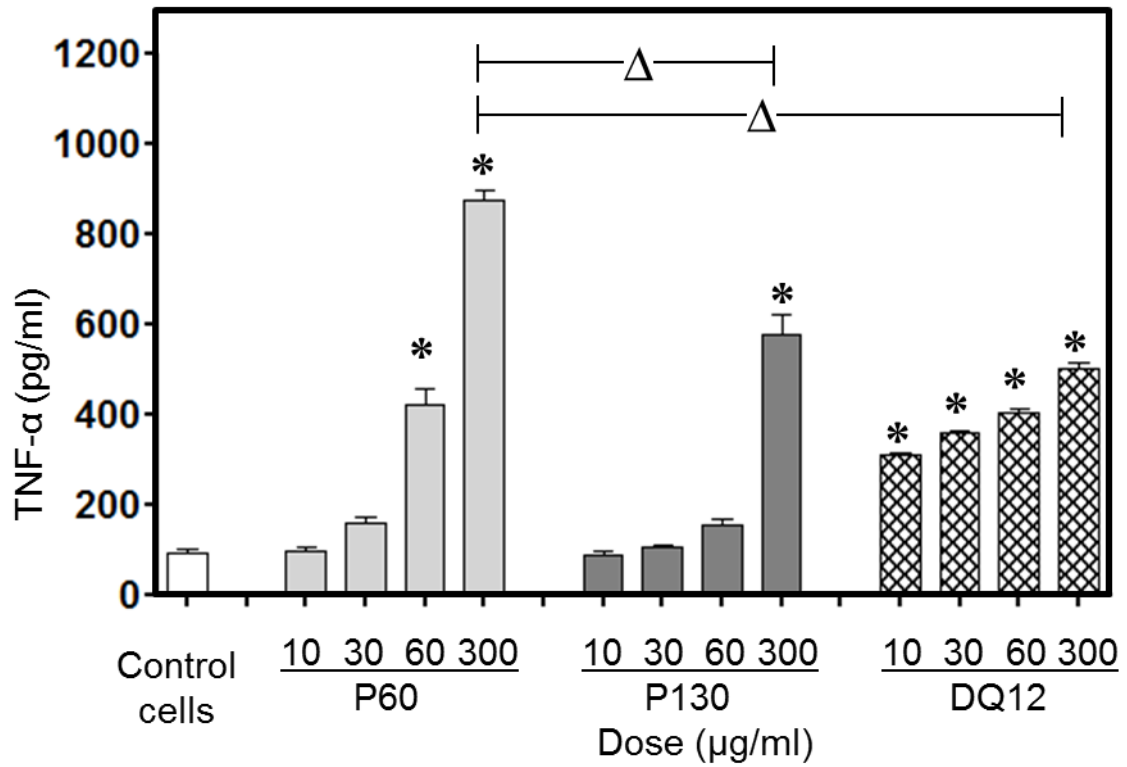


Figure 5 . Cytotoxicity of P60 and P130 investigated using the LDH assay in RAW 264.7 macrophages. Results are presented using different metrics: (A) particle mass ($\mu\text{g/mL}$) and (B) particle surface area per well (cm^2/well). The doses of 1 and 3 cm^2/well correspond to the doses of 10 and 30 $\mu\text{g/mL}$ for P60 and 30 and 60 $\mu\text{g/mL}$ for P130 respectively. (n=3)(* = statistically different from negative control. Δ = statistically different.)

A



B

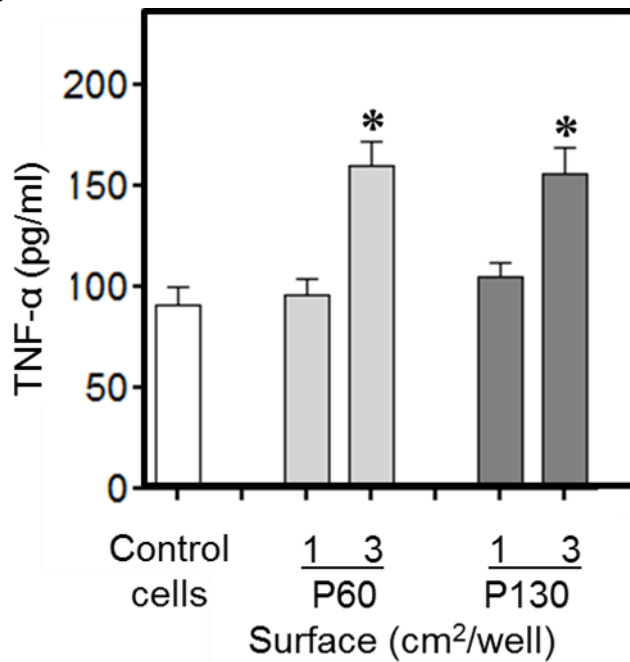


Figure 6 . Pro-inflammatory response induced by P60 and P130 investigated using the TNF- α assay in RAW 264.7 macrophages. Results are presented using different metrics: (A) particle mass ($\mu\text{g/mL}$) and (B) particle surface area per well (cm^2/well). The doses of 1 and 3 cm^2/well correspond to the doses of 10 and 30 $\mu\text{g/mL}$ for P60 and 30 and 60 $\mu\text{g/mL}$ for P130 respectively. ($n=3$)(*= statistically different from negative control. Δ = statistically different.)

TABLES

Table 1 . Summary of particle characteristics at 100 µg/mL

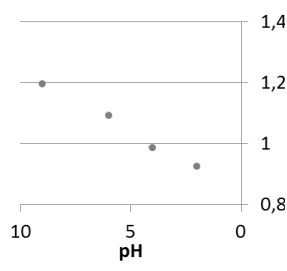
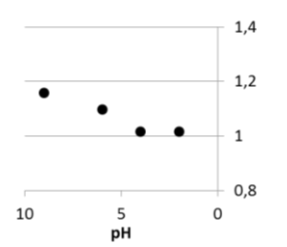


Particle type	Particles number/well	Particles total surface (cm ²)/well	Initial FITC massic %	Initial pHrodo mole %	Measured fluorescent ratio FITC/pHrodo
P60	8 .10 ⁵	10	0.5	0.2 (1 268 dyes per particle)	
P130	0.6 .10 ⁵	4	1.2	0.2 (30 305 dyes per particle)	

Table 2 . Physico-chemical features of the particles used in the present study

Method	SEM	DLS			
		Hydro-dynamic diameter (nm)		Zeta potential (mV)	
Particle characteristic	Geometric diameter	in water	in DMEMc	in water	in DMEMc
P60	62 ± 10 nm	122± 1 (Pdi 0,07)	71 ± 2 (Pdi 0,15)	- 44,5 ± 2,3	- 164 ± 13
P130	140 ± 6 nm	183 ± 3 (Pdi 0,03)	123 ± 2 (Pdi 0,17)	- 44,4 ± 0,4	- 179 ± 17

Table 3 . Semi-quantification of particles uptake by cells over time by time-lapse microscopy. Macrophages were incubated with P60 and P130 at 300µg/mL. Macrophages initially exhibit a normal morphology with homogeneous cytoplasm and green particles adsorbed at their membrane, and then activated macrophages cytoplasm contains yellow to red particles depending on pH of phagocytic vesicles.

Particle type	Observation	T2	T8	T15	T20	Schematic repartition of particles in cell
P60	Cells containing particles in phagosomes	34%	29%	0%	0%	
	Cells containing particles in phagolysosomes	66%	38%	24%	14%	
	Dead cells after release of particles	0%	33%	76%	86%	
P130	Cells containing particles in phagosomes	83%	68%	42%	40%	
	Cells containing particles in phagolysosomes	17%	14%	28%	16%	
	Dead cells after release of particles	0%	18%	30%	44%	

II.3. Données complémentaires et perspectives d'études

II.3.1. Les essais complémentaires en microscopie confocale

La limite de la technique de vidéo-microscopie (excitation par lumière blanche filtrée) réside dans la mortalité cellulaire induite par la surexposition des cellules à la lumière pour chaque prise d'image. De plus, le Hoechst marquant les noyaux des cellules est létal à long terme, même à très faible dose. Une technique complémentaire d'observation par microscopie confocale (excitation laser) a été utilisée (Annexe V). Après différents temps d'incubation avec les particules, les cellules ont été fixées au paraformaldehyde (PFA), et les images ont confirmé la phagocytose des P130 détectée par vidéo-microscopie, voir figure 29.

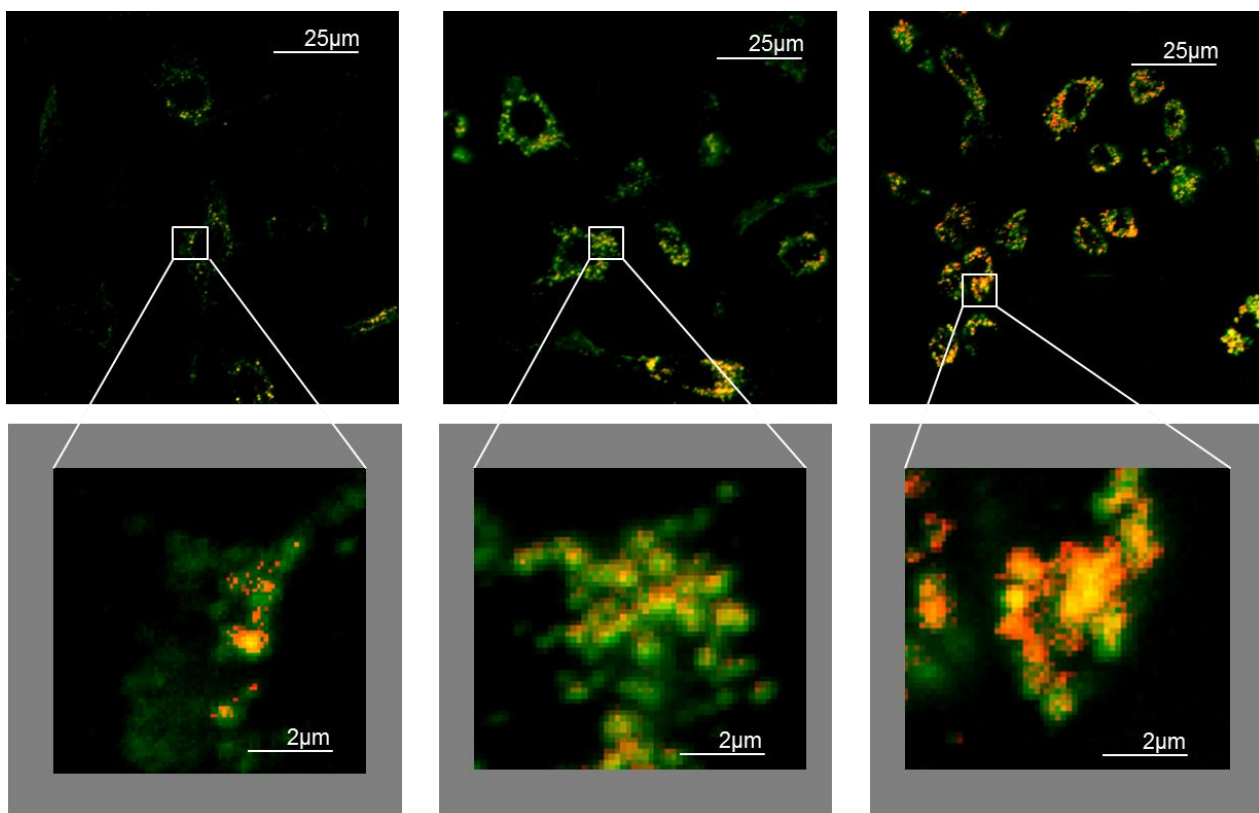


Figure 29 – Images de microscopie confocale de cellules RAW 264.7 après incubation avec des particules de silice à double fluorescence FITC/pHrodo de 130 nm de diamètre. De gauche à droite les temps d'incubation étaient respectivement de 1, 5 et 15 heures pour une dose de 150 μg de particules/mL. Les couleurs correspondent au FITC en vert pour les nanoparticules adsorbées en surface de la cellule et au pHrodo en rouge lorsque les nanoparticules sont internalisées. La superposition des fluorescences, témoin de la colocalisation des nanoparticules dans les phagolysosomes, apparaît en jaune.

Cependant, cette technique présente plusieurs inconvénients dont une gamme de doses de nanoparticules au contact de la cellule très limitée, d'une part, par leur manque d'intensité à trop faible dose (dose testée 30 μg /mL), et d'autre part, par leur surexpression à trop forte dose (dose testée 300 μg /mL). De plus, cette technique entraîne un photobleaching accéléré des nanoparticules

qui laisse peu de temps à l'exploitation des données. Enfin, l'observation de cellules fixées limite l'étude en cinétique.

II.3.2. Les mécanismes de l'internalisation des nanoparticules par la cellule

La vidéo-microscopie a permis d'observer l'interaction particules/cellules et l'évolution des signaux de fluorescence des fluorophores FITC et de la sonde pHrodo contenus dans les particules et sensibles aux variations de pH. Outre la différence de « couleurs » émises par les deux types de particules une fois internalisées en milieu acide (P60 rouges-orangées et P130 orangées-jaunes) et expliquée par des proportions de fluorochromes différentes pour les deux types de particules, la répartition des particules dans le cytoplasme des cellules semble différente. La figure 30 ci-dessous permet de visualiser la répartition des particules P60 (A) et P130 (B) au cours du temps. On observe une distribution relativement homogène des P60 dans le cytoplasme, tandis que les P130 apparaissent dans des petites vésicules bien délimitées.

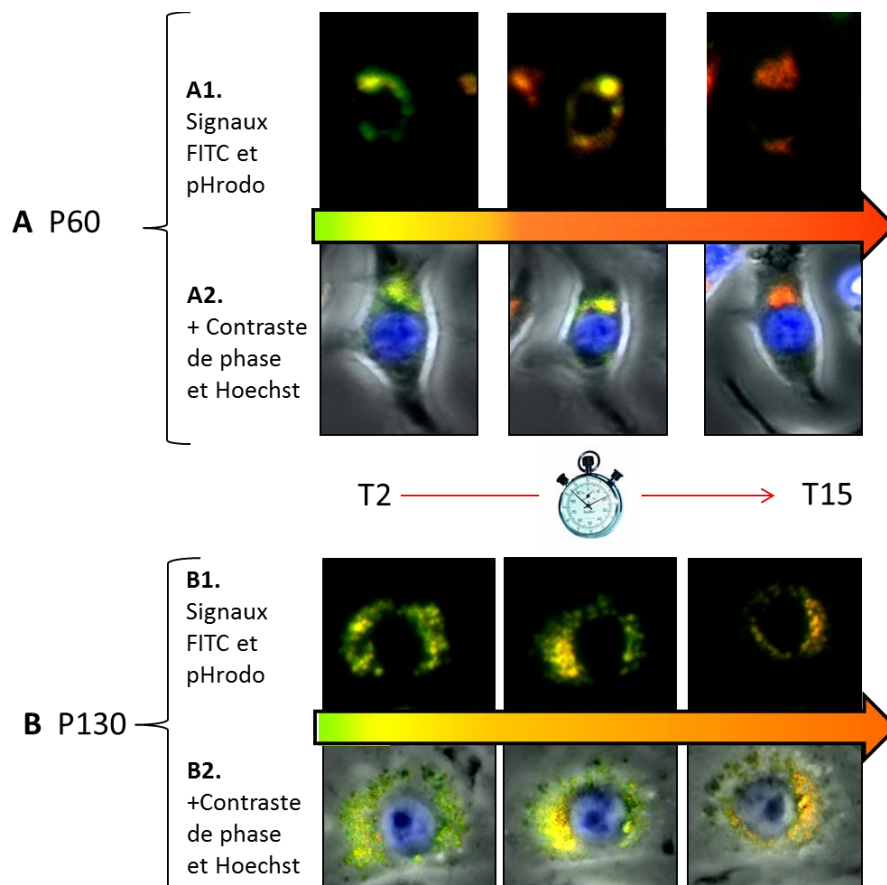


Figure 30 - Extraits de vidéo-microscopie montrant la répartition des particules P60 (A) et P130 (B) contenant les fluorochromes FITC en vert et pHrodo en rouge (vert et rouge superposés apparaissant en jaune) au cours du temps. La membrane cytoplasmique des macrophages est rendue visible avec le contraste de phase, les noyaux ont été marqués au Hoechst en bleu.

II. Adaptation d'une méthode innovante pour la quantification de la phagocytose de nanoparticules

Cependant, les variations de « couleurs » pour les deux types de particules sont dues à l'activation du signal de fluorescence du pHrodo en milieu acide. Or, excepté pour la phagocytose, toutes les voies d'endocytose débutent par la formation d'endosomes primaires (pH=7 environ) dont l'acidification résulte de l'activation des pompes à protons H⁺ puis l'endosome devient un endosome tardif (pH=6 environ) et fusionne avec les lysosomes (pH=3,5 à 5) riches en enzymes lytiques pour donner un endolysosome (pH=5 environ) (Cain *et al.*, 1989 ; Sillence, 2013). Dans le cas de la phagocytose, la vésicule d'endocytose est appelée phagosome (pH=6 environ) et sa fusion avec les lysosomes forme des phagolysosomes (pH=4 environ) (Miksa *et al.*, 2009 ; Aderem et Underhill, 1999). Ainsi, la phagocytose entraîne la formation de vésicules plus acides que les autres voies d'endocytose. Or dans les essais préliminaires, les échantillons de particules ayant permis de mesurer les ratios FITC/pHrodo à différents pH (10-6-4-2) ont été observés au microscope à épifluorescence. Ils ont permis d'observer une apparition de l'émission de « rouge » du pHrodo seulement aux pH 2 et 4 tandis que l'émission de « vert » du FITC était très intense à pH10, puis de plus en plus faible à pH6 et 4 mais ne disparaissait qu'à pH2. Ainsi, l'émission de « jaune » (superposition du « rouge » et du « vert ») des particules est représentative d'un pH autour de 4 dans les vésicules plutôt corrélé à un processus de phagocytose.

Pour autant des variations du processus de phagocytose liées à la différence de tailles des particules internalisées pourraient survenir et être analysées par exemple par l'étude de l'organisation du cytosquelette. En effet, le cytosquelette, élément dynamique, est responsable de la forme de la cellule, de ses propriétés d'adhérence, de sa mobilité et du maintien de la structure interne de la cellule, et en particulier de l'agencement des compartiments cellulaires. Il comprend trois types de réseaux de filaments : les microtubules (regroupés autour d'un centre organisateur), les microfilaments d'actine (ubiquitaires) et les filaments intermédiaires. Il a un rôle majeur dans les phénomènes d'internalisation de la cellule et peut être étudié par différentes techniques de microscopie en fluorescence à l'aide de marqueurs spécifiques du cytosquelette. Par exemple la phalloïdine permet de marquer l'actine (Andre *et al.*, 1990).

En complément l'évolution des phagosomes en phagolysosomes, qui semblent plus gros après la phagocytose des P60, pourrait être étudiée avec des marqueurs spécifiques des lysosomes comme le LysoTracker® Red DND 99 (Ibrahim-Granet *et al.*, 2003).

Ce type d'étude nécessite des choix de fluorochromes et des mises au point pour éviter que les signaux des marqueurs ne se superposent avec les signaux émis par les particules ou le colorant des noyaux cellulaires.

II.4. Bilan

Les particules modèles de silice amorphe étudiées comportaient un cœur contenant le fluorophore FITC et une coquille contenant la sonde pHrodo. Leur utilisation, associée aux méthodes d'analyse développées, notamment la vidéo-microscopie, a permis de comparer la dynamique de phagocytose de particules nanométriques et submicroniques de dimensions proches mais bien séparées par la limite admise de 100 nm. La quantification de la réponse biologique induite par ces deux types de particules montre qu'à doses massiques égales ($\mu\text{g}/\text{mL}$) :

- Les nanoparticules de 60 nm de diamètre étaient les plus adsorbées à la surface des cellules. De plus elles étaient internalisées plus tôt et en plus grande quantité par rapport aux particules submicroniques. Elles induisaient une cytotoxicité dès la dose moyenne de $60\mu\text{g}/\text{mL}$.
- Les particules submicroniques de 130 nm de diamètre induisaient une cytotoxicité uniquement à la forte dose de $300\mu\text{g}/\text{mL}$.
- Les essais ont permis d'observer une activité cellulaire dépendante de la dose de particules utilisée indépendamment de leur taille.

Les résultats à la dose de $60\mu\text{g}/\text{mL}$ sont résumés dans la figure 31.

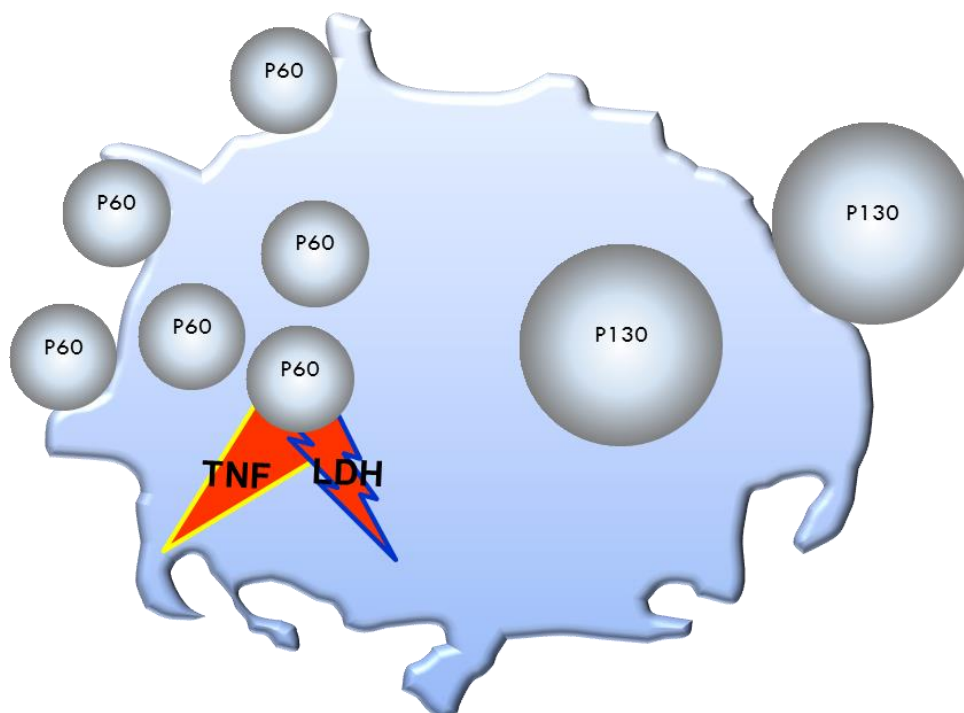


Figure 31 - Schéma figuratif de l'effet (à la dose de $60\mu\text{g}/\text{mL}$) de la taille des particules de silice sur leur adsorption à la surface du macrophage, leur internalisation et leur cytotoxicité.

II. Adaptation d'une méthode innovante pour la quantification de la phagocytose de nanoparticules

L'originalité des résultats est l'activité biologique des particules équivalente pour les deux lots de particules lorsque les résultats sont exprimés selon la surface totale de particules au contact des cellules (cm^2/puits , ou dans l'article en anglais cm^2/well). Plusieurs équipes ont déjà constaté une réponse cellulaire dose-dépendante (viabilité, inflammation, stress oxydant) davantage corrélé à la surface qu'à la masse de particules mise au contact des cellules (Waters *et al.*, 2009 ; Oberdörster *et al.*, 2005 ; Bruch *et al.*, 2004), comme le montre la figure 32. En effet, comme expliqué dans la synthèse bibliographique au paragraphe I.1.3 (p.17), la réactivité d'un élément dépend avant tout des atomes présents à sa surface, bien que d'autres paramètres puissent contribuer à sa bio-toxicité (nombre, volume...) (Ostiguy *et al.*, 2010).

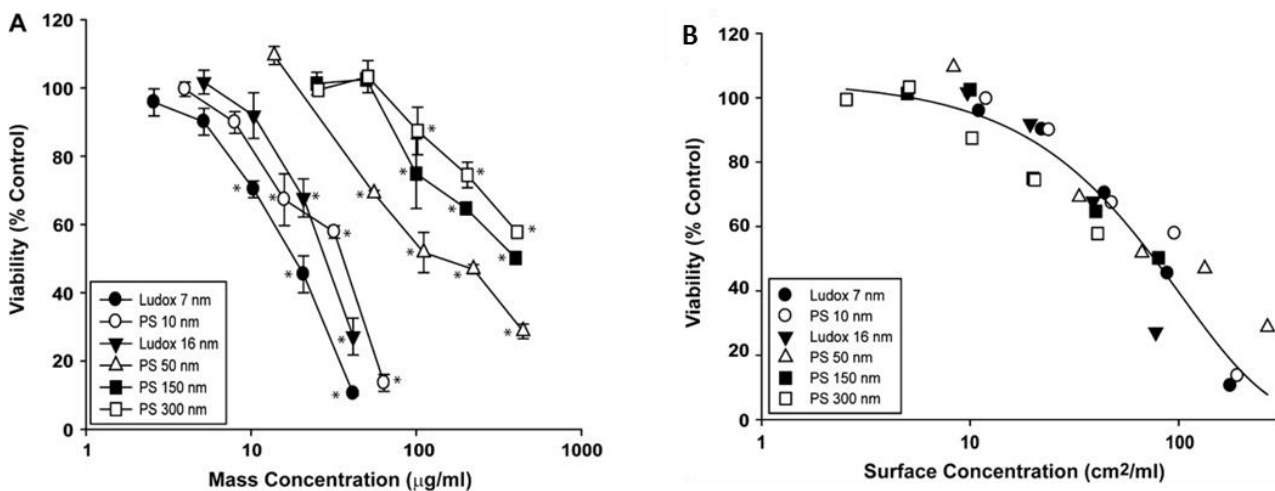


Figure 32 – Viabilité (test MTT) des macrophages RAW 264.7 après 24 h de contact avec des particules de silice amorphe commerciales (Polyscience pour les PS et W.R. Grace and Company pour les ludox) de 7 à 300 nm de diamètre. Les données sont présentées selon une gamme de doses en fonction (A) de la masse ou (B) de l'aire de surface de la particule. L'étude a été réalisée en triplicat (Waters *et al.*, 2009).

