



Nouvelles stratégies pour le traitement des tumeurs chimio et radio-résistantes : Nanodiamants hydrogénés et Solides hybrides poreux. Etude in vitro dans des systèmes 2D et 3D.

Romain Grall

► To cite this version:

Romain Grall. Nouvelles stratégies pour le traitement des tumeurs chimio et radio-résistantes : Nanodiamants hydrogénés et Solides hybrides poreux. Etude in vitro dans des systèmes 2D et 3D.. Sciences pharmaceutiques. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. NNT : 2015PA11T034 . tel-01249597

HAL Id: tel-01249597

<https://theses.hal.science/tel-01249597>

Submitted on 4 Jan 2016

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.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 418 :
DE CANCÉROLOGIE

Laboratoire de Cancérologie Expérimentale, CEA, Fontenay-aux-Roses

THÈSE DE DOCTORAT

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

par

Romain GRALL

Nouvelles stratégies pour le traitement des tumeurs chimio et
radio-résistantes :
Nanodiamants hydrogénés et Solides hybrides poreux.

Etude in vitro dans des systèmes 2D et 3D.

Date de soutenance : 25/06/2015

Composition du jury :

Directeur de thèse :

Sylvie CHEVILLARD

Directeur de Recherche, CEA

Rapporteurs :

Armelle BAEZA
Pierre VERRELLE

Professeur, Université Paris Diderot
Professeur, Institut Curie, Paris

Examineurs :

Sandrine LACOMBE
Jean-François BERNAUDIN

Professeur, ISM, Orsay
Professeur, Hôpital Tenon, Paris

REMERCIEMENTS

“A quoi que ce soit que l'homme s'applique, la nature l'y destinait.”

Denis Diderot - Le neveu de Rameau

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Cancérologie Expérimentale du CEA de Fontenay-aux-Roses. Il a été financé par le Programme national de recherche Environnement Santé Travail 2011 soutenu par l'ANSES et l'ITMO Cancer de l'Alliance pour les Sciences de la vie et de la santé (AVIESAN) en concertation avec l'INCa.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, les rapporteurs Armelle Baeza et Pierre Verelle ainsi que les examinateurs Sandrine Lacombe et Jean-François Bernaudin pour l'intérêt porté à mon travail, pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture du présent manuscrit ainsi que pour leur conseils.

Mon plus grand remerciement est adressé à Sylvie, directrice de cette thèse pour m'avoir offert la possibilité de mener à bien ce projet. Un immense merci pour ta disponibilité, ta patience et pour m'avoir transmis ta rigueur scientifique et ton goût pour la recherche.

Une mention particulière à Vincent, pionner des nanos au sein du laboratoire. Je te dois beaucoup quant à mon apprentissage des rudiments de la toxicologie, pour tes précieux conseils, un grand merci !

Merci à Jozo compagnon de route sur le chemin de la gloire des nanodiamants hydrogénés. Merci pour ta disponibilité et tes conseils toujours avisés. Rendez-vous à Berlin !

Merci également à tous les membres du LCE : Jérôme, Marie-No, Kathy, Sandrine, Maud, Kristelle, François, Nicolas et Emilie. Promis vous ne serez plus dérangés par mes questions saugrenues, mes coups de téléphone inattendus, mes sautes d'humeur et les réflexions sur les odeurs de déjeuner !

Une pensée particulière pour les étudiants du laboratoire croisés pendant ces dernières années : Julie B, Caroline, Julie K, Arnaud, Ivana, Amélie, Benoît et Chloé, c'était quand pas mal !

Merci aux chercheurs du LCD Jean-Charles, Hugues et Tristan pour leur expertise des nanodiamants et gentillesse. Merci également à Patricia et Tania de l'Institut Lavoisier.

Merci à toutes les personnes de l'iRCM : Luis, Sylvie et Jean-Baptiste pour leur patience dans la résolution de nos problèmes de nanos. Egalement Sébastien pour son expertise précieuse en matière d'histologie. Et Vilma pour la réalisation des premières chirurgies, un moment de liberté pendant la rédaction... !

A tous celles et ceux qui ont contribué à ce que ce travail se déroule dans les meilleures conditions possible et que j'aurais oublié de nommer qu'ils soient ici remerciés.

A tous mes « confrères », dijonnais, clermontois, parisiens notamment qui avaient hâte que je termine mes études, et qui regrettaient sitôt posée la question « alors t'en es où dans ta thèse ? », promis, c'est fini !

Enfin à mes parents, sœur et frères pour leur soutien, et la précieuse aide à la relecture un très très grand merci. Et à toi, Céline, pour ta patience, ta présence et ta compréhension durant ces longues et belles années, un immense merci.

TABLE DES MATIERES

<u>TABLE DES ILLUSTRATIONS</u>	<u>3</u>
<u>LISTE DES ABREVIATIONS</u>	<u>5</u>
<u>PREAMBULE</u>	<u>7</u>
<u>DEFINITION DES NANOMATERIAUX</u>	<u>9</u>
HISTORIQUE	9
DEFINITIONS ET APPLICATIONS	10
DEFINITIONS	10
APPLICATIONS	11
<u>NANOPARTICULES POUR LA MEDECINE</u>	<u>15</u>
GENERALITES	15
CIBLAGE	18
ENTREE DES NANOPARTICULES	19
DIFFERENTES CLASSES DE NANOPARTICULES POUR LA MEDECINE	20
NANOTECHNOLOGIES POUR LA VECTORISATION DE MOLECULES ACTIVES	20
NANOTECHNOLOGIES POUR L'IMAGERIE MEDICALE	22
LIPOSOMES	23
MICELLES	23
DENDRIMERES	23
NANOPARTICULES METALLIQUES	24
Oxyde de fer magnétique	24
Or	24
Hafnium	25
<u>MATERIAUX DE L'INSTITUT LAVOISIER (MILS)</u>	<u>27</u>
DEGRADATION	27
SYNTHESE	28
CARACTERISATION	29
TAILLE	30
ENCAPSULATION	31
APPLICATIONS	32
VECTORISATION DE MEDICAMENTS	33
IMAGERIE MEDICALE	34
AUTRES APPLICATIONS	36
<u>LES NANODIAMANTS HYDROGENES</u>	<u>37</u>
SYNTHESE ET PROPRIETES DU DIAMANT A LA TAILLE NANO	37
SYNTHESE	37
PROPRIETES	39
APPLICATIONS MEDICALES DES NDs	40
HYDROGENATION	41
PRINCIPE	41

LA RADIOTHERAPIE	43
LES RAYONNEMENTS IONISANTS	43
Rayonnements électromagnétiques	43
Rayonnements particulaires	44
MECANISMES D’ACTION	45
LIMITATIONS	47
APPORT DES NANODIAMANTS HYDROGENES POUR LA RADIOTHERAPIE	53
MECANISME D’ACTION	53
<u>TOXICOLOGIE DES NANOPARTICULES</u>	<u>57</u>
EXPOSITION HUMAINE	57
PROPRIETES DE SURFACE	59
CARACTERISATION DES NANOPARTICULES	61
ANALYSE DE LA TOXICITE	63
<u>MODELE CELLULAIRE TRIDIMENSIONNEL DE CULTURE DE POUMON</u>	<u>69</u>
ETUDES <i>IN VITRO</i> CLASSIQUES	69
AVANTAGES	70
LIMITATIONS	70
EXPERIMENTATION ANIMALE	72
REGLE DES 3 R	73
MODELES ALTERNATIFS	74
GENERALITES	74
AVANTAGES	74
PRESENTATION DES PRINCIPALES APPROCHES	76
Agrégation cellulaire spontanée	76
Matrices semi-solides biocompatibles	78
Organe ex-vivo	79
Synthèse et perspectives	79
<u>OBJECTIFS GENERAUX</u>	<u>81</u>
<u>RESULTATS</u>	<u>83</u>
LES MATERIAUX DE L’INSTITUT LAVOISIER	83
TOXICOLOGIE DES NANOPARTICULES	121
BIOCOMPATIBILITE DES NANODIAMANTS	121
EFFET TOXIQUE DU DIOXYDE DE TITANE PHOTO-ACTIVE	123
LES NANODIAMANTS HYDROGENES COMME POTENTIALISATEUR DE LA RADIOTHERAPIE	147
DEVELOPPEMENT D’UN MODELE TRIDIMENSIONNEL D’EPITHELIUM PULMONAIRE	149
<u>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</u>	<u>165</u>
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	<u>171</u>

Table des Illustrations

Figure 1 Rosace de la Cathédrale Notre-Dame de Chartres composée de nanoparticules d'or et d'argent de différentes tailles (<i>d'après Horikoshi, 2013</i>).....	9
Figure 2 Echelle Nanométrique (en μm)	11
Figure 3 Domaine d'activité des principales industries investissant dans les nanotechnologies en 2004 (599 compagnies étudiées)	12
Figure 4 Activité catalytique et température de fusion de l'or en fonction de la taille des particules (<i>d'après Lafoui, 2011</i>)	13
Figure 5 Différentes combinaisons pour le développement de nanoparticules pour la médecine (<i>d'après Kai-Hua Chow, et al, 2013</i>)	17
Figure 6 Différentes applications biomédicales envisagées avec les nanotechnologies	17
Figure 7 Description des deux voies d'approche pour le ciblage de nanoparticules vers la tumeur (<i>d'après Raemdonck K, et al, 2014</i>).....	18
Figure 8 Différentes voies d'entrée des nanoparticules dans la cellule (<i>d'après Zhao et al, 2011</i>)	19
Figure 9 a) synthèse des nanoparticules à base d'insuline, b) mécanisme de libération, c) application in vivo (<i>d'après Gu et al, 2013</i>)	22
Figure 10 Description des deux tailles de pores au sein de la structure MIL-100(Fe), depuis l'auto assemblage métallique jusqu'à la structure cristalline (a), et acquisition par MET (échelle=100nm) (<i>d'après Agostina et al, 2013</i>).....	31
Figure 11 a) Courbes de dégradation et de relargage du MIL-100(Fe); b) entrée intracellulaire de l'AZT-TP libre (bleu) ou encapsulée dans MIL-100(Fe) (vert), et dose efficace correspondante (<i>d'après Horcajada et al, 2010 et Agostini et al, 2013</i>)	34
Figure 12 Exemple d'acquisition avant (haut) et après (bas) injection de produit de contraste à base de Gadolinium (<i>Source: Université de Wisconsin-Madison</i>).....	35
Figure 13 Structure cristalline du diamant.....	37
Figure 14 Synthèse de NDs par détonation. a) Explosion entre TNT et RDX. b) Diagrammes de phase des différents états du graphique jusqu'au carbone. c) Etapes de formation des NDs depuis l'explosion jusqu'aux cristaux (<i>d'après Mochalin et al, 2011</i>)	38
Figure 15 Principaux groupements à la surface des NDs issus de détonation (<i>d'après Krueger, 2008</i>).....	40
Figure 16 Montage expérimental permettant l'hydrogénation des NDs (<i>d'après T. Petit</i>)	42
Figure 17 Dose déposée par un faisceau de photons (bleu), électrons (vert) ou protons (rouge) en fonction de la profondeur de tissus traversés (<i>d'après http://cology4u.blogspot.fr</i>)	44
Figure 18 Principales voies de réparation de cassures doubles et simples brins de l'ADN (<i>d'après McKinnon, 2009</i>).....	49
Figure 19 Voies d'induction de sénescence en réponse à un stress génotoxique (<i>d'après Campisi, 2007</i>)	51
Figure 20 Deux modèles proposés pour la progression tumorale (<i>d'après Girouard, 2011</i>).....	53
Figure 21 Génération d'espèces radicalaires par transfert d'électron du photon incident via le nanodiamant hydrogéné (<i>d'après Petit, 2013</i>).....	54
Figure 22 Cycle de vie des nanoparticules	58
Figure 23 Evolution de la surface spécifique en fonction de la taille des particules (<i>d'après Witschger et Fabriès, INRS, 2005</i>)	60
Figure 24 Evolution de la quantité de nanoparticules depuis la solution mère jusqu'à la cellule au fond du puits de culture. SA= Surface Area, #= Nombre de particules (<i>d'après Teeguraden, 2007</i>).....	65
Figure 25 Modèles in vitro et in vivo et leur niveau de complexité et de ressemblance depuis l'Homme jusqu'aux enzymes isolées (<i>d'après Bradon, et al. 2003</i>).....	71

Figure 26 Organisations des cellules dans des modèle 2D et 3D (<i>d'après Yamada et al, 2007</i>)	75
Figure 27 Méthodes d'obtention de sphéroïdes (<i>d'après Breslin et al, 2013</i>)	78
Figure 28 Etapes de formation d'un sphéroïde (<i>d'après Debnath et al, 2005</i>)	78
Figure 29 Efficacité de dépôt de nanoparticules en fonction du compartiment de l'arbre respiratoire (<i>d'après Theophanides 2011</i>).....	80

Tableau 1 Caractéristiques de différents MIL-100 (Fe, Al, Cr) en fonction du solvant utilisé (<i>d'après García Márquez, 2012</i>).....	29
Tableau 2 Description de la structure et de la taille de différents MILs ferriques (<i>d'après Horcajada et al, 2010</i>).....	30
Tableau 3 Capacité d'encapsulation de différentes molécules en fonction du type de MIL Ferrique (<i>d'après Keskin et al, 2011</i>).....	33

Liste des Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AES	Spectrométrie Auger
Al	Aluminium
ALDH	Aldehyde deshydrogenase
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament
ASMR	Amélioration du service médical rendu
ATM	Ataxia telangectasia mutated
ATR	Ataxia telangectasia and Rad3 related
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-Cell CLL/Lymphoma 2
CAT	Catalase
Chk1/2	Cell cycle checkpoint kinase 1/2
Cr	Chrome
CVD	Dépôt chimique en phase vapeur
DCFDA	Dichlorofluoroscein diacetate
DNA-PK	DNA-protein kinase
DLS	Diffraction light scattering
EPR	Enhanced permeability and retention
Fe	Fer
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformé de Fourier
Gy	Gray
H-NDs	Nanodiamants hydrogénés

HAS	Haute autorité de santé
HPHT	Haute pression haute température
IRM	Imagerie par résonnance magnétique
ISO	Internationale standardization organisation
LDH	Lactate deshydrogenase
MEB	Microscopie électronique à balayage
MET	Microscopie électronique à transmission
MILs	Matériaux de l’Institut Lavoisier
MOFs	Metal organic frameworks
NDs	Nanodiamants
Nm	Nanomètre
NO	Monoxyde d’azote
NOX	NADPH-oxygénase
OCDE	Organisation de coopération et de développement économique
PI	Propidium iodure
RDX	Hexogène
ROS	Reactive oxygen species
siRNA	small interfering RNA
SOD	Superoxide dismutase
SP	Side population
SRB	Sulphorhodamine B
SSC	Side scatter chanel
TNT	Trinitrotoluène
UHV	Hydrogénation en condition d’ultra-vide
XPS	Spectrométrie photo-électronique X
XRPD	Diffraction rayons X

Préambule

« Nanoparticules », ce seul mot provoque dans l'esprit de chacun d'entre nous un ensemble d'images, des applications existantes et merveilleuses pour les plus avertis d'entre nous jusqu'à des évocations mystérieuses et lointaines comme celles de planètes les plus reculées, provoquant peur et émerveillement. Derrière cette envolée quelque peu lyrique se cache malgré tout la complexité immense des nanoparticules, de leurs définitions, de leurs propriétés, de leurs innombrables applications, mais également de leur possible effet néfaste sur notre santé et notre environnement.

C'est dans ce contexte d'engouement très fort pour les nanoparticules et les possibilités qu'elles offrent que s'inscrit ce projet. Les propriétés particulières de ces objets, qui seront détaillées dans ce manuscrit, leurs confèrent des capacités d'interaction avec leur environnement tout à fait remarquables. Outre les applications industrielles faisant entrer des nanoparticules dans la composition de produits de notre quotidien, leur utilisation en médecine est très étudiée.

Le domaine de cancérologie voit ainsi des opportunités innovantes pour pallier les limites d'efficacité de certains traitements. En effet, les phénomènes de résistances à ces traitements de certaines cellules cancéreuses est un défi majeur auquel doivent répondre les acteurs de la communauté scientifique. De nombreuses stratégies sont aujourd'hui à l'étude et ont pour but l'augmentation de l'index thérapeutique des traitements et de leur efficacité.

Cependant, avec l'utilisation de ces particules et l'étude de nouvelles application, une interrogation est grandissante : quels sont les effets des nanoparticules sur notre organisme (et dans un second temps sur notre environnement) ? Leur cycle de vie depuis leur synthèse jusqu'à leur destruction ou recyclage en passant par leur utilisation à proprement parler font qu'elles sont aujourd'hui omniprésentes dans notre environnement. Mais cette interrogation demeure sans véritable réponse à cause de la difficulté d'évaluer l'exposition des individus aux nanoparticules, tant sur le plan de la nature des composés que sur celui de la dose. Egalement la nécessité d'harmoniser la toxicologie des nanoparticules pour en clarifier les résultats et permettre une meilleure compréhension de leurs effets biologiques.

Parallèlement à cela, la communauté scientifique et la classe politique mondiales œuvrent depuis de nombreuses années pour rationaliser l'expérimentation animale. Ce mouvement global ne vise pas à supprimer totalement cette activité incontournable de la toxicologie du développement de médicaments. Il encourage cependant à limiter son recours au strict minimum d'un part et à proposer des modèles dit alternatifs d'autre part. Ces modèles doivent permettre des informations prédictives quant aux effets d'un composé vis-à-vis de notre organisme ou à l'efficacité d'un future traitement.

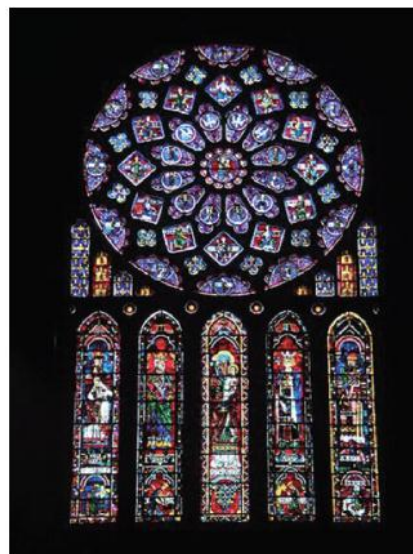
Ce projet divisé en trois parties complémentaires vise à donc à proposer deux nouveaux types de nanoparticules pour enrichir l'arsenal thérapeutique en cancérologie. Cette étude se fera en respectant les règles de bonne pratique en matière d'étude des effets biologiques des nanoparticules. Dans un troisième temps, il vise à développer un modèle alternatif à l'expérimentation animal comme outil innovant pour la toxicologie et la cancérologie.