En complément, les études de vidéo-microscopie pourraient être améliorées afin d'observer les interactions particules/cellules à des doses plus faibles que $300 \mu\text{g/mL}$, dose sans doute peu réaliste mais nécessaire pour avoir un signal fluorescent suffisant. Ainsi, le développement de particules présentant une émission de fluorescence plus importante que celles présentées ici permettrait d'étudier des doses plus faibles. De plus, le développement de particules de tailles différentes mais contenant des proportions de fluorophores adaptées, afin que les évolutions de « couleurs » en fonction du pH soient similaires entre des particules de tailles différentes, simplifierait l'analyse des images.

Pour faire suite à cette partie qui a démontré l'impact de la taille des particules à l'échelle nanométrique sur leur activité biologique, la partie suivante revient sur l'impact de la fonctionnalisation de surface des nanoparticules et aborde l'impact de la formation de la corona protéique.

III. Interactions protéines/nanoparticules : impact sur l'activité biologique de nanoparticules de silice

III.1. Introduction et méthodologie

En collaboration avec l'ILM, des mises au point concernant la méthode de synthèse des nanoparticules ont permis d'obtenir des nanoparticules avec des charges de surface différentes, avec ou sans gène stérique (présence ou non de PEG à la surface des nanoparticules). Cinq types de nanoparticules, de même structure que celles synthétisées dans la première partie (avec un cœur d'or et une coquille de silice amorphe fluorescente) mais de fonctionnalisations de surface différentes, comme représenté dans la figure 33, ont été étudiés et sont décrits dans l'ébauche de publication suivante.

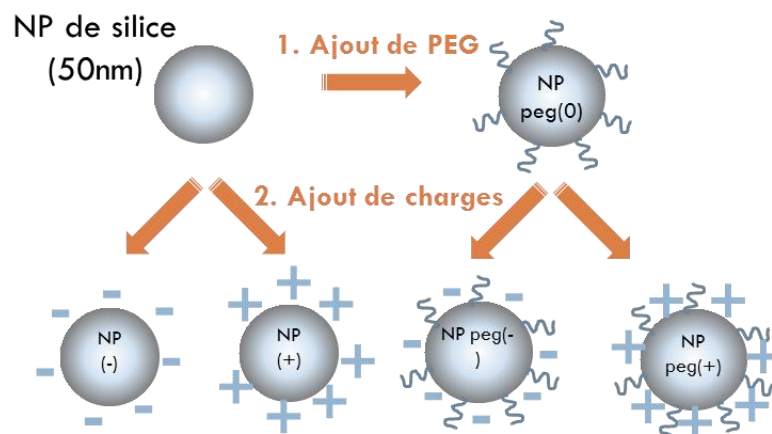


Figure 33 - Schéma descriptif des lots de nanoparticules mis au point.

La méthode de caractérisation physico-chimique des particules est la même que dans les parties précédentes (Annexe I). Les méthodes utilisées pour la quantification du processus de phagocytose par fluorimétrie et les tests commerciaux de cytotoxicité ainsi que les mises au point sont également similaires à ceux des parties précédentes (Annexe II).

Les différentes natures chimiques de surface des nanoparticules sont suspectées d'induire la formation de coronas protéiques de nature différente autour des nanoparticules et donc d'avoir un effet indirect sur l'activité biologique des cellules. La méthode d'étude de la « corona » par spectrométrie de masse développée pour les échantillons de nanoparticules de silice étudiées a été réalisée à l'IAB par l'équipe *Immunologie analytique des pathologies chroniques* (Département oncogénèse et biotechnologie) et est détaillée en annexe (Annexe VI).

III.2. Projet de publication III

IMPACT OF SURFACE FUNCTIONALIZATION OF SILICA NANOPARTICLES ON THEIR BIOLOGICAL IDENTITY AND THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY

Andréa Kurtz-Chalot, Jérémie Pourchez, Delphine Boudard, Valérie Bin, Matteo Martini, Michèle Cottier and Valérie Forest.

A. Kurtz-Chalot (*Corresponding author: kurtz-chalot@emse.fr*), J. Pourchez, V. Forest
École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, 158 cours Fauriel, CS62362, 42023 Saint-Etienne cedex 2, France.

D. Boudard, V. Bin, M. Cottier
LINA Laboratoire Interdisciplinaire d'étude des Nanoparticules Aérosolisées (EA 4624) Faculté de Médecine Jacques Lisfranc, 15 rue Ambroise Paré, 42023 Saint-Étienne Cedex 2, France.

M. Martini
ILM, Institut Lumière Matière, UMR 5603 CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Bâtiment Kastler 10 rue Ada Byron, 69622 Villeurbanne cedex, France.

Abstract Surface functionalization of nano-objects is a feature to consider in order to improve their innocuousness. Amorphous silica is particularly interesting for versatile surface modifications because of the silane chemistry and its chemical stability. The aim of the present study was to investigate the nanoparticles uptake by phagocytic cells and the biological response induced depending on their surface functionalization: (1) with chemical groups of different charges (positively charged amine groups NH_3^+ , negatively charged carboxylic acid groups COO^-) and (2) with or without steric hindrance generated by polyethylene glycol (PEG). To that purpose, phagocytic cell of the immune system, murine macrophages, were incubated for 20 hours with each kind of nanoparticles. The cellular uptake was assessed by a fluorimetric assay and cellular responses were evaluated in terms of cytotoxicity, pro-inflammatory factor production and oxidative stress. Results showed that nanoparticles PEG free appeared more internalized by macrophages than nanoparticles coated with PEG. In contrast, independently of the PEG functionalization, positively charged nanoparticles were the most adsorbed at macrophages membrane and induce the most loss of membrane integrity, while negatively charged nanoparticles induce the most pro-inflammatory response. The different profiles of proteins binding to nanoparticles surface and cell types could explain those results.

Key words Silica nanoparticles, phagocytic cells, surface functionalization, uptake, pro-inflammatory effect, cytotoxicity.

INTRODUCTION

Nanotechnology is rapidly expanding in high-tech sectors such as electronics, materials, biotechnology or medicine (Zheng, 2014 ; Liu *et al.*, 2012 ; Sekhon, 2010). It results in an increasing exposure of human to nanoparticles at diverse levels: for workers using nanomaterials and for products consumers (directly or indirectly from degradation of objects containing nanoparticles). Nanoparticles may subsequently enter human organism through several pathways such as respiratory tract, digestive tract or skin (Hervé-Bazin, 2007). Moreover, in the field of nanomedicine, nanoparticles are intentionally injected in organism. Consequently, it becomes of great interest to establish a “safer by design” approach for nanotechnology ahead of their commercialization or medical application.

With this intention, industries have largely focused on materials classically considered as biologically inert, such as titanium dioxide (sunscreen, white pigment...), gold (in food, as contrast agent...) or amorphous silica (anti-caking agents, nano-abrasive ...) (Smijns and Pavel, 2011 ; Ahn *et al.*, 2013 ; Napierska *et al.*, 2010). This latter is particularly used in nanomedicine because the chemistry of the silanes allows surface modification of silica nanoparticles with chemical functional groups like addition of specific antibodies or fluorescent labels for specific drug delivery (targeting of cancer cells) or specific diagnosis (tumor labeling) (Chandolu and Dass, 2013 ; Mignot *et al.*, 2013).

However *in vivo* studies on mice showed that materials classically considered as biologically inert have been reported to cause exacerbated biological responses such as lung inflammation when used at the nanoscale (Kaewamatawong *et al.*, 2006 ; Oberdörster *et al.*, 2005). This is why current researches are ongoing for a better knowledge of nanoparticles fate to provide safer uses (Seaton and Donaldson, 2012).

Literature highlights that nanoparticles-cells interaction strongly depends on cell type (Sohaebuddin *et al.*, 2010) and on the nanoparticle physico-chemical features (7 parameters seem to have a crucial importance as defined by ISO2008 TS/27687 (Albanese *et al.*, 2012): state of agglomeration, composition, solubility, dispersibility, specific surface area, density of surface groups and surface chemistry) (Musyanovych *et al.*, 2011 ; Chung *et al.*, 2007 ; Hu *et al.*, 2007). The same characteristics may play a role in nanoparticle cytotoxicity (Greish *et al.*, 2011 ; Yu *et al.*, 2011 ; Chung *et al.*, 2007), thus defining parameters to take into consideration to manufacture safer nanoparticles (Fröhlich, 2012 ; Duffin *et al.*, 2007).

In vitro studies are informative on the direct interactions between immune cells and nanoparticles. For example, Nabeshi *et al.*, incubated unmodified or modified (amine or hydroxyl groups) silica nanoparticles with murine macrophages (RAW264.7). Cell proliferation was more decreased when cells were incubated with unmodified silica nanoparticles than with functionalized nanoparticles (Nabeshi *et al.*, 2011).

Studies highlighted that nanoparticles surface functionalization have an impact on nanoparticles biological responses. However, one of the particularities of nanoparticles to consider in biological fluids is that they interact with proteins. Proteins are adsorbed and desorbed from the nanoparticle surface. This so called “corona” becomes the first element of the nanomaterial in contact with the cells and may influence their

III. Interactions protéines/nanoparticules

biological responses (Monopoli *et al.*, 2012 ; Mortensen *et al.*, 2013). For example, opsonins present in blood quickly adsorb at the nanoparticles surface, allowing phagocytic cells to easily recognize nanoparticles as exogenous elements and remove them (Owens and Peppas, 2006).

Some strategies may be used to decrease protein adsorption at the nanoparticle surface and allow nanoparticles to circulate in the bloodstream for a prolonged period of time. For example, « PEGylation », i.e. the grafting of linear chains of hydrophilic polymers, such as poly(ethylene glycol) (PEG) at nanomaterial surface, allows reducing protein adsorption by blocking protein-binding sites and creating a steric hindrance (Walkey *et al.*, 2012). Moreover, the relative density of each type of adsorbed proteins is known to depend on PEG grafting density (Walkey and Chan, 2012).

The presence, nature (anionic, cationic...) and density of chemical groups, at the nanoparticle surface have a clear impact on the nature of the protein adsorbed at the nanoparticle surface and influence the nanoparticle distribution and cytotoxicity (Xiao *et al.*, 2011 ; Fröhlich, 2012 ; Kim *et al.*, 2013). Those provide a biological “identity” to nanoparticles that evolves in biological media over time (Faunce *et al.*, 2008 ; Dell’Orco *et al.*, 2010). But literature data on this topic is sparse and the potential relationship between the biological “identity” and the biological “activity” of nanoparticles remains to be more deeply investigated to be better understood.

The aim of the present study was to investigate the nanoparticles uptake by phagocytic cells and the biological response induced depending on their surface functionalization: (1) with chemical groups of different charges (positively charged amine groups NH_3^+ , negatively charged carboxylic acid groups COO^-) and (2) with or without steric hindrance generated by polyethylene glycol (PEG). For that purpose, five kinds of 50 nm fluorescent (fluorescein isothiocyanate - FITC) silica-based nanoparticles were synthesized:

- 1) Sterically stabilized silica nanoparticles positively charged with amine groups,
- 2) Negatively charged silica nanoparticles with carboxylic acid groups,
- 3) Neutrally charged silica nanoparticles coated with neutral PEG molecules,
- 4) Silica nanoparticles coated with PEG and amine groups,
- 5) Silica nanoparticles coated with PEG and acid groups.

Nanoparticles were incubated with murine macrophages as these cells represent the first line of defense against inhaled exogenous elements and are *in vitro* reference models in nanotoxicology. Cellular uptake was then assessed by fluorimetry and the cellular response was evaluated in terms of cytotoxicity: loss of cell membrane integrity (determined by the Lactate DeHydrogenase (LDH) assay), pro-inflammatory effect (TNF- α production) and oxidative stress (Reactive Oxygen Species (ROS) generation).

MATERIALS AND METHODS

Preparation of nanoparticle solutions

Silica-based nanoparticles, called NP, were prepared according to a previous method developed by Martini *et al.* (Martini *et al.*, 2009). The water/oil (W/O) microemulsion procedure was considered the best way to produce homogeneous and reproducible core-shell samples for systematic biological assays. Indeed, each reverse micelle (aqueous droplets sized ~10 nm) acts as template for the controlled-growth of core-shell structures. Quaternary W/O microemulsions were prepared by mixing Triton X-100 (surfactant), n-hexanol (co-surfactant) and cyclohexane (oil), followed by sequential additions of specific polar-like precursors. An inclusion of gold clusters at the center of each particle was obtained by the reduction of gold salt in presence of ligands and NaBH₄. The formation of polysiloxane matrix arose from the base-catalyzed hydrolysis and condensation of two silica precursors: 92 %w TEOS (tetraethoxysilane) and 8 %w dye conjugated-APTES ((3-aminopropyl)triethoxysilane). APTES conjugates ensured a covalent bonding of dyes (Fluorescein molecules FITC) and their random distribution within nanoparticles. The colloidal stabilization was then achieved by the final addition of specific silane precursors. The specific surface charge depended on amine or carboxylic acid groups grafted on silane precursors (Table 1). Thereafter, all solvents were eliminated by the addition of acetone followed by several cycles of vortexing and centrifuging. Unreacted dyes and precursors were removed by ultrafiltration using 300 kDa PES membranes. Particles were dispersed in aqueous solution (2g/L) and stored at 4°C.

The five kinds of nanoparticles were referred depending on their surface chemical groups and the presence of PEG. Sterically stabilized with PEG were referred to as NPpeg(0), positively charge stabilized nanoparticles with and without PEG to as NPpeg(+) and NP(+) respectively, negatively charge stabilized nanoparticles with and without PEG to as NPpeg(-) and NP(-) respectively.

Physico-chemical characterization of nanoparticles

Scanning electron microscopy (SEM) images of nanoparticles were performed using an ESEM XL30-FEI microscope equipped with a thermal field emission gun (FEG). Transmission electron microscopy (TEM) images were obtained using a Philips CM200 microscope at a 200 kV accelerating voltage.

Dynamic light scattering method (nano Zetasizer, Malvern) allowed determining the zeta potential (ξ) and the size distribution of nanoparticles. Measures were performed both in distilled water and in the complemented cell culture medium DMEMc, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% of fetal calf serum (Invitrogen), 1% penicillin-streptomycin (penicillin 10,000 units/mL, streptomycin 10 mg/mL; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

Cell culture

RAW 264.7 cell line derived from mice peritoneal macrophages transformed by the Abelson murine leukemia virus and was provided by ATCC Cell Biology Collection (Promochem, LGC, Molsheim, France). Cells were cultured in DMEMc at 37°C and under a 5% carbon dioxide humidified atmosphere.

Cells/nanoparticles contacts

For cellular uptake and cytotoxicity assays, cells were seeded in 96-well-plates (100 000 cells in 200 μ L of medium per well) and were allowed to adhere for 4 h.

Nanoparticles were diluted in cell culture medium to reach the following final concentrations: 75, 750, 4500 and 9000 NP/cell (corresponding to 5, 50, 300 and 600 μ gNP/mL). Nanoparticles were added to cells and incubation lasted 20h.

Cellular uptake assessment

Nanoparticle uptake was quantified using a fluorometer (Fluoroskan Ascent, Thermolabsystems, France). FITC labeled nanoparticles have an excitation peak at 485 nm and an emission peak at 538 nm (green fluorescence) with a large spectrum. The fluorescence of the total amount of nanoparticles in each well were measured, then the fluorescence of nanoparticles (1) in supernatant, (2) adsorbed to cell membrane and (3) internalized by cells were discriminated by a “trypan blue quenching” (TB) method previously developed by Leclerc *et al.* from flow cytometry techniques (Van Amersfoort and Van Strijp, 1994 ; Nuutila and Lilius, 2005 ; Leclerc *et al.*, 2010). In addition to its principal function as an exclusion dye of dead cells, TB is known for its ability to “turn off” the green fluorescence emitted by FITC labeled particles outside the cells (Leclerc *et al.*, 2012). This process allowed us to distinguish internalized nanoparticles from those just adhering to the plasma membrane (Gratton *et al.*, 2008). For each well, the three measures were converted as a percentage of the initial measure of the fluorescence emitted by the total amount of nanoparticle. After 20 hours of contact between nanoparticles and cells, the fluorescence of nanoparticles remained in cell supernatant was measured. as well as the fluorescence of nanoparticles adsorbed at the cell surface and the fluorescence of the nanoparticles uptaken by cells. For each condition, nanoparticles fluorescence was measured independently. Control wells without nanoparticles were used to assess the autofluorescence of cells in culture media.

Cytotoxicity assays on macrophages

Membrane integrity

The release in the cell culture supernatant of the cytoplasmic lactate dehydrogenase (LDH) enzyme from cells with damaged membranes was assessed using the CytoTox-96™ Homogeneous Membrane Integrity Assay (Promega, Charbonnières les bains, France) according to the manufacturer’s instructions. The optical density of the samples was determined using a microplate reader (Multiskan RC; Thermolabsystems, Helsinki, Finland) set to 450 nm. The activity of the released LDH was reported to that of total cellular LDH (measured after control cells lysis) and was expressed as a percent of the control.

Pro-inflammatory effect

After incubation with nanoparticles, the production of TNF- α was assessed in the supernatant using a commercial ELISA Kit (Quantikine® Mouse TNF- α Immunoassay; R&D Systems, Lille, France) according to the manufacturer's instructions. The optical density of each sample was determined using a microplate reader (Multiskan RC; Thermolabsystems, Helsinki, Finland) set to 450 nm. A standard curve was established, and results were expressed in picograms per milliliter of TNF- α . Each experiment included controls: cells alone (negative control) and DQ12 quartz (toxicological positive control) (Bruch et al. 2004; Fubini et al. 2004).

Oxidative stress

A large array of reactive oxygen species (ROS) activity can be assessed with the OxiSelect™ ROS Assay Kit (Euromedex, Mundolsheim, France). The assay uses the conversion of a non-fluorescent substrate, 2,7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate that can easily diffuse through cell membranes and be converted into a fluorogenic molecule 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF) in presence of ROS and which fluorescence is proportional to total ROS level. DCF production was detected using a Fluoroskan Ascent fluorometer (Thermolabsystems) using excitation and emission wavelengths of 480 and 530 nm respectively, and the generation of ROS was expressed as nanomolar.

Statistical analysis

Analysis and graphics were performed on Prism 5.0 software (GraphPad, San Diego, CA). Significance was established with Bonferroni's Multiple Comparison Test, (1) Two-way-ANOVA test (compared to negative control: cells alone) and data considered significant with $P < 0.05$ are marked with an asterisk (*) sign, and (2) One-way-ANOVA (particle compared with each other) and data considered significant with $P < 0.05$ are marked with a sign as specified in each legend. Each data point represents the mean of three independent experiments ($n = 3$) and is presented with the arithmetic standard error of the means (\pm s.e.m.).

RESULTS

Nanoparticles characterization

As illustrated in Fig.1, the spherical shape was clearly observed by SEM and geometric diameters were measured. Hydrodynamic diameters were measured using dynamic light scattering (DLS). These data including zeta potentials are reported in Table 1.

The hydrodynamic diameters for each nanoparticle solution were measured in water, and in cell culture media, complemented Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEMc). In water and for each type of nanoparticles, the hydrodynamic diameter was correlated with the geometric diameter, whereas in culture media it was significantly increased. Similarly, zeta-potentials of the five kinds of nanoparticles were distinct in water and coherent with expected values depending on the surface functionalization, but in culture media all zeta-potentials became negative, with the most important decrease of surface charges observed for the nanoparticles without PEG: NP(-) and NP(+).

Fluorimetry

Cellular uptake was then quantified using a quantitative assessment by fluorimetry as reported in Fig.2. The amounts of nanoparticles in supernatant, adsorbed at cell surface or uptaken were expressed in number of nanoparticles per cell. (A) It clearly appeared that nanoparticles mainly remained in the supernatant whatever the surface functionalization. Moreover, uptake by cell and adsorption to cell membrane were found to be dose-dependent irrespective of the nanoparticle type. Therefore, at the same dose, the amount of nanoparticles uptaken (B) was the most important for nanoparticles without PEG: NP(-) and NP(+) irrespective of their charges. In contrast, the amount of nanoparticles adsorbed at cell surface (C) was the lowest for nanoparticles coated with COOH: NP(-) and NPpeg(-) irrespective of the presence or absence of PEG.

Cytotoxicity assessment on macrophages

Membrane integrity

Quantitative results for membrane integrity assay are shown in Fig.3. After macrophages incubation with nanoparticles, the LDH release triggered by NP(-), NPpeg(-) and NPpeg(0) was not significantly different from that of control cells (incubated without nanoparticles). On the opposite, NPpeg(+) were found to be cytotoxic at dose of 9000 NP/cell and NP(+) became significantly cytotoxic from the dose of 4500 NP/cell.

TNF- α pro-inflammatory production

Pro-inflammatory effects of the nanoparticles were determined by the TNF- α assay. Results are shown in Fig.4. After macrophages incubation with nanoparticles, basal level of TNF- α production was increased by the presence of nanoparticles for the five types of nanoparticles and the inflammatory effect was dose-dependent. NP(-) and NPpeg(-) induced the highest pro-inflammatory signal and NPpeg(-) biological effect exceeded the positive control DQ12 signal at high doses.

Oxidative stress

No significant oxidative stress was detected when cells were incubated with the different types of nanoparticles.

DISCUSSION

This study aimed at understanding the relationship between the surface chemical functionalizations of 50 nm silica-based nanoparticles, their ability to be uptaken by cells and their toxicity. A thorough physico-chemical characterization of the nanoparticles was carried out in water and in cell culture media by dynamic light scattering instrument (Table 1). It was observed that the hydrodynamic diameter of each type of nanoparticle increased in culture medium containing proteins and zeta potentials became highly negative. Moreover zeta potentials were the most negative for nanoparticles without PEG (i.e. NP(-) and NP(+)). Those nanoparticles characteristics evolutions could be due to adsorption of proteins from the culture

medium at the nanoparticles surface forming the so-called “corona” (Cedervall *et al.*, 2007). Because proteins hide chemical groups initially grafted onto the nanoparticle surface, nanoparticle surface charge is modified and is rather related to the nature of the adsorbed proteins. This hypothesis is supported by unpublished preliminary data from the analysis of the protein corona of NP(-), NPpeg(0) and NP(+). But these results must be confirmed and completed by analysis of the protein corona of NPpeg(-) and NPpeg(+). Serum proteins are not much adsorbed on NPpeg(0) with PEG grafting providing steric hindrance. On the opposite, lots of proteins of different nature are adsorbed on NP(-) and NP(+) without PEG. The amount of proteins adsorbed at the nanoparticle surface was not proportional to its concentration in the culture medium. This is consistent with a study by Izak-Nau *et al.* on differently functionalized (NH₂ and SH groups and polyvinylpyrrolidone coating) fluorescent 50 nm silica nanoparticles in a variety of media (cell culture medium containing either bovine or human serum or no serum) which moreover shown that the most abundant protein, irrespective of time or functionalization, was albumin (Izak-Nau *et al.*, 2013).

Then nanoparticles were incubated with macrophages and their uptake was quantitatively assessed to distinguish FITC fluorescent nanoparticles uptaken by cells from nanoparticles adsorbed (Nuutila and Lilius, 2005) at the cell membrane (Fig.2.(A)). Interestingly, NP(-) and NP(+) without PEG were the nanoparticles the most uptaken by macrophages (Fig.2.(B)), whereas, independently of PEG coating, NPpeg(+) and NP(+) were the most adsorbed at the macrophages membrane (Fig.2.(C)). Those results pointed out that nanoparticles uptake by phagocytic cells might be related to PEG grafting, while the nanoparticles adsorption at the cell membrane might be related to the initially positively charged nanoparticle surface.