Définition des nanomatériaux

Historique

Plusieurs études ont montré que l'Homme utilise sciemment et depuis des siècles des nanoparticules. On peut ainsi citer la présence dans des sabres conçus, pour leur défense au moment des croisades il y a plus de 400 ans, par les musulmans de la région de Damas [1]. On constate ainsi que des nanotubes de carbones entrent dans la composition de ces sabres, et cette présence n'est pas due au hasard puisqu'elle résulte de nombreux essais menés par les forgerons afin d'obtenir des armes de la meilleure qualité possible.

Un autre exemple marquant est l'utilisation de nanoparticules d'or pour la fabrication des vitraux des églises. En effet, les propriétés inhérentes à l'échelle nano sont parfaitement illustrées, puisque les nanoparticules d'or changent de couleur en fonction de leur taille. La cathédrale Notre-Dame de Chartres est un des plus beaux exemples avec des nanoparticules d'or et d'argent dont la taille et la forme varient pour donner de multiples couleurs [2].



Red:
Ag (~100 nm, Triangle)

Yellow:
Au (~100 nm, Spheres)

Green:
Au (~50 nm, Spheres)

Light blue:
Ag (~90 nm, Spheres)

Blue:
Ag (~40 nm, Spheres)

Figure 1 Rosace de la Cathédrale Notre-Dame de Chartres composée de nanoparticules d'or et d'argent de différentes tailles (d'après Horikoshi, 2013)

C'est en 1974 que le terme nanotechnologie a été utilisé pour la première fois par le Japonais Norio Taniguchi, pour désigner les procédés qui appartiennent à la conception, la fabrication et l'utilisation des structures à l'échelle du nanomètre.

En 1981, la mise au point du microscope à effet tunnel par les lauréats du prix Nobel de Physique Gerd Binnig et Heinrich Rohrer concrétise cette échelle nanométrique puisque pour la première fois, il sera possible non seulement d'observer les atomes mais également de les manipuler un par un.

La sérendipité a aujourd'hui cédé sa place à la physique et à la chimie permettant, comme nous allons le voir de connaître, comprendre et contrôler la synthèse et l'activité de certaines nanoparticules. Ces activités qui donnent naissance à un grand nombre de composés ont nécessité un long apprentissage dont la première étape a été de définir les nanoparticules et leurs principales propriétés.

Définitions et applications

Définitions

Le terme nanoparticule provient du grec : Nano qui signifie « nain ». On appelle donc nanoparticule un objet de taille nanométrique. On distinguera alors deux grandes classes : les nanoparticules à proprement parler et les nanomatériaux, leur origine étant le facteur clé de distinction entre ces deux groupes. Une explication à cette différence voudrait que les premières aient une origine naturelle et que les secondes soient manufacturées.

Cependant, les définitions restent multiples et afin de les uniformiser, la norme ISO TS/27687 a été établie en 2008 :

« Les nano-objets sont des substances dont au moins une des trois dimensions physiques est comprise entre 1 et 100 nm et qui présente des propriétés spécifiques à l'échelle nanométrique. Un nano-objet ayant trois dimensions dans le domaine nanométrique sera appelé nanoparticule, avec deux dimensions nanofil et avec une dimension nanofeuillet.

Purs ils se présentent sous forme d'agrégats et/ou d'agglomérats de granulométrie moyenne dépassant le micron. Ils peuvent être utilisés en tant que tels (purs) ou intégrés à des matrices solides, liquides ou pulvérulentes. Lorsque les nano-objets sont inclus ou intégrés à la structure d'un matériau, les termes nanomatériaux ou nano-composites sont utilisés »

Le nanomètre (nm), est l'unité de mesure des nanoparticules qui correspond à un milliardième de mètre (10^{-9} m). A titre de comparaison, un atome mesure entre 0,1 et 0,4 nm, une molécule d'ADN 2 nm de diamètre, un virus entre 10 et 100 nm et un cheveu humain entre 50 000 et 100 000 nm.

Les nanosciences sont donc l'étude des phénomènes de taille nanométrique dont les propriétés découlent de cette taille. Les nanotechnologies quant à elles regroupent l'ensemble des techniques permettant de concevoir, produire, caractériser des objets de taille nanométrique et d'en contrôler les paramètres. De ces nanotechnologies naissent des nanomatériaux.

Pour illustrer ces définitions, la Figure 1 situe ces nanoparticules sur une échelle vis-à-vis d'objets connus de notre environnement.

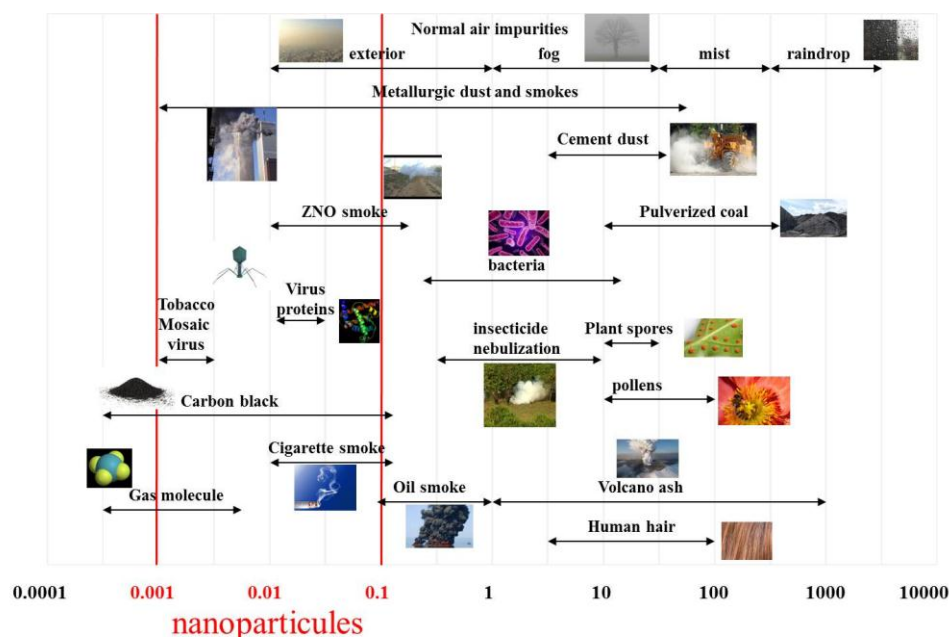


Figure 2 Echelle Nanométrique (en µm)

Applications

Les nanomatériaux sont de nos jours de plus en plus employés, la majorité l'étant dans des applications industrielles tels que des matériaux de construction, des produits cosmétiques ou textiles. L'augmentation de leur utilisation est telle qu'il est aujourd'hui difficile de la quantifier précisément en terme de poids et encore moins en terme de composition. En effet, sous l'impulsion de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) et du programme européen Reach qui a été mis à jour, la déclaration de l'utilisation de nanomatériaux a été rendue obligatoire au 1^{er} Janvier 2013. Cela a permis d'évaluer la quantité de nanomatériaux utilisée en France en 2013 à environ 500 000 tonnes (dont la moitié étant produite sur le territoire, l'autre moitié étant importée). A titre d'illustration de cette augmentation, le marché mondial associé à l'utilisation des nanoparticules est passé de 135 milliards de dollars en 2006 à une prévision de près de 2950 milliards de dollars pour 2015 (Cientifica 2007). Un rapport du cabinet Lux Research estime que les gouvernements et les entreprises ont investi près de 18 milliards de dollars dans les nanotechnologies en 2012, augmentant ces dépenses de 8 % par rapport à 2010. Les Etats-Unis restent largement en tête puisque le gouvernement y a investi 2,1 milliards de dollars en 2012, montant auquel s'ajoute la somme des investissements privés, ce qui porte l'investissement des USA dans les nanotechnologies à 36% du total mondial.

L'engouement pour l'utilisation des nanomatériaux par les industriels vient du fait que chaque type de nanoparticule présente des propriétés physico-chimiques particulières qui leur confèrent bien souvent un avantage sur leurs grandes sœurs de même composition mais de taille micrométrique. Elles seront détaillées plus loin, cependant on peut citer dans le domaine alimentaire les propriétés rhéologiques, de coloration et d'onctuosité des nanoparticules de dioxyde de titane et de silice. Egalement les propriétés antibactériennes de nanoparticules d'argent utilisées dans certains vêtements ou pansements, les nanotubes de carbone dont les propriétés physiques de résistance à la torsion seront un atout pour la fabrication d'objets de sport comme des raquettes de tennis ou des vélos. Les grandes capacités de conductivité de la silice, de nanotubes de carbone ou encore du graphite sont très intéressantes pour l'augmentation des performances de certains composés électroniques. Enfin, en cosmétique, on note la présence de nombreux produits comme la crème solaire, contenant par exemple du dioxyde de titane qui possède de grandes capacités de déviation de la lumière.

Les applications sont donc extrêmement nombreuses, et dans de multiples domaines. Une tentative de recenser l'ensemble des produits commercialisés et contenant des nanoparticules est matérialisée par un site internet : The Nanodatabase (www.nanodb.dk). La tâche est immense et il est vraisemblable que le nombre de produits est sous-estimé même si, à ce jour, 1432 d'entre eux sont parfaitement détaillés.

La Figure 3 permet ainsi d'apprécier la diversité des domaines d'applications. On constate à sa lecture que les domaines de la biologie et de la médecine sont très importants ; nous en détaillerons les applications dans un prochain paragraphe.

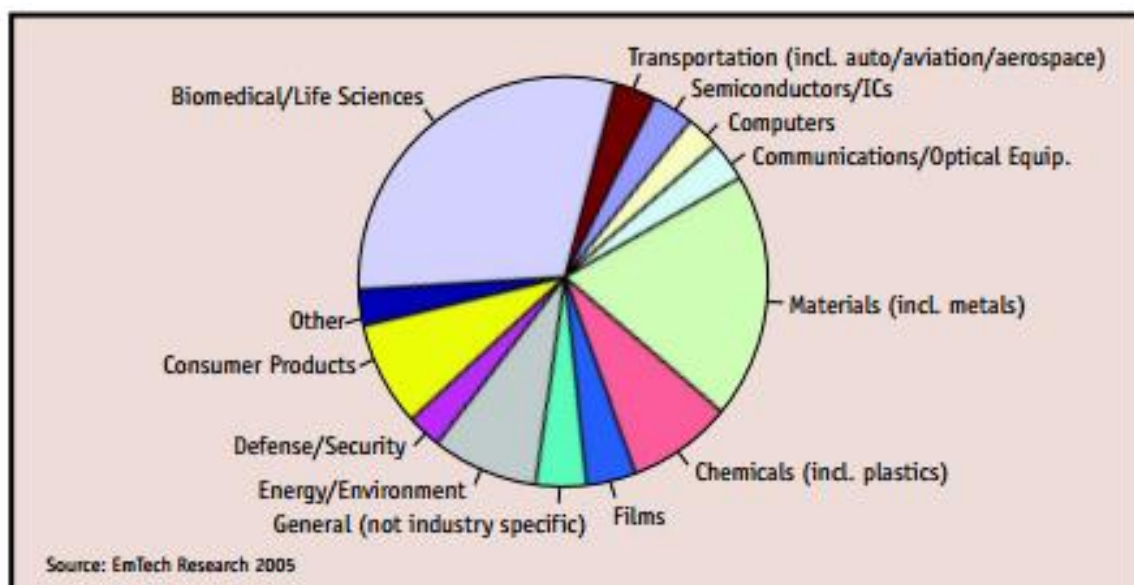


Figure 3 Domaine d'activité des principales industries investissant dans les nanotechnologies en 2004 (599 compagnies étudiées)

Un exemple très marquant des propriétés inhérentes à l'échelle nano est l'or. En effet, ce métal précieux très prisé en orfèvrerie, va voir ses caractéristiques physico-chimiques évoluer en fonction de la taille unitaire et de la forme de ses particules. Ainsi, dans sa forme naturelle micrométrique, l'or est un matériau inerte, d'une couleur jaune si particulière, et dont le point de fusion se situe à 1200 °C. Les nanoparticules d'or de 1 nm de diamètres vont elles être bleues en suspension et présenter une faible réactivité (activité catalytique), avec une température de fusion de 200 °C. En revanche, des nanoparticules d'or de 3 nm de diamètre vont avoir une couleur rouge en suspension ainsi qu'une activité catalytique importante. La Figure 4 présente l'évolution de la température de fusion et de l'activité catalytique de l'or en fonction de la taille des particules.

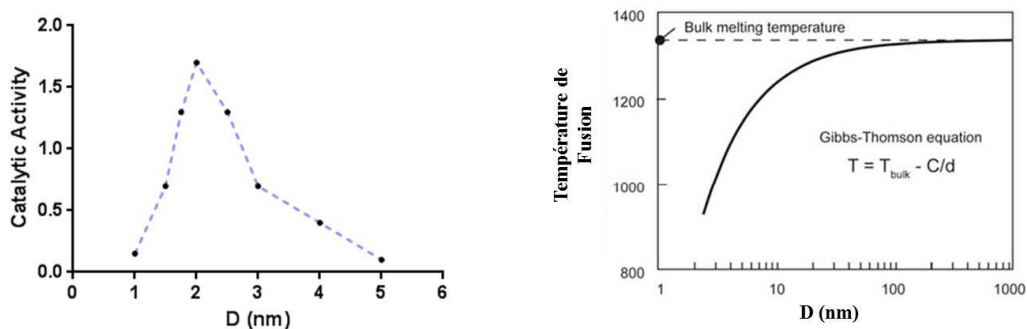


Figure 4 Activité catalytique et température de fusion de l'or en fonction de la taille des particules (d'après Lafoui, 2011)

La conductance de ce métal variera aussi, en fonction de la taille.

Enfin, la forme des particules, pour un diamètre identique, aura une importance puisqu'une suspension de nanoparticules d'or de 14 nm de diamètre en bâtonnets aura une couleur bleu-gris, alors qu'en sphères, la suspension aura une couleur tirant sur le rose.

Cet exemple montre bien à quel point la taille nanométrique confère aux matériaux des caractéristiques complètement différentes de celles possédées à l'échelle micrométrique et l'intérêt qui en découle pour des applications industrielles et médicales.

Dans le cadre de ce travail de thèse, c'est l'application au domaine médical qui nous a intéressé. En particulier la possibilité pour les nanomatériaux d'être internalisés dans des cellules d'organismes vivants et leurs propriétés de surface permettant d'atteindre une cible spécifique. Les champs d'applications sont immenses.

Nanoparticules pour la médecine

Généralités

La définition des nanoparticules ainsi que la description de certaines de leurs caractéristiques physico-chimiques permettent de comprendre l'engouement autour de leur utilisation dans diverses applications. Concernant les applications médicales, le terme de nanomédecine est courant et regroupe les différentes applications des nanotechnologies à la médecine. Cette activité est très multidisciplinaire puisqu'elle nécessite la coopération de biologistes, chimistes, physiciens et cliniciens.

Lorsque l'on parle de nanoparticules pour la médecine, on troque la définition purement législative d'une nanoparticule pour une autre plus pragmatique. On définira alors les nanoparticules comme des structures solides supramoléculaires et de taille submicronique (inférieure à 500nm étant l'idéal). C'est l'Oncologie qui bénéficie de la plus grande attention quant aux applications potentielles, et c'est sur cette aire thérapeutique que nous allons nous concentrer. L'objectif principal est de pallier les principales limites de l'arsenal thérapeutique actuel, que ce soit en chimiothérapie, en radiothérapie en imagerie ou encore pour des approches plus innovantes comme l'immunothérapie. Par exemple, la chimiothérapie classique présente certaines contraintes comme l'accumulation préférentielle nécessaire dans les cellules tumorales, la faible bio-distribution de certaines molécules. L'association aux nanotechnologies aura donc pour but d'augmenter au maximum leur efficacité et l'index thérapeutique [3, 4]. La plateforme idéale reprendrait alors le principe du « Magic Bullet » du Dr. Paul Ehrlich en étant à la fois un véhicule précis et fiable de la molécule vers le site d'intérêt tout en la protégeant d'une rapide dégradation et élimination de l'organisme. Même si de nombreux outils sont aujourd'hui à la disposition de la communauté scientifique, ce composé parfait n'existe toujours pas, bien que certains sortent du lot.

Une des premières publications qui fasse appel à des nanoparticules pour une application médicale date de 1976 [5]. Il y est question d'améliorer la réponse immunitaire et donc l'efficacité d'une vaccination. Des Immunoglobulines G ont été encapsulées dans des micelles, et il a alors été montré *in vitro* une libération prolongée et continue dans le temps sans modifier la structure et l'activité de l'anticorps. Cependant cette approche a longtemps été limitée par la faible biocompatibilité ou encore l'absence de dégradation spontanée des composés utilisés pour la vectorisation ou l'encapsulation [5, 6]. C'est l'apport de la Chimie et de nouveaux composés biodégradables qui a permis une diversification de la synthèse de ces nanoparticules [7-10]. Malgré tout, deux facteurs principaux sont toujours limitants: le taux d'encapsulation qui reste faible et le relargage de la drogue à vectoriser reste trop rapide (phénomène de « burst effect ») [11, 12].

A l'inverse des applications industrielles pour des produits communs, l'utilisation des nanoparticules en médecine tarde à se concrétiser. A ce jour peu de produits ont été mis sur le marché, l'Oncologie étant actuellement le principal champ d'application. On peut ainsi citer Abraxane® associant du paclitaxel et de l'albumine pour le traitement du cancer du sein à un stade métastatique. Egaleme nt Livatag® développé par le groupe pharmaceutique Onxeo qui associe de la doxorubicine à des nano capsules de polyalkycyanoacrylate pour le traitement de certains hépatocarcinomes chimio résistants et qui est actuellement en phase III d'étude clinique.

Dans un registre légèrement différent, une nanoparticule d'oxyde d'hafnium développée par la société Nanobiotix a obtenu récemment un agrément de la FDA et mène actuellement des essais cliniques pour une utilisation comme agent potentialisateur des effets de la radiothérapie [13].

Une approche plus récente consiste à associer deux stratégies en une structure nanométrique. On peut ainsi envisager la combinaison de deux molécules habituellement utilisées en association comme un agent anti-angiogénique et un antitumorale. Cette association a déjà montré un intérêt car l'effet résultant était supérieur à une simple addition des effets de chaque molécule [14].

Récemment, le test de dépistage rapide de contamination par le virus Ebola utilise des nanoparticules d'or greffées à un anticorps complémentaire d'un antigène spécifique du virus. L'agrégation du complexe permet de révéler la positivité de façon rapide et reproductible.

Plus globalement, les approches médicales des nanotechnologies sont nombreuses comme en témoigne la Figure 6 qui recense l'ensemble des études biomédicales aujourd'hui. On constate les outils de diagnostic in vitro et in vivo ont une place importante dans ce diagramme puisque certaines nanoparticules comme par exemple les quantum dots ont des capacités de fluorescence particulières. D'autres, fonctionnalisées ou non, par leur interaction avec la lumière et les champs électromagnétiques constituent d'excellents produits pour l'imagerie biomédicale [15]. Enfin les propriétés de polymérisation, de réactivité de surface ou encore de résistance à la contrainte font de certaines nanoparticules des candidats innovants pour le développement d'implants médicaux ou la médecine régénérative [16].

Les principaux objectifs de l'utilisation des nanotechnologies pour la médecine sont donc de mieux diagnostiquer les pathologies (par imagerie ou par test direct de dépistage), de mieux les soigner (vectorisation de molécules actives, assistance chirurgicale) et enfin de mieux réparer et accompagner (par l'utilisation d'implants miniatures biocompatibles comme une rétine artificielle ou encore un stimulateur cérébral (développé par la société Clnatec®)). Cette révolution technologique doit cependant se faire dans un contexte d'accompagnement éthique et rigoureux de protection du patient.

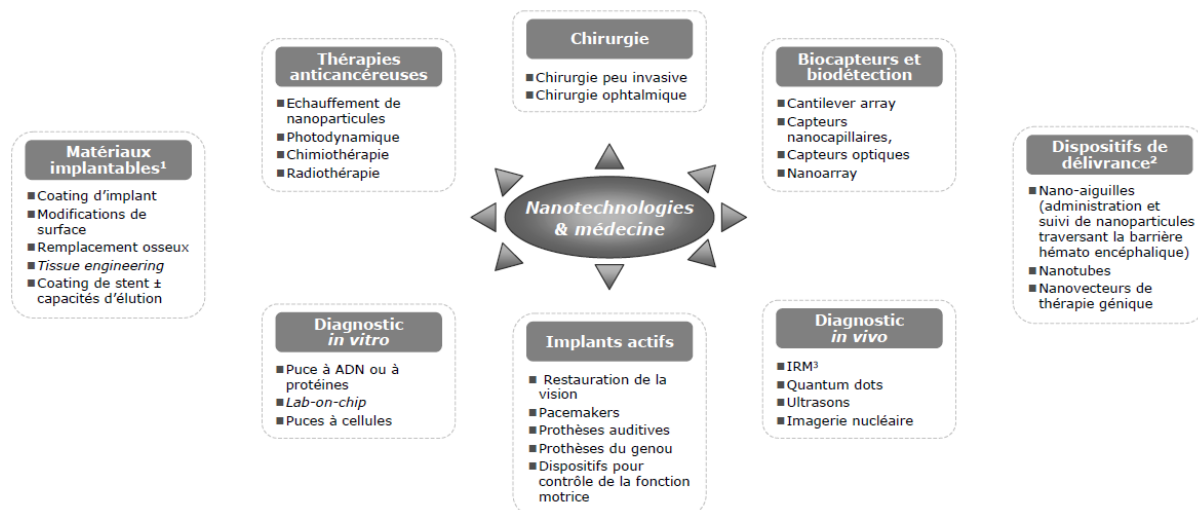


Figure 6 Différentes applications biomédicales envisagées avec les nanotechnologies

La Figure 5 synthétise les différentes combinaisons possibles pour la mise au point de nanoparticules pour des applications médicales. Le choix est donc possible dans le type de matériau, son architecture et surtout sa fonctionnalisation permettant entre autre de faciliter son adressage à la cible.

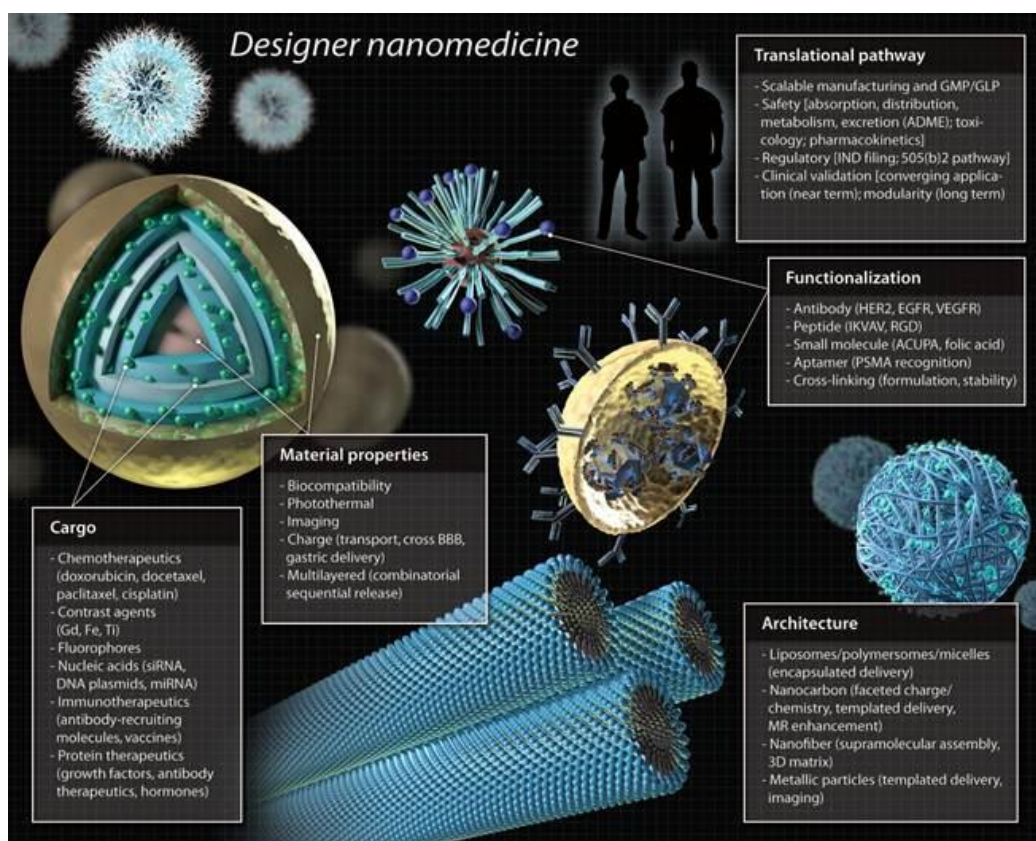


Figure 5 Différentes combinaisons pour le développement de nanoparticules pour la médecine (d'après Kai-Hua Chow, et al, 2013)

Ciblage

Comme nous venons de le voir, les nanoparticules et la chimie qui y est associée permettent de multiplier les approches pour la délivrance de molécules actives ou le ciblage de certaines zones de l'organisme. Pour ce faire, l'adressage des particules et des éventuelles molécules actives qu'elles véhiculent est primordial. Deux types de ciblage sont possibles : le ciblage passif et le ciblage actif.

Le ciblage passif est basé sur une observation : l'accumulation préférentielle de particules et de molécules circulantes dans les tumeurs. Ceci est due à deux choses : d'une part l'augmentation significative de la vascularisation dans et aux abords des tumeurs, un phénomène caractéristique du développement de tumeurs [17]. D'autre part on assiste à une diminution de l'intégrité de la paroi des vaisseaux sanguins, ce qui facilite la sortie des composés du compartiment vasculaire. L'accumulation au sein de la tumeur sera facilitée par l'absence de drainage lymphatique efficace dans cette zone. Cette accumulation facilitée est appelée effet EPR (Enhanced Permeability and Retention) [18].

Cependant, l'accumulation au sein de la tumeur ne garantit pas une entrée de la molécule véhiculée dans les cellules tumorales. Pour cela, la surface des particules peut-être fonctionnalisée par des ligands complémentaires de certains marqueurs spécifiques des cellules tumorales. Ce ciblage actif permet de faciliter l'internalisation intracellulaire des molécules transportées par les nanoparticules [19].

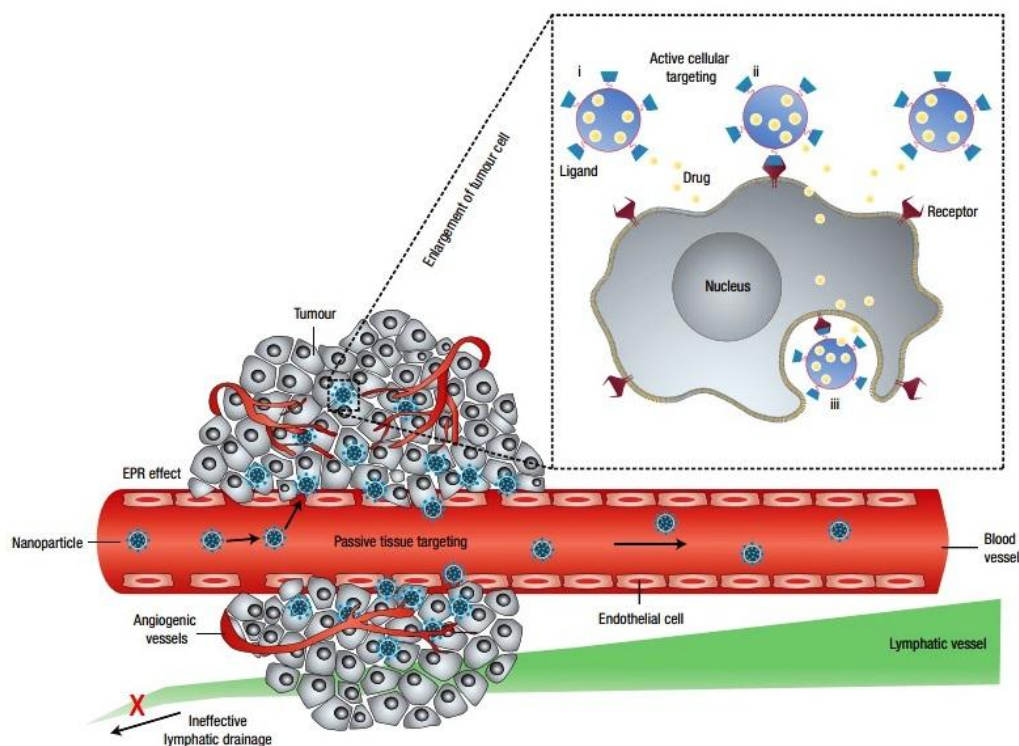


Figure 7 Description des deux voies d'approche pour le ciblage de nanoparticules vers la tumeur (d'après Raemdonck K, et al, 2014)

Entrée des nanoparticules

La membrane cytoplasmique est perméable aux petits composés de taille inférieure à 10 nm. Les petites molécules hydrophobes ou non polaires vont pouvoir diffuser librement au travers de la membrane. Par exemple les acides aminés traversent la membrane de façon active grâce à des transporteurs spécifiques [20]. Les molécules hydrophiles seront internalisées préférentiellement par endocytose [21].

Concernant les nanoparticules, la voie de prédilection semble également être l'endocytose, permettant l'entrée de composés de tailles variées. On observera cependant certaines variantes comme par exemple la pinocytose, la phagocytose ou encore l'endocytose médiée par la cavéole ou la clathrine (Figure 8) [22, 23]. Pour la délivrance ciblée de molécules actives, l'entrée du vecteur qu'est la nanoparticule dans la cellule est un élément important. En effet, comme nous le verrons dans un prochain paragraphe, certains systèmes vont être capables de libérer la molécule transportée dans des conditions particulières de pH notamment.

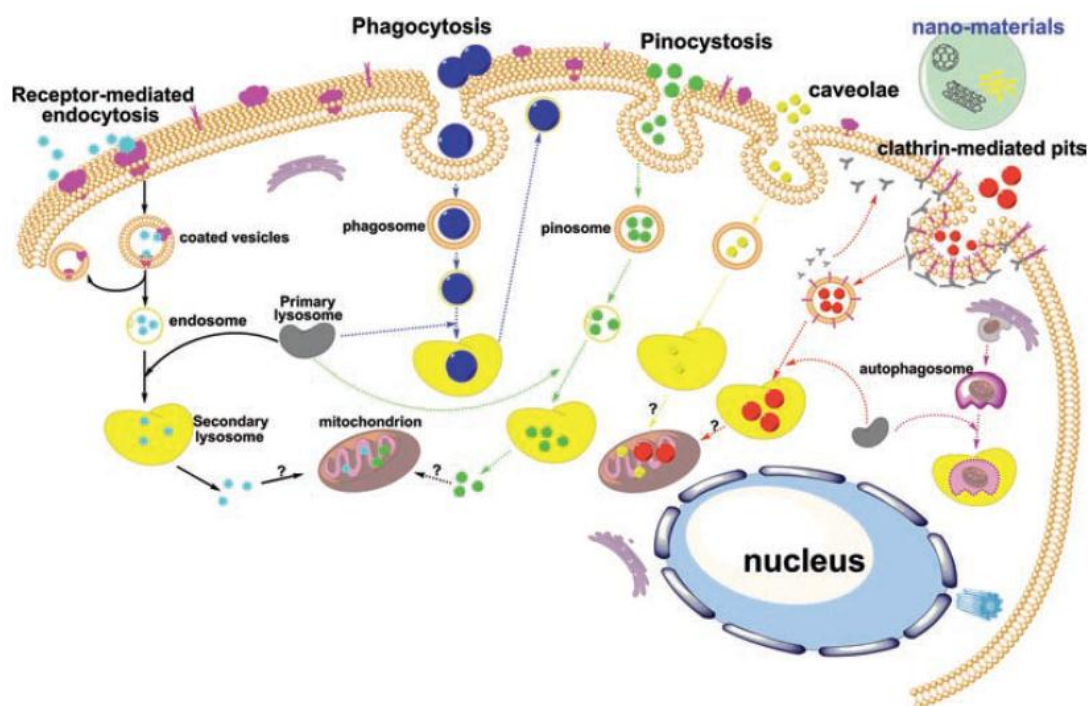


Figure 8 Différentes voies d'entrée des nanoparticules dans la cellule (d'après Zhao et al, 2011)

La limite actuelle de la chimiothérapie anti tumorale est souvent due à l'apparition d'un phénomène de résistance des cellules au traitement. En effet, les cellules tumorales, douées de fortes capacités d'adaptation, vont développer des mécanismes de résistance

parmi lesquels on peut citer l'efflux actif des drogues grâce à des pompes [24, 25]. L'augmentation des doses administrées étant impossible au regard de leur toxicité et de leur non sélectivité vis à vis des cellules tumorales, les nanovecteurs proposent une alternative crédible en véhiculant les drogues de façon sélective jusqu'au cœur des cellules tumorales. La dose ainsi administrée par cellule est augmentée de façon importante. Les mécanismes de résistance n'auraient à priori pas le temps d'être activés, conduisant à la mort de la cellule [26-28].

Nous allons maintenant procéder à un rapide tour d'horizon des différentes classes de nanoparticules aujourd'hui candidates à des applications médicales. Seront rapidement décrites les principales approches ainsi que les avantages et les inconvénients de chacune de ces classes.

Différentes classes de nanoparticules pour la médecine

Comme nous l'avons vu, les champs d'application dans le domaine médical sont multiples. Les deux approches principales dans le domaine thérapeutique et diagnostic sont le transport de molécules actives délivrées de façon spécifique aux différentes cibles (par un ciblage actif ou passif, ou les deux), ainsi que l'optimisation de l'imagerie diagnostic et interventionnelle.

Bien que tous les domaines de la médecine soient concernés par cette révolution, c'est l'oncologie qui bénéficie de la plus grande attention, principalement due au fait des enjeux thérapeutiques. En effet, elle reste une pathologie dont l'étiologie est souvent mal identifiée et pour laquelle il reste de nombreux défis à relever.

Nous aborderons donc dans un premier temps les projets actuellement menés pour l'utilisation de nanoparticules en médecine, puis seront détaillées les principales approches

Nanotechnologies pour la vectorisation de molécules actives

Ce domaine est sans aucun doute celui qui est le plus étudié pour la localisation et le traitement de maladies humaines notamment cancéreuses, infectieuses et génétiques. Plusieurs plateformes sont étudiées, que ce soit par encapsulation à proprement parler des molécules actives au sein de la structure ou bien par adsorption à sa surface, les possibilités sont nombreuses. On trouve ainsi des sphères pleines ou creuses, des polymères, des tubes, des cages poreuses notamment, dont les principaux seront décrits un peu plus loin.

Cependant, c'est le mode de délivrance qui va donner tout son sens à l'objet, plus que l'augmentation de la solubilité de la molécule active ou sa protection vis à vis des mécanismes de détoxification de l'organisme. En effet, la molécule qui va être associée à la nanoparticule pourra être libérée soit par diffusion passive ou lors de la dégradation de celle-ci, soit par des mécanismes beaucoup plus complexes qui sont aujourd'hui de plus en

plus optimisés. On peut ainsi citer la libération en fonction du pH, de la température ou sous l'action d'une enzyme donnée. Quelques mots à propos d'une autre approche qui consiste à utiliser la présence d'une molécule pour la libération du médicament. Prenons l'exemple du glucose dont l'utilisation comme déclencheur de libération est particulièrement intéressant [29]. Des nanoparticules poreuses contenant de l'insuline et un mélange de glucose oxydase et de catalase sont préparées, mélangées à du *m*-dextran et enrobées avec du chitosan donnant des particules chargées positivement ou avec de l'alginate donnant des particules chargées négativement. Ces deux types de particules sont mélangés en quantités égales, les charges opposées conférant à l'ensemble une grande cohésion. La présence de glucose dans l'environnement dans lequel évoluent ces particules a pour conséquence la dégradation du glucose selon la réaction suivante, produisant ainsi de l'acide gluconique et du peroxyde d'hydrogène.



La catalase intervient pour éliminer le peroxyde d'hydrogène produit. L'acide gluconique quant à lui va dissoudre le dextran, libérant alors l'insuline. La Figure 9 synthétise cette approche, dont l'efficacité a été montrée dans une souris permettant de normaliser sa glycémie.