Many authors reported that high adsorption of positive nanoparticles may be related to electrostatic interactions due to the negatively charged cell surface and influence their cytotoxicity (Ge *et al.*, 2009 ; El Badawy *et al.*, 2011). Because of the general negative nanoparticles zeta potentials in culture medium, a different interpretation may be suggested: initially positively charged nanoparticles might be covered with specific proteins of culture media which induced nanoparticles adsorption at the cell membrane.

NP(+) and NPpeg(+) induced the most significant loss of cell membrane integrity (LDH release) at high doses (4500 and 9000 NP/cell) (Fig.3). NP(-), NPpeg(-) and NPpeg(0) did not show a significant loss of membrane integrity but the five types of nanoparticles provided pro-inflammatory effect at high dose (Fig.4). The highest levels of TNF- α production was provided by NP(-) and NPpeg(-). No significant oxidative stress was detected which is consistent with a similar study carried out by Panas *et al.* where the same RAW264.7 macrophages were incubated with engineered silica nanoparticles of 25 nm diameter (Panas *et al.*, 2013).

CONCLUSION

III. Interactions protéines/nanoparticules

The present study clearly demonstrated that surface chemical functionalization plays a key role in the interactions between silica-based nanoparticles and cells. Interestingly, nanoparticles uptake by phagocytic cells seems to be related to the absence of PEG, while the nanoparticles adsorption at the cell membrane seems to be influenced by an initial positively charged nanoparticle surface. Moreover, the biological *in vitro* toxicity was not correlated with nanoparticles uptake but with adsorption to the macrophage membrane.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to acknowledge the financial support of the Région Rhône-Alpes and the Conseil Général de la Loire.

REFERENCES

- Ahn, S., Jung, S.Y., and Lee, S.J. (2013). Gold nanoparticle contrast agents in advanced X-ray imaging technologies. *Molecules* 18, 5858–5890.
- Albanese, A., Tang, P.S., and Chan, W.C.W. (2012). The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu Rev Biomed Eng* 14, 1–16.
- Van Amersfoort, E.S., and Van Strijp, J.A. (1994). Evaluation of a flow cytometric fluorescence quenching assay of phagocytosis of sensitized sheep erythrocytes by polymorphonuclear leukocytes. *Cytometry* 17, 294–301.
- Bruch, J., Rehn, S., Rehn, B., Borm, P.J.A., and Fubini, B. (2004). Variation of biological responses to different respirable quartz flours determined by a vector model. *Int J Hyg Environ Health* 207, 203–216.
- Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggård, T., Thulin, E., Nilsson, H., Dawson, K.A., and Linse, S. (2007). Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 2050–2055.
- Chandolu, V., and Dass, C.R. (2013). Treatment of lung cancer using nanoparticle drug delivery systems. *Curr Drug Discov Technol* 10, 170–176.
- Chung, T.-H., Wu, S.-H., Yao, M., Lu, C.-W., Lin, Y.-S., Hung, Y., Mou, C.-Y., Chen, Y.-C., and Huang, D.-M. (2007). The effect of surface charge on the uptake and biological function of mesoporous silica nanoparticles in 3T3-L1 cells and human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 28, 2959–2966.
- Dell’Orco, D., Lundqvist, M., Oslakovic, C., Cedervall, T., and Linse, S. (2010). Modeling the time evolution of the nanoparticle-protein corona in a body fluid. *PLoS ONE* 5, e10949.
- Duffin, R., Mills, N.L., and Donaldson, K. (2007). Nanoparticles-a thoracic toxicology perspective. *Yonsei Med. J.* 48, 561–572.
- El Badawy, A.M., Silva, R.G., Morris, B., Scheckel, K.G., Suidan, M.T., and Tolaymat, T.M. (2011). Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 45, 283–287.
- Faunce, T.A., White, J., and Matthaei, K.I. (2008). Integrated research into the nanoparticle-protein corona: a new focus for safe, sustainable and equitable development of nanomedicines. *Nanomedicine (Lond)* 3, 859–866.
- Fröhlich, E. (2012). The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 7, 5577–5591.

- Fubini, B., Fenoglio, I., Ceschino, R., Ghiazza, M., Martra, G., Tomatis, M., Borm, P., Schins, R., and Bruch, J. (2004). Relationship between the state of the surface of four commercial quartz flours and their biological activity *in vitro* and *in vivo*. *Int J Hyg Environ Health* 207, 89–104.
- Ge, Y., Zhang, Y., Xia, J., Ma, M., He, S., Nie, F., and Gu, N. (2009). Effect of surface charge and agglomerate degree of magnetic iron oxide nanoparticles on KB cellular uptake *in vitro*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 73, 294–301.
- Gratton, S.E.A., Ropp, P.A., Pohlhaus, P.D., Luft, J.C., Madden, V.J., Napier, M.E., and DeSimone, J.M. (2008). The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 11613–11618.
- Greish, K., Thiagarajan, G., Herd, H., Price, R., Bauer, H., Hubbard, D., Burckle, A., Sadekar, S., Yu, T., Anwar, A., *et al.* (2011). Size and surface charge significantly influence the toxicity of silica and dendritic nanoparticles. *Nanotoxicology*.
- Hervé-Bazin, B. (2007). Les nanoparticules: Un enjeu majeur pour la santé au travail ? (EDP SCIENCES).
- Hu, Y., Xie, J., Tong, Y.W., and Wang, C.-H. (2007). Effect of PEG conformation and particle size on the cellular uptake efficiency of nanoparticles with the HepG2 cells. *Journal of Controlled Release* 118, 7–17.
- Izak-Nau, E., Voetz, M., Eiden, S., Duschl, A., Puentes, V.F., (2013). Altered characteristics of silica nanoparticles in bovine and human serum: the importance of nanomaterial characterization prior to its toxicological evaluation. *Part. Fibre Toxicol.* 10, 56.
- Kaewamatawong, T., Shimada, A., Okajima, M., Inoue, H., Morita, T., Inoue, K., and Takano, H. (2006). Acute and subacute pulmonary toxicity of low dose of ultrafine colloidal silica particles in mice after intratracheal instillation. *Toxicol Pathol* 34, 958–965.
- Kim, S.T., Saha, K., Kim, C., and Rotello, V.M. (2013). The role of surface functionality in determining nanoparticle cytotoxicity. *Acc. Chem. Res.* 46, 681–691.
- Leclerc, L., Boudard, D., Pourchez, J., Forest, V., Sabido, O., Bin, V., Palle, S., Grosseau, P., Bernache, D., and Cottier, M. (2010). Quantification of microsized fluorescent particles phagocytosis to a better knowledge of toxicity mechanisms. *Inhal Toxicol* 22, 1091–1100.
- Leclerc, L., Rima, W., Boudard, D., Pourchez, J., Forest, V., Bin, V., Mowat, P., Perriat, P., Tillement, O., Grosseau, P., *et al.* (2012). Size of submicrometric and nanometric particles affect cellular uptake and biological activity of macrophages *in vitro*. *Inhal Toxicol* 24, 580–588.
- Liu, Y., Tan, J., Thomas, A., Ou-Yang, D., and Muzykantov, V.R. (2012). The shape of things to come: importance of design in nanotechnology for drug delivery. *Ther Deliv* 3, 181–194.
- Mignot, A., Truillet, C., Lux, F., Sancey, L., Louis, C., Denat, F., Boschetti, F., Bocher, L., Gloter, A., Stéphan, O., *et al.* (2013). A top-down synthesis route to ultrasmall multifunctional Gd-based silica nanoparticles for theranostic applications. *Chemistry* 19, 6122–6136.
- Monopoli, M.P., Åberg, C., Salvati, A., and Dawson, K.A. (2012). Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat Nano* 7, 779–786.
- Mortensen, N.P., Hurst, G.B., Wang, W., Foster, C.M., Nallathamby, P.D., and Retterer, S.T. (2013). Dynamic development of the protein corona on silica nanoparticles: composition and role in toxicity. *Nanoscale* 5, 6372–6380.
- Musyanovych, A., Dausend, J., Dass, M., Walther, P., Mailänder, V., and Landfester, K. (2011). Criteria impacting the cellular uptake of nanoparticles: A study emphasizing polymer type and surfactant effects. *Acta Biomaterialia* 7, 4160–4168.

III. Interactions protéines/nanoparticules

- Nabeshi, H., Yoshikawa, T., Arimori, A., Yoshida, T., Tochigi, S., Hirai, T., Akase, T., Nagano, K., Abe, Y., Kamada, H., *et al.* (2011). Effect of surface properties of silica nanoparticles on their cytotoxicity and cellular distribution in murine macrophages. *Nanoscale Research Letters* 6, 93.
- Napierska, D., Thomassen, L.C., Lison, D., Martens, J.A., and Hoet, P.H. (2010). The nanosilica hazard: another variable entity. *Particle and Fibre Toxicology* 7, 39.
- Nuutila, J., and Lilius, E.-M. (2005). Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells. *Cytometry A* 65, 93–102.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., and Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113, 823–839.
- Owens, D.E., 3rd, and Peppas, N.A. (2006). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm* 307, 93–102.
- Panas, A., Marquardt, C., Nalcaci, O., Bockhorn, H., Baumann, W., Paur, H.-R., Mülhopt, S., Diabaté, S., and Weiss, C. (2013). Screening of different metal oxide nanoparticles reveals selective toxicity and inflammatory potential of silica nanoparticles in lung epithelial cells and macrophages. *Nanotoxicology* 7, 259–273.
- Romberg, B., Hennink, W.E., and Storm, G. (2008). Sheddable coatings for long-circulating nanoparticles. *Pharm. Res.* 25, 55–71.
- Seaton, A., and Donaldson, K. (2012). Nanoscience, nanotoxicology, and the need to think small. *The Lancet* 365, 923–924.
- Sekhon, B.S. (2010). Food nanotechnology - an overview. *Nanotechnol Sci Appl* 3, 1–15.
- Smijs, T.G., and Pavel, S. (2011). Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness. *Nanotechnol Sci Appl* 4, 95–112.
- Sohaebuddin, S.K., Thevenot, P.T., Baker, D., Eaton, J.W., and Tang, L. (2010). Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Part Fibre Toxicol* 7, 22.
- Walkey, C.D., and Chan, W.C.W. (2012). Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chem Soc Rev* 41, 2780–2799.
- Walkey, C.D., Olsen, J.B., Guo, H., Emili, A., and Chan, W.C.W. (2012). Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 2139–2147.
- Xiao, K., Li, Y., Luo, J., Lee, J.S., Xiao, W., Gonik, A.M., Agarwal, R.G., and Lam, K.S. (2011). The effect of surface charge on *in vivo* biodistribution of PEG-oligocholic acid based micellar nanoparticles. *Biomaterials* 32, 3435–3446.
- Yu, T., Malugin, A., and Ghandehari, H. (2011). Impact of silica nanoparticle design on cellular toxicity and hemolytic activity. *ACS Nano* 5, 5717–5728.
- Zheng, J. (2014). Layout of Nanotechnology Patents in Global Market. *Advanced Materials Research* 889–890, 1578–1584.

FIGURES

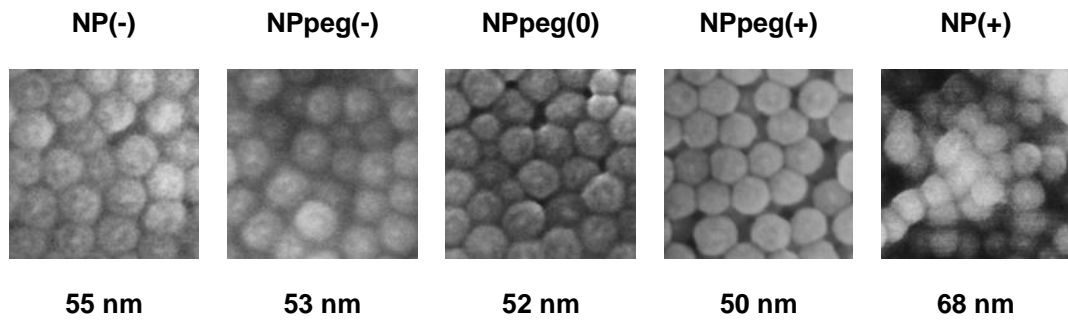
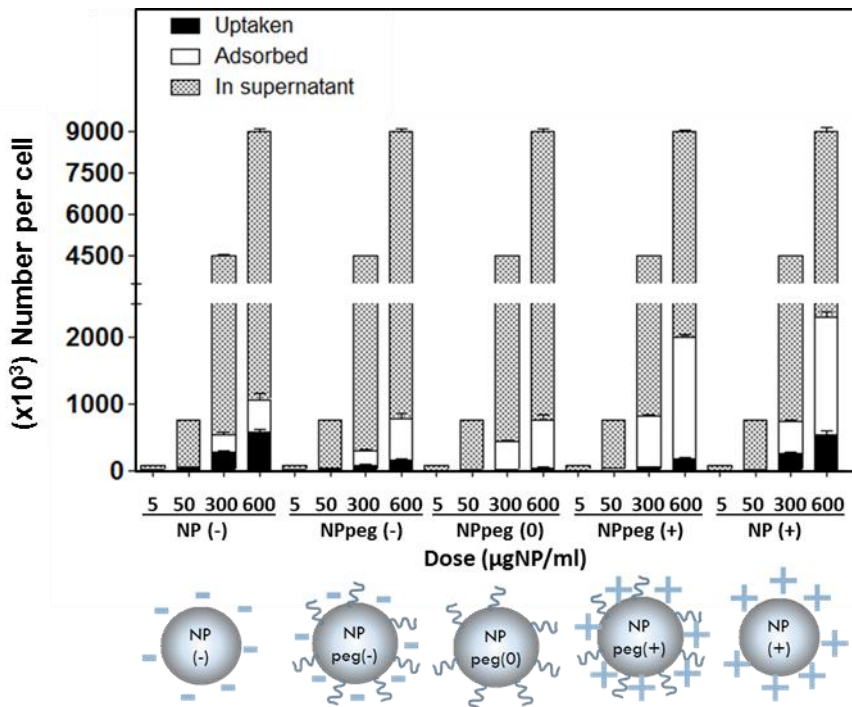
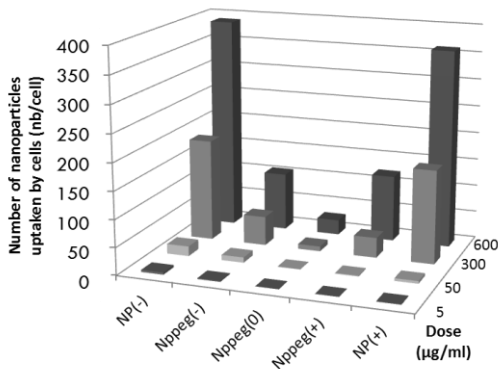


Figure 1 . Measurement of nanoparticles geometric diameter using scanning electron microscopy.

A



B



C

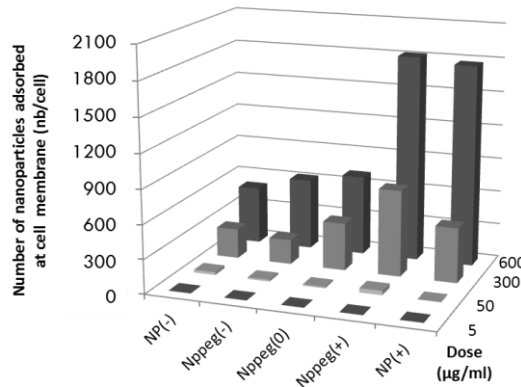


Figure 2 . (A) Fluorescent (FITC) silica nanoparticles with different surface functionalizations: NP (-), NPpeg(-), NPpeg(0), NPpeg(+), NP (+) were incubated for 20h with RAW264.7 macrophages and the distribution of NP was assessed by fluorimetry and Trypan Blue quenching. Results are expressed in number per cell. Detail (B) and (C) correspond to nanoparticles uptaken by cell and adsorbed at cell membrane respectively. (n=3)

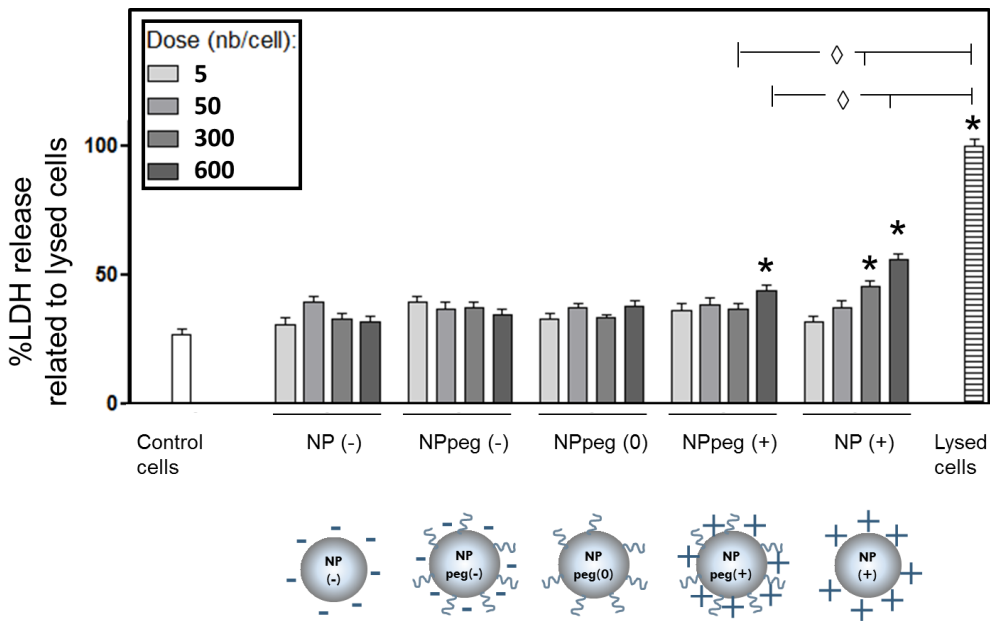


Figure 3 . Cytotoxicity of five different nanoparticles investigated using the LDH assay in RAW 264.7 macrophages. (n=3) (*= statistically different from negative control and p<0.0001. ◊= statistically different.)

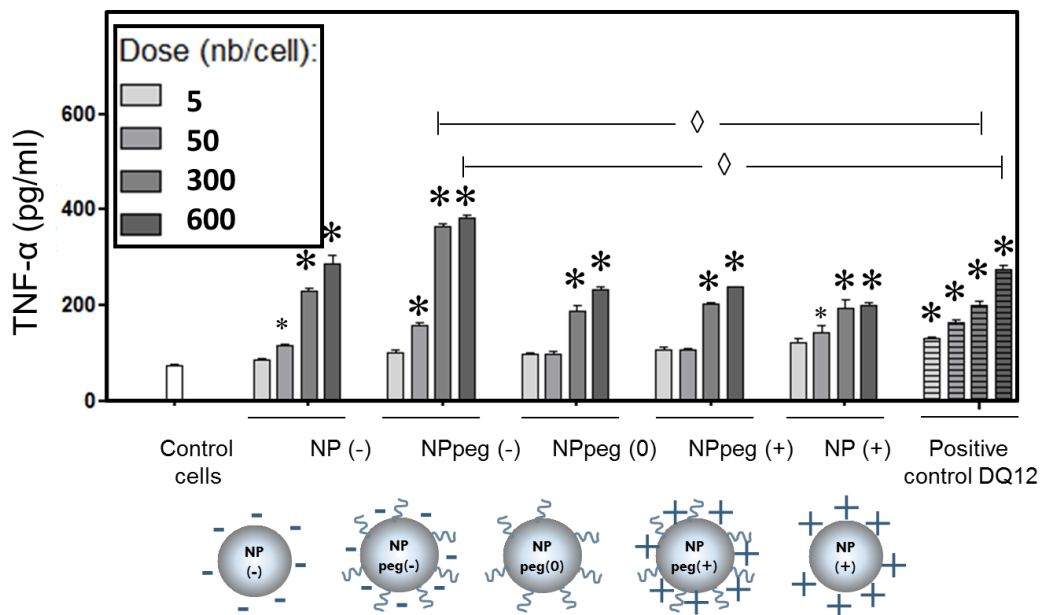
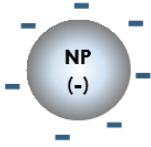
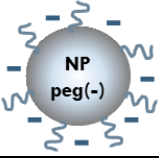
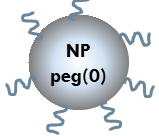
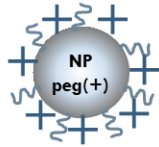
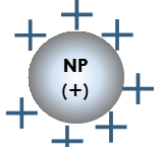


Figure 4 . Pro-inflammatory effect of five different nanoparticles investigated using the TNF-α assay in RAW 264.7 macrophages. (*= statistically different from negative control, smallest sign for p<0.05 and biggest sign for p<0.0001. ◊= statistically different from positive control at same dose.) (n=3)

III. Interactions protéines/nanoparticules

TABLES

Table 1 . Characteristics of the nanoparticles used in the present study.

	Schema	Function- alization	Zeta potential in water (pH7-8)	Zeta potential in DMEMc (pH7-8)	Hydro- dynamic diameter (DLS) in water	Hydro- dynamic diameter (DLS) in DMEMc
NP(-)		COOH	-42 mV	-135 mV	87±3 nm	110±0 nm
NPpeg(-)		COOH+PEG	-32 mV	-55 mV	61±0nm	109±6 nm
NP peg(0)		PEG	-29 mV	-99 mV	64±1 nm	101±3 nm
NPpeg(+)		NH ₂ +PEG	18 mV	-92 mV	86±7 nm	124±8 nm
NP(+)		NH ₂	25 mV	-109 mV	75±2 nm	115±7 nm

III.3. Données complémentaires et perspectives d'études

Dans le cadre de la collaboration avec l'IAB, une analyse préliminaire de l'influence de la fonctionnalisation de surface des nanoparticules sur la corona protéique a été réalisée par la plateforme de protéomique Prométhée. La méthode combinant spectrométrie de masse et analyse bio-informatique est détaillée ci-dessous. Cette étude a été réalisée sur trois des cinq types de nanoparticules étudiées (NP(-), NPpeg(0) et NP(+)). Les nanoparticules ont été incubées avec du sérum humain pour s'approcher au mieux de conditions réelles physiologiques.

III.3.1. L'étude de la corona protéique par spectrométrie de masse

Le processus pour l'étude des protéines de la corona utilisé par la Plateforme Prométhée est séparé en trois étapes selon la figure 34 ci-dessous.

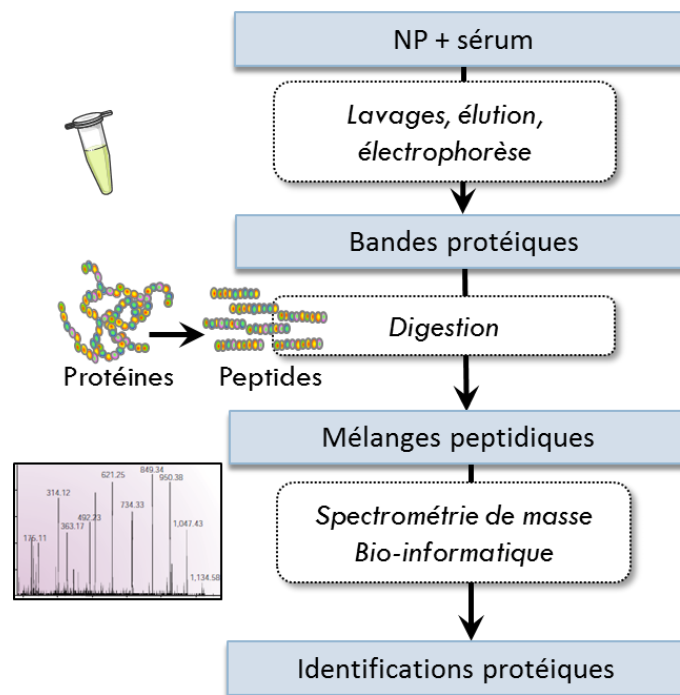


Figure 34 - Processus global pour l'étude de la corona protéique développé par la plateforme Prométhée.

Comme le montre la figure 34, dans un premier temps les protéines sont désorbées de la surface des nanoparticules. La désorption se fait passivement en milieu réducteur et fortement concentré en détergent et les protéines sont triées par un gel d'électrophorèse. Pour l'analyse, le gel est découpé en bandes en fonction du poids moléculaire des protéines. Dans un second temps, les portions de gel sont traitées en présence de protéases (trypsine) qui coupent les protéines en peptides. Les peptides résultants sont alors extraits du gel ce qui constitue l'étape délicate du processus. L'étape de digestion de la bande d'électrophorèse est représentée en figure 35.