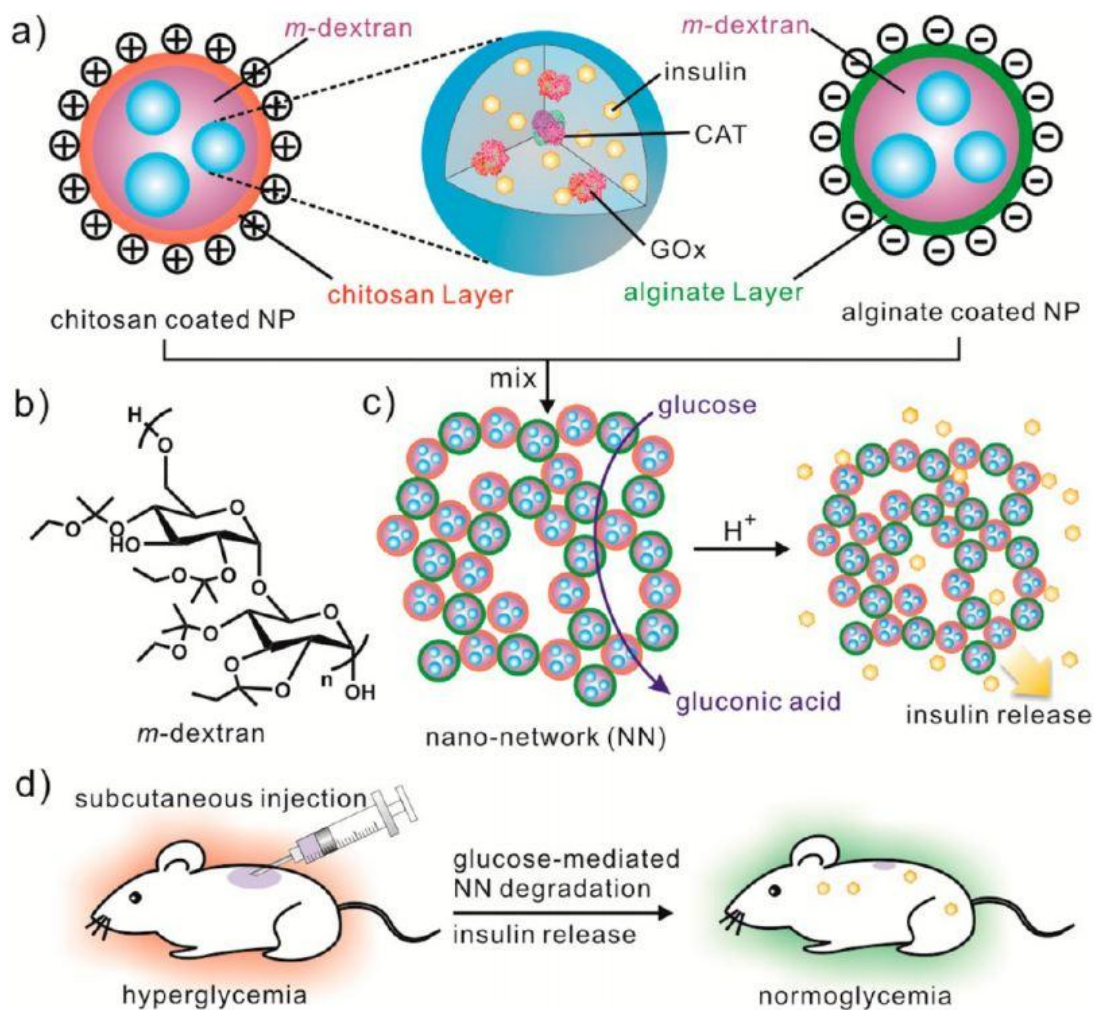


Figure 9 a) synthèse des nanoparticules à base d'insuline, b) mécanisme de libération, c) application in vivo (d'après Gu et al, 2013)

Nanotechnologies pour l'imagerie médicale

Un autre domaine médical pour lequel les nanoparticules présentent un intérêt important est l'imagerie. Pour cela différentes approches sont étudiées. La première consiste à fonctionnaliser les nanoparticules avec des molécules fluorescentes, associées ou non à un ciblage actif. Ce type d'approche a deux limites principales. La première est la faible pénétration intra tissulaire de la fluorescence, la deuxième est l'auto fluorescence importante de l'organisme, autant dans le vert que dans le rouge. C'est pourquoi des applications impliquant de travailler dans le proche infrarouge permettent d'obtenir de meilleurs résultats [30, 31].

Une autre approche consiste à utiliser les propriétés intrinsèques de nanoparticules pour augmenter le signal en imagerie médicale. L'exemple le plus courant est l'utilisation de nanoparticules métalliques et magnétiques comme agent de contraste pour l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) dont nous détaillerons le principe dans un prochain paragraphe [32].

Cependant, l'utilisation des nanoparticules pour l'imagerie ne se limite pas au diagnostic médical puisque plusieurs équipes étudient l'utilisation de nanostructures comme assistance chirurgicale [33].

Pour exemple l'équipe du Pr van Dam qui a développé une technique permettant de marquer spécifiquement les cellules ovariennes cancéreuses sur-exprimant le récepteur α à l'acide folique. Ils ont développé un complexe alliant une molécule d'acide folique à une molécule fluorescente [34]. Un système semblable à un microscope à fluorescence placé au-dessus du champ opératoire permet au chirurgien responsable de la résection de la tumeur d'identifier les cellules cancéreuses et de s'assurer qu'il n'en laisse aucune.

Cette brève introduction ainsi que ces quelques exemples illustrent les multiples possibilités d'applications dans le domaine médical. Voici maintenant la description de quelques-uns des composés les plus étudiés aujourd'hui, ainsi que leurs applications potentielles.

Liposomes

Les liposomes ont été parmi les premières structures nanométriques à être étudiées pour la vectorisation de molécules actives [35]. Composés d'une bicouche lipidique auto assemblées semblable à celle des membranes cytoplasmiques, ils présentent le grand avantage de pouvoir transporter des molécules hydrophiles comme hydrophobes [36]. Il a ainsi été étudié le comportement de ces liposomes quand ils étaient chargés par diverses molécules utilisées en chimiothérapie comme la doxorubicine [37], la vincristine [38], le paclitaxel [39] ou encore l'irinotecan [40]. La fonctionnalisation de surface de ces structures est possible, notamment par le polyéthylène glycol (PEG) qui permet d'augmenter la bio distribution des liposomes [41].

Micelles

Comme les liposomes, la micelle est composée de molécules amphiphiles auto assemblées mais en mono couche cette fois. Elle présente ainsi un cœur hydrophobe et une surface hydrophile [42]. Leur méthode de synthèse permet d'une part d'obtenir des particules de petite taille (entre 10 et 100 nm) et d'autre part de véhiculer des molécules faiblement hydrophiles [43] ou une drogue hydrophobe au cœur de la structure tout en garantissant une bonne demi-vie plasmatique [44].

Dendrimères

Les dendrimères sont des macromolécules constituées de monomères qui s'associent selon un processus arborescent autour d'un cœur central plurifonctionnel. On a ainsi la formation d'un réseau sphérique de ramifications ayant toutes la même origine [45]. Deux types de méthodes de synthèse peuvent être employés pour obtenir des dendrimères : la

synthèse divergente qui s'effectue du cœur vers la périphérie, en greffant un nombre plus en plus grand de petites molécules sur la surface multi fonctionnalisée du dendrimère. A l'inverse la synthèse convergente consiste à construire le dendrimère de la périphérie vers le cœur à l'aide de fragments dendritiques appelés dendrons qui sont rattachés lors d'une étape finale à un cœur plurifonctionnel [46, 47]. Leur surface, constituée de l'extrémité des monomères est fonctionnalisable selon les besoins d'adressage avec par exemple des molécules d'acide folique [48]. Les molécules actives à véhiculer sont placées dans le réseau des monomères, proche du cœur ou liées à la surface des dendrimères [49].

Nanoparticules métalliques

Oxyde de fer magnétique

Les nanoparticules d'oxyde de fer possèdent de nombreuses applications potentielles en biologie et en médecine. En effet, via une fonctionnalisation organique ou inorganique de la surface des nanoparticules synthétisées, il est possible d'y ajouter diverses molécules, que ce soit des anticorps (pour la séparation de cellules par exemple) ou des molécules actives (pour l'adressage spécifique de chimiothérapie anticancéreuse) [50]. Elles peuvent également être utilisées pour de l'imagerie comme agent de contraste en IRM [51]. Pour ces deux types d'application, un champ magnétique est utilisé pour faciliter l'accès et l'accumulation des particules magnétiques dans les zones souhaitées (la tumeur par exemple dans le cas de la vectorisation de drogues) [52].

L'application la plus particulière de ces nanoparticules est l'hyperthermie. Ce type de traitement n'est pas récent puisqu'Hippocrate préconisait déjà cette approche en cautérisant la surface des tumeurs. L'utilisation des nanoparticules magnétiques permet une mise en œuvre moins radicale et plus efficace. Une fois que les nanoparticules ont atteint leur cible, un champ magnétique variable est appliqué autour de cette zone. L'agitation magnétique des particules va engendrer une production très localisée de chaleur (43°C) à laquelle les cellules cancéreuses sont très sensibles [52, 53]. La seule interrogation qui réside autour de l'utilisation de ce type de nanoparticules est leur bio persistance, puisque qu'elles ont montré un certain degré de toxicité, limité par la modification de la surface avec du PEG notamment [54].

Or

Les nanoparticules d'or possèdent également de multiples capacités pour des utilisations en oncologie. Elles peuvent être obtenus dans différentes formes (sphères, bâtonnets, coques ou encore cages) selon les applications souhaitées [55]. La toxicité de ces particules est mal définie mais il semble qu'elle soit dépendante de leur taille et de leur forme, avec une taille critique comprise entre 8 et 37 nm pour laquelle une cytotoxicité importante est observée [56, 57]. Par ailleurs elles sont capables, par des liaisons covalentes ou non, de recevoir à leur surface un grand nombre de molécules, que ce soit pour la vectorisation de drogues anticancéreuses, l'imagerie médicale ou encore la radio

sensibilisation [55-60] qui semble être un terrain de prédilection pour les métaux précieux comme l'or qui permettent d'augmenter le nombre d'électrons d'Auger obtenus par l'irradiation [61-63]

Hafnium

L'Hafnium présente l'intérêt de posséder une densité électronique qui lui permet d'interagir de façon importante avec les photons de la radiothérapie. Comme abordé précédemment ces particules ont été utilisées notamment comme potentialisateur des effets de la radiothérapie par la société Nanobiotix®.

A la lecture de ces descriptions, plusieurs points peuvent être soulignés. Premièrement, les nanoparticules, par leurs caractéristiques intrinsèques et leur nature physico-chimique ouvrent le champ à de multiples applications dans le domaine de la cancérologie : l'imagerie, le diagnostic des pathologies et leur traitement. Sous la forme de particules beaucoup plus complexes qui présentent à la fois des capacités de ciblage associées à des molécules actives ou des agents de contrastes ou encore qui sont capables d'interagir avec la radiothérapie est une activité en pleine expansion appelée théranostique [64-66].

Deuxièmement, l'utilisation de toutes ces nanoparticules n'a qu'un seul et même but : augmenter l'efficacité des thérapies actuelles, que ce soit en chimiothérapie ou en radiothérapie. Ceci afin de permettre une diminution des doses tout en conservant voir en améliorant la réponse biologique au traitement et finalement en réduisant la toxicité associée aux traitements actuels.

Cependant, malgré l'explosion spectaculaire du nombre de publications sur ce sujet appelé communément nanomédecine, la prudence est de mise car à part quelques particules qui semblent montrer des résultats intéressants, l'équation parfaite ne semble toujours pas avoir été trouvée. Si on prend l'exemple de l'Abraxane® préconisé dans le cas de cancer du sein métastatique en deuxième ligne, son efficacité a été montrée avant l'obtention de son autorisation de mise sur le marché. Il a été reconnu par la Haute Autorité de Santé (HAS, prédécesseur de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament, ANSM) comme ayant un service médical rendu (SMR) important (le plus élevé des quatre niveaux de ce baromètre évaluant la performance d'un médicament). En revanche l'amélioration du service médical rendu (ASMR) en comparaison du Taxol® traitement de référence dans ce cas, a été jugé mineur (le plus faible des quatre niveaux d'évaluation du progrès thérapeutique).

Troisièmement, dans le cas de la vectorisation de molécule active ou de produits de contraste, le reproche récurrent est la faible capacité d'encapsulation des nanoparticules puisque dans les plupart des cas, elle ne dépasse pas 5 % en poids de drogue du poids de nanoparticules [12]. Dès lors, l'utilisation d'un ciblage passif pour véhiculer les molécules (en

utilisant l'effet EPR par exemple [67, 68]) montrera ses limites puisque la quantité de nanoparticules nécessaires à l'obtention d'un effet pharmacologique sera très important. Le risque de voir apparaître des effets toxiques des nanoparticules ou secondaires indésirables de la molécule sera augmenté également. Deux possibilités sont alors envisageables, modifier la nanoparticule pour augmenter sa capacité d'encapsulation ou pratiquer un ciblage actif [36].

Concernant la capacité d'encapsulation des particules, plusieurs matériaux semblent montrer des résultats intéressants. On peut notamment citer les solides hybrides poreux de base métallique déjà connus depuis de nombreuses années sous leur forme micrométrique pour leurs hautes capacités d'adsorption [69, 70] et dont la version nanométrique offre de nouvelles perspectives dans le domaine médicale [71].

Une des approches également pour l'étude de certaines nanoparticules (d'or ou d'hafnium notamment) est l'utilisation de leurs propriétés physico-chimiques pour interagir avec l'irradiation pour en potentialiser l'effet. Les nanodiamants ont montré des propriétés intéressantes pour des applications médicales notamment l'absence de toxicité [72]. Ils sont de bons candidats par la possibilité de modifier aisément leur surface et ils présentent le grand intérêt d'un faible coût de production [73].

Nous allons maintenant détailler ces deux types de nanoparticules qui ont été étudiées au cours de ce travail.

Le premier est une cage polymérique produit par l'Institut Lavoisier (MILs) permettant l'encapsulation d'une quantité importante de molécules actives. La biocompatibilité de ces composées associée à cette capacité d'encapsulation innovante en fait un candidat intéressant pour la vectorisation de médicaments.

Le second est une particule de diamant dont les propriétés de surface vont être utilisées pour potentialiser les effets de l'irradiation. Ainsi, la non toxicité intrinsèque du diamant associée à une chimie de surface contrôlée lui confère un intérêt tout particulier pour la radiosensibilisation de cellules cancéreuses radiorésistantes.

Matériaux de l'Institut Lavoisier (MILs)

Ces matériaux sont ainsi nommés car créés, développés, caractérisés et optimisés à l'Institut Lavoisier de l'Université de Versailles. Ils font partie de la famille des solides hybrides poreux cristallisés ou Metal-Organic Frameworks (MOFs).

Ces composés constitués de l'assemblage régulier d'ions métalliques et de ligands organiques, ont déjà démontré leurs aptitudes pour des applications médicales comme la vectorisation de médicaments ou l'imagerie grâce à leurs propriétés spécifiques sur lesquelles nous reviendrons.

Les MOFs sous leur forme nanométrique (ou NanoMOFs, (NMOFs)) sont formés par l'auto-assemblage d'ions métalliques formant des nœuds et reliés entre eux par des ligands acides organiques. La synthèse peut être réalisée selon plusieurs protocoles, allant de la simple mise en contact de la partie inorganique du composé avec la partie organique, jusqu'à l'utilisation de conditions de températures et de pression particulières en passant par un système d'émulsion inversée [74, 75]. Ainsi, en fonction du type de synthèse, du métal et du ligand organique choisis, le composé obtenu sera singulier et les combinaisons sont déclinables à volonté [76].

Dégradation

Une des particularités des MOFs et donc des MILs est leur biodégradabilité spontanée. En effet les composés, placés dans des conditions biologiques vont spontanément et régulièrement perdre leur architecture, le réseau cristallin se désagrégeant progressivement en libérant les composant organiques et inorganiques. Ceci est extrêmement avantageux pour les applications médicales puisqu'il permet d'éviter le phénomène de bioaccumulation observé pour certaines particules dont l'élimination rénale est difficile, la taille étant un facteur important de leur pharmacocinétique [77, 78]. Il est cependant nécessaire de poser la question de la toxicité, non seulement des structures entières mais également, à plus long terme, des composés issus de la dégradation de celles-ci afin de confirmer leur biocompatibilité. Notons toutefois que le relargage des molécules encapsulées suit une cinétique différente de celle de la dégradation, démontrant l'intérêt de telles structures pour la vectorisation de molécules actives.

Vont maintenant être détaillées les différents modes de synthèses des MILs, leurs caractéristiques physico-chimiques ainsi que les applications possibles de ces composés. Par la nature du type d'architecture et le nombre important de déclinaisons, une famille a été particulièrement étudiée lors de ce projet : le MIL-100.

Synthèse

La synthèse des MILs est qualifiée de « synthèse verte » car elle ne fait appel à aucun solvant organique comme cela est le cas classiquement pour les NMOFs ; ici l'eau est le seul solvant utilisé ce qui est donc parfaitement compatible avec une utilisation médicale [79].

Le principe de base de la synthèse de ces composés est le même : un chauffage par micro-ondes qui conduit à la cristallisation des nanoparticules, dans des conditions aqueuses, une étape de lavage avant un séchage pour l'obtention des nanoparticules sous forme de poudre.

Le premier constituant est la partie inorganique représentée par des ions métalliques trivalents auto-assemblés sous la forme de trimères. Dans le cas du MIL-100, on peut citer trois métaux principalement utilisés : le fer (Fe), l'aluminium (Al) et le chrome (Cr), qui forment trois sous familles : MIL-100(Fe), MIL-100(Al) et MIL-100(Cr) respectivement.

Le deuxième constituant est la partie organique représentée par un acide. Le choix de l'acide sera d'une grande importance puisqu'il va déterminer la forme, la taille et surtout la structure du composé synthétisé [80]. Et ainsi sa capacité à créer une ou plusieurs liaisons avec la partie métallique du MIL. Dans le cas du MIL-100, c'est l'acide trimésique qui est utilisé.

La mise en contact de ces deux parties dans les conditions optimales de la synthèse va donner lieu à la formation d'un super-tétraèdre composé de quatre trimères métalliques aux angles, reliés entre eux par quatre molécules d'acide formant les faces du tétraèdre [81]. Ces super-tétraèdres vont ensuite s'assembler pour former des pores, de deux tailles différentes (décrit ci-dessous), lesquels s'assemblent à leur tour pour former un réseau cristallin régulier [82]. Les particules obtenues sont ensuite lavées afin d'ôter les résidus de phase organique et déshydratés afin d'obtenir une poudre.

Dans le cas du MIL-100 et de ses trois déclinaisons avec une base de fer, d'aluminium ou de chrome même si le principe de base de la synthèse de ces composés est le même, une adaptation des différentes étapes a été réalisée afin d'obtenir des nanoparticules présentant le meilleur équilibre entre taille, pureté et cristallinité [79]. Ainsi, la température de synthèse varie pour chacun des trois composés (130°C pour MIL-100(Fe), 210°C pour MIL-100(Al) et 200°C pour MIL100-(Cr)), ainsi que la vitesse d'atteinte de cette température et celui de la réaction en elle-même.