III. Interactions protéines/nanoparticules

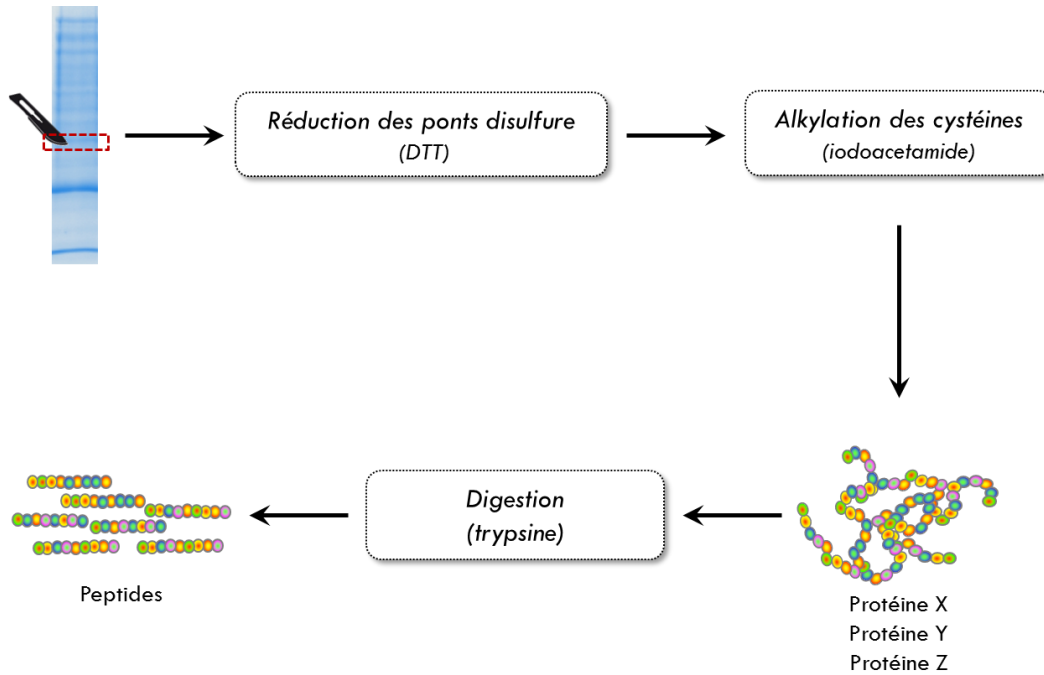


Figure 35 - Processus de la digestion protéique développé par la plateforme Prométhée.

Enfin dans un troisième temps, les peptides sont analysés en spectroscopie de masse (MS pour une mesure du poids moléculaire ou MS/MS pour une analyse du poids et de séquence peptidique) selon la figure 36.

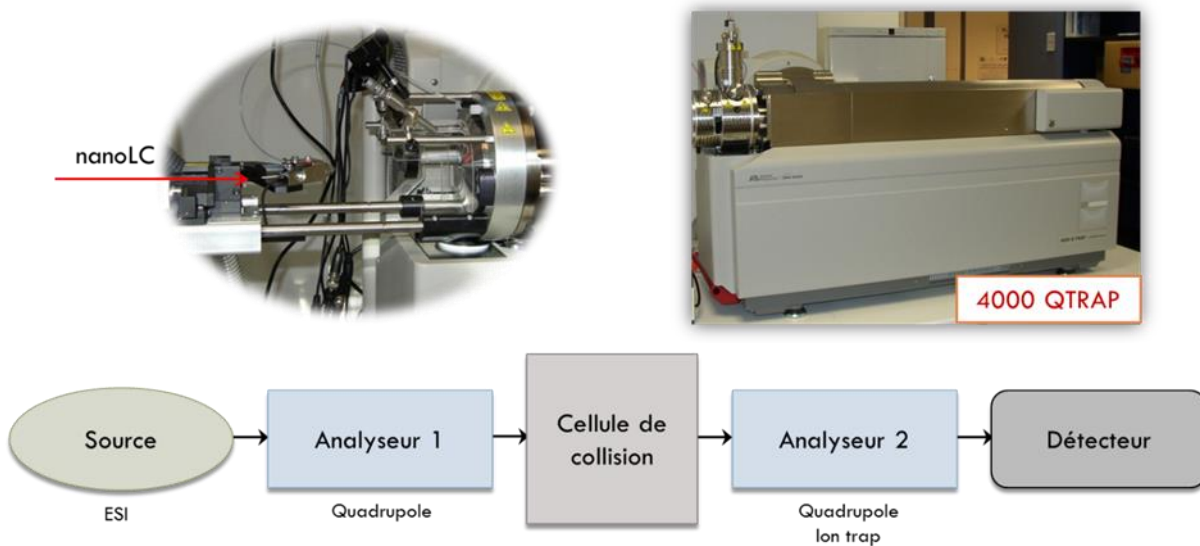


Figure 36 - Process de spectrométrie de masse développé à l'IAB.

Puis un logiciel d'analyse, qui compare le poids moléculaire et la séquence peptidique, muni d'une base de données spécifique des protéines humaines, permet de reconnaître le type de protéines

adsorbées à la surface de la nanoparticule. L'analyseur fournit le nombre de peptides reconnus pour une protéine donnée. Un nombre élevé étant garant de la qualité de l'analyse.

Les bandes d'électrophorèses des protéines de la corona après incubation des nanoparticules en présence de sérum humain (2,3 g/1,3mL sérum pur) pendant 1h30 à pH 7,4 sont présentées dans la figure 37 ci-dessous. L'adsorption de protéines à la surface des nanoparticules a été la plus importante pour les NP(-) et relativement faible pour les NP(+), tandis que les NPpeg(0) n'en ont presque pas fixé.

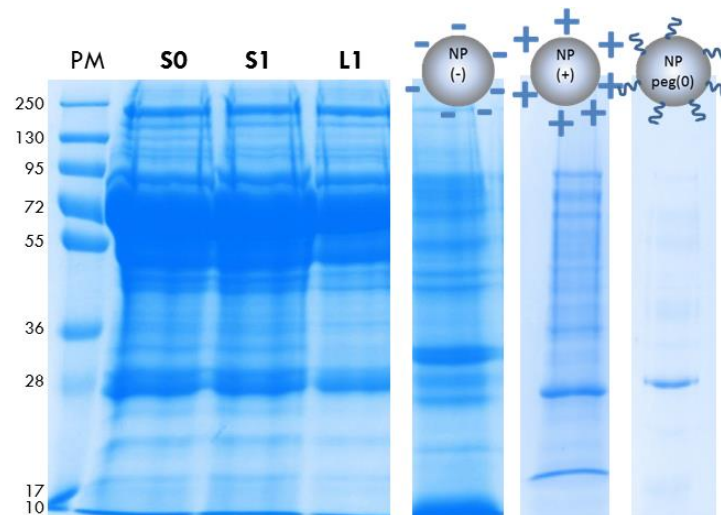


Figure 37 - Exemple de chromatographie pour des protéines de la corona réalisé par la plateforme Prométhée : PM échelle de poids moléculaires, S0 sérum seul avant incubation, S1 sérum après incubation avec les nanoparticules, L1 surnageant après le premier lavage.

Les résultats préliminaires d'analyse, concernant uniquement les protéines dont la présence a pu être fortement suspectée, ont montré une adsorption de protéines différente pour chaque type de nanoparticule et sans relation de proportionnalité avec les concentrations des différentes protéines présentes dans le sérum : par exemple, la protéine D a été plus adsorbée que C2, alors que sa concentration sérique est plus faible et que les deux protéines sont très proches structurellement.

L'analyse des peptides issus de l'électrophorèse a permis de montrer :

- (1) d'une part que la quantité de protéines détectées était différente pour chaque type de nanoparticules. Ainsi, les NP(-) ont fixé 133 protéines, les NP(+) 86 et les NPpeg(0) semblent n'avoir fixé aucune protéine.
- (2) d'autre part que les protéines fixées en surface des NP(-) et NP(+) sont de nature différente.

Les analyses doivent être complétées par une recherche ciblée de chaque type de protéine détectée afin de s'assurer que la présence majoritaire de protéines du complément n'est pas fortuite.

III.3.2. L'influence des caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules et de la composition du milieu de culture sur la « corona »

Ces observations sont soutenues par la littérature. En effet, l'absence de protéine détectée à la surface de NPpeg(0) pourrait être due à la forte gêne stérique générée par les longues chaînes de PEG fixées à sa surface (Vonarbourg *et al.*, 2006 ; Sacchetti *et al.*, 2013). Ce type de recouvrement est d'ailleurs utilisé pour favoriser la rémanence vasculaire des nanoparticules comme expliqué dans la synthèse bibliographique au paragraphe I.3.2.2 (p.26).

L'absence de corrélation entre les taux de protéines dans le milieu et les taux de protéines adsorbées à la surface de la nanoparticule a également déjà été montré et semble dépendre des caractéristiques physico-chimiques (type de matériau, forme, nature chimique de surface et hydrophobicité...) de la nanoparticule (Ruh *et al.*, 2012 ; Saptarshi *et al.*, 2013). Izak-Nau *et al.* ont notamment analysé le recouvrement protéique par spectrométrie (MALDI-TOF) de trois types de nanoparticules de silice (50 nm) fonctionnalisées par des groupements différents (amines NH, thiol SH et polyvinylpyrrolidone PVP) dans le milieu de culture DMEM complété avec 10% de sérum SVF. Les protéines d'albumine (BSA) et l'apolipoprotéine A-I ont été retrouvées sur les trois types de nanoparticules mais en proportions différentes, tandis que d'autres protéines étaient spécifiques d'un type de nanoparticule. De plus, cette étude a montré que la corona protéique évolue au cours du temps (1h, 24 h, 72h, 1 semaine) et ainsi des protéines préférentiellement adsorbées sur un type de nanoparticule à un temps donné peuvent être associées à un autre type de nanoparticule à un temps de contact différent (Izak-Nau *et al.*, 2013).

Depuis peu, cette approche consistant à déterminer la corona protéique spécifique de chaque type de nanoparticule est jugée comme un complément fondamental aux études de nanotoxicologie. En effet, ce recouvrement protéique constitue l'identité biologique de la nanoparticule et influence directement son activité biologique comme expliqué dans la synthèse bibliographique au paragraphe III.3.3.1 (p.51). En outre ce recouvrement protéique est également spécifique de l'environnement biologique, donc du milieu de culture *in vitro* (pH, force ionique et concentration des sels...) dans lequel est réalisé le contact nanoparticule/cellule, et de sa composition en protéines.

Par exemple, Lesniak *et al.* ont montré que des cellules épithéliales pulmonaires (A549) internalisaient une plus grande quantité de nanoparticules de silice (50 nm de diamètre, stabilisées par groupements carboxyles) lorsque celles-ci présentaient une corona protéique moins dense en milieu de culture contenant du sérum SVF par rapport à des nanoparticules présentant une corona protéique plus dense en milieu de culture contenant un sérum dont les protéines du complément ont été détruites par la chaleur (Lesniak *et al.*, 2010). La même équipe, sur un modèle similaire, a montré que les cellules internalisaient plus rapidement et en plus grande quantité les nanoparticules lorsque celles-ci étaient incubées en milieu de culture sans sérum par rapport au même milieu de culture complété avec 10% de sérum SVF. La quantité de nanoparticules internalisées était alors environ 300

fois plus importante au bout de 4 heures de contact et induisait une cytotoxicité plus importante (dosage de l'ATP) (Lesniak *et al.*, 2012). Cette étude a également montré que l'absence de protéines du sérum n'induit pas une absence de « corona » mais une « corona » différente constituée de protéines directement issues de la membrane et du cytosol de la cellule une fois internalisées.

Des mises au point, en vue d'analyser par la plateforme Prométhée une « corona » plus proche de celle formée lors de l'étude des réponses cellulaires, c'est-à-dire avec comme milieu d'incubation le milieu de culture cellulaire, pourraient être développées. De plus, la corona protéique est un recouvrement dynamique qui évolue au cours du temps. Ainsi, la corona protéique détectée après 1h30 par la plateforme Prométhée pourrait être non représentative de la « corona » établie à plus long terme (Dell'Orco *et al.*, 2010).

III.3.3. Le développement d'un modèle prédictif de la corona protéique

En outre, un des aboutissements de cette étude en collaboration avec l'IAB serait d'établir un modèle d'adsorption des protéines en fonction du recouvrement de surface des nanoparticules.

Plusieurs modèles ont déjà été suggérés comme le modèle de Langmuir, développé pour décrire le cas idéal de l'adsorption réversible de molécules de gaz sur une surface homogène mais extrapolable aux interactions protéines/nanoparticules. Cependant, certains effets, comme une adsorption irréversible, la compétition entre différents sites d'interactions et les modifications de structures des protéines lors de leur fixation à la surface des nanoparticules ne sont pas pris en compte (Hitchcock, 1925). Le modèle d'adsorption de protéines proposé par Norde à la surface de matériaux non nanométriques met en corrélation le type de surface de contact (hydrophile ou hydrophobe, de charge positive ou négative), avec le point isoélectrique de la protéine modèle (charge globale positive ou négative) et la stabilité de sa structure (« dure » si la protéine ne peut subir que de légères modifications structurales ou « molle » si elle est susceptible de subir d'importantes restructurations conduisant à son étalement sur la surface avec différents sites de fixation en simultané) (Norde, 2008). Dans ce modèle, résumé dans le tableau 3 ci-dessous, l'absence d'adsorption est rare (seulement dans le cas de protéines « dures » de même charge globale que la surface hydrophile en contact) et l'adsorption augmente généralement avec l'hydrophobicité de la surface de contact. Cependant des exceptions existent comme la mucine (présentant des chaînes oligosaccharidiques) qui est davantage adsorbée sur des surfaces hydrophiles par rapport à des surfaces hydrophobes.

De plus l'étude de Mathe *et al.* sur des nanoparticules de silice (de charge de surface négative au-dessus de pH 3) a mis en évidence que l'échelle nanométrique permet une meilleure homogénéité de la charge de surface du matériau et qu'ainsi à cette échelle d'autres paramètres comme la présence d'acides aminés basiques de type arginine ou aromatiques dans la protéine influenceraient également l'adsorption des protéines (Mathe *et al.*, 2013).

III. Interactions protéines/nanoparticules

Tableau 3- Modèle théorique d'adsorption des protéines à la surface des nanoparticules (Norde, 2008) :

		SURFACE DE CONTACT (POTENTIELLEMENT ASSIMILABLE A LA SURFACE DE LA NANOPARTICULE)			
		HYDROPHILE		HYDROPHOBE	
		Positivement chargée (+)	Négativement chargée (-)		
MODELE DE PROTEINES	« Dure »	Charge globale positive (+)	NON-adsorbée	Adsorbée	Adsorbée
		Charge globale négative (-)	Adsorbée	NON-adsorbée	Adsorbée
	« Molle »	Charge globale positive (+)	Adsorbée	Adsorbée	Adsorbée
		Charge globale négative (-)	Adsorbée	Adsorbée	Adsorbée

III.4. Bilan

Les nanoparticules modèles étudiées, contenant un cœur d'or et une coquille de silice amorphe fluorescente, associées aux méthodes développées ont clairement permis d'étudier l'impact de la fonctionnalisation de surface des nanoparticules (1) sur la formation de la « corona » et (2) indirectement sur leur internalisation par les macrophages et la réponse biologique induite, voir figure 38.

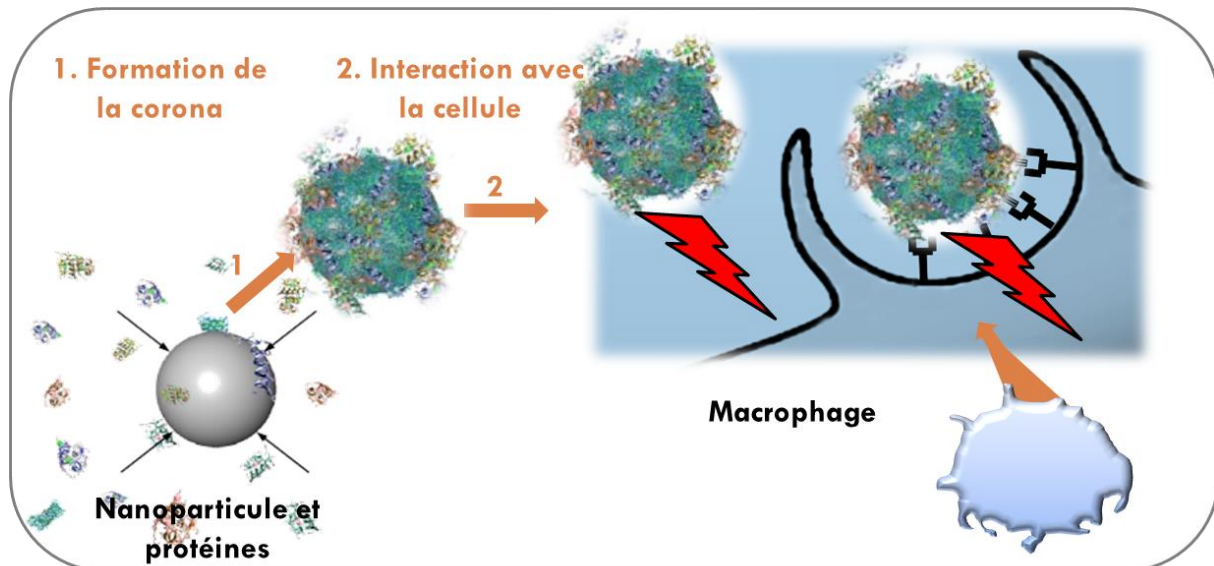


Figure 38 – Schéma du lien entre la fonctionnalisation de surface des nanoparticules et (1) directement la formation de la corona protéique puis (2) indirectement leur internalisation par les macrophages et leur réponse biologique.

Cette étude a montré que :

- L'internalisation des nanoparticules de silice par les cellules phagocytaires semble être corrélée à l'absence de pégylation.
- Tandis que l'adsorption des nanoparticules à la membrane cellulaire et leur bio-toxicité semblent être influencées par leur charge de surface initiale. Ainsi, les nanoparticules chargées positivement, indépendamment de la présence de PEG sont les plus adsorbées à la membrane cellulaire et induisent une perte d'intégrité membranaire. A l'inverse les nanoparticules chargées négativement induisent une plus forte pro-inflammation.
- Les essais ont permis d'observer une activité cellulaire dépendante de la dose de nanoparticules utilisée indépendamment de leur fonctionnalisation de surface.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail était d'améliorer la compréhension de l'activité biologique de nanoparticules modèles de silice de taille et charge de surface contrôlées. Une approche expérimentale *in vitro* sur des cellules macrophagiques a été développée pour étudier leur internalisation et leur bio-toxicité.

Dans une première partie des nanoparticules fluorescentes de fonctionnalisation de surface différentes ont été mises en contact avec les macrophages murins. Ces nanoparticules de même taille, de même forme et de même composition chimique exceptés leurs groupements de surface (groupements amines, groupements carboxyliques et molécules PEG), ont révélé des comportements différents en termes d'interaction avec les cellules. Les nanoparticules les moins internalisées et les plus cytotoxiques ont été les nanoparticules de nature chimique de surface positive. Elles étaient également les plus adsorbées à la membrane cellulaire. A l'inverse les nanoparticules de nature chimique de surface négative ont été relativement internalisées et étaient toxiques uniquement à forte dose. Les nanoparticules de nature chimique de surface faiblement chargée, positivement et négativement, avaient le même profil d'interaction avec les cellules que leurs homologues hautement chargés respectifs. Cependant, comme les nanoparticules de nature chimique de surface neutre, elles se sont avérées pro-inflammatoires uniquement à forte dose et n'induisaient pas de perte d'intégrité membranaire significative.

Dans une deuxième partie, la méthode d'étude de l'internalisation des particules a été améliorée grâce au développement de particules modèles doublement fluorescentes et sensibles aux variations de pH. Le comportement de nanoparticules a été comparé à celui de particules submicroniques. Les nanoparticules se sont avérées avoir plus d'interaction avec les cellules et être plus toxiques que les particules submicroniques pourtant de même composition chimique et de même nature chimique de surface. L'étude par vidéo-microscopie a confirmé visuellement ces résultats. De plus, l'impact du à l'aire totale de surface des particules était plus importante que celui de leur taille et induisait des profils d'internalisation cellulaire et de localisation intracellulaire différents.

Enfin dans une troisième partie, l'effet de la fonctionnalisation de surface des nanoparticules a été approfondi et a permis de mettre en évidence l'influence de la pégylation des nanoparticules sur leur activité biologique. En effet, les nanoparticules non pégylées, donc présentant une très faible gêne stérique de surface, étaient les plus internalisées. Ce résultat peut être relié à une fixation accrue de protéines d'intérêt pour la cellule à leur surface. A l'inverse l'adsorption des nanoparticules à la membrane cellulaire et la perte d'intégrité membranaire des cellules étaient indépendantes de la pégylation et corrélées à une nature chimique de surface des nanoparticules positive, tandis que la pro-inflammation était corrélée à une nature chimique de surface négative.

Les méthodes mises au point et les nanoparticules modèles synthétisées permettent bien d'appréhender l'impact des paramètres de taille et de fonctionnalisation de surface des nanoparticules de silice sur leur activité biologique au contact des macrophages murins.

Cependant des incohérences ont été révélées par la mise en perspective des études, notamment pour les NP(-) non pro-inflammatoires dans la première étude et très pro-inflammatoires dans la troisième étude. La différence majeure entre ces deux lots a été révélée par la caractérisation des potentiels zêta. En effet le potentiel de la suspension de NP(-) était de -25 mV dans la première étude et -42 mV dans la troisième. Cette incohérence pourrait révéler que des modifications minimales et non contrôlées lors de la synthèse des nanoparticules ont une influence sur leur activité biologique : variation minimale de densité des groupes chimiques en surface des nanoparticules, variation lors de la réaction due à une différence de température ou de pression atmosphérique, variation manipulateur-dépendant, variation due aux réactifs utilisés... Des études croisées entre plusieurs laboratoires pourraient permettre de révéler ces caractéristiques peu prises en compte actuellement. Ces caractéristiques encore mal connues pourraient expliquer en partie le manque de cohérence dans la littérature en plus des paramètres connus comme les modèles cellulaires, les temps d'incubation et les doses non standardisées.

En outre, ces travaux ont montré que :

- (1) la taille des nanoparticules et notamment une dimension inférieure à la limite admise des 100 nm augmente leurs interactions avec les cellules tout comme la réponse cellulaire.
- (2) la fonctionnalisation de surface par des groupements amines peu denses et/ou la pégylation limite l'internalisation des nanoparticules par les cellules mais permet de conserver l'intégrité de la membrane cellulaire, et ce même à forte dose (supérieure à 300µg/mL).
- (3) à l'inverse, la fonctionnalisation de surface par des groupements carboxyliques denses induit la perte d'intégrité membranaire des cellules, et ce même à faible dose (5µg/mL), ce qui ne permet pas de valider ou d'invalider leur internalisation.
- (4) La réponse cellulaire dépend de la dose de particules mise en contact avec les cellules et notamment la dose de 300µg/mL est délétère pour l'ensemble des types de particules étudiées dans ce projet

Ainsi, les cinétiques de contact et les mécanismes précis d'internalisation sont à approfondir par analyses fonctionnelles et mécanistiques pour les voies d'internalisation supposées. Le développement de ces méthodes pour d'autres types cellulaires, voire des co-cultures, seront indispensables afin d'avoir une approche *in vitro* plus réaliste du tractus respiratoire (notamment avec des cellules épithéliales).

De la même manière, les résultats obtenus dans ce travail de thèse avec des particules de silice sont difficilement extrapolables à d'autres types de matériaux. En effet, le matériau dont est composée la

nanoparticule influence lui-même son activité biologique comme l'a montré l'équipe de Simon-Deckers *et al.*. Cette équipe a comparé l'impact de nanosphères d'aluminium et de titane de même dimension (environ 12 nm) et a montré qu'au contact des cellules épithéliales pulmonaires (A549) les nanoparticules de titane sont plus cytotoxiques (MTT, XTT et dosage LDH) que celles d'aluminium (Simon-Deckers *et al.*, 2008). Cependant, la cytotoxicité spécifique du matériau pourrait être due aux propriétés chimiques intrinsèques au matériau. Ainsi, Chusuei *et al.* suggèrent que la cytotoxicité (dosage de la densité cellulaire par Sulforhodamine B) de nanoparticules métalliques au contact de A549 augmente avec le numéro atomique du métal (TiO_2 , Cr_2O_3 , Fe_2O_3) (Chusuei *et al.*, 2013).

En perspective, le développement de recouvrement de surface non cytotoxique indépendamment du matériau interne pourrait permettre de contrôler la toxicité de certaines nanoparticules, mais à ce jour, aucune étude ne l'a encore démontré. Par exemple la stratégie d'enrobage de matériaux prometteurs mais toxiques comme les quantum dots dans une coquille de matériaux peu toxique comme la silice amorphe pourrait être envisagé (Bottini *et al.*, 2007). Cependant, ces développements doivent prendre en compte le cycle de vie du nano-objet et notamment la dégradation du matériau protecteur une fois dans l'organisme (Malvindi *et al.*, 2014 ; Li *et al.*, 2013 ; Ma *et al.*, 2012).

En complément, le dernier rapport de l'ANSES souligne que des essais en exposition chronique à de petites doses de nanoparticules, peu cytotoxiques lors d'exposition aigue permettraient d'aller plus loin dans l'étude de la nanotoxicité et l'élaboration de modèles plus réalistes. De plus, des études de « cocktails », mélangeant différents types de nanoparticules, permettraient d'appréhender la toxicité liée aux développements et aux usages multiples de nano-objets présents dans notre environnement (ANSES (2014)).