Le choix de l'enceinte micro-onde pour la synthèse apporte plusieurs avantages par rapport aux techniques de chauffages classiquement utilisées pour la synthèse des MOFs. On obtient un temps de chauffage qui est modulable et plus court, et surtout la température est homogène dans toute l'enceinte. L'apport de cette technologie est important au niveau de la taille et de la structure des particules synthétisées. Car la première étape de la synthèse est

la formation des super-tétraèdres qui seront ensuite assemblés lors de l'étape de cristallisation. C'est le temps mis pour atteindre la température de synthèse qui définit la taille des super-tétraèdres, une fois la température adéquate atteinte, la cristallisation a lieu. Le chauffage rapide par micro-onde a permis de raccourcir la phase de chauffage et de réduire la taille des super-tétraèdres, donc des particules finales [83].

Le solvant de synthèse ainsi que celui utilisé pour la remise en suspension a également une importance comme on peut le voir dans le **Tableau 1**.

MIL-100	S.S. ^[a]	D.S. ^[b]	P.S. ^[c] [nm]	PDI	ζ ^[d]	S_{BET} [m ² g ⁻¹]	V_p ^[e] [cm ³ g ⁻¹]
Al	water	water	585 ± 150	0.33	+9.7	1700	0.99
		ethanol	565 ± 75	0.33	+33.1		
Cr	water	water	142 ± 63	0.24	-14.6	1400	0.98
		ethanol	80 ± 41	0.13	+32.4		
		methanol	106 ± 47	0.38	-		
Fe	water	water	139 ± 25	0.11	+25.8	1350	0.86
		ethanol	168 ± 10	0.07	+29.7		
	water/	water	110 ± 25	0.13	+18.2	860	0.83
	ethanol 80:20	ethanol	119 ± 11	0.12	+36.0		

[a] Synthesis solvent. [b] Dispersion solvent. [c] Particle size. [d] ζ zeta potential. [e] Pore volume.

Tableau 1 Caractéristiques de différents MIL-100 (Fe, Al, Cr) en fonction du solvant utilisé (d'après García Márquez, 2012)

Une fois le composé obtenu, il peut alors être caractérisé. Cela comprend une étude de la cristallinité et de la structure par diffraction rayons X (XRPD), spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et microscopie électronique (MET ou MEB). On étudie également la taille des particules (DLS) ainsi que leur potentiel ζ (Zêta)[79]

Caractérisation

Le **Tableau 2** illustre la multiplicité des combinaisons pour la synthèse des MILs et les particularités des nanoparticules obtenues. On constate que plusieurs paramètres majeurs vont dépendre de la synthèse et du type de ligand utilisé.

Table 1 | Structure description, particle size, drug loading (wt%) and entrapment efficiency (below the drug loading values in parentheses, wt%) in several porous iron(III) carboxylate nanoparticles.

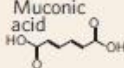
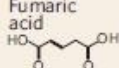
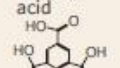
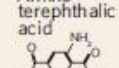
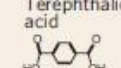
	MIL-89	MIL-88A	MIL-100	MIL-101_NH ₂	MIL-53
Organic linker					
Crystalline structure					
Flexibility	Yes	Yes	No	No	Yes
Pore size (Å)	11	6	25 (5.6) 29 (8.6)	29 (12) 34 (16)	8.6
Particle size (nm)	50-100	150*	200	120	350*

Tableau 2 Description de la structure et de la taille de différents MILs ferriques (d'après Horcajada et al, 2010)

Taille

En premier lieu, la nature du ligand organique utilisé détermine la structure cristalline du composé [80]. En effet, les cinq acides utilisés dans cette étude sont à la base des cinq principales sous-familles de MILs. De la structure cristalline va dépendre la taille et l'organisation du maillage. La taille nominale des différentes sous-familles varie donc de 50 nm pour la MIL-89 à 350 nm pour la MIL-53. La taille des pores est également régit par la cristallinité de la structure et le type de ligand, mais n'est cependant pas dépendante de la taille générale du MIL. Concernant le MIL-100 qui nous intéresse plus particulièrement, on distingue deux tailles de pores celles dont le diamètre interne est de 25 Å (constitué de 20 super-tétraèdres) et celles de 29 Å (constitué de 28 super-tétraèdres). La Figure 10 montre l'organisation de ces deux types de pores dans la structure générale du MIL-100 [82]. La taille des pores des MIL-100 est d'ailleurs remarquable puisqu'elle est habituellement retrouvée dans des matériaux mésoporeux dont la structure est amorphe au contraire des MILs qui sont cristallins [84]; le MIL-100 a été le premier solide cristallin qualifié de poreux [82]. Cette porosité confère au MIL-100 une surface spécifique exceptionnelle puisqu'elle est estimée entre 1500 et 2000 m²/g (mesurée selon le technique BET (Brunauer–Emmett–Teller) qui consiste à mesurer cette surface en fonction de sa capacité d'absorption d'un gaz comme le CO₂ par exemple) [85-87].

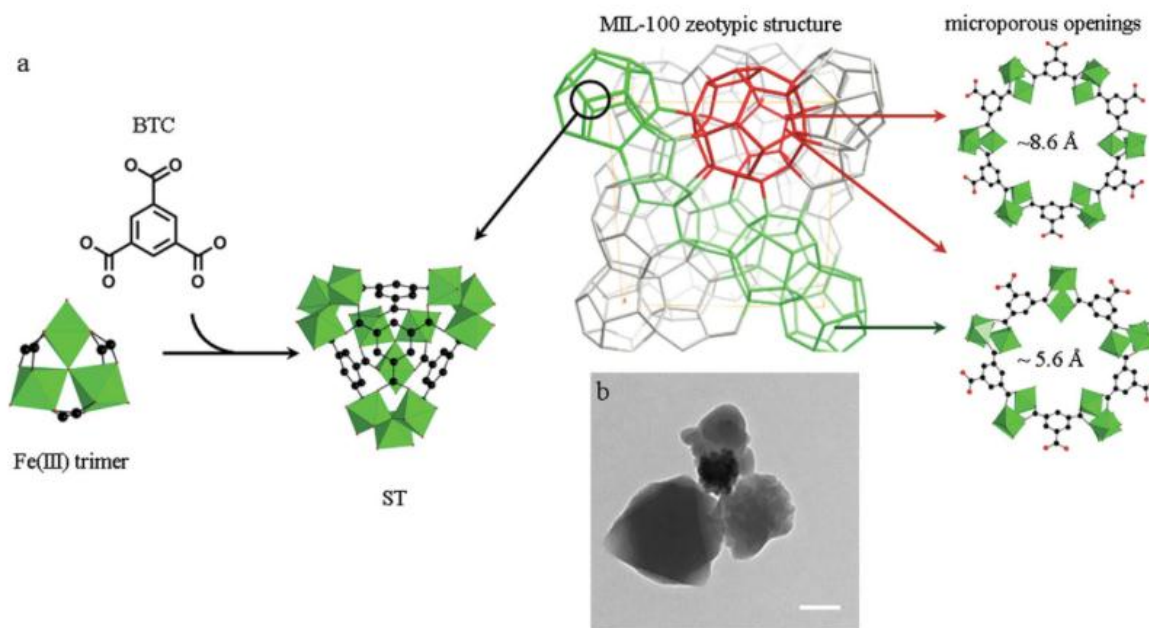


Figure 10 Description des deux tailles de pores au sein de la structure MIL-100(Fe), depuis l'auto assemblage métallique jusqu'à la structure cristalline (a), et acquisition par MET (échelle=100nm) (d'après Agostina et al, 2013)

potentielles. Plusieurs voies sont possibles pour l'encapsulation :

La liaison non-covalente est la voie la plus simple à mettre en place et ne nécessite pas de préparation particulière de la nanoparticule. C'est cette solution qui a été choisie pour les MILs. Pour la réaliser, la mise en contact des MILs en suspension dans une solution de la molécule à encapsuler est suffisante. Le mélange est agité et les MILs agissent telles des éponges, adsorbant dans leurs pores les molécules en suspension. L'adsorption n'est pas le seul phénomène mis en jeu puisqu'il est accompagné d'une interaction entre la molécule adsorbée dans les pores et les unités inorganiques de ces derniers [88]. Il est ainsi envisageable d'encapsuler toute sorte de molécules, hydrophiles, amphiphiles ou hydrophobes [80]. Le seul facteur limitant étant que la taille des pores et leur diamètre d'ouverture soit supérieurs à la taille de la molécule à encapsuler [71]. Si les deux tailles sont compatibles, l'encapsulation est alors très rapide (plus de 93 % d'encapsulation durant les cinq premières minutes [88]), et les taux d'encapsulation, bien que variables en fonction de la molécule et du MIL considéré, atteignent des valeurs très importantes (jusqu'à 33 % w/w (masse de molécule par rapport à la masse de MIL) pour l'ibuprofène encapsulé dans le MIL-100 par exemple [80]).

Le relargage de la molécule depuis les nanoparticules a été montré comme étant lent, continu et prolongé dans le temps. Il est donc possible d'éviter le phénomène de relargage massif et quasi immédiat qui est parfois observé pour d'autres types de nanoparticules. La libération de la molécule encapsulée dans les MILs est donc lente et continue mais, en l'absence de liaison covalente, elle débute immédiatement. Cela peut être

problématique car il est alors obligatoire d'encapsuler extemporanément la molécule dans les MILs, ce qui peut limiter les applications ou tout au moins contraindre à les adapter [71].

Une autre stratégie envisageable consiste à lier de façon covalente la molécule à la structure. Pour cela, des groupes fonctionnels sont préalablement placés au sein du maillage et serviront à la réalisation de la liaison covalente avec la molécule à encapsuler. Cette approche revient donc à synthétiser une pro drogue puisque la molécule ainsi stabilisée au sein du maillage ne sera libérée que lors de sa dégradation. Cela implique également que la formation de la liaison ne modifie pas l'activité de la molécule encapsulée et que le clivage de cette liaison covalente se fasse dans des conditions biologiques spécifiques afin que la molécule soit libérée aussi près que possible de son site d'action [89, 90]. L'inconvénient de cette approche réside dans la constante d'affinité des groupes fonctionnalisés placés proches de l'entrée des pores qui sera plus importante que celle des groupes placés au fond des pores. Il est donc possible d'observer une répartition inégale des molécules au sein du MOF.

Une autre approche radicalement différente pour l'ajout de molécules actives au sein de la structure des MOFs consiste à les y intégrer au cours de la synthèse elle-même. L'agent actif est alors la partie organique ou inorganique du MOF. Dans ce cas, la quantité d'agent actif incorporé sera très importante et il sera réparti de façon uniforme au sein de la structure. Ainsi plusieurs études ont montré l'utilisation de métaux comme unités inorganiques, permettant notamment de transformer les MOFs ainsi synthétisés en puissants agents de contraste [80, 91, 92]. Au contraire, des molécules anticancéreuses ont été employées comme ligands organiques [93-95]. Le composé actif d'intérêt est alors relargué au fur et à mesure de la dégradation de la structure. Cette approche peut constituer une réponse à la toxicité potentielle liée au relargage d'un ligand non actif. L'inconvénient de ce genre de construction tient dans la nécessité de devoir adapter les conditions de synthèse à chaque fois, puisque de la nature du ligand dépend la forme du maillage et chaque métal a besoin d'un environnement particulier pour former les trimères.

Ces différentes synthèses possibles des MILs ainsi que le choix de la stratégie d'encapsulation de molécules actives ouvrent le champ à de multiples applications dont nous allons aborder les principales.

Applications

Le stockage de gaz constitue une des applications industrielles les plus prometteuses [96]. Nous allons cependant aborder ici les applications biomédicales qui sont tout aussi nombreuses.

Vectorisation de médicaments

C'est sans doute l'application la plus intéressante de ces composés et aussi la plus prometteuse. Ainsi, la capacité de ces composés à permettre une encapsulation importante et un relargage ciblé, continu et prolongé dans le temps permettrait d'augmenter l'efficacité de la molécule transportée et de réduire les éventuels effets indésirables inhérents à son administration [97]. Concernant les MILs, un grand nombre de molécules ont été testées pour l'encapsulation, on peut notamment citer le busulfan, l'azidothymidine triphosphate, la doxorubicine ou encore le cidofovir [80, 88, 98]. Les résultats montrent des disparités importantes entre les différentes molécules pour un composé donné et inversement (**Tableau 3**). Ils sont cependant remarquables concernant la quantité de molécules transportables dans ces véhicules.

		MIL-89	MIL-88A	MIL-100	MIL-53	MIL-101_NH ₂
organic linker		muconic acid	fumaric acid	trimesic acid	terephthalic acid	aminoterephthalic acid
pore size (Å)		11	6	25	8.6	29
particle size (nm)		50–100	150	200	350	120
anticancer or antiviral drugs	busulfan loading (%)	9.8	8.0	25.5	14.3	
	azidothymidine triphosphate loading (%)		0.60	21.2	0.24	42.0
	cidofovir loading (%)	14	2.6	16.1	41.9	
	doxorubicin loading (%)			9.1		
pain reliever	ibuprofen loading (%)			33	22	

Tableau 3 Capacité d'encapsulation de différentes molécules en fonction du type de MIL Ferrique (d'après Keskin et al, 2011)

Prenons l'exemple du Busulfan, un agent alkylant anticancéreux utilisé en association avec d'autres molécules de chimiothérapie en traitement de conditionnement préalable à une greffe de cellules souches hématopoïétiques. La faible stabilité de cette molécule très hydrophobe est à l'origine d'occlusion veineuse, notamment au niveau de la microcirculation hépatique [99]. Le taux d'encapsulation est très largement supérieur à d'autres vecteurs précédemment utilisés (25 % en poids pour le MIL-100 contre 5 à 6 % pour les polymères les plus performants) [100].

Dans le cas de l'AZT, un antirétroviral utilisé pour le traitement de patients atteints du VIH, deux facteurs importants ressortent. Le premier est que le relargage de la molécule dans le milieu biologique est effectivement indépendant de la dégradation spontanée des MILs, comme l'atteste la courbe a) de la Figure 11. Le deuxième est dû au caractère hydrophile de cette molécule, dont la pénétration intracellulaire est naturellement faible mais est augmentée de façon significative quand elle est encapsulée dans le MIL-100(Fe) ; une modification structurelle de la molécule est cependant nécessaire, sans que cela n'affecte son activité, afin d'augmenter le taux d'encapsulation. La combinaison de ces différents facteurs conduit à une diminution significative de la dose efficace (qui est divisée par trois environ (Figure 11 b) [80, 88].

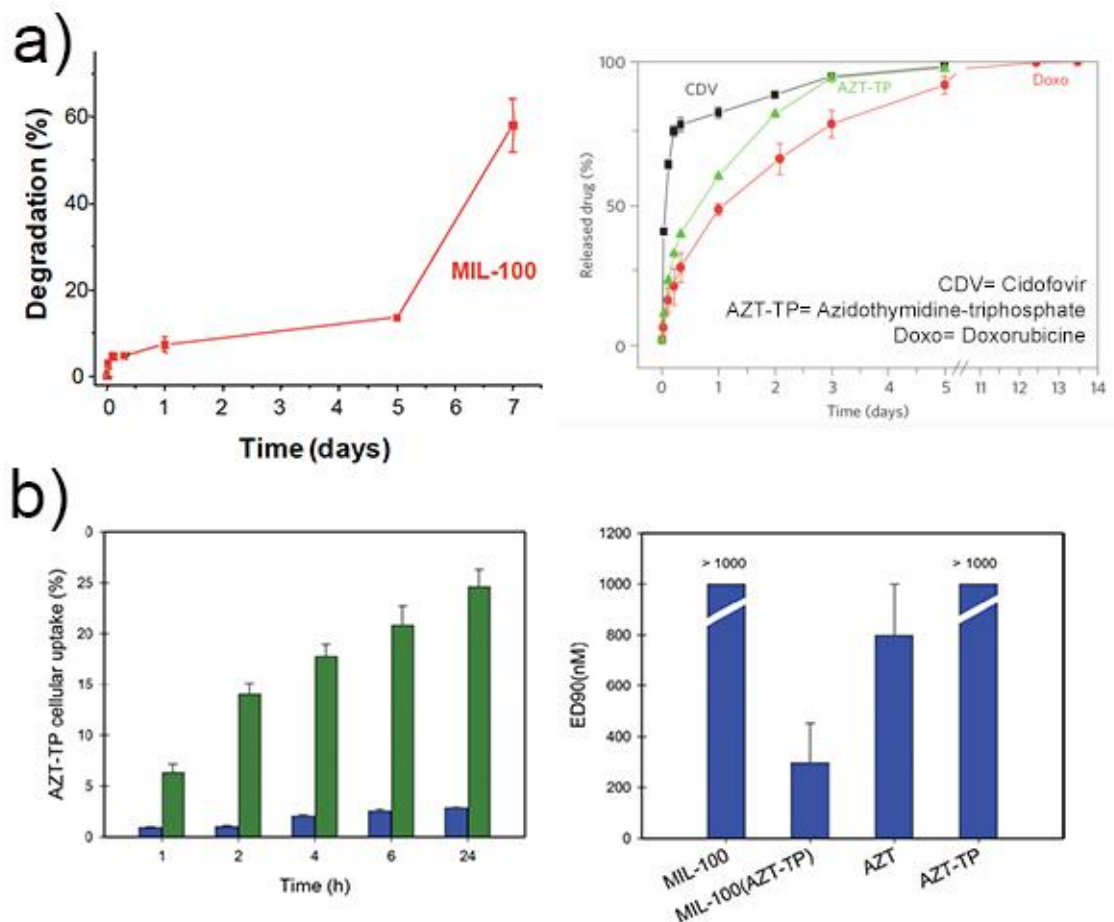


Figure 11 a) Courbes de dégradation et de relargage du MIL-100(Fe); b) entrée intracellulaire de l'AZT-TP libre (bleu) ou encapsulée dans MIL-100(Fe) (vert), et dose efficace correspondante (d'après Horcajada et al, 2010 et Agostini et al, 2013)

La toxicité des MILs a été étudiée rapidement et a démontré une faible cytotoxicité *in vitro* et l'absence d'inflammation *in vivo*, y compris à des doses élevées (220 mg.kg^{-1}) [80]. Cependant, la biodistribution du MIL-100(Fe) effectuée soit en fonction du poids des différents organes au court du temps [80], soit par dosage par HPLC de l'acide trimésique relargué [101], montre une capture préférentielle et rapide par les tissus réticulo-endothéliaux que sont notamment le foie et la rate, ce phénomène étant parfaitement réversible puisque le poids des organes était revenu à la normal trois mois après l'injection. Les composés étant rapidement retrouvés dans les urines et les fèces sans métabolisation [102].