Pour conclure, les réflexions gouvernementales concernant le principe de précaution à appliquer aux nano-objets et l'évolution de normes comme celles sur les dispositifs médicaux (fusion des directives 90/385/CEE et 93/42/CEE courant 2014) montrent bien que les enjeux sanitaires et environnementaux liés au développement des nanoparticules dans l'espace public sont indéniables. Cependant, tant que la réglementation pour la standardisation des études de nanotoxicologie ne sera pas établie, l'ensemble des études menées sur la toxicité *in vivo* et *in vitro* des nanoparticules, comme le travail exposé ici, ne pourront pas constituer une réponse globale quant à l'impact des nanoparticules sur l'homme. Ainsi, des plans nationaux « santé-environnement » et « santé-travail » sont mis en place pour déterminer les méthodes d'expertise les mieux appropriées pour caractériser les dangers, les expositions et les risques des nanoparticules pour la santé humaine et l'environnement.

Cependant, les nanotechnologies ouvrent un nouveau champ du possible comme la nanomédecine perçue comme une solution pour aller au-delà des limites des traitements actuels. Par exemple en thérapie ciblée, pour lutter contre la diffusion non ciblée ou encore la dégradation des médicaments avant la libération de leur principe actif dans la zone à traiter. Des équipes de recherche développent

ainsi des nano-objets aux applications prometteuses comme les nanovecteurs de médicaments comportant des nanovalves activées uniquement à pH suffisamment acide pour n'être activés qu'au cœur de la zone tumorale (Guardado-Alvarez *et al.*, 2014), les nanovecteurs permettant le transport dans le sang et l'adressage d'agents innovant de photochimiothérapie (Singh *et al.*, 2014) ou les nanovecteurs assurant l'intégrité et la délivrance ciblée de médicaments de chimiothérapie et ainsi contourner les mécanismes de résistance de la tumeur (Zhang *et al.*, 2014). Pour ces applications les nanoparticules de silice amorphe sont particulièrement développées. Tout comme pour améliorer l'efficacité des vaccins (Neuhaus *et al.*, 2014), leur stabilité (Mody *et al.*, 2014) ou encore permettre leur inhalation (Neuhaus *et al.*, 2013).

Ainsi, les nanotechnologies offrent des perspectives d'applications variées et innovantes mais la maîtrise de leurs risques est nécessaire. Cette maîtrise est l'objectif de la nanotoxicologie.

ANNEXES

I. Caractérisation physico-chimique des particules

La technique de **diffusion dynamique de la lumière** (Dynamic Light Scattering – DLS) permet de mesurer des diamètres de particules en suspension pouvant descendre jusqu'à 3 nm. En effet, en solution colloïdale, les particules rencontrant un faisceau laser, le dispersent en partie dans toutes les directions. L'intensité du faisceau dispersé fluctue en fonction du temps en raison du mouvement brownien des particules. Grâce à un photomultiplicateur, l'appareil détecte les photons et analyse les fluctuations d'intensité pour donner les coefficients de diffusion des particules. Ces coefficients permettent de calculer le diamètre hydrodynamique de la particule par l'équation de Stokes-Einstein.

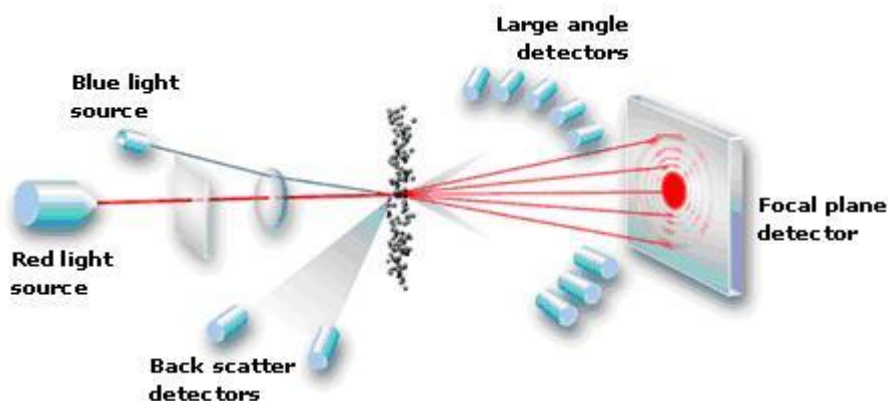


Figure 39 - Principe de la technique de diffusion dynamique de la lumière.

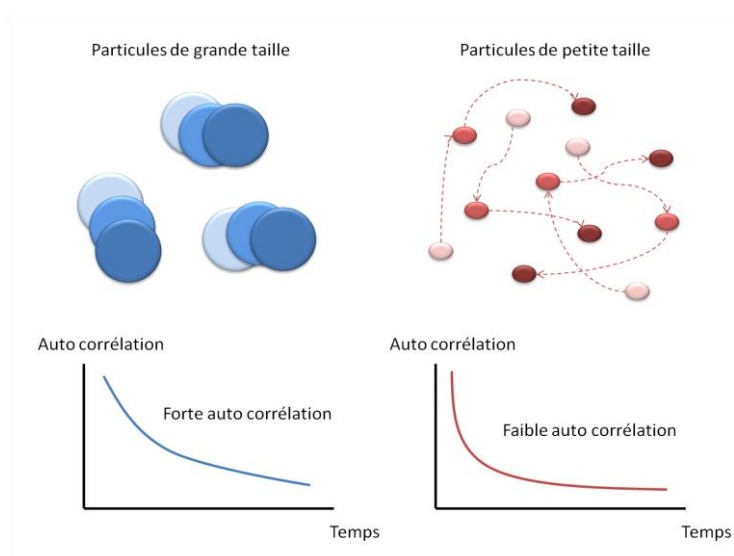


Figure 40 - En DLS, la courbe d'auto corrélation créée à partir des variations d'intensité du signal permet d'obtenir des informations sur le mouvement des particules et ainsi d'en déduire leur taille.

Pour ces travaux, la caractérisation du diamètre hydrodynamique des particules a été réalisée à l'Ecole des Mines de Saint Etienne sur un ZetaSizer nano S (Malvern) associé à un logiciel dédié. Les informations sont données en pourcentage de particules en intensité mesurée par classe de taille.

Ce type d'appareil permet aussi d'évaluer le **potentiel zêta** (ζ). Il correspond au potentiel électrique mesuré au niveau du diamètre hydrodynamique de la particule en suspension, c'est à dire au niveau du plan de cisaillement (limite entre la partie de la solution qui se déplace avec la particule et celle qui se déplace sans la particule). En effet, actuellement il n'est pas possible de mesurer le potentiel de surface d'une nanoparticule mais la zétamétrie permet de mesurer le potentiel d'une suspension dans un fluide. Le potentiel zêta représente la charge que la particule acquiert grâce aux ions qui l'entourent quand elle est en solution pour atteindre la neutralité dans la masse de la solution.

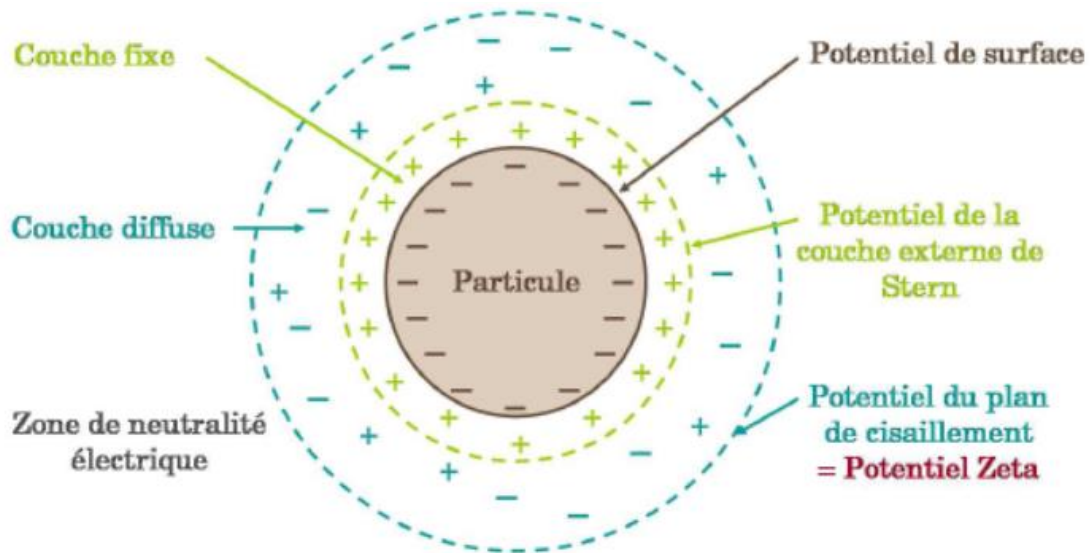


Figure 41 - Charge et potentiels électriques d'une particule dont le potentiel zêta (Simon-Deckers, 2008).

En pratique, plus ce paramètre est élevé en valeur absolue, plus la charge de la particule s'intensifie (négativement lorsque le potentiel zêta est négatif et inversement), ce qui offre aux particules leur stabilité en générant un effet répulsif lorsque deux particules s'approchent l'une de l'autre. A l'inverse, au fur et à mesure qu'il diminue en valeur absolue, les particules deviennent de moins en moins chargées et peuvent donc s'approcher les unes des autres plus étroitement. Cela accroît les probabilités de collision et donc a pour conséquence une perte de stabilité. Par conséquent, le potentiel zêta est un bon indicateur des interactions entre particules et donc de la stabilité colloïdale. Ainsi, on considère qu'une suspension est stable lorsque son $\zeta > \pm 30$ mV.

La suspension ainsi caractérisée dépend de différents paramètres. En effet lorsque le pH est acide les particules tendent à acquérir des charges positives et lorsque celui-ci est basique les particules tendent à acquérir des charges négatives. La valeur de pH pour lequel la particule a un potentiel zêta nul est le point isoélectrique (pI). D'autre part, des paramètres comme l'épaisseur de la couche diffuse, qui est directement corrélée à l'intensité du potentiel zêta, est régie principalement par la concentration en électrolytes de la solution et par la valence des ions présents. Ainsi le potentiel zêta d'une particule dépend du milieu dans lequel elle est placée en suspension.

II. Principe des différents dosages utilisés

a) Test LDH : Etude de la perte d'intégrité membranaire (Cyto Tox 96™ assay, Promega)

L'hydrolyse du lactate en pyruvate par la LDH conduit à la formation de pouvoir réducteur NADH+H⁺. Dans ce kit, ce pouvoir réducteur est ensuite utilisé comme réactif limitant d'une réaction catalysée par une seconde enzyme appelée la diaphorase. Cette enzyme catalyse une réaction colorimétrique en transformant son substrat (iodonitrotétrazolium) en un composé coloré (Formazan, longueurs d'ondes d'adsorption 490 nm).

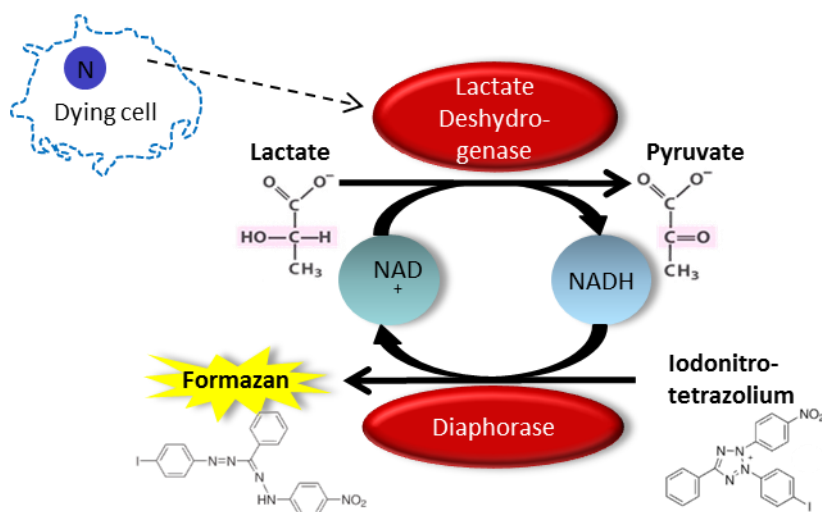


Figure 42 - Principe du dosage de la LDH (Promega).

A chaque étape de la réaction d'oxydo-réduction sur le surnageant de culture les particules résiduelles peuvent interférer avec les réactifs faussant le résultat de la mesure. L'étude d'artefact a été réalisée par mesure du signal du formazan après lyse de l'ensemble des cellules en contact avec des particules pour chaque dose de chaque lot de particules. Aucun artefact significatif n'a été détecté pour l'étude des échantillons de particules de silice de l'approche expérimentale.

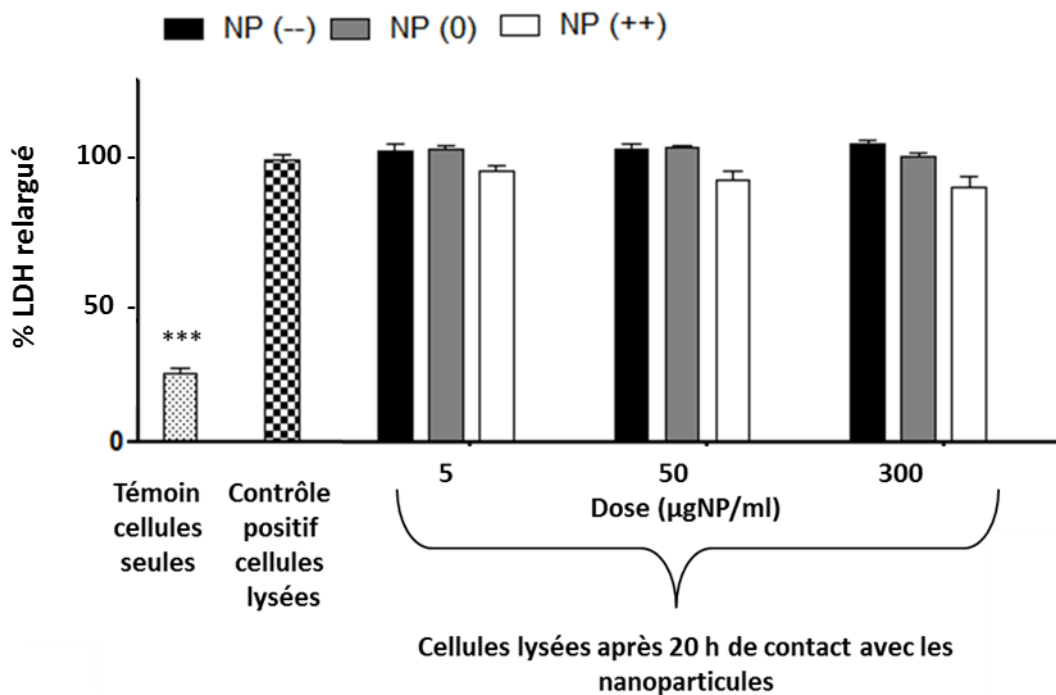


Figure 43 - Etude d'artefact dû à la présence de particules de silice dans le test LDH utilisé pour les macrophages RAW 264.7. Exemple des NP(--), NP(0) et NP(++). (***) indique une différence de signal significative entre le paramètre étudié et le contrôle positif).

b) Test TNF- α : Etude la réaction pro-inflammatoire

(Quantikine mouse TNF- α Immunoassay, R&D system)

Dans le kit un anticorps polyclonal spécifique pour le TNF- α a été préfixé au fond des puits de la plaque au format 96 puits. Après incubation avec l'échantillon et rinçages, un anticorps de détection anti TNF- α conjugué à l'enzyme HRP (HorseRadish Peroxydase) a été ajouté. Enfin une solution substrat (peroxyde d'hydrogène et tétraméthylbenzidine) permet de générer une réaction colorée avec la HRP de façon proportionnelle à la concentration en TNF- α présente. Le dosage colorimétrique est réalisé après ajout de solution stop d'acide chlorhydrique à la longueur d'onde 450 nm comparativement à une gamme étalon.

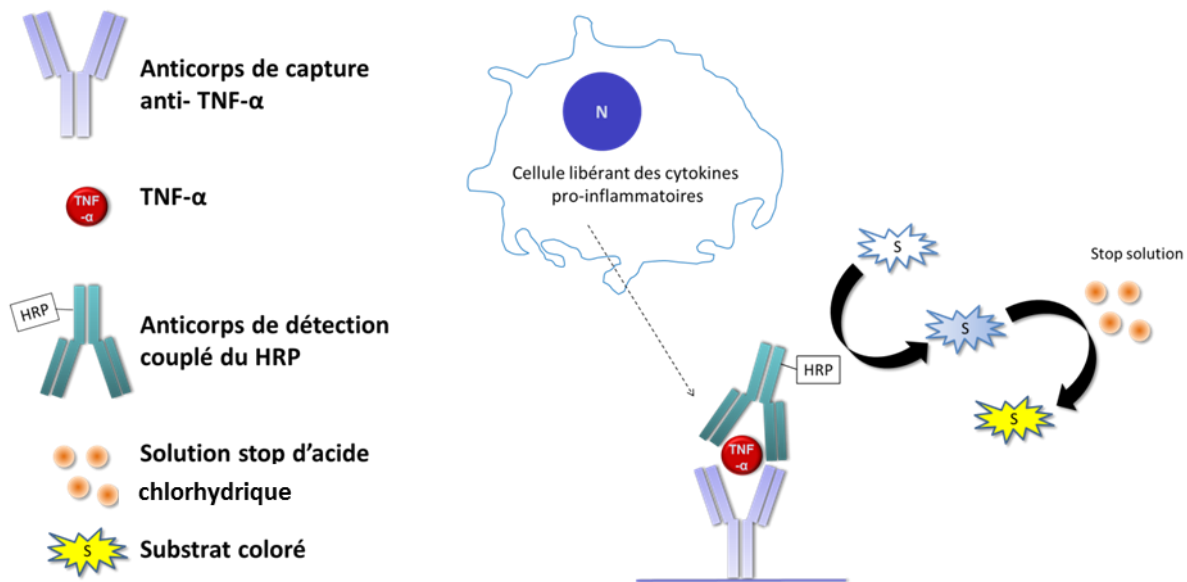


Figure 44 - Principe du dosage ELISA du TNF- α .

A chaque étape du dosage sur le surnageant de culture les particules résiduelles peuvent interférer avec les réactifs faussant les résultats du test. L'étude d'artefacts a été réalisée par mesure du signal de l'HRP de l'étalon fourni dans le kit pour 1500 pg/mL de TNF- α après contact avec des particules pour chaque dose de chaque lot de particules. Aucun artefact significatif n'a été détecté pour l'étude des échantillons de particules de silice selon l'approche expérimentale appliquée.

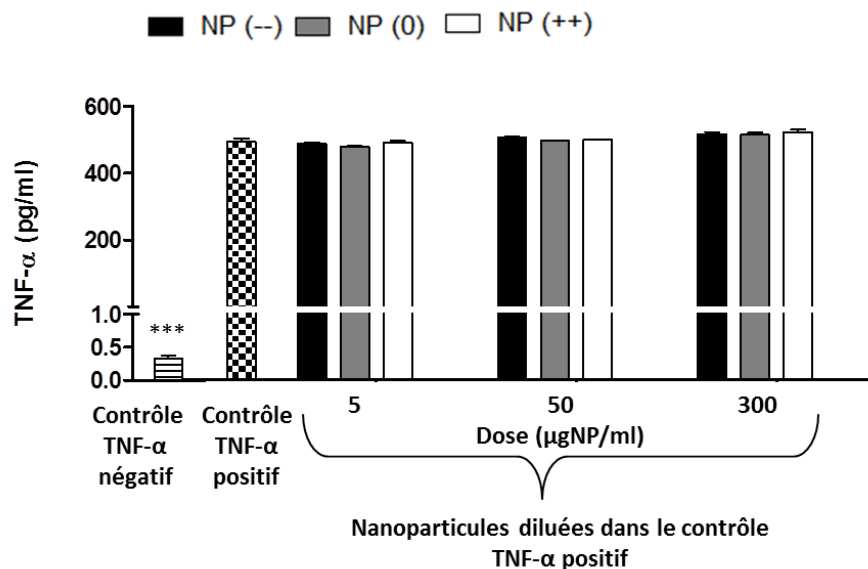


Figure 45 - Etude d'artefact dû à la présence de particules de silice dans le test TNF- α utilisé pour les macrophages RAW 264.7. Exemple des NP(--), NP(0) et NP(++). (***) indique une différence de signal significative entre le paramètre étudié et le contrôle positif).

**c) Test ROS : Etude la production d'espèces réactives oxygénées
(Oxiselect™ ROS assay kit, Euromedex)**

Cet essai a été réalisé après un temps court de 90 minutes de contact particules-cellules (car selon les recommandations de la littérature la réponse cellulaire est rapide), et permet de détecter une large gamme de dérivés réactifs de l'oxygène. Cet essai utilise une sonde fluorogénique perméable aux cellules, le 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescéine diacétate (DCFH-DA). Une fois que le DCFH-DA a pénétré dans les cellules, il est déacétylé par des estérases cellulaires en 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescéine (DCFH) non fluorescent, lui-même rapidement oxydé en 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescéine (DCF) fluorescent (longueur d'onde d'excitation 480 nm et d'émission 530 nm) par les ROS.

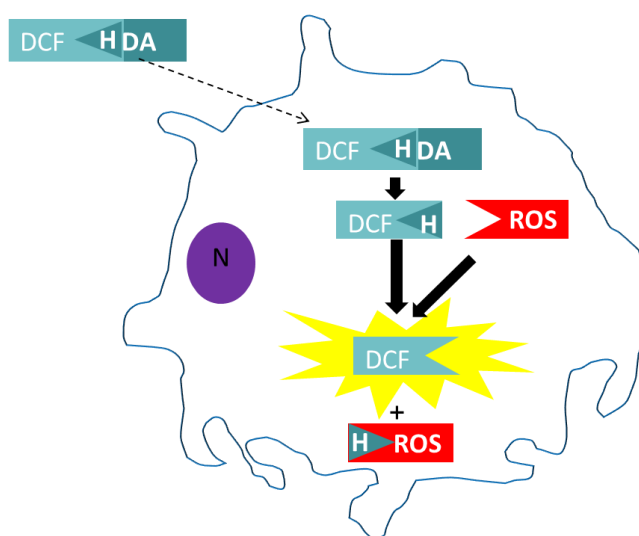


Figure 46 - Principe de l'essai « Oxiselect » (Euromedex).

Aucun signal ROS n'a été détecté au sein des cellules lors de la mise en contact des particules avec les macrophages RAW 264.7.

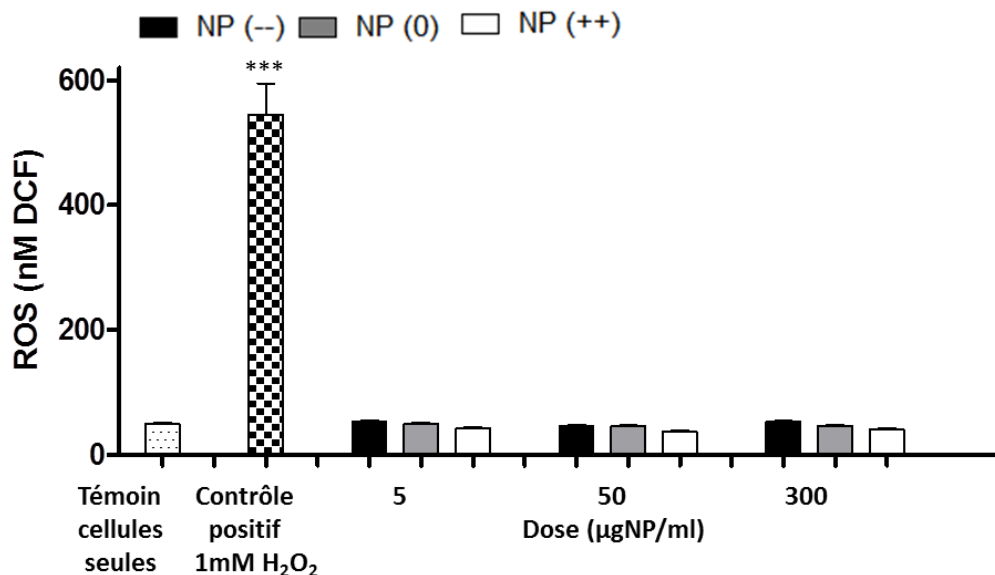


Figure 47 - Etude de la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) par les macrophages RAW 264.7 après 90 minutes de contact avec des nanoparticules de silice. Exemple des NP(--), NP(0) et NP(++). (***) indique une différence de signal significative entre le paramètre étudié et le témoin cellules seules).

d) Test Caspase-3 : Etude de l'apoptose

(Casp-3 activity colorimetric Assay BF3100, R&D systems)

L'activité de la caspase-3 présente dans le lysat a été quantifiée après 20h d'incubation des cellules avec les nanoparticules par le kit de dosage commercial. Dans le kit utilisé le substrat DEVD-pNA se fixait sur un site spécifique de la caspase-3 en libérant le composé pNA coloré.