Imagerie médicale

L'une des applications potentielles des MILs est leur utilisation en imagerie médicale, en particulier pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

L'IRM est une technique d'imagerie basée sur le magnétisme des atomes d'hydrogènes composant majoritairement notre organisme. Ces atomes, placés dans un

champ magnétique puissant, entrent en résonance, ils seront alors tous orientés dans la même direction. Au court de cette étape, ils accumulent l'énergie du champ magnétique qu'ils resitueront à l'arrêt de la stimulation. La restitution produit un signal qui est traité et enregistré par un système informatique. Cette technique, non invasive va ainsi permettre de visualiser l'organisme placé dans ce champ magnétique en utilisant la résonance magnétique des protons de l'eau (présente à 80 % dans notre corps). L'intensité du signal recueilli va donc dépendre de la densité d'eau dans le tissu [103]. La relaxation est un paramètre correspondant au temps de retour à la normale de l'orientation des protons excités, une fois le champ magnétique ôté ; il dépend du degré de liberté des protons, il augmente avec l'hydratation des tissus.

Cette technique permet de différencier précisément un type de tissu d'un autre (par exemple la matière grise de la matière blanche dans l'encéphale). Cependant, afin d'obtenir une meilleure résolution, il est nécessaire soit d'augmenter le temps d'acquisition, soit d'utiliser un produit de contraste qui a un temps de relaxation très différent de celui des tissus biologiques (le plus couramment utilisé étant le gadolinium).

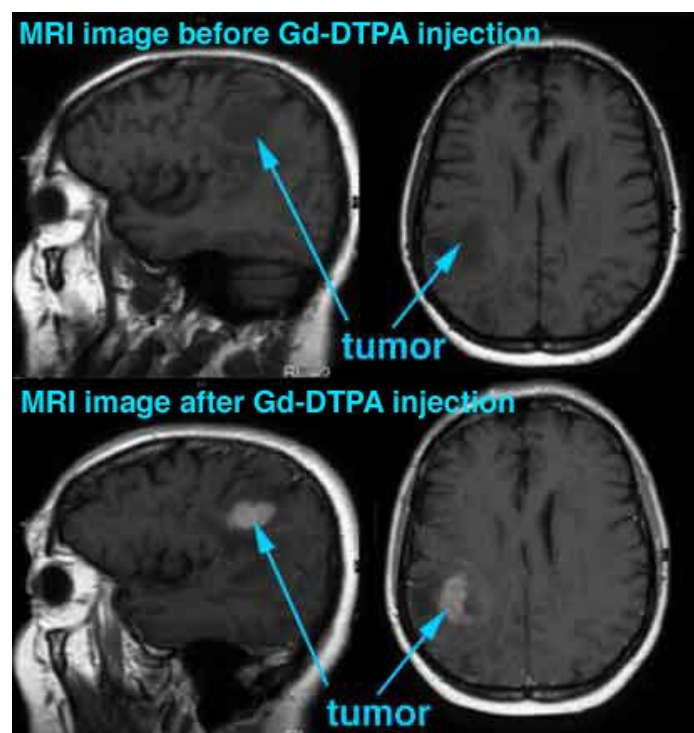


Figure 12 Exemple de l'acquisition avant (haut) et après (bas) injection de produit de contraste à base de Gadolinium (Source: Université de Wisconsin-Madison)

Les MILs ont démontré un potentiel intéressant en tant qu'agent de contraste pour l'IRM. Certains MOFs avaient précédemment montré des propriétés particulières pour la potentialisation de la résolution en IRM, notamment des composés à base de gadolinium [104] ou de manganèse [105]. Mais les MIL-100(Fe) notamment étaient les premiers de base

ferrique [80]. Ceci est dû à leur structure poreuse et aux molécules d'eau qui s'y adsorbent qui augmente la relaxation ainsi que le contraste du signal obtenu [80].

Autres applications

D'autres applications sont également envisagées. On peut par exemple citer l'adsorption et la délivrance de monoxyde d'azote (NO) utilisé comme agent anti-thrombotique, cicatrisant, antibactérien ou encore dermatologique [106].

Par leur capacité d'adsorption et leur surface spécifique très importantes, il est également envisagé d'utiliser les MILs comme agent de détoxification de l'organisme.

Les nanodiamants hydrogénés

Synthèse et propriétés du diamant à la taille nano

Le diamant est un matériau constitué uniquement d'atomes de carbone, et est le composé minéral le plus dur au monde. A la taille micrométrique, il est largement utilisé pour des applications industrielles, également en joaillerie, son architecture cristalline parfaitement régulière en faisant un composé naturel rare et recherché.

Nous allons cependant aborder et détailler leurs propriétés à l'échelle nanométrique. En effet, il existe des procédés particuliers de synthèse des nanodiamants (NDs). Ces composés conservent les propriétés avantageuses du diamant micrométrique tout en acquérant celles inhérentes à leur taille dont la chimie de surface particulièrement intéressante pour des applications médicales.

Synthèse

Le diamant est constitué d'un maillage cristallin de carbone parfaitement régulier, dérivé de la structure cubique face centrée (Figure 13).

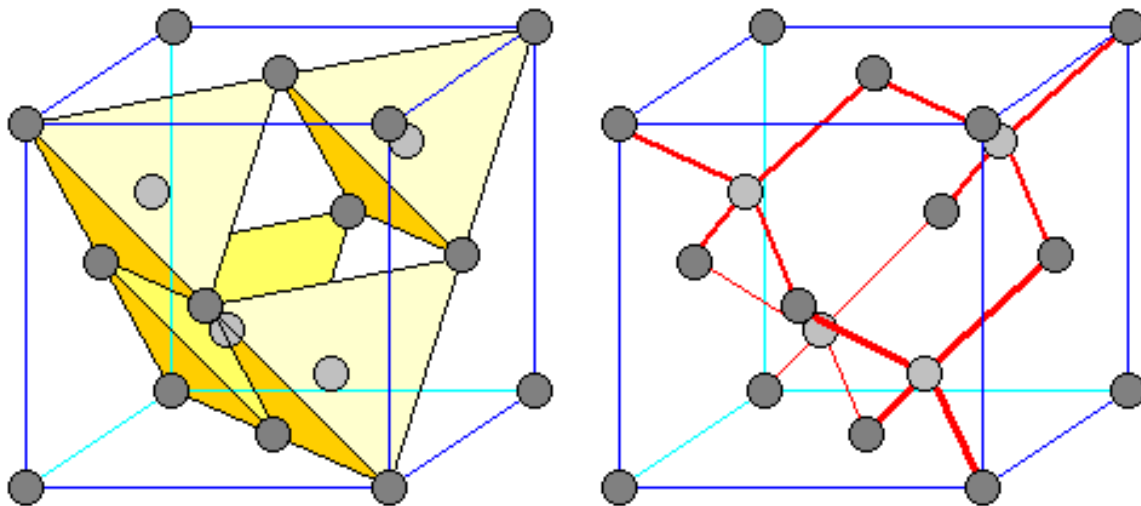


Figure 13 Structure cristalline du diamant

Le diamant est une forme métastable du carbone et nécessite donc des conditions de température et de pression très élevées pour sa synthèse qui, à l'état naturel ne sont retrouvées que dans les couches profondes du manteau terrestre ou les zones de

subduction. Du diamant a également été trouvé, sous forme nanométrique, dans certaines météorites [107].

Cependant, les besoins industriels croissants ont favorisé l'obtention synthétique de diamants par deux techniques de synthèse qui sont la Haute Pression Haute Température (HPHT) pour laquelle les conditions naturelles de croissance du diamant sont reconstituées [108] ; et la croissance par Dépôt Chimique en phase Vapeur (CVD), qui ne nécessite pas de pression et permet l'obtention de particules d'environ 50 nm par nucléation en phase vapeur [109].

Concernant les NDs, plusieurs approches sont possibles pour leur obtention, dont les deux principales sont

- le broyage de substrats de diamants obtenus par synthèse HPHT, qui seront ensuite centrifugés pour être triés par taille, l'étape de broyage ne conduisant pas à la formation de nanoparticules de taille unique. On obtient par cette voie des particules de 20 à 100 nm environ [110].
- la détonation, dont la première synthèse a eu lieu en 1962 en URSS. Elle donne naissance à des NDs de 5 nm. Cette technique consiste à faire exploser du trinitrotoluène (TNT) et de l'hexogène (RDX) deux explosifs militaires qui vont également servir de source carbonée. L'explosion a lieu dans une cuve fermée hermétiquement et dont l'atmosphère a été appauvrie en oxygène [111, 112]. L'explosion va augmenter fortement la température et la pression dans la cuve, favorisant la cristallisation des NDs. Cette phase de croissance cristalline va rapidement être stoppée par le retour à des conditions normales de température et de pression dans la cuve (Figure 14). Les particules obtenues sont agglomérées en particules de plusieurs centaines de nanomètres et vont nécessiter une purification de leur surface et un broyage afin de les séparer avant une mise en suspension ; les particules ainsi obtenues ont alors une taille primaire de 5 nm de diamètre [113, 114].

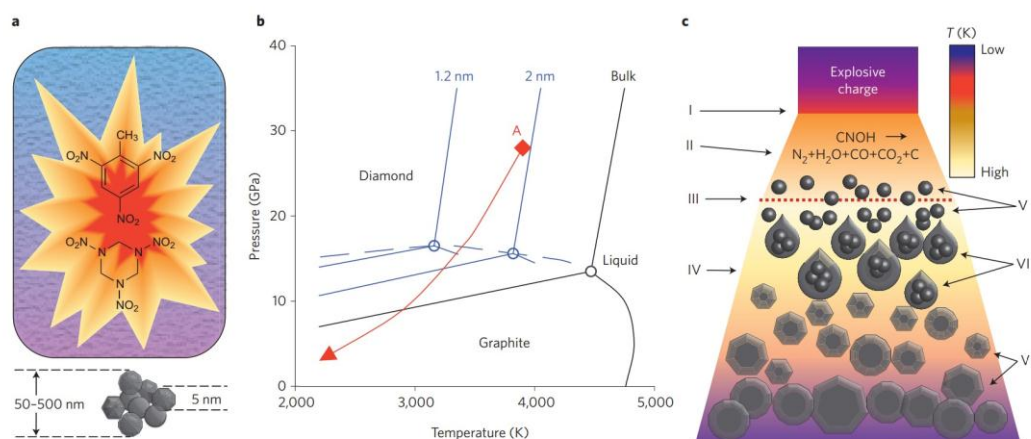


Figure 14 Synthèse de NDs par détonation. a) Explosion entre TNT et RDX. b) Diagrammes de phase des différents états du graphique jusqu'au carbone. c) Etapes de formation des NDs depuis l'explosion jusqu'aux cristaux (d'après Mochalin et al, 2011)

Propriétés

Les NDs conservent les propriétés du diamant brut auxquelles viennent s'ajouter celles de l'échelle nanométrique. Les propriétés physico chimiques les plus remarquables du diamant sont sa dureté exceptionnelle qui en fait un excellent revêtement pour des outils de découpe, sa grande conductivité thermique et sa résistance électrique qui présentent un grand intérêt pour la fabrication de composés électroniques [112]. Les capacités d'abrasion leur confèrent des propriétés tribologiques particulières qui leur valent d'augmenter significativement le pouvoir lubrifiant des huiles de moteur [115]. Les NDs possèdent également une grande stabilité chimique, ainsi que des propriétés optiques et des capacités de fluorescence dans certains cas [116].

Bien que le diamant soit connu pour être un matériau inerte et non toxique, la question de la toxicité de NDs est légitime [117]. Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont été menées afin d'évaluer la toxicité des NDs et ont montré l'absence de toxicité de ce composés que ce soit sur le plan cellulaire *in vitro* [72, 118] ou systémique *in vivo* [119-121]. Comme cela a été abordé précédemment, ce facteur est primordial pour envisager des applications médicales. Cependant, très peu d'études ont été menées sur la biodistribution et surtout la pharmacocinétique des NDs. D'où il ressort qu'ils ont tendance à s'accumuler préférentiellement dans le foie et la rate, et que l'élimination urinaire dépend largement de leur taille [122-124].

Mais l'intérêt porté aux NDs pour des applications médicales est basé sur leur chimie de surface. Ceci est particulièrement vrai pour les NDs produits par détonation dont la surface spécifique est particulièrement élevée (près de 20% des atomes sont en surface). Comme nous venons de le voir, une fois synthétisés, les NDs issus de détonation doivent être débarrassés des impuretés rencontrées à leur surface, par des traitements acides principalement [111].

Après cette étape de purification, on obtient des NDs composés de trois couches : un cœur diamant constituant la majorité de la structure, une couche intermédiaire de carbone amorphe et enfin une couche externe contenant divers groupes fonctionnels principalement oxydés et hydrogénés provenant de l'eau utilisée pour le refroidissement des NDs après la détonation [125]. C'est cette couche externe qui sera la base pour la fonctionnalisation de surface permettant d'ouvrir le champ d'application des NDs en biologie notamment. Cependant, la surface obtenue après l'étape de purification est très inhomogène puisqu'on trouve aussi bien des groupements carboxyles, hydroxyles, hydrogènes, ainsi que des chaînes hydrocarbonées insaturées (Figure 15).

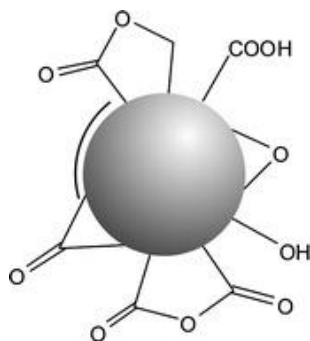


Figure 15 Principaux groupements à la surface des NDs issus de détonation (d'après Krueger, 2008)

L'étape de modification de la surface des NDs est donc importante afin d'homogénéiser ces groupements. Elle a pour but de saturer la surface des composés avec le groupement voulu afin d'obtenir l'homogénéité et la reproductibilité soit de la réactivité de surface à proprement parler, soit de la fonctionnalisation si elle est envisagée. Selon le type de surface souhaité, il existe différents traitements possibles. Pour l'obtention de groupements carboxyliques, un traitement chimique à base d'acides principalement, une étape de réduction étant possible ensuite pour l'obtention des groupements hydroxyles par exemple [111]. Une autre approche consiste en un traitement physico-chimique. Les NDs subissent alors un traitement thermique, à des températures de 450 °C environ sous différentes atmosphères notamment d'air, d'hydrogène, de fluor, donnant lieu à des NDs porteurs respectivement de groupement carboxyliques, hydrogénés, fluorés [126-128]. La surface ainsi modifiée permet de contrôler au mieux les propriétés de surface des NDs et d'envisager plus sereinement une étape de fonctionnalisation qui implique dans certains cas une réaction chimique pour la formation de liaisons covalentes [125].

Une fois homogénéisée, la surface peut donc être fonctionnalisée, suivant un greffage covalent ou non de molécules permettant de donner aux NDs des fonctions supplémentaires [125]. Concernant les NDs hydrogénés qui nous intéressent plus particulièrement, la liaison carbone-hydrogène possède une réactivité particulière qui permet d'envisager un grand nombre de greffages différents [129].

Applications médicales des NDs

Comme nous venons de l'aborder, les NDs sont constitués d'un cœur de diamant, inerte vis à vis d'un environnement biologique mais actif vis à vis de sources physiques comme des photons (capacités de fluorescence notamment). Ils sont également constitués d'une couche externe, très réactive et modulable aisément. C'est pourquoi les NDs vont principalement être utilisés comme une plateforme de vectorisation de molécules variées complétée éventuellement d'une activité de luminescence [117].

Deux possibilités se présentent alors: une liaison basée sur des interactions électrostatiques entre les NDs et les molécules à véhiculer (des molécules actives [121] ou des anticorps [130]). Une variation de la force ionique ou du pH (après internalisation intracellulaire du complexe par exemple), va conduire à la libération de la molécule transportée [130, 131], qui était restée jusque-là inactive [121]. Pour que cette liaison soit possible, il faut une attraction entre deux charges opposées, en l'occurrence le ND chargé négativement et la molécule possédant une charge positive. Il est également possible de véhiculer des nucléotides ou des siRNA, ayant une charge négative, moyennant une inversion de la charge des NDs grâce à des polymères chargés négativement [132]. La clé dans ce type de système est donc de maîtriser la force d'attraction entre les deux entités afin de garantir la libération de la molécule uniquement dans les conditions souhaitées.

L'autre possibilité est d'associer de manière covalente la molécule et le ND. Cette association, plus stable et moins soumise aux variations de l'environnement, est malgré tout dépendante de deux choses : la non-inactivation de la drogue greffée et la possibilité de cliver la liaison une fois le site d'action atteint par le complexe. Ces deux conditions sont bien entendu valables pour le cas de la fonctionnalisation par des molécules actives dont l'efficacité a déjà été prouvée dans plusieurs études [133-135]. Ce type de greffage permet également l'association avec des composés de ciblage comme des anticorps, des peptides ou encore des protéines [136, 137]. L'association à la surface des NDs d'agents de ciblage avec des molécules actives, auxquels on peut ajouter les éventuelles capacités d'imagerie inhérentes au cristal en lui-même font des NDs une véritable plateforme multimodale pour des applications médicales [138].

Nous venons de décrire les propriétés physico-chimiques de NDs qui sont nombreuses et exceptionnelles. Cependant, à la lecture des différentes applications biomédicales aujourd'hui à l'étude on constate que les propriétés intrinsèques de ces composés ne sont que peu exploitées. Par exemple, les propriétés de la réactivité de surface ne sont pas étudiées alors qu'elles pourraient en elles même constituer une arme redoutable contre des cellules tumorales entre autre. C'est sur cet aspect que nous allons nous pencher dans le prochain paragraphe en nous appuyant sur l'exemple du ND hydrogéné (H-ND) qui montre des propriétés extrêmement intéressantes comme en témoigne cette étude positionnant les H-NDs comme pièce maîtresse d'une nouvelle approche d'hyperthermie [139].

Hydrogénation

Principe

L'hydrogénation est une étape de modification de la surface des NDs afin de la saturer de façon homogène en groupements hydrogènes. Le principe de la modification de la surface des NDs a été abordé précédemment de façon générale, nous allons préciser la

technique d'hydrogénation en particulier, sur des NDs issus de détonation, qui ont été utilisés pour le présent travail.

Plusieurs approches avaient été étudiées afin d'obtenir une hydrogénation homogène en surface des NDs, que ce soit par l'exposition des composés à des atomes d'hydrogène dans des conditions d'ultravide (UHV) [140, 141] ou à un plasma d'hydrogène généré par micro-onde [142]. Cependant aucune d'elles ne s'était montrée concluante. Le Laboratoire Capteur Diamants du CEA de Saclay a donc développé une technique permettant une hydrogénation complète et homogène sur la totalité de la surface des NDs [143].