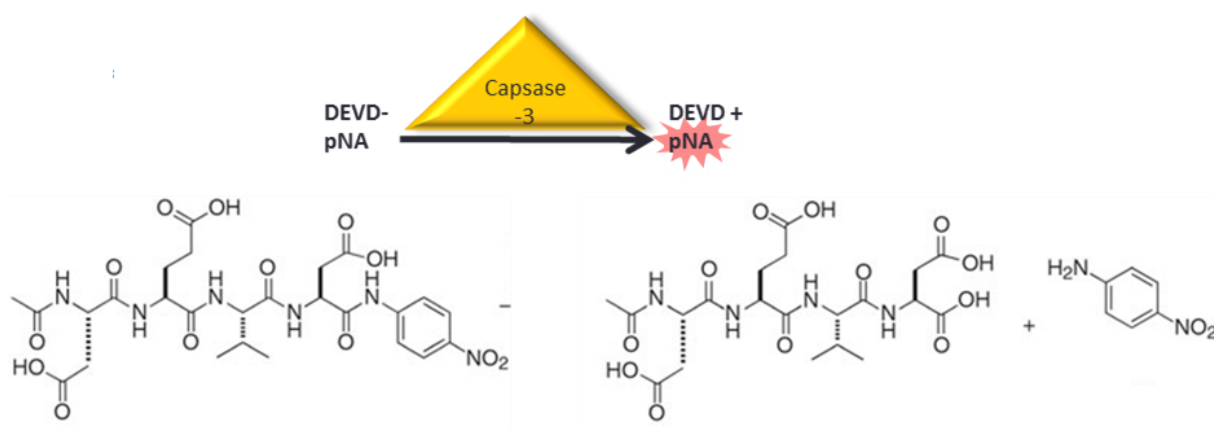


Figure 48 - Principe du dosage de la caspase-3.

Ainsi, l'intensité mesurée par spectrophotométrie à 405 nm était proportionnelle à l'activité de caspase-3 dans le milieu.

III. Coloration May-Grünwald Giemsa

L'aspect morphologique des cellules peut-être observé après cytocentrifugation (Shandon Cytospin) ou culture en Lab-Tek (PAA) puis coloration au May-Grünwald Giemsa (MGG). Cette coloration repose sur l'action combinée de deux colorants neutres, le May-Grünwald (éosine acide et bleu de méthylène basique) et le Giemsa (éosine et azur de méthylène basique). Elle permet de faire apparaître les noyaux des cellules en violet et le cytoplasme acidophile des macrophages en bleu-gris.

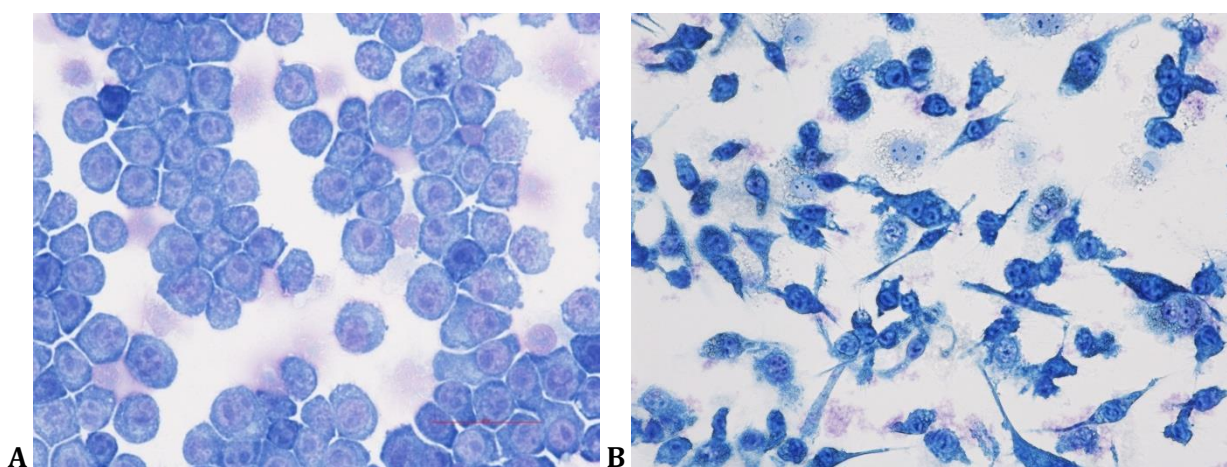


Figure 49 - Observations de la lignée de macrophages RAW 264.7 après coloration MGG (objectif x40) après cytocentrifugation (A) ou incubation en chambre de culture Lab-Tek permettant la conservation de la morphologie de ces cellules semi-adhérentes (B).

La préparation par cytopspin permet la réalisation d'un étalement cellulaire et l'observation des caractéristiques morphologiques du noyau, du cytoplasme (présences de vésicules de phagocytose en cas d'activation) ainsi que l'intégrité membranaire. A l'inverse la préparation sur Lab-Tek conserve la morphologie de la cellule et dans le cas de cellules phagocytaires permet d'observer leurs extensions cytoplasmiques. Ces deux méthodes apportent des observations complémentaires mais peu comparables. De plus, la coloration au MGG est moins adaptée pour la préparation sur Lab-Tek selon la densité cellulaire et n'a donc pas été présentée dans les publications de ce manuscrit.

IV. Microscopie électronique

La **microscopie électronique à balayage** (MEB, ou SEM en anglais pour Scanning Electron Microscopy) est une technique de microscopie électronique capable de produire des images en haute résolution (entre 0,4 nm et 20 nm) de la surface d'un échantillon en utilisant le principe des interactions électrons-matière.

Un MEB est essentiellement composé d'un canon à électrons et d'une colonne électronique dont la fonction est de produire une sonde électronique fine sur l'échantillon, d'une platine porte-objet permettant de déplacer l'échantillon dans les trois directions et de détecteurs permettant de capter et d'analyser les rayonnements émis par l'échantillon. En outre l'appareil doit nécessairement être équipé d'un système de pompes à vide.

Concernant son principe de fonctionnement, la sonde électronique (« canon à électrons ») génère un faisceau d'électrons qui est projeté sur l'échantillon à analyser. L'interaction entre la sonde électronique et l'échantillon génère des électrons rétrodiffusés et secondaires qui sont accélérés vers un détecteur, lequel amplifie le signal. A chaque point d'impact correspond un signal électrique. L'intensité de ce signal électrique dépend à la fois de la nature de l'échantillon au point d'impact et de la topographie de l'échantillon au point considéré. Il est ainsi possible, en balayant le faisceau sur l'échantillon, d'obtenir une cartographie de la zone balayée.

Des bobines disposées selon les deux axes perpendiculaires à l'axe du faisceau et parcourues par des courants synchronisés permettent de soumettre la sonde à un balayage. Les lentilles électroniques, qui sont généralement des lentilles magnétiques et les bobines de balayage, forment un ensemble que l'on appelle la colonne électronique.

Sous l'impact des électrons, l'échantillon émet en réponse plusieurs types de rayonnements correspondant à plusieurs phénomènes :

- Les électrons secondaires sont les électrons du faisceau incident qui ont une pénétration très faible. Ils sont transformés en signal électrique servant à moduler le faisceau d'un tube d'oscilloscope dont le balayage est synchrone avec le faisceau incident. L'image est retransmise point par point et ne devient complète qu'après une période de balayage. L'image obtenue est celle de la surface en relief de l'échantillon, jusqu'à des échelles très petites (grossissement possible jusqu'à 100 000 fois).
- Les électrons rétrodiffusés sont les électrons du faisceau incident qui ressortent après un court parcours dans l'échantillon. Leur énergie est fonction de la densité atomique de l'échantillon, l'image reconstituée comme pour les électrons secondaires donne alors une idée de la répartition des masses atomiques dans l'échantillon.
- Les photons X sont des radiations caractéristiques émises par les atomes constituant l'échantillon. Ils présentent un spectre énergétique composé d'un spectre continu et d'un spectre de

raies caractéristiques des éléments de l'échantillon placé sous le faisceau. L'épaisseur de la zone d'émission de photons X sous l'impact du faisceau est d'environ 1 μm . Le système de détection, placé près de la zone d'impact, donne un signal proportionnel à l'énergie du photon X détecté. Ce signal, amplifié et digitalisé, est appliqué à l'entrée d'un analyseur multicanal.

Ainsi, la MEB est une technique d'imagerie qui permet diverses analyses physiques et chimiques de nombreux types d'échantillons.

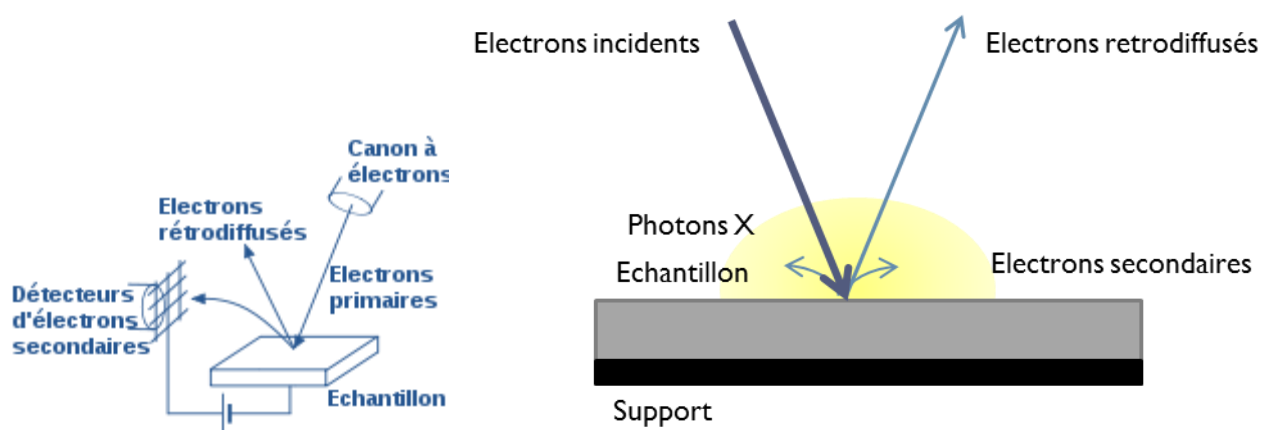


Figure 50 - Schéma du principe d'un Microscope Electronique à Balayage.

Concernant les échantillons de nanoparticules observés en MEB, une simple goutte a été déposée sur du scotch carbone et a été mise à sécher à l'abri de la poussière

Pour la **microscopie électronique à transmission** (MET, ou TEM en anglais pour Transmission Electron Microscopy), les analyses sont effectuées grâce aux électrons diffractés à travers l'échantillon. La contrainte principale est l'utilisation d'échantillons ultra-minces (épaisseur de l'ordre de 100 nm) afin d'être le plus transparent possible aux électrons. De plus, l'échantillon doit être compatible avec l'ultravide (vide limite inférieur à 10^{-7} hPa). La préparation des échantillons biologiques pour la MET nécessite le plus grand soin et différentes étapes successives (fixation, déshydratation et augmentation du contraste, inclusion en résine, coupes ultrafines puis observation).

Le principe de la MET est basé sur un faisceau d'électrons qui est focalisé sur la préparation à observer par l'intermédiaire de lentilles électromagnétiques. Les interactions entre les électrons incidents et l'échantillon sont résumées ci-dessous :

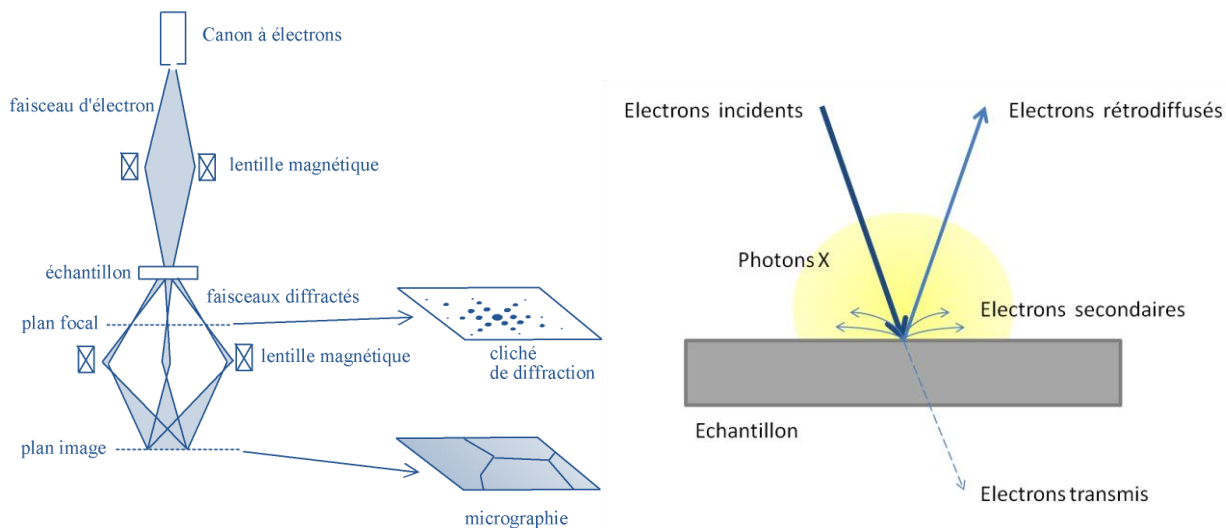


Figure 51 - Schéma des interactions faisceau d'électrons-matière.

Seuls les électrons traversant la préparation sont analysés. On distingue à la sortie de l'échantillon trois types d'électrons :

- Les électrons transmis n'ayant pas interagi avec l'échantillon.
- Les électrons diffusés élastiquement (sans perte d'énergie) résultant de l'interaction des électrons incidents avec les atomes de l'échantillon. Dans le cas où ce dernier est cristallin, les électrons sont diffractés par les plans réticulaires selon la loi de Bragg.
- Les électrons diffusés inélastiquement (avec perte d'énergie) provenant de l'interaction des électrons incidents avec les cortèges électroniques des atomes de l'échantillon.

La distinction entre les électrons transmis et les électrons diffusés permet de créer le contraste des images en MET. Cette technique permet des observations ultrastructurales intracellulaires. Les informations apportées par la MET et MEB sont donc complémentaires.

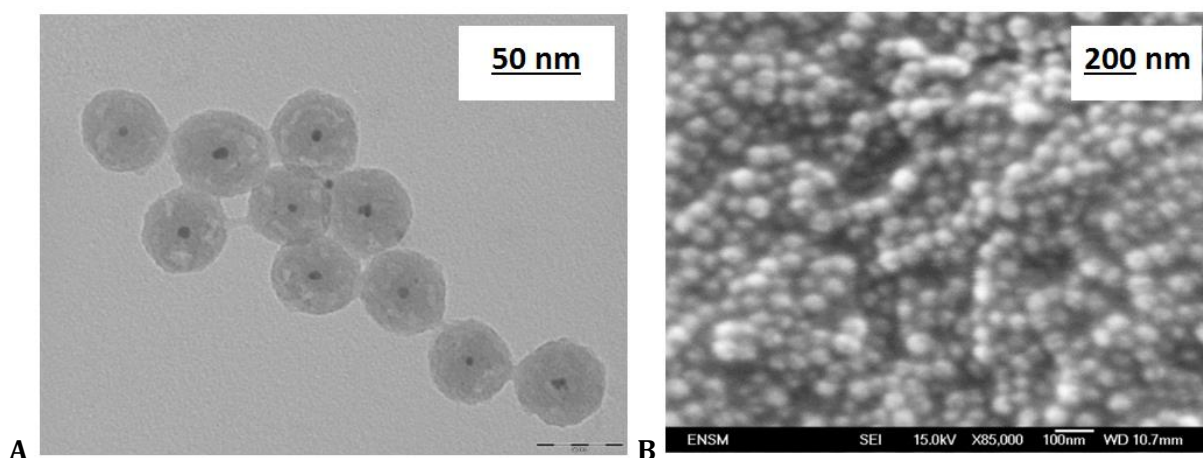


Figure 52 - Echantillons de nanoparticules sphériques de silice avec un coeur d'or observés (A) en MET et (B) en MEB.

V. Microscopie confocale

La microscopie confocale à balayage laser (monophotonique) est une des stratégies développées pour s'affranchir des problèmes de fluorescence défocalisée.

C'est la géométrie de l'optique confocale qui permet de discriminer les plans en dehors du plan focal grâce aux deux pinholes ou diaphragmes variables. La source de lumière utilisée est une source laser continue opérant dans le visible tel que les lasers Argon ou Hélium-Néon. Dans le cas de la microscopie confocale conventionnelle, on parle de régime monophotonique. Cela veut dire qu'une molécule de fluorophore n'est excitée que par un seul photon suffisamment énergétique pour compenser la perte de lumière après le passage à travers le pinhole du détecteur, le laser utilisé est en mode continu.

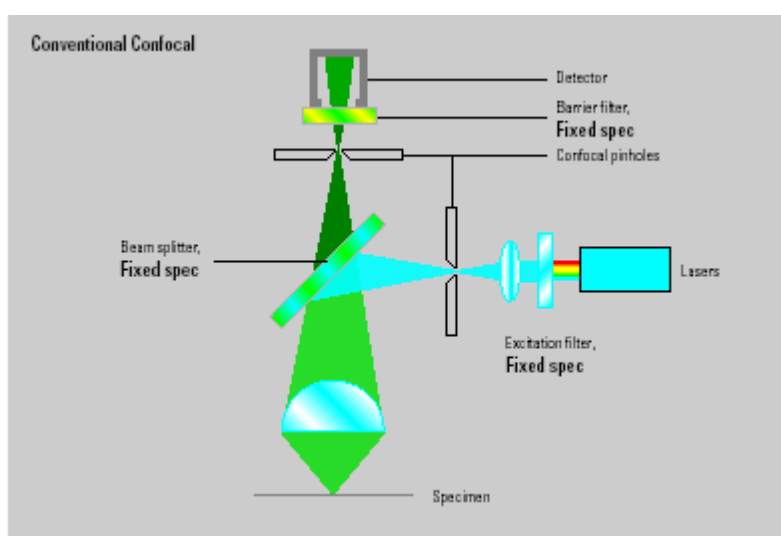


Figure 53 - Principe de la confocalité d'un microscope à balayage laser. Seule la lumière d'émission de fluorescence (beam splitter) provenant du plan focal (focus level) est collectée au niveau du détecteur (photomultiplicateur) pour constituer l'image (CMCM Stéphanois).

Le rayon laser permet d'illuminer un point précis et bien défini spatialement. Le point d'illumination se déplace dans l'échantillon et le balaye point par point dans les directions X et Y grâce à un scanner (miroirs galvanométriques). La lumière réfléchie émise dans l'échantillon traverse un miroir (semi transparent dichroïque) puis arrive à un système de détection par photomultiplicateurs (PMT). Devant le PMT se trouve le deuxième pinhole qui permet de sélectionner la lumière d'émission de fluorescence provenant d'un seul plan focal de la préparation, en éliminant le signal de fluorescence provenant des autres plans. L'ouverture du diaphragme/pinhole (taille du disque d'Airy) va conditionner en grande partie la qualité optique de l'image. De plus, un déplacement selon l'axe optique Z est réalisé grâce à une sur-platine (quartz piézo-électrique), faisant varier le plan de mise au point, ce qui permet d'obtenir une série de coupes optiques appelées séries en Z. Un empilement

par projection de sections optiques conduit facilement à une image reconstruite en 3D montrant une distribution dans l'espace de sondes fluorescentes.

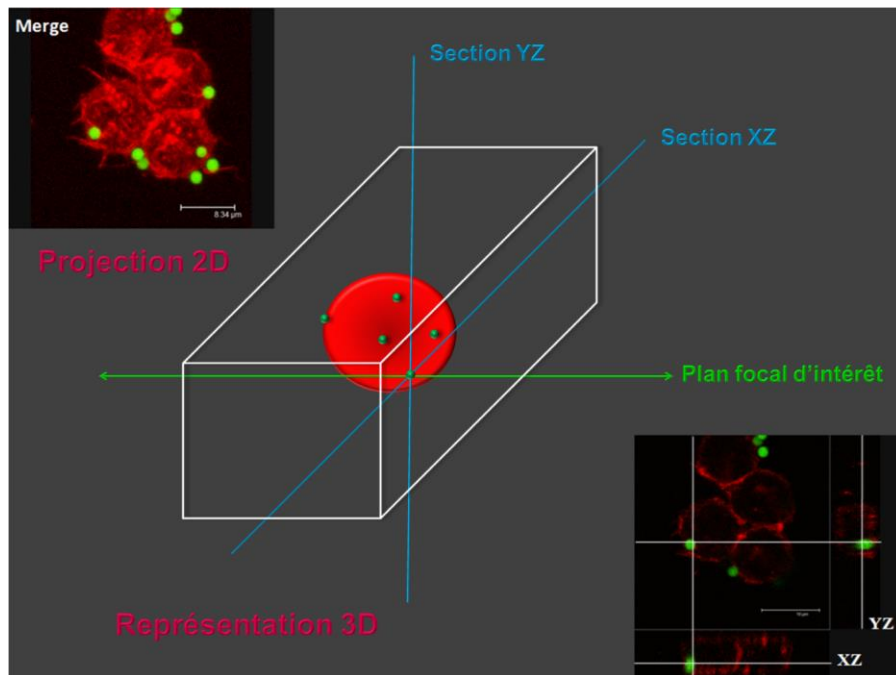


Figure 54 - Schéma explicatif des sections de plans de coupe en microscopie confocale avec l'image d'un plan focal en XZ et YZ, et d'une image moyennée finale acquise sur une série de plans de coupe.

Par rapport à la microscopie de fluorescence conventionnelle, la microscopie confocale offre de nombreux avantages pour la localisation *in situ* d'une sonde fluorescente dans des cellules et/ou des tissus et une résolution latérale ($0,2 \mu\text{m}$) et axiale ($0,4 \mu\text{m}$) optimale.

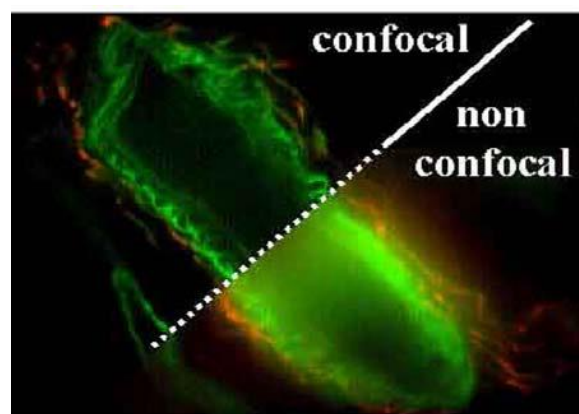


Figure 55 - Différence de netteté entre une image confocale et non-confocale (CMCM Stéphanois).

Cependant, la puissance de la source laser est trop importante au plan focal et entraîne une photodégradation rapide de la sonde fluorescente (photobleaching) auquel s'ajoute un photo-dommage

cellulaire irréversible qui modifie et altère le métabolisme cellulaire. C'est une des raisons pour laquelle les spécimens sont souvent fixés et montés entre lame et lamelle. De plus, les applications restent limitées à des échantillons de faible épaisseur ($< 200 \mu\text{m}$). Cette technique ne permet pas non plus l'observation précise de particules isolées de taille nanométrique inférieure à 100 nm.