Cette technique consiste à placer les NDs au centre d'un tube en quartz résistant aux hautes températures. Dans ce tube le vide est fait et l'atmosphère est saturée en dihydrogène (entre 10 et 20 mbar). Il est placé dans un bloc d'émetteur de micro-ondes de 300 W (Figure 16). La génération de micro-onde sur le dihydrogène du tube va générer un plasma d'hydrogène qui provoque une modification de la surface des NDs en deux étapes. Premièrement on assiste à une désorption des espèces oxygénées de la surface des NDs, qui vont dans un deuxième temps être remplacées par l'hydrogène du plasma. Pendant cette étape qui dure entre 15 et 30 minutes en fonction de la quantité de NDs placés dans le tube, la température dans le tube atteint les 700°C.

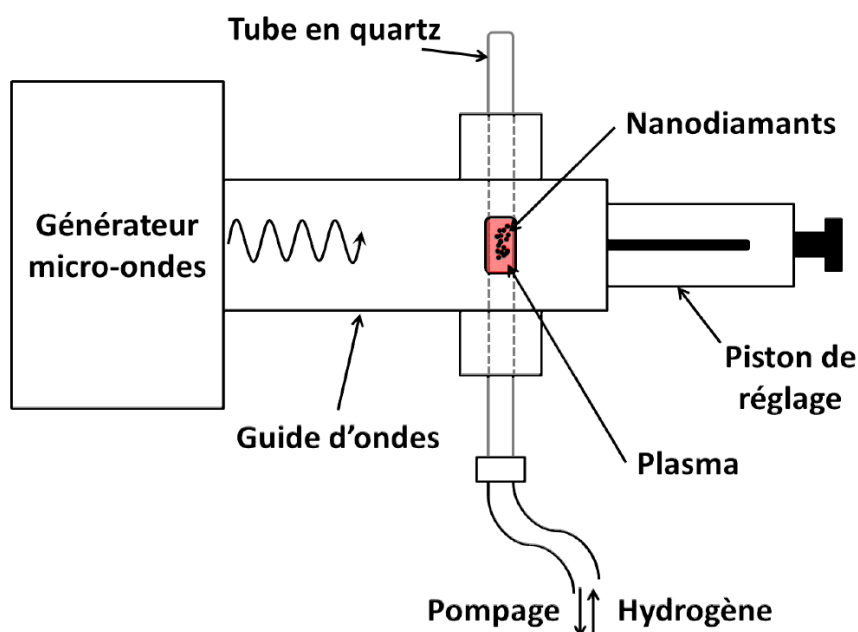


Figure 16 Montage expérimental permettant l'hydrogénation des NDs (d'après T. Petit)

identifié. La méthode XPS permet d'étudier les éléments présents dans les premières couches du matériau jusqu'à 5 nm de profondeur. Ceci est particulièrement intéressant dans le cas de NDs de détonation dont on sait que le diamètre unitaire est de 5 nm.

La réactivité de surface des H-NDs étudiée dans l'eau et en milieu biologique semble très importante. En effet ils présentent un potentiel ζ positif très élevé, dans un milieu biologique enrichi en protéines, l'adsorption de ces protéines à la surface des H-NDs est importante, comme cela avait déjà été observé pour ce type de particules [144, 145].

C'est cette réactivité de surface des H-NDs et la capacité de leur couche hydrogénée à interagir avec l'environnement dans lequel ils sont placés qui est à la base du postulat pour leur utilisation médicale. En effet, il a été décidé d'étudier le potentiel de ces nanoparticules hyper-réactives associées aux photons de la radiothérapie pour le traitement de cellules tumorales. La radiothérapie est une technique qui est impliquée dans près des deux tiers des protocoles mis en place dans le cadre du traitement de tumeurs cancéreuses. Elle est cependant confrontée à l'apparition d'une capacité de résistance de certaines cellules cancéreuse limitant alors son efficacité.

La radiothérapie

Cette technique consiste en une approche locorégionale utilisant des rayonnements ionisants pour irradier la masse tumorale avec pour but ultime la mort des cellules cancéreuses. Elle est utilisée seule ou en association avec la chirurgie ou la chimiothérapie. Différents types de rayonnement sont utilisés qu'ils soient électromagnétiques ou particuliers et sera dite externe ou interne selon la position de la source par rapport à l'organisme.

Les rayonnements ionisants

Les rayonnements ionisants constituent une propagation d'énergie à travers l'espace capable de ioniser et d'exciter les milieux biologiques qu'elle traverse. Il existe différents types de particules constituant ces rayonnements, chacune ayant un niveau d'énergie particulière, lui conférant des propriétés de pénétration tissulaire et d'ionisation différentes. On peut répartir ces particules en deux familles : les rayonnements électromagnétiques comprenant les photons γ et les photons X) et les rayonnements particuliers comprenant des particules chargées (électrons, protons, rayonnement α , ions lourds) et non chargées (neutrons).

Rayonnements électromagnétiques

Ce sont des rayonnements de haute énergie, possédant un pouvoir de pénétration tissulaire élevé. Dans cette catégorie, on distingue les photons γ et les photons X, dont les propriétés biologiques, à énergie égale, sont les mêmes. Seul le mode de production les distingue. Les photons γ sont issus de la désintégration d'atomes radioactifs dont le cobalt (Co^{60}) pour l'irradiation externe (bien que de moins en moins utilisé) ou le Césium (Cs^{137}) pour l'irradiation interne (ou Curiethérapie). Les photons X sont produits artificiellement en bombardant par un faisceau d'électrons un métal lourd.

Rayonnements particuliers

On distingue notamment les particules chargées comme les électrons qui sont produits par des accélérateurs de particules dont le pouvoir de pénétration tissulaire est faible leur énergie étant rapidement absorbée. Egalement les protons qui constituent une nouvelle approche, produits par un cyclotron et dont la pénétration tissulaire est à la fois plus importante et plus précise (on parle du pic de Bragg, distance à laquelle la quasi-totalité de l'énergie est déposée).

La Figure 17 montre le dépôt d'énergie des différentes particules en fonction de la distance de leur trajet dans l'organisme. On constate donc la décroissance linéaire de la dose relative en fonction de la distance parcourue par les photons. Elle diminue extrêmement rapidement pour les électrons alors qu'elle est déposée en quasi-totalité en un point dans le cadre d'une irradiation par des protons. A noter que la distance du pic de Bragg est modulable en fonction de l'énergie initiale du proton qui peut être modulée selon les besoins.

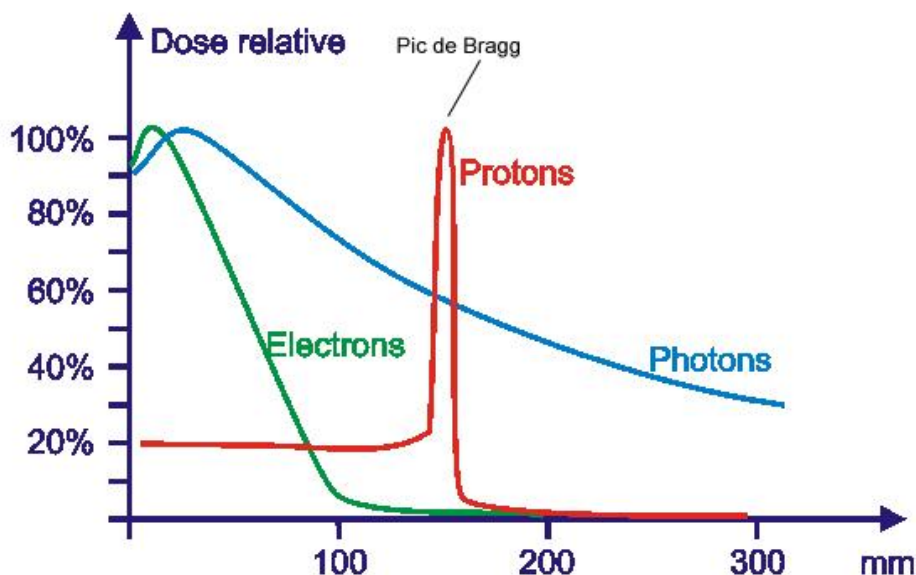


Figure 17 Dose déposée par un faisceau de photons (bleu), électrons (vert) ou protons (rouge) en fonction de la profondeur de tissus traversés (d'après <http://cology4u.blogspot.fr>)

Mécanismes d'action

L'effet induit par les radiations ionisantes au cours de la radiothérapie peut être divisé en quatre phases successives : physique, chimique, cellulaire et tissulaire.

La phase physique est extrêmement rapide et correspond à l'interaction physique entre les particules émises et la matière qu'elles traversent. Cette interaction produit des électrons qui sont arrachés de la couche externe d'un atome du milieu par transmission d'une partie de l'énergie du photon incident. Les électrons libérés vont à leur tour entrer en collision avec d'autres électrons adjacents dans une réaction en chaîne. Cette étape d'ionisation et d'excitation provoque des réarrangements moléculaires.

La phase physico-chimique est divisée en deux temps et est au cœur de l'action des radiations ionisantes sur les cellules : les dommages à l'ADN. On distingue ainsi une action directe par lésion de l'ADN suite à la collision avec une particule qui va induire des cassures simples ou doubles brins, des lésions de bases ou encore des pontages inter-brins. Mais également une action indirecte consécutive aux réarrangements moléculaires dont la principale conséquence est la rupture des liaisons covalentes et la production d'espèce radicalaire possédant une réactivité chimique élevée. La radiolyse de l'eau est un phénomène important puisqu'il conduit à la formation d'espèces radicalaires de l'oxygène (ROS) comme $\text{HO}^\cdot$, $\text{H}^\cdot$, $\text{HO}_2^\cdot$, H_3O^+ , OH^- , H_2O_2 et de stress oxydatif. Dans des conditions physiologiques, les ROS sont principalement issus de la respiration mitochondriale, ainsi que de certaines autres enzymes cytoplasmiques et le peroxydase [146, 147]. Ces ROS endogènes ont un rôle biologique important notamment dans la réponse inflammatoire et immunitaire et certaines fonctions de prolifération cellulaire. Cependant, à trop forte concentration, les espèces radicalaires ont un effet néfaste sur les cellules et une balance entre production et neutralisation est indispensable sous peine d'induire des dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides. On parlera alors de balance oxydative pour citer cet équilibre et tous les mécanismes qui contribuent à sa conservation [148]. La détoxification, mécanisme par lequel la cellule va neutraliser ces ROS, peut se faire selon deux voies. Une voie non enzymatique grâce à des molécules qui interagiront directement avec les radicaux libres ; on peut citer les vitamines C et E, le glutathion et le β -carotène. Une voie enzymatique dont les principales actrices sont les superoxyde dismutases (SOD), les catalases (CAT), des peroxydases et la NADPH-oxydase (NOX). La détoxification permettra de transformer ces molécules très réactives en molécules qui le sont moins comme l'eau ou le dioxygène.

Une rupture de la balance oxydative a des conséquences multiples dont la première est l'induction de dommages à l'ADN. On estime à plusieurs milliers le nombre de dommages par jours induits dans des conditions normales. En conditions de stress oxydatif, ce nombre augmente de façon importante et l'accumulation de dommages induits serait à l'origine du vieillissement cellulaire, de l'induction de la senescence mais également de l'initiation et la progression tumorale. Ce dernier point est dû à l'accumulation de mutations génétiques et épigénétiques qui jouent un rôle clé dans le développement tumoral.

Dans le cas de ROS exogènes comme peuvent l'être ceux induits les radiations ionisantes, la balance sera rapidement déstabilisée, et les voies de détoxification largement mises à contribution. Les lésions à l'ADN seront nombreuses, soit simples brins, soit doubles brins, et d'une manière générale, la quantification de ces dommages pourra être mis en regard du stress oxydatif subit par la cellule [149]. En conditions physiologiques, les cellules possèdent un taux de base de ROS qui lui est propre, lequel va considérablement augmenter suite à l'irradiation. Cette augmentation sera à l'origine des dommages causés et pourra conduire à la mort de la cellule.

La phase cellulaire est la conséquence des multiples lésions de l'ADN qui nécessitent la mise en place des mécanismes de réparation qui pourront, selon le degré d'atteinte de l'ADN et les capacités de réparation des cellules, soit être complet et fidèle, soit être complet mais infidèle, soit elle est incomplète. Dans le troisième cas, l'impossibilité de réparation induira la mort cellulaire. C'est d'ailleurs cette incapacité à réparer fidèlement des cellules cancéreuses qui est utilisée pour obtenir un effet différentiel avec les cellules saines. Plus que la mort par apoptose, c'est la mort mitotique qui est la plus importante, les cellules cancéreuses mourant en tentant de se diviser. De plus cette sensibilité varie selon la phase du cycle cellulaire dans laquelle elles se trouvent, la phase G2/M étant la plus sensible, expliquant pourquoi les cellules cancéreuses qui se divisent à une fréquence élevée sont différenciellement plus sensibles que les cellules normales. Il est d'ailleurs établi, depuis très longtemps une relation de proportionnalité entre la radiosensibilité et la vitesse de prolifération.

L'effet tissulaire est l'étape ultime qui est la conséquence des dommages cellulaires induits. Selon le tissu et la vitesse de prolifération des cellules qui le constituent, l'effet sera visible en quelques jours ou semaine pour les vitesses de prolifération élevée (tissu tumoral par exemple) jusqu'à plusieurs années pour les vitesses de prolifération lente (tissu hépatique).

En résumé, on peut établir les paramètres suivants comme étant primordiaux pour l'efficacité de la radiothérapie :

- la radiosensibilité intrinsèque du tissu à traiter
- le cycle cellulaire (les cellules sont beaucoup plus sensibles en phase G2/M et beaucoup moins en phase S)
- le fractionnement, qui consiste à diviser la dose totale d'irradiation en plusieurs doses répétées, permettant aux cellules des tissus sains de procéder à la réparation de leur ADN. Il faudra cependant veiller à ne pas augmenter de façon trop importante le temps nécessaire à la délivrance de la totalité de la dose. Une augmentation du temps sera favorable aux tissus possédant un taux de prolifération élevé qui pourront ainsi se régénérer
- le débit de dose et la température locale puisque plus elles seront élevées, meilleure sera l'efficacité

- l'hypoxie est un facteur de résistance des cellules cancéreuses à la radiothérapie [150].

Limitations

Comme beaucoup d'approches pour le traitement du cancer, la radiothérapie présente des limites en terme d'efficacité. En effet, l'adaptabilité des cellules cancéreuses, l'hétérogénéité intra-tumorale ainsi que le concept de cellules souches cancéreuses associé à certaines tumeurs cancéreuses, font que les critères énumérés ci-dessus ne sont pas toujours réunis.

Les limitations de la réponse à la radiothérapie sont principalement liées aux particularités des cellules cancéreuses. Douglas Hanahan et Robert Weinberg ont listé ces particularités qu'ils ont regroupées sous le terme de « Hallmarks of Cancer » [17]. Les auteurs considèrent que ces caractéristiques sont acquises par une cellule normale tout au long de son processus de cancérisation. Elles sont regroupées en plusieurs familles que sont l'autosuffisance en signaux de croissance, la perte de sensibilité aux facteurs suppresseurs de tumeurs, l'échappement à la mort cellulaire dont l'apoptose, une capacité à proliférer indéfiniment, l'activation de l'angiogenèse, la capacité d'invasion et de métastase, la dérégulation du métabolisme énergétique et la capacité à échapper au système immunitaire.

Certains de ces facteurs sont particulièrement intéressants comme par exemple l'échappement aux mécanismes de contrôle de la prolifération. Ainsi, deux protéines sont primordiales pour ce rôle : la protéine associée au rétinoblastome (RB) et la protéine TP53. La protéine RB est un checkpoint important dans analyse les signaux de suppression de prolifération et y répond en autorisant ou en bloquant l'entrée de la cellule en division [151]. La protéine TP53 dont le gène est muté dans de très nombreux cancers répond quant à elle à des signaux de stress intracellulaire comme des dommages à l'ADN en bloquant l'entrée dans le cycle cellulaire [152].

Les dommages à l'ADN sont une conséquence directe de l'irradiation qui cause des cassures doubles et simples brins. Ces cassures doivent être réparées afin de conserver l'intégrité du génome, ce qui nécessite l'arrêt du cycle cellulaire. Pour cela, les kinases Check1 et Check2 (Chk1 et Chk2 respectivement), ATM, ATR et DNA-PKcs sont activées [153]. L'activation de ces kinases initie une cascade dont le résultat sera le blocage du cycle cellulaire. Le cycle cellulaire est un cercle dynamique sous le contrôle de cyclines et de cyclines kinases dépendante, dont le degré de phosphorylation définit l'activité. Les blocages les plus fréquents en réponse à l'irradiation sont ceux en phase G2 et en phase G1 (par ordre d'importance). Ce sont les kinases Chk1 et Chk2 qui, une fois activées, vont inhiber l'activité de la phosphatase Cdc25, bloquant alors l'entrée en phase S ou M. Cette voie est indépendante de TP53, une voie cette fois dépendante de la protéine TP53. Elle

nécessite l'inactivation de Cdk2 via l'activation de p21, le résultat étant un blocage en phase G1. Le blocage induit par TP53 peut être prolongé dans le temps, la protéine étant alors stabilisée par phosphorylation des sérines en position 15 et 20. Cette stabilité est médiée par les ATM, ATR, Chk1 et Chk2 et va permettre le maintien de l'activation de p21. Les cellules cancéreuses dont TP53 est mutée ne se bloqueront pas en G1 mais en G2 ce qui implique l'existence de voies indépendantes de TP53 pour le maintien du blocage. On peut ainsi citer la voie initiée par les MAPK impliquant p38 et MK2. Une fois les réparations effectuées, la reprise du cycle implique l'activité de certaines protéines comme PK1, PP2A, PP1 et PP2C δ qui va permettre la levée du blocage. Un défaut d'activité des différents points de contrôle du cycle cellulaire peut avoir pour conséquence une reprise de la division trop précoce avant que la réparation de l'ADN ne soit effectuée ; celui pourra conduire à des mutations ou à une instabilité génétique.

L'irradiation induit des cassures simples et doubles brins qui doivent être réparées, le blocage du cycle cellulaire le permet. Les cassures doubles brins sont les plus préjudiciables pour la cellule et doivent être réparées en priorité. Il est intéressant de noter que les voies de recrutement des protéines nécessaires à la réparation de l'ADN sont les mêmes que celles de l'activation du blocage du cycle cellulaire [154]. La réparation des cassures doubles brins peut se faire selon plusieurs voies dont les deux principales sont la recombinaison homologue (HR) et la ligature d'extrémités non homologues (NHEJ). La voie HR est particulièrement utilisée lorsque la cellule est en phase S tardive ou G2 et nécessite la stabilisation des brins lésés par les protéines RPA et sont ensuite reconstitués par les protéines BRCA2 et RAD51 à partir d'un brin homologue fourni par la chromatide sœur. La voie NHEJ, bien qu'indépendante de la phase du cycle cellulaire sera plutôt préférée en phase G1 et S précoce. Elle est initiée par la liaison sur les brins lésés de deux protéines Ku70 et Ku80 puis de DNA-PKcs en formant un complexe qui va protéger les brins lésés tout en les rapprochant en vue d'une ligature directe [154].

Les cassures simples brins, moins complexes à réparer, font quant à elles principalement appel à une protéine PARP1 dont le recrutement sur le site de la cassure précède celui de ligases qui vont reconstituer la partie manquante. La Figure 18 résume ces différentes voies pour la réparation des dommages à l'ADN.

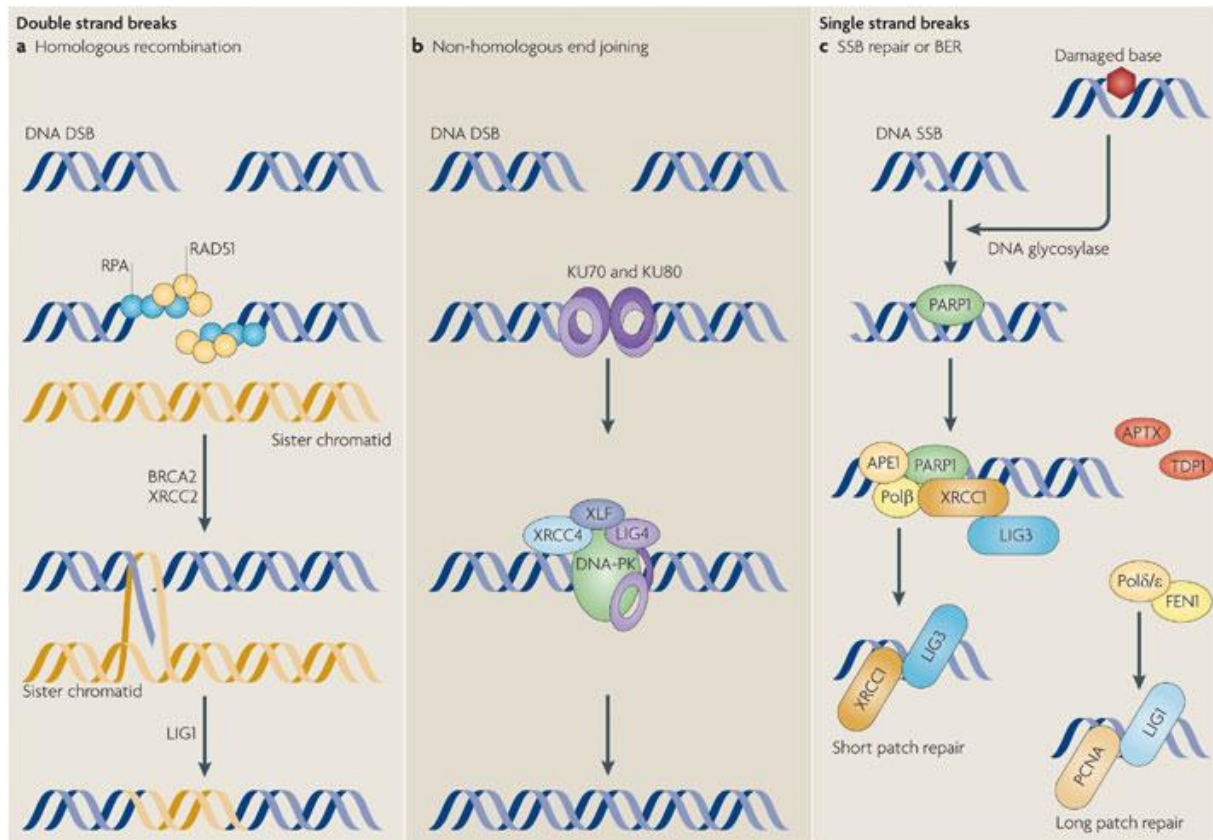


Figure 18 Principales voies de réparation de cassures doubles et simples brins de l'ADN (d'après McKinnon, 2009) Nature Reviews | Neuroscience

La mutation de l'expression des gènes codant pour ces protéines, conduit à une absence d'expression ou à une expression de protéine non active. Parallèlement à ces contrôles directs de la prolifération, on peut citer la protéine LKB1 responsable de la polarisation des cellules et de l'intégrité tissulaire mais également impliqué dans le contrôle de la prolifération en cas de contact cellule-cellule. Elle est absente dans un certain nombre de cellules cancéreuses, levant à nouveau un frein à la prolifération [155].

Echappant à un certain nombre de mécanismes de contrôle de la prolifération, les cellules cancéreuses acquièrent la capacité de proliférer indéfiniment. Une cellule normale est limitée en terme de nombre de divisions au-delà duquel elle meurt. Cette limitation est entre autre due au raccourcissement des télomères qui atteignent progressivement une taille critique. Les cellules entrent alors en senescence, un état irréversible du métabolisme cellulaire, voir la mort cellulaire. La télomérase, une polymérase capable d'ajouter des séquences télomériques aux extrémités des télomères est absente des cellules normales. En

revanche elle est exprimée et très active dans la plupart des cancers, levant dans ces cellules la limitation du nombre de divisions par la longueur des télomères [156].

Lorsque les dommages induits par l'irradiation ne sont pas réparés efficacement, la cellule peut mourir en suivant différentes voies. On distingue une voie de mort programmée dont on peut citer l'apoptose, la nécrose et l'autophagie, ainsi qu'une voie particulière appelée sénescence.

L'apoptose est une voie de mort programmée, qui fait office de barrière naturelle à la déstabilisation cellulaire et notamment au développement. Elle est activée en réponse à un certain nombre de stress physiologiques que la cellule traverse au cours du processus de cancérisation comme par exemple les signaux oncogéniques et les dommages à l'ADN associés à une prolifération débridée. Cette voie particulière est activée par des signaux extrinsèques ou intrinsèques, résultant par l'activation de la cascade des caspases qui conduira au démantèlement de la cellule. Les cellules cancéreuses présentent des modifications d'expression des protéines pro et anti apoptotiques. On peut ainsi citer une augmentation de l'expression de protéines anti-apoptotiques (Bcl-2 notamment) ou une diminution des facteurs anti-apoptotiques (Bax, Bim, Puma notamment) [157].

La nécrose, historiquement définie comme une mort cellulaire incontrôlée, a malgré tout été définie par des événements communs comme l'augmentation du ROS intracellulaire, la migration périnucléaire des organites, la perte de l'homéostasie du calcium, une déplétion en ATP, l'activation de protéases, rupture des lysosomes puis de la membrane plasmique et activation d'un processus inflammatoire médiée par les cellules immunitaires [158].

L'autophagie est une voie particulière puisqu'elle consiste en une réaction catabolique dont le but est la survie dans des conditions de stress cellulaire. Elle peut cependant conduire à la mort cellulaire en cas de conditions trop défavorables selon une voie différente de l'apoptose et la nécrose. Une protéine a un rôle capital dans ce processus : Beclin1 normalement associée à la protéine anti-apoptotique Bcl2 mais est libérée en conditions de stress (sous l'action des facteurs Bid, Bax, Bak et Bam). La voie PI3K, AKT et mTOR régule négativement cette voie, et sa surexpression dans certains cancers rend les cellules mutées résistantes à l'autophagie, faisant de cette voie un élément de survie dans des conditions de stress extrêmes. L'autophagie joue donc un double rôle de mort et de survie des cellules cancéreuses en réponse à l'irradiation [159].

L'autre voie de mort cellulaire également décrite à la suite d'une irradiation est la sénescence. Plus que la mort de la cellule à proprement parler, la sénescence est un arrêt irréversible de son métabolisme. Il se manifeste par l'arrêt des cellules en phase G1 du cycle cellulaire, et constitue physiologiquement un mécanisme de défense de l'organisme contre la prolifération de cellules endommagées. Il est induit par un stress génotoxique notamment

comme celui induit par les radiations ionisantes. Deux voies sont impliquées, celle de TP53 et celle de Rb [160, 161]. Cette voie est particulièrement intéressante car elle n'induit pas de réaction inflammatoire massive, la cellule conservant son intégrité physique mais stoppant toute prolifération. Elle constitue une cible de prédilection pour le traitement de certains cancers particulièrement résistants. La Figure 20 résume les différentes voies conduisant à la sénescence d'une cellule.

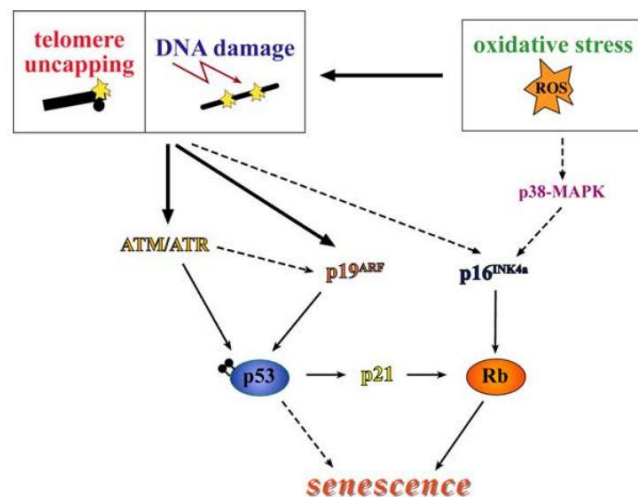


Figure 19 Voies d'induction de sénescence en réponse à un stress génotoxique (d'après Campisi, 2007)

Cependant, malgré les effets directs et indirects induits par l'irradiation, force est de constater que certaines cellules survivent aux principaux protocoles de radiothérapie. Ceci peut être expliqué par la capacité de certaines d'entre elles à développer des capacités d'adaptation exceptionnelles en réponse à l'irradiation, tant sur le plan de la détoxification des ROS que sur celui de la réparation de l'ADN.

Dans un registre particulier, Kobayashi et ses collègues ont montré que les cellules souches hématopoïétiques avaient une grande faculté de résistance à l'irradiation [162]. Ceci était principalement dû à un mécanisme de détoxification beaucoup plus important et efficace. Un autre travail a également montré, pour le cancer du sein que certaines cellules exprimaient de façon importante les gènes TMX3, FOXO1, GSS et SOD2 codant pour les principales protéines de détoxification. Et de façon intéressante, le niveau d'expression était directement corrélé avec le degré d'agressivité des cancers étudiés [163]. De façon plus générale, il a été montré que le niveau de ROS de base dans une tumeur n'était pas homogène. Une fois les cellules radorésistantes isolées, il apparaît qu'elles possèdent un niveau de base plus faible que celui des cellules plus sensibles, mais sont cependant capables d'une plus grande induction des protéines responsables de la neutralisation des ROS. Cela pourrait expliquer leur capacité à survivre au stress oxydatif induit par l'irradiation.

Concernant le contrôle du cycle cellulaire et la réparation à l'ADN, il semblerait que les cellules capables de survivre à l'irradiation, en plus de leur capacité à mieux neutraliser les ROS, possèderait des systèmes de réparation plus efficaces. Cette hypothèse est également basée sur l'observation des cellules souche hématopoïétiques dont l'état quiescent ainsi que des mécanismes de réparation plus efficaces leur permettent de mieux résister aux stress génotoxiques [164]. Plus généralement, plusieurs études ont démontré la capacité des cellules tumorales radiorésistantes à posséder un système de réparation plus efficace en bloquant mieux le cycle cellulaire d'une part (par une expression plus importante de Chk1 et Chk2) et en permettant une réparation sinon plus rapide au moins plus fidèle (notamment par la phosphorylation plus importante et plus prolongée de ATM). Des inhibiteurs de ces protéines ont d'ailleurs démontré leur capacité à sensibiliser ces cellules à l'irradiation [165-168].

Les particularités qui confèrent à ces cellules des capacités d'adaptation phénoménales et de résistance à l'irradiation est régulièrement rattaché à un concept particulier : celui des cellules souches cancéreuses. Ce concept est très ancien puisque Rudolf Virchow fut le premier en 1855 à émettre l'hypothèse selon laquelle le cancer proviendrait de cellules particulières ayant conservé des propriétés embryonnaires au sein des tissus matures. Ce modèle établi qu'une tumeur cancéreuse serait issue d'une cellule souche normale ayant accumulé des mutations initiant un processus de cancérisation. Ces cellules indifférenciées sont douées de prolifération illimitée et leur descendance pourra soit posséder les mêmes caractéristiques ou au contraire celles de cellules différenciées, douées de divisions limitées permettant ainsi de renouveler ce stock de cellules souche cancéreuse et également d'augmenter le nombre de cellules constituant la tumeur. Les cellules souches cancéreuses seraient plus tumorigènes que les autres cellules composant la tumeur, plus résistantes aux différents traitements et pourraient être à l'origine de la formation des métastases.

Ce modèle vient s'opposer au modèle stochastique historiquement proposé pour le développement de tumeurs cancéreuses. Ce modèle plus classique établi que les cellules de la tumeur constituent un ensemble tumorigène homogène possédant toutes le même potentiel de prolifération [169, 170].

Ce sont donc deux modèles qui s'opposent, l'un où toutes les cellules possèdent le même pouvoir tumorigénique, la progression tumorale étant alors due à des mutations aléatoires qui confèrent aux cellules mutées un avantage prolifératif. L'autre plus hiérarchique où un sous-groupe de cellules tumorales agressives appelées cellules souches tumorales cancéreuses possède une capacité d'auto renouvellement ainsi que de constitution de la masse tumorale. Ces deux modèles sont illustrés dans la Figure 20.

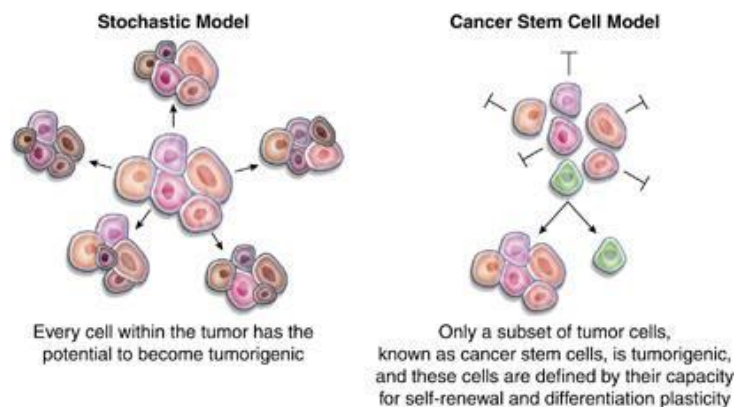


Figure 20 Deux modèles proposés pour la progression tumorale (d'après Girouard, 2011)

Bien que l'un et l'autre de ces modèles possèdent chacun des arguments valables, il n'en reste pas moins que l'échec de la radiothérapie pour le traitement de certains cancers doit être contourné. Malgré les capacités d'adaptation des cellules survivant aux radiations ionisantes, la stratégie à adopter est de déborder les mécanismes impliqués. En effet, la particularité des cellules cancéreuses de type souche est d'être, dans certains cas, identifiées par des marqueurs spécifiques. Schématiquement, les principaux marqueurs aujourd'hui décrits sont CD24, CD44, CD133, CD34, ABCB5, c-kit, l'activité ALDH, la capacité d'efflux appelé « side population » (SP) qui seront retrouvés surexprimés ou sous-exprimés, seuls ou combinés dans différents cancers.

Les pistes sont donc multiples aujourd'hui pour pallier la résistance des cellules cancéreuses à la radiothérapie. Cibler spécifiquement ces cellules de type souche en est une. On peut également envisager de saturer les voies anormalement efficaces de réponse au stress génotoxique que ce soit les mécanismes de détoxification ou ceux de réparation de l'ADN. C'est cette dernière approche qui a été choisie pour l'utilisation des H-NDs en association à la radiothérapie. Nous allons maintenant en décrire le mécanisme d'action supposé et détailler l'activité biologique de ces composés.

Apport des Nanodiamants hydrogénés pour la radiothérapie

Mécanisme d'action

La surface des H-NDs est extrêmement réactive et son association avec la radiothérapie pour l'exposition de cellules cancéreuse radiorésistantes semble être très prometteuse.

Les mécanismes de résistance à l'irradiation de certaines cellules cancéreuses sont nombreux mais une des voies est la capacité à mieux réagir à l'induction de stress oxydatif induit par l'irradiation.

Les propriétés suivantes vont être utilisées pour ce type d'application des H-NDs :

- la densité atomique importante des NDs puisque de l'ordre de $1,8 \times 10^{23}$ atomes/cm³. Cela permettra aux particules d'absorber de façon très importante les photons incidents, ce qui conduira à une libération toute aussi importante d'électrons à la surface des particules.
- stabilité colloïdale native des NDs hydrogénés, avec un potentiel ζ très positif qui autorise leur utilisation sans fonctionnalisation pour augmenter leur stabilité.
- l'adsorption de molécules d'eau et d'oxygène à la surface des H-NDs. Ce point est probablement le plus important puisque ce sont ces molécules adsorbées qui vont interagir avec les électrons émis et être à l'origine d'une production importante d'espèces radicalaires de l'oxygène. Ceci est particulièrement intéressant puisque les H-NDs qui sont de petite taille entrent facilement dans les cellules et vont être capable de véhiculer ces molécules d'eau et de dioxygène au sein des cellules tumorale, souvent hypoxiques. L'interaction avec les photons de l'irradiation va générer un fort stress oxydatif au sein des cellules tumorales. Ceci est donc un avantage pour la radiosensibilisation des cellules hypoxiques, qui sont souvent les plus radiorésistantes [171].

L'efficacité théorique des H-NDs en tant qu'agent radiosensibilisant, est donc basée sur l'absorption des photons γ ou X générant secondairement un électron de basse énergie. Cet électron ainsi émis va être transféré aux molécules d'eau et de dioxygène adsorbées à la surface des H-NDs. Ce transfert électronique oxyde les molécules en espèces radicalaires génératrices de stress oxydatif, la Figure 21 résume cette réaction.

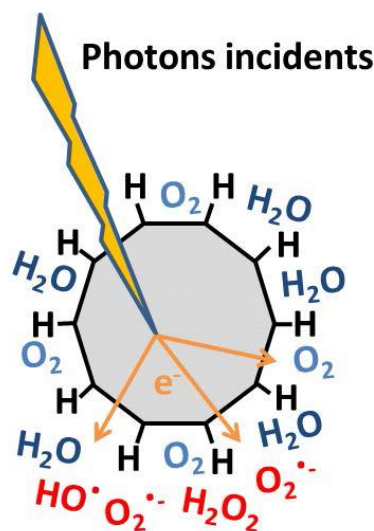


Figure 21 Génération d'espèces radicalaires par transfert d'électron du photon incident via le nanodiamant hydrogéné (d'après Petit, 2013)

La présente étude constitue la première validation biologique de l'intérêt des H-NDs comme potentialisateurs des effets de l'irradiation