REFERENCES

- 1 Aderem, A., and Underhill, D.M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 593–623.
- 2 Aitken (2004). Nanoparticles : an occupational hygiene review.
- 3 Akiyama, I., Ogami, A., Oyabu, T., Yamato, H., Morimoto, Y., and Tanaka, I. (2003). Clearance of deposited silicon carbide whisker from rat lungs inhaled during a 4-week exposure. *J. Occup. Health* 45, 31–35.
- 4 Albanese, A., Tang, P.S., and Chan, W.C.W. (2012). The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 14, 1–16.
- 5 Andre, P., Capo, C., Benoliel, A.M., Buferne, M., and Bongrand, P. (1990). Analysis of the topological changes induced on cells exposed to adhesive or mechanical stimuli. *Cell Biophys.* 16, 13–34.
- 6 De Angelis, I., Barone, F., Zijno, A., Bizzarri, L., Russo, M.T., Pozzi, R., Franchini, F., Giudetti, G., Ubaldi, C., Ponti, J., et al. (2013). Comparative study of ZnO and TiO₂ nanoparticles: physicochemical characterisation and toxicological effects on human colon carcinoma cells. *Nanotoxicology* 7, 1361–1372.
- 7 Arnida, Janát-Amsbury, M.M., Ray, A., Peterson, C.M., and Ghandehari, H. (2011). Geometry and surface characteristics of gold nanoparticles influence their biodistribution and uptake by macrophages. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Für Pharm. Verfahrenstechnik EV* 77, 417–423.
- 8 Asefa, T., and Tao, Z. (2012). Biocompatibility of Mesoporous Silica Nanoparticles. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 2265–2284.
- 9 Auffinger, B., Morshed, R., Tobias, A., Cheng, Y., Ahmed, A.U., and Lesniak, M.S. (2013). Drug-loaded nanoparticle systems and adult stem cells: a potential marriage for the treatment of malignant glioma? *Oncotarget* 4, 378–396.
- 10 Avelar-Freitas, B.A., Almeida, V.G., Pinto, M.C.X., Mourão, F. a. G., Massensini, A.R., Martins-Filho, O.A., Rocha-Vieira, E., and Brito-Melo, G.E.A. (2014). Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica* 47, 307–315.
- 11 Barolo, C., Yum, J.-H., Artuso, E., Barbero, N., Di Censo, D., Lobello, M.G., Fantacci, S., De Angelis, F., Grätzel, M., Nazeeruddin, M.K., et al. (2013). A simple synthetic route to obtain pure trans-ruthenium(II) complexes for dye-sensitized solar cell applications. *ChemSusChem* 6, 2170–2180.
- 12 Barrán-Berdón, A.L., Pozzi, D., Caracciolo, G., Capriotti, A.L., Caruso, G., Cavaliere, C., Riccioli, A., Palchetti, S., and Laganà, A. (2013). Time evolution of nanoparticle-protein corona in human plasma: relevance for targeted drug delivery. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* 29, 6485–6494.
- 13 Benmerah, A., and Lamaze, C. (2002). Endocytose : chaque voie compte ! *MS Médecine Sci.* 18, 1126–1136.
- 14 Blidberg, K., Palmberg, L., Dahlén, B., Lantz, A.-S., and Larsson, K. (2012). Chemokine release by neutrophils in chronic obstructive pulmonary disease. *Innate Immun.* 18, 503–510.
- 15 Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis, Nanomanufacturing handbook (2007).
- 16 Boczkowski, J., and Lanone, S. (2010). Nanoparticules : une prévention est-elle possible ? *Rev. Fr. Allergol.* 50, 214–216.
- 17 Boisselier, E., and Astruc, D. (2009). Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem. Soc. Rev.* 38, 1759–1782.
- 18 Borak, B., Biernat, P., Prescha, A., Baszczuk, A., and Pluta, J. (2012). In vivo study on the biodistribution of silica particles in the bodies of rats. *Adv. Clin. Exp. Med. Off. Organ Wroclaw Med. Univ.* 21, 13–18.

- 19 Bottini, M., D'Annibale, F., Magrini, A., Cerignoli, F., Arimura, Y., Dawson, M.I., Bergamaschi, E., Rosato, N., Bergamaschi, A., and Mustelin, T. (2007). Quantum dot-doped silica nanoparticles as probes for targeting of T-lymphocytes. *Int. J. Nanomedicine* 2, 227–233.
- 20 Boumahdi, N. (2009). Approche pluridisciplinaire de l'étude de l'activité biologique de particules fines.
- 21 Bressenot, A., Marchal, S., Bezdetnaya, L., Garrier, J., Guillemin, F., and Plenat, F. (2009). Assessment of Apoptosis by Immunohistochemistry to Active Caspase-3, Active Caspase-7, or Cleaved PARP in Monolayer Cells and Spheroid and Subcutaneous Xenografts of Human Carcinoma. *J. Histochem. Cytochem.* 57, 289–300.
- 22 Brown, D.M., Kinloch, I.A., Bangert, U., Windle, A.H., Walter, D.M., Walker, G.S., Scotchford, C.A., Donaldson, K., and Stone, V. (2007). An in vitro study of the potential of carbon nanotubes and nanofibres to induce inflammatory mediators and frustrated phagocytosis. *Carbon* 45, 1743–1756.
- 23 Bruce, P.G., Scrosati, B., and Tarascon, J.-M. (2008). Nanomaterials for Rechargeable Lithium Batteries. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 2930–2946.
- 24 Bruch, J., Rehn, S., Rehn, B., Borm, P.J.A., and Fubini, B. (2004). Variation of biological responses to different respirable quartz flours determined by a vector model. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 207, 203–216.
- 25 Buzea, C., Pacheco, I.I., and Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases* 2, MR17–MR71.
- 26 Cain, C.C., Sipe, D.M., and Murphy, R.F. (1989). Regulation of endocytic pH by the Na⁺,K⁺-ATPase in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 544–548.
- 27 Calvo, P., Gouritin, B., Villarroya, H., Eclancher, F., Giannavola, C., Klein, C., Andreux, J.P., and Couvreur, P. (2002). Quantification and localization of PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles in brain and spinal cord during experimental allergic encephalomyelitis in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 15, 1317–1326.
- 28 Catelas, I., Petit, A., Marchand, R., Zukor, D.J., Yahia, L., and Huk, O.L. (1999). Cytotoxicity and macrophage cytokine release induced by ceramic and polyethylene particles in vitro. *J. Bone Joint Surg. Br.* 81, 516–521.
- 29 Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggård, T., Thulin, E., Nilsson, H., Dawson, K.A., and Linse, S. (2007). Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 2050–2055.
- 30 Champion, J.A., and Mitragotri, S. (2009). Shape induced inhibition of phagocytosis of polymer particles. *Pharm. Res.* 26, 244–249.
- 31 Chandolu, V., and Dass, C.R. (2013). Treatment of lung cancer using nanoparticle drug delivery systems. *Curr. Drug Discov. Technol.* 10, 170–176.
- 32 Chen, B., Liu, Y., Song, W.M., Hayashi, Y., Ding, X.C., and Li, W.H. (2011). In vitro evaluation of cytotoxicity and oxidative stress induced by multiwalled carbon nanotubes in murine RAW 264.7 macrophages and human A549 lung cells. *Biomed. Environ. Sci.* 24, 593–601.
- 33 Chimini, G., and Chavrier, P. (2000). Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nat. Cell Biol.* 2, E191–196.
- 34 Chithrani, B.D., Ghazani, A.A., and Chan, W.C.W. (2006). Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett.* 6, 662–668.
- 35 Cho, E.C., Xie, J., Wurm, P.A., and Xia, Y. (2009). Understanding the role of surface charges in cellular adsorption versus internalization by selectively removing gold nanoparticles on the cell surface with a I2/KI etchant. *Nano Lett.* 9, 1080–1084.
- 36 Cho, W.-S., Choi, M., Han, B.S., Cho, M., Oh, J., Park, K., Kim, S.J., Kim, S.H., and Jeong, J. (2007). Inflammatory mediators induced by intratracheal instillation of ultrafine amorphous silica particles. *Toxicol. Lett.* 175, 24–33.
- 37 Choi, J., Burns, A.A., Williams, R.M., Zhou, Z., Flesken-Nikitin, A., Zipfel, W.R., Wiesner, U., and Nikitin, A.Y. (2007). Core-shell silica nanoparticles as fluorescent labels for nanomedicine. *J. Biomed. Opt.* 12, 064007.

- 38 Choi, K.Y., Liu, G., Lee, S., and Chen, X. (2012). Theranostic nanoplatfoms for simultaneous cancer imaging and therapy: current approaches and future perspectives. *Nanoscale* 4, 330–342.
- 39 Chung, T.-H., Wu, S.-H., Yao, M., Lu, C.-W., Lin, Y.-S., Hung, Y., Mou, C.-Y., Chen, Y.-C., and Huang, D.-M. (2007). The effect of surface charge on the uptake and biological function of mesoporous silica nanoparticles in 3T3-L1 cells and human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 28, 2959–2966.
- 40 Chusuei, C.C., Wu, C.-H., Mallavarapu, S., Hou, F.Y.S., Hsu, C.-M., Winiarz, J.G., Aronstam, R.S., and Huang, Y.-W. (2013). Cytotoxicity in the age of nano: The role of fourth period transition metal oxide nanoparticle physicochemical properties. *Chem. Biol. Interact.* 206, 319–326.
- 41 Clift, M.J.D., Rothen-Rutishauser, B., Brown, D.M., Duffin, R., Donaldson, K., Proudfoot, L., Guy, K., and Stone, V. (2008). The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 232, 418–427.
- 42 Coccini, T., Barni, S., Manzo, L., and Roda, E. (2013). Apoptosis induction and histological changes in rat kidney following Cd-doped silica nanoparticle exposure: evidence of persisting effects. *Toxicol. Mech. Methods* 23, 566–575.
- 43 Colilla, M., Manzano, M., and Vallet-Regí, M. (2008). Recent advances in ceramic implants as drug delivery systems for biomedical applications. *Int. J. Nanomedicine* 3, 403–414.
- 44 Commission Européenne (2011). Recommandations de la Commission du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux 2011/696/UE. *J. Off. Union Eur.*
- 45 Conner, S.D., and Schmid, S.L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422, 37–44.
- 46 Dai, Q., Walkey, C., and Chan, W.C.W. (2014). Polyethylene glycol backfilling mitigates the negative impact of the protein corona on nanoparticle cell targeting. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 53, 5093–5096.
- 47 Dausend, J., Musyanovych, A., Dass, M., Walther, P., Schrezenmeier, H., Landfester, K., and Mailänder, V. (2008). Uptake mechanism of oppositely charged fluorescent nanoparticles in HeLa cells. *Macromol. Biosci.* 8, 1135–1143.
- 48 Dell’Orco, D., Lundqvist, M., Oslakovic, C., Cedervall, T., and Linse, S. (2010). Modeling the time evolution of the nanoparticle-protein corona in a body fluid. *PloS One* 5, e10949.
- 49 Direction générale de l’armement (2010). Politique et Objectifs Scientifiques, Edition 2010, Orientations 2011 - 2012, Domaine 4 : Nanotechnologies, p.45 – 52
- 50 Dive, C., Gregory, C.D., Phipps, D.J., Evans, D.L., Milner, A.E., and Wyllie, A.H. (1992). Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1133, 275–285.
- 51 Dobrovolskaia, M.A., Patri, A.K., Zheng, J., Clogston, J.D., Ayub, N., Aggarwal, P., Neun, B.W., Hall, J.B., and McNeil, S.E. (2009). Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 5, 106–117.
- 52 Donaldson, K., Brown, D., Clouter, A., Duffin, R., MacNee, W., Renwick, L., Tran, L., and Stone, V. (2002). The pulmonary toxicology of ultrafine particles. *J. Aerosol Med. Off. J. Int. Soc. Aerosols Med.* 15, 213–220.
- 53 Drescher, D., Orts-Gil, G., Laube, G., Natte, K., Veh, R.W., Österle, W., and Kneipp, J. (2011). Toxicity of amorphous silica nanoparticles on eukaryotic cell model is determined by particle agglomeration and serum protein adsorption effects. *Anal. Bioanal. Chem.* 400, 1367–1373.
- 54 Faunce, T.A., White, J., and Matthaei, K.I. (2008). Integrated research into the nanoparticle-protein corona: a new focus for safe, sustainable and equitable development of nanomedicines. *Nanomed.* 3, 859–866.
- 55 Faure, A.-C., Dufort, S., Josserand, V., Perriat, P., Coll, J.-L., Roux, S., and Tillement, O. (2009). Control of the in vivo biodistribution of hybrid nanoparticles with different poly(ethylene glycol) coatings. *Small Weinh. Bergstr. Ger.* 5, 2565–2575.
- 56 Fubini, B., Ghiazza, M., and Fenoglio, I. (2010). Physico-chemical features of engineered nanoparticles relevant to their toxicity. *Nanotoxicology* 4, 347–363.

- 57 Gambelli, F., Di, P., Niu, X., Friedman, M., Hammond, T., Riches, D.W.H., and Ortiz, L.A. (2004). Phosphorylation of tumor necrosis factor receptor 1 (p55) protects macrophages from silica-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 2020–2029.
- 58 Garnett, M.C., and Kallinteri, P. (2006). Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles. *Occup. Med. Oxf. Engl.* 56, 307–311.
- 59 Gaur, S., Wang, Y., Kretzner, L., Chen, L., Yen, T., Wu, X., Yuan, Y.-C., Davis, M., and Yen, Y. (2014). Pharmacodynamic and pharmacogenomic study of the nanoparticle conjugate of camptothecin CRLX101 for the treatment of cancer. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*
- 60 Ge, Y., Zhang, Y., Xia, J., Ma, M., He, S., Nie, F., and Gu, N. (2009). Effect of surface charge and agglomerate degree of magnetic iron oxide nanoparticles on KB cellular uptake in vitro. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 73, 294–301.
- 61 Geiser, M. (2010). Update on macrophage clearance of inhaled micro- and nanoparticles. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 23, 207–217.
- 62 Geiser, M., Rothen-Rutishauser, B., Kapp, N., Schurch, S., Kreyling, W., Schulz, H., Semmler, M., Hof, V.I., Heyder, J., and Gehr, P. (2005). Ultrafine Particles Cross Cellular Membranes by Nonphagocytic Mechanisms in Lungs and in Cultured Cells. *Environ. Health Perspect.* 113, 1555–1560.
- 63 Goldhaber-Gordon, D., Montemerlo, M.S., Love, J.C., Opitck, G.J., and Ellenbogen, J.C. (1997). Overview of nanoelectronic devices. *Proc. IEEE* 85, 521–540.
- 64 Göppert, T.M., and Müller, R.H. (2005). Adsorption kinetics of plasma proteins on solid lipid nanoparticles for drug targeting. *Int. J. Pharm.* 302, 172–186.
- 65 Greish, K., Thiagarajan, G., Herd, H., Price, R., Bauer, H., Hubbard, D., Burckle, A., Sadekar, S., Yu, T., Anwar, A., et al. (2012). Size and surface charge significantly influence the toxicity of silica and dendritic nanoparticles. *Nanotoxicology* 6, 713–723.
- 66 Greulich, C., Diendorf, J., Geßmann, J., Simon, T., Habijan, T., Eggeler, G., Schildhauer, T.A., Epple, M., and Köller, M. (2011). Cell type-specific responses of peripheral blood mononuclear cells to silver nanoparticles. *Acta Biomater.* 7, 3505–3514.
- 67 Gromadzka-Ostrowska, J., Dziendzikowska, K., Lankoff, A., Dobrzyńska, M., Instanes, C., Brunborg, G., Gajownik, A., Radzikowska, J., Wojewódzka, M., and Kruszewski, M. (2012). Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats. *Toxicol. Lett.* 214, 251–258.
- 68 Guardado-Alvarez, T.M., Russell, M.M., and Zink, J.I. (2014). Nanovalve activation by surface-attached photoacids. *Chem. Commun.*
- 69 Hamilton, R.F., Jr, Thakur, S.A., and Holian, A. (2008). Silica binding and toxicity in alveolar macrophages. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 1246–1258.
- 70 Harush-Frenkel, O., Debotton, N., Benita, S., and Altschuler, Y. (2007). Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353, 26–32.
- 71 Hayashi, H., and Kajita, A. (1988). Silicon carbide in lung tissue of a worker in the abrasive industry. *Am. J. Ind. Med.* 14, 145–155.
- 72 He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C., and Yin, C. (2010). Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials* 31, 3657–3666.
- 73 He, H., Xiao, H., Kuang, H., Xie, Z., Chen, X., Jing, X., and Huang, Y. (2014). Synthesis of mesoporous silica nanoparticle-oxaliplatin conjugates for improved anticancer drug delivery. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 117, 75–81.
- 74 Herd, H., Daum, N., Jones, A.T., Huwer, H., Ghandehari, H., and Lehr, C.-M. (2013). Nanoparticle geometry and surface orientation influence mode of cellular uptake. *ACS Nano* 7, 1961–1973.
- 75 Hervé-Bazin, B. (2007). Les nanoparticules: Un enjeu majeur pour la santé au travail ? (EDP SCIENCES).

- 76 Hillaireau, H., and Couvreur, P. (2009). Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 66, 2873–2896.
- 77 Hitchcock, D.I. (1925). PROTEIN FILMS ON COLLODION MEMBRANES. *J. Gen. Physiol.* 8, 61–74.
- 78 Horie, M., Kato, H., Fujita, K., Endoh, S., and Iwahashi, H. (2012). In vitro evaluation of cellular response induced by manufactured nanoparticles. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 605–619.
- 79 Hu, Y., Xie, J., Tong, Y.W., and Wang, C.-H. (2007). Effect of PEG conformation and particle size on the cellular uptake efficiency of nanoparticles with the HepG2 cells. *J. Controlled Release* 118, 7–17.
- 80 Huang, J., Bu, L., Xie, J., Chen, K., Cheng, Z., Li, X., and Chen, X. (2010). Effects of nanoparticle size on cellular uptake and liver MRI with polyvinylpyrrolidone-coated iron oxide nanoparticles. *ACS Nano* 4, 7151–7160.
- 81 Hullmann, A. (2006). Who is winning the global nanorace? *Nat. Nanotechnol.* 1, 81–83.
- 82 Ibrahim-Granet, O., Philippe, B., Boleti, H., Boisvieux-Ulrich, E., Grenet, D., Stern, M., and Latgé, J.P. (2003). Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. *Infect. Immun.* 71, 891–903.
- 83 INRS - Particules ultra-fines et santé au travail - Caractéristiques et effets potentiels sur la santé.
- 84 ISO - International Organization for Standardization, 2008, ISO/TS 27687:2008. Nanotechnologies: Terminology and definitions for nano-objects, nanoparticle, nanofibre and nanoplate. Available at: http://www.iso.org/iso/catalogue_detail?csnumber=44278
- 85 ISO - International Organization for Standardization, 2011, ISO/TS 80004:2011 Nanotechnologies - Vocabulary - Part 1: Core terms, and Part 4: Nanostructured materials. Available at: <http://sagaweb.afnor.org/fr-FR/sw/Consultation/Notice/1381627>
- 86 ISO - International Organization for Standardization, 2012, ISO/TR 13014:2012 - Nanotechnologies - Guidance on physico-chemical characterization of engineered nanoscale materials for toxicologic assessment. Available at: http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=52334
- 87 Izak-Nau, E., Voetz, M., Eiden, S., Duschl, A., and Puntès, V.F. (2013). Altered characteristics of silica nanoparticles in bovine and human serum: the importance of nanomaterial characterization prior to its toxicological evaluation. *Part. Fibre Toxicol.* 10, 56.
- 88 Jänicke, R.U., Sprengart, M.L., Wati, M.R., and Porter, A.G. (1998). Caspase-3 Is Required for DNA Fragmentation and Morphological Changes Associated with Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273, 9357–9360.
- 89 De Jong, W.H., Hagens, W.I., Krystek, P., Burger, M.C., Sips, A.J.A.M., and Geertsma, R.E. (2008). Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials* 29, 1912–1919.
- 90 Kaewamatawong, T., Shimada, A., Okajima, M., Inoue, H., Morita, T., Inoue, K., and Takano, H. (2006). Acute and subacute pulmonary toxicity of low dose of ultrafine colloidal silica particles in mice after intratracheal instillation. *Toxicol. Pathol.* 34, 958–965.
- 91 Kar, S., Gajewicz, A., Puzyn, T., and Roy, K. (2014). Nano-quantitative structure-activity relationship modeling using easily computable and interpretable descriptors for uptake of magnetofluorescent engineered nanoparticles in pancreatic cancer cells. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 28, 600–606.
- 92 Karmakar, A., Zhang, Q., and Zhang, Y. (2014). Neurotoxicity of nanoscale materials. *Yao Wu Shi Pin Fen Xi J. Food Drug Anal.* 22, 147–160.
- 93 Keller, A.A., McFerran, S., Lazareva, A., and Suh, S. (2013). Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *J. Nanoparticle Res.* 15, 1–17.

- 94 Kemp, S.J., Thorley, A.J., Gorelik, J., Seckl, M.J., O'Hare, M.J., Arcaro, A., Korchev, Y., Goldstraw, P., and Tetley, T.D. (2008). Immortalization of human alveolar epithelial cells to investigate nanoparticle uptake. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 39, 591–597.
- 95 Kendall, M., Ding, P., and Kendall, K. (2011). Particle and nanoparticle interactions with fibrinogen: the importance of aggregation in nanotoxicology. *Nanotoxicology* 5, 55–65.
- 96 Klein, J.-P., Boudard, D., Cadusseau, J., Palle, S., Forest, V., Pourchez, J., and Cottier, M. (2013). Testicular biodistribution of 450 nm fluorescent latex particles after intramuscular injection in mice. *Biomed. Microdevices* 15, 427–436.
- 97 Kong, L., Mume, E., Triani, G., and Smith, S.V. (2013). Optimizing Radiolabeling Amine-Functionalized Silica Nanoparticles Using SarAr-NCS for Applications in Imaging and Radiotherapy. *Langmuir* 29, 5609–5616.
- 98 De Kozak, Y., Andrieux, K., Villarroja, H., Klein, C., Thillaye-Goldenberg, B., Naud, M.-C., Garcia, E., and Couvreur, P. (2004). Intraocular injection of tamoxifen-loaded nanoparticles: a new treatment of experimental autoimmune uveoretinitis. *Eur. J. Immunol.* 34, 3702–3712.
- 99 Kralj, S., Rojnik, M., Romih, R., Jagodič, M., Kos, J., and Makovec, D. (2012). Effect of surface charge on the cellular uptake of fluorescent magnetic nanoparticles. *J. Nanoparticle Res.* 14.
- 100 Kuschner, M., and Wright, G. (1976). The effect of intratracheal instillation of glass fiber of varying sizes in guinea pigs. *Occup. Expo. Fibrous Glass Proc. Symp.* 151–169.
- 101 Leclerc, L., Boudard, D., Pourchez, J., Forest, V., Sabido, O., Bin, V., Palle, S., Grosseau, P., Bernache, D., and Cottier, M. (2010). Quantification of microsized fluorescent particles phagocytosis to a better knowledge of toxicity mechanisms. *Inhal. Toxicol.* 22, 1091–1100.
- 102 Leclerc, L., Boudard, D., Pourchez, J., Forest, V., Marmuse, L., Louis, C., Bin, V., Palle, S., Grosseau, P., Bernache-Assollant, D., et al. (2012). Quantitative cellular uptake of double fluorescent core-shelled model submicronic particles. *J. Nanoparticle Res.* 14, 1–13.
- 103 Lee, Y.-E.K., and Kopelman, R. (2012). Nanoparticle PEBBLE sensors in live cells. *Methods Enzymol.* 504, 419–470.
- 104 Lesniak, A., Campbell, A., Monopoli, M.P., Lynch, I., Salvati, A., and Dawson, K.A. (2010). Serum heat inactivation affects protein corona composition and nanoparticle uptake. *Biomaterials* 31, 9511–9518.
- 105 Lesniak, A., Fenaroli, F., Monopoli, M.P., Åberg, C., Dawson, K.A., and Salvati, A. (2012). Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells. *ACS Nano* 6, 5845–5857.
- 106 Leung, J.P., Wu, S., Chou, K.C., and Signorell, R. (2013). Investigation of Sub-100 nm Gold Nanoparticles for Laser-Induced Thermotherapy of Cancer. *Nanomaterials* 3, 86–106.
- 107 Li, J.F., Tian, X.D., Li, S.B., Anema, J.R., Yang, Z.L., Ding, Y., Wu, Y.F., Zeng, Y.M., Chen, Q.Z., Ren, B., et al. (2013). Surface analysis using shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy. *Nat. Protoc.* 8, 52–65.
- 108 Li, Q., Mahendra, S., Lyon, D.Y., Brunet, L., Liga, M.V., Li, D., and Alvarez, P.J.J. (2008). Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. *Water Res.* 42, 4591–4602.
- 109 Lidén, G. (2011). The European commission tries to define nanomaterials. *Ann. Occup. Hyg.* 55, 1–5.
- 110 Limbach, L.K., Bereiter, R., Müller, E., Krebs, R., Galli, R., and Stark, W.J. (2008). Removal of oxide nanoparticles in a model wastewater treatment plant: influence of agglomeration and surfactants on clearing efficiency. *Environ. Sci. Technol.* 42, 5828–5833.
- 111 Liu, J.-H., Yang, S.-T., Wang, H., Chang, Y., Cao, A., and Liu, Y. (2012). Effect of size and dose on the biodistribution of graphene oxide in mice. *Nanomed.*
- 112 Liu, W., Rose, J., Plantevin, S., Auffan, M., Bottero, J.-Y., and Vidaud, C. (2013). Protein corona formation for nanomaterials and proteins of a similar size: hard or soft corona? *Nanoscale* 5, 1658–1668.

- 113 Liu, Y., Jiao, F., Qiu, Y., Li, W., Lao, F., Zhou, G., Sun, B., Xing, G., Dong, J., Zhao, Y., et al. (2009). The effect of Gd@C82(OH)22 nanoparticles on the release of Th1/Th2 cytokines and induction of TNF-alpha mediated cellular immunity. *Biomaterials* 30, 3934–3945.
- 114 Lundqvist, M., Stigler, J., Elia, G., Lynch, I., Cedervall, T., and Dawson, K.A. (2008). Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 14265–14270.
- 115 Lunov, O., Syrovets, T., Loos, C., Beil, J., Delacher, M., Tron, K., Nienhaus, G.U., Musyanovych, A., Mailänder, V., Landfester, K., et al. (2011). Differential uptake of functionalized polystyrene nanoparticles by human macrophages and a monocytic cell line. *ACS Nano* 5, 1657–1669.
- 116 Luzio, J.P., Poupon, V., Lindsay, M.R., Mullock, B.M., Piper, R.C., and Pryor, P.R. (2003). Membrane dynamics and the biogenesis of lysosomes. *Mol. Membr. Biol.* 20, 141–154.
- 117 Lynch, I., Cedervall, T., Lundqvist, M., Cabaleiro-Lago, C., Linse, S., and Dawson, K.A. (2007). The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century. *Adv. Colloid Interface Sci.* 134-135, 167–174.
- 118 Ma, M., Chen, H., Chen, Y., Wang, X., Chen, F., Cui, X., and Shi, J. (2012). Au capped magnetic core/mesoporous silica shell nanoparticles for combined photothermo-/chemo-therapy and multimodal imaging. *Biomaterials* 33, 989–998.
- 119 Ma, N., Ma, C., Li, C., Wang, T., Tang, Y., Wang, H., Moul, X., Chen, Z., and Hel, N. (2013). Influence of nanoparticle shape, size, and surface functionalization on cellular uptake. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 13, 6485–6498.
- 120 Majno, G., and Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 146, 3–15.
- 121 Malvindi, M.A., De Matteis, V., Galeone, A., Brunetti, V., Anyfantis, G.C., Athanassiou, A., Cingolani, R., and Pompa, P.P. (2014). Toxicity assessment of silica coated iron oxide nanoparticles and biocompatibility improvement by surface engineering. *PLoS One* 9, e85835.
- 122 Mamaeva, V., Sahlgren, C., and Lindén, M. (2013). Mesoporous silica nanoparticles in medicine--recent advances. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 689–702.
- 123 Markowska, K., Grudniak, A.M., and Wolska, K.I. (2013). Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. *Acta Biochim. Pol.* 60, 523–530.
- 124 Mathe, C., Devineau, S., Aude, J.-C., Lagniel, G., Chedin, S., Legros, V., Mathon, M.-H., Renault, J.-P., Pin, S., Boulard, Y., et al. (2013). Structural Determinants for Protein adsorption/non-adsorption to Silica Surface. *PLoS ONE* 8.
- 125 Maynard, A.D., Aitken, R.J., Butz, T., Colvin, V., Donaldson, K., Oberdörster, G., Philbert, M.A., Ryan, J., Seaton, A., Stone, V., et al. (2006). Safe handling of nanotechnology. *Nature* 444, 267–269.
- 126 McLaughlin, J.K., Chow, W.H., and Levy, L.S. (1997). Amorphous silica: a review of health effects from inhalation exposure with particular reference to cancer. *J. Toxicol. Environ. Health* 50, 553–566.
- 127 Mehravi, B., Ahmadi, M., Amanlou, M., Mostaar, A., Ardestani, M.S., and Ghalandarlaki, N. (2013). Conjugation of glucosamine with Gd3+-based nanoporous silica using a heterobifunctional ANB-NOS crosslinker for imaging of cancer cells. *Int. J. Nanomedicine* 8, 3383–3394.
- 128 Merhi, M., Dombu, C.Y., Brient, A., Chang, J., Platel, A., Le Curieux, F., Marzin, D., Nessler, F., and Betbeder, D. (2012). Study of serum interaction with a cationic nanoparticle: Implications for in vitro endocytosis, cytotoxicity and genotoxicity. *Int. J. Pharm.* 423, 37–44.
- 129 Miksa, M., Komura, H., Wu, R., Shah, K.G., and Wang, P. (2009). A novel method to determine the engulfment of apoptotic cells by macrophages using pHrodo succinimidyl ester. *J. Immunol. Methods* 342, 71–77.
- 130 Milačič R, Murko S, Ščančar J. (2009) Problems and progresses in speciation of Al in human serum: An overview. *Journal of Inorganic Biochemistry* 103(11): 1504-13

- 131 Milani, S., Baldelli Bombelli, F., Pitek, A.S., Dawson, K.A., and Rädler, J. (2012). Reversible versus Irreversible Binding of Transferrin to Polystyrene Nanoparticles: Soft and Hard Corona. *ACS Nano* 6, 2532–2541.
- 132 Mo, Y., and Lim, L.-Y. (2004). Mechanistic study of the uptake of wheat germ agglutinin-conjugated PLGA nanoparticles by A549 cells. *J. Pharm. Sci.* 93, 20–28.
- 133 Mody, K.T., Mahony, D., Cavallaro, A.S., Stahr, F., Qiao, S.Z., Mahony, T.J., and Mitter, N. (2014). Freeze-drying of ovalbumin loaded mesoporous silica nanoparticle vaccine formulation increases antigen stability under ambient conditions. *Int. J. Pharm.* 465, 325–332.
- 134 Monopoli, M.P., Walczyk, D., Campbell, A., Elia, G., Lynch, I., Baldelli Bombelli, F., and Dawson, K.A. (2011). Physical–Chemical Aspects of Protein Corona: Relevance to in Vitro and in Vivo Biological Impacts of Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 2525–2534.
- 135 Monopoli, M.P., Åberg, C., Salvati, A., and Dawson, K.A. (2012). Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat. Nanotechnol.* 7, 779–786.
- 136 Mortensen, N.P., Hurst, G.B., Wang, W., Foster, C.M., Nallathamby, P.D., and Retterer, S.T. (2013). Dynamic development of the protein corona on silica nanoparticles: composition and role in toxicity. *Nanoscale* 5, 6372–6380.
- 137 Munkholm, C., Parkinson, D.R., and Walt, D.R. (1990). Intramolecular fluorescence self-quenching of fluoresceinamine. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 2608–2612.
- 138 Nakata, E., Yukimachi, Y., Nazumi, Y., Uto, Y., Maezawa, H., Hashimoto, T., Okamoto, Y., and Hori, H. (2010). A newly designed cell-permeable SNARF derivative as an effective intracellular pH indicator. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 46, 3526–3528.
- 139 Natte, K., Friedrich, J.F., Wohlrab, S., Lutzki, J., von Klitzing, R., Österle, W., and Orts-Gil, G. (2013). Impact of polymer shell on the formation and time evolution of nanoparticle-protein corona. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 104, 213–220.
- 140 Nel, A.E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E.M.V., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., and Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat. Mater.* 8, 543–557.
- 141 Neuhaus, V., Schwarz, K., Klee, A., Seehase, S., Förster, C., Pfennig, O., Jonigk, D., Fieguth, H.-G., Koch, W., Warnecke, G., et al. (2013). Functional testing of an inhalable nanoparticle based influenza vaccine using a human precision cut lung slice technique. *PloS One* 8, e71728.
- 142 Neuhaus, V., Chichester, J.A., Ebbesen, T., Schwarz, K., Hartman, C.E., Shoji, Y., Guzmán, C.A., Yusibov, V., Sewald, K., and Braun, A. (2014). A new adjuvanted nanoparticle-based H1N1 influenza vaccine induced antigen-specific local mucosal and systemic immune responses after administration into the lung. *Vaccine* 32, 3216–3222.
- 143 Nishikawa, T., Iwakiri, N., Kaneko, Y., Taguchi, A., Fukushima, K., Mori, H., Morone, N., and Kadokawa, J. (2009). Nitric oxide release in human aortic endothelial cells mediated by delivery of amphiphilic polysiloxane nanoparticles to caveolae. *Biomacromolecules* 10, 2074–2085.
- 144 Norde, W. (2008). My voyage of discovery to proteins in flatland ...and beyond. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 61, 1–9.
- 145 Nowacek, A.S., Balkundi, S., McMillan, J., Roy, U., Martinez-Skinner, A., Mosley, R.L., Kanmogne, G., Kabanov, A.V., Bronich, T., and Gendelman, H.E. (2011). Analyses of nanoformulated antiretroviral drug charge, size, shape and content for uptake, drug release and antiviral activities in human monocyte-derived macrophages. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 150, 204–211.
- 146 Nowak, J.S., Mehn, D., Nativo, P., García, C.P., Gioria, S., Ojea-Jiménez, I., Gilliland, D., and Rossi, F. (2014). Silica nanoparticle uptake induces survival mechanism in A549 cells by the activation of autophagy but not apoptosis. *Toxicol. Lett.* 224, 84–92.

- 147 Nune, S.K., Gunda, P., Thallapally, P.K., Lin, Y.-Y., Forrest, M.L., and Berkland, C.J. (2009). Nanoparticles for biomedical imaging. *Expert Opin. Drug Deliv.* 6, 1175–1194.
- 148 Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Kreyling, W., and Cox, C. (2004). Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal. Toxicol.* 16, 437–445.
- 149 Oberdörster, G., Oberdörster, E., and Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113, 823–839.
- 150 Ohkuma, S., and Poole, B. (1978). Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 3327–3331.
- 151 Ostiguy, G.L. (1979). Summary of task force report on occupational respiratory disease (pneumoconiosis). *Can. Med. Assoc. J.* 121, 414–416, 418–421.
- 152 Papahadjopoulos, D., Allen, T.M., Gabizon, A., Mayhew, E., Matthay, K., Huang, S.K., Lee, K.D., Woodle, M.C., Lasic, D.D., and Redemann, C. (1991). Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 11460–11464.
- 153 Park, E.-J., and Park, K. (2009). Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicol. Lett.* 184, 18–25.
- 154 Peng, J., He, X., Wang, K., Tan, W., Wang, Y., and Liu, Y. (2007). Noninvasive monitoring of intracellular pH change induced by drug stimulation using silica nanoparticle sensors. *Anal. Bioanal. Chem.* 388, 645–654.
- 155 Podila, R., Chen, R., Ke, P.C., Brown, J.M., and Rao, A.M. (2012). Effects of surface functional groups on the formation of nanoparticle-protein corona. *Appl. Phys. Lett.* 101, 263701.
- 156 Prasad, B.R., Mullins, G., Nikolskaya, N., Connolly, D., Smith, T.J., Gérard, V.A., Byrne, S.J., Davies, G.-L., Gun'ko, Y.K., and Rochev, Y. (2012). Effects of long-term exposure of gelatinated and non-gelatinated cadmium telluride quantum dots on differentiated PC12 cells. *J. Nanobiotechnology* 10, 4.
- 157 Puzyn, T., Rasulev, B., Gajewicz, A., Hu, X., Dasari, T.P., Michalkova, A., Hwang, H.-M., Toropov, A., Leszczynska, D., and Leszczynski, J. (2011). Using nano-QSAR to predict the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* 6, 175–178.
- 158 Qiu, Y., Liu, Y., Wang, L., Xu, L., Bai, R., Ji, Y., Wu, X., Zhao, Y., Li, Y., and Chen, C. (2010). Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. *Biomaterials* 31, 7606–7619.
- 159 Quignard, S., Mosser, G., Boissière, M., and Coradin, T. (2012). Long-term fate of silica nanoparticles interacting with human dermal fibroblasts. *Biomaterials* 33, 4431–4442.
- 160 Ramshesh, V.K., and Lemasters, J.J. (2012). Imaging of mitochondrial pH using SNARF-1. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 810, 243–248.
- 161 Rapport ANSES, Éléments issus des déclarations des substances à l'état nanoparticulaire, publié en novembre 2013
- 162 Regulating nanotechnology in food and consumer products: Developing a consumer-focused transatlantic approach.
- 163 Rima, W., Sancey, L., Aloy, M.-T., Armandy, E., Alcantara, G.B., Epicier, T., Malchère, A., Joly-Pottuz, L., Mowat, P., Lux, F., et al. (2013). Internalization pathways into cancer cells of gadolinium-based radiosensitizing nanoparticles. *Biomaterials* 34, 181–195.
- 164 Roco, M.C. (2011). The long view of nanotechnology development: the National Nanotechnology Initiative at 10 years. *J. Nanoparticle Res.* 13, 427–445.
- 165 Rose, S., PrevotEAU, A., Elzière, P., Hourdet, D., Marcellan, A., and Leibler, L. (2014). Nanoparticle solutions as adhesives for gels and biological tissues. *Nature* 505, 382–385.
- 166 Roy, I., Ohulchanskyy, T.Y., Pudavar, H.E., Bergey, E.J., Oseroff, A.R., Morgan, J., Dougherty, T.J., and Prasad, P.N. (2003). Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: a novel drug-carrier system for photodynamic therapy. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 7860–7865.

- 167 Ruh, H., Kühl, B., Brenner-Weiss, G., Hopf, C., Diabaté, S., and Weiss, C. (2012). Identification of serum proteins bound to industrial nanomaterials. *Toxicol. Lett.* 208, 41–50.
- 168 Sacchetti, C., Motamedchaboki, K., Magrini, A., Palmieri, G., Mattei, M., Bernardini, S., Rosato, N., Bottini, N., and Bottini, M. (2013). Surface polyethylene glycol conformation influences the protein corona of polyethylene glycol-modified single-walled carbon nanotubes: potential implications on biological performance. *ACS Nano* 7, 1974–1989.
- 169 Sakurai, Y., Tada, H., Gonda, K., Takeda, M., Cong, L., Amari, M., Kobayashi, Y., Watanabe, M., Ishida, T., and Ohuchi, N. (2012). Development of Silica-Coated Silver Iodide Nanoparticles and Their Biodistribution. *Tohoku J. Exp. Med.* 228, 317–323.
- 170 Santhosh, P.B., and Ulrih, N.P. (2013). Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles: promising tools in cancer theranostics. *Cancer Lett.* 336, 8–17.
- 171 Saptarshi, S.R., Duschl, A., and Lopata, A.L. (2013). Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *J. Nanobiotechnology* 11, 26.
- 172 Satulovsky, J., Carignano, M.A., and Szleifer, I. (2000). Kinetic and thermodynamic control of protein adsorption. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 9037–9041.
- 173 Schrurs, F., and Lison, D. (2012). Focusing the research efforts. *Nat. Nanotechnol.* 7, 546–548.
- 174 Schulman, J.H., Stoeckenius, W., and Prince, L.M. (1959). Mechanism of Formation and Structure of Micro Emulsions by Electron Microscopy. *J. Phys. Chem.* 63, 1677–1680.
- 175 Seaton, A., and Donaldson, K. (2012). Nanoscience, nanotoxicology, and the need to think small. *The Lancet* 365, 923–924.
- 176 Seglen, P.O., Gordon, P.B., and Holen, I. (1990). Non-selective autophagy. *Semin. Cell Biol.* 1, 441–448.
- 177 Silience, D.J. (2013). Glucosylceramide modulates endolysosomal pH in Gaucher disease. *Mol. Genet. Metab.* 109, 194–200.
- 178 Simon-Deckers, A., Gouget, B., Mayne-L’Hermite, M., Herlin-Boime, N., Reynaud, C., and Carrière, M. (2008). In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. *Toxicology* 253, 137–146.
- 179 Singh, S.P., Sharma, M., Patel, H., and Gupta, P.K. (2014). Extra cellular pH influences uptake and photodynamic action of pyropheophorbide-a entrapped in folate receptor targeted organically modified silica nanoparticle. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 11, 156–164.
- 180 Song, Y., Li, X., and Du, X. (2009). Exposure to nanoparticles is related to pleural effusion, pulmonary fibrosis and granuloma. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* 34, 559–567.
- 181 Soto, K.F., Murr, L.E., and Garza, K.M. (2008). Cytotoxic responses and potential respiratory health effects of carbon and carbonaceous nanoparticulates in the Paso del Norte airshed environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 5, 12–25.
- 182 Stöber, W., Fink, A., and Bohn, E. (1968). Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J. Colloid Interface Sci.* 26, 62–69.
- 183 Sumer, B., and Gao, J. (2008). Theranostic nanomedicine for cancer. *Nanomed.* 3, 137–140.
- 184 Teng, I.-T., Chang, Y.-J., Wang, L.-S., Lu, H.-Y., Wu, L.-C., Yang, C.-M., Chiu, C.-C., Yang, C.-H., Hsu, S.-L., and Ho, J.A. (2013). Phospholipid-functionalized mesoporous silica nanocarriers for selective photodynamic therapy of cancer. *Biomaterials* 34, 7462–7470.
- 185 Thiberville, L., Salaün, M., Lachkar, S., Dominique, S., Moreno-Swirc, S., Vever-Bizet, C., and Bourghackly, G. (2009). Human in vivo fluorescence microimaging of the alveolar ducts and sacs during bronchoscopy. *Eur. Respir. J.* 33, 974–985.
- 186 Treuel, L., and Nienhaus, G. (2012). Toward a molecular understanding of nanoparticle–protein interactions. *Biophys. Rev.* 4, 137–147.

- 187 Tsuji, J.S., Maynard, A.D., Howard, P.C., James, J.T., Lam, C.-W., Warheit, D.B., and Santamaria, A.B. (2006). Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part IV: risk assessment of nanoparticles. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 89, 42–50.
- 188 Tsuzuki, T. (2009). Commercial scale production of inorganic nanoparticles. *Int. J. Nanotechnol.* 6, 567–578.
- 189 Vallet-Regi, M., and Balas, F. (2008). Silica Materials for Medical Applications. *Open Biomed. Eng. J.* 2, 1–9.
- 190 Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutellingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* 184, 39–51.
- 191 Vonarbourg, A., Passirani, C., Saulnier, P., Simard, P., Leroux, J.C., and Benoit, J.P. (2006). Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake. *J. Biomed. Mater. Res. A* 78, 620–628.
- 192 Walczyk, D., Bombelli, F.B., Monopoli, M.P., Lynch, I., and Dawson, K.A. (2010). What the Cell “Sees” in Bionanoscience. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 5761–5768.
- 193 Walkey, C.D., and Chan, W.C.W. (2012). Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chem. Soc. Rev.* 41, 2780–2799.
- 194 Walkey, C.D., Olsen, J.B., Guo, H., Emili, A., and Chan, W.C.W. (2012). Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 2139–2147.
- 195 Wang, C.-C., Wang, S., Xia, Q., He, W., Yin, J.-J., Fu, P.P., and Li, J.-H. (2013). Phototoxicity of zinc oxide nanoparticles in HaCaT keratinocytes-generation of oxidative DNA damage during UVA and visible light irradiation. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 13, 3880–3888.
- 196 Wang, J., Jensen, U.B., Jensen, G.V., Shipovskov, S., Balakrishnan, V.S., Otzen, D., Pedersen, J.S., Besenbacher, F., and Sutherland, D.S. (2011). Soft interactions at nanoparticles alter protein function and conformation in a size dependent manner. *Nano Lett.* 11, 4985–4991.
- 197 Waters, K.M., Masiello, L.M., Zangar, R.C., Tarasevich, B.J., Karin, N.J., Quesenberry, R.D., Bandyopadhyay, S., Teeguarden, J.G., Pounds, J.G., and Thrall, B.D. (2009). Macrophage Responses to Silica Nanoparticles are Highly Conserved Across Particle Sizes. *Toxicol. Sci.* 107, 553–569.
- 198 Wright, J.D., Hagemann, A., Rader, J.S., Viviano, D., Gibb, R.K., Norris, L., Mutch, D.G., and Powell, M.A. (2006). Bevacizumab combination therapy in recurrent, platinum-refractory, epithelial ovarian carcinoma: A retrospective analysis. *Cancer* 107, 83–89.
- 199 Xia, T., Kovichich, M., Liang, M., Zink, J.I., and Nel, A.E. (2008). Cationic polystyrene nanosphere toxicity depends on cell-specific endocytic and mitochondrial injury pathways. *ACS Nano* 2, 85–96.
- 200 Xia, X.R., Monteiro-Riviere, N.A., Mathur, S., Song, X., Xiao, L., Oldenberg, S.J., Fadeel, B., and Riviere, J.E. (2011). Mapping the surface adsorption forces of nanomaterials in biological systems. *ACS Nano* 5, 9074–9081.
- 201 Yu, S.S., Lau, C.M., Thomas, S.N., Jerome, W.G., Maron, D.J., Dickerson, J.H., Hubbell, J.A., and Giorgio, T.D. (2012). Size- and charge-dependent non-specific uptake of PEGylated nanoparticles by macrophages. *Int. J. Nanomedicine* 7, 799–813.
- 202 Yu, Y., Duan, J., Yu, Y., Li, Y., Liu, X., Zhou, X., Ho, K.-F., Tian, L., and Sun, Z. (2014). Silica nanoparticles induce autophagy and autophagic cell death in HepG2 cells triggered by reactive oxygen species. *J. Hazard. Mater.* 270, 176–186.
- 203 Yue, Z.-G., Wei, W., Lv, P.-P., Yue, H., Wang, L.-Y., Su, Z.-G., and Ma, G.-H. (2011). Surface charge affects cellular uptake and intracellular trafficking of chitosan-based nanoparticles. *Biomacromolecules* 12, 2440–2446.
- 204 Zhang, C., Liu, L., Cui, X., Zheng, L., Deng, Y., and Shi, F. (2013). Chlorine as an indicator in the controllable preparation of active nano-gold catalyst. *Sci. Rep.* 3, 1503.

205 Zhang, X., Li, F., Guo, S., Chen, X., Wang, X., Li, J., and Gan, Y. (2014). Biofunctionalized polymer-lipid supported mesoporous silica nanoparticles for release of chemotherapeutics in multidrug resistant cancer cells. *Biomaterials* 35, 3650–3665.

206 Zhao, F., Zhao, Y., Liu, Y., Chang, X., Chen, C., and Zhao, Y. (2011). Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials. *Small Weinh. Bergstr. Ger.* 7, 1322–1337.

NNT : *Communiqué le jour de la soutenance*

Andréa KURTZ-CHALOT

CELLULAR UPTAKE AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF FLUORESCENT SILICA NANOPARTICLES WITH CONTROLLED SIZE AND SURFACE CHARGE

Speciality : Process engineering

Keywords : nanoparticles, cellular uptake, physico-chemistry, biological activity.

Abstract :

In the 21st century nanotechnologies are growing fast and are continuously evolving. Indeed, high-tech industries rely on remarkable innovations enabled by the new properties of matter at the nanoscale. In addition, the nanomedicine field seems hopeful to cure human health problems such as heart or liver diseases, brain damage or cancers. However, despite expansive scientific efforts the potential risks of nano-objects on human health and on the environment are still poorly understood due to the wide variety of nano-objects. In addition, no consensus about nanotoxicology exists yet, sometimes leading to inhomogeneous and inconsistent findings. In this context, the present study aimed at a better understanding of the nanoparticles biological effects. Fluorescent silica nanoparticles with well-controlled size and surface functionalization were synthesized to study separately the impact of these two physico-chemical characteristics on cell response. Murine macrophages (from the RAW 264.7 cell line commonly used as a reference for nanotoxicology studies) were exposed to the different nanoparticles, and membrane alteration, induction of pro-inflammatory effect and generation of oxidative stress were investigated. In addition, in order to distinguish uptaken nanoparticles from those adsorbed at the cell membrane and to observe phagocytosis over time, methods were developed. Results demonstrated that the studied nanoparticles were not inert. Moreover the biological effects were found to depend on nanoparticles size, surface functionalization and dose.

NNT : *Communiqué le jour de la soutenance*

Andréa KURTZ-CHALOT

INTERNALISATION CELLULAIRE ET EFFETS BIOLOGIQUES DE NANOPARTICULES FLUORESCENTES DE SILICE : INFLUENCE DE LA TAILLE ET DE LA CHARGE DE SURFACE

Spécialité : Génie des procédés

Mots clefs : nanoparticules, internalisation cellulaire, physico-chimie, activité biologique

Résumé :

En ce début de XXIème siècle l'essor des nanotechnologies est indéniable et ne semble pas près de ralentir. En effet, les secteurs industriels de pointe misent sur les innovations remarquables permises par les nouvelles propriétés de la matière à l'échelle nanométrique. De plus, le secteur de la nanomédecine s'avère prometteur pour répondre aux problèmes de santé humaine actuels tels que les affections neurologiques, hépatiques, cardiaques, et les cancers. Cependant, les efforts scientifiques et budgétaires, mis en place pour comprendre les potentiels risques sanitaires des nano-objets pour l'homme et l'environnement, s'avèrent peu fructueux tant la diversité des nano-objets est étendue. De plus, il n'existe pas de consensus réglementaire pour la nanotoxicologie, ce qui entraîne un manque d'homogénéité, et parfois de cohérence, entre les données issues de la recherche. Dans ce contexte, la présente étude porte sur l'amélioration de la compréhension de l'activité biologique des nanoparticules. Des nanoparticules fluorescentes de silice, synthétisées à façon, ont permis d'étudier séparément l'impact de deux de leurs caractéristiques physico-chimiques (taille et fonctionnalisation de surface). L'altération membranaire, la réaction pro-inflammatoire et la génération de stress oxydant induites par la mise en contact des nanoparticules avec une lignée de macrophages murins (cellules RAW 264.7, représentant une lignée de référence en nanotoxicologie) ont été étudiées. En complément, des méthodes permettant de distinguer les nanoparticules internalisées de celles adsorbées à la membrane cellulaire ainsi que d'observer en cinétique la phagocytose, ont été développées. La nature et l'intensité des effets biologiques observés ont montré que les nanoparticules n'étaient pas inertes et que leur impact dépendait bien de leur taille et de leur fonctionnalisation de surface ainsi que de la dose étudiée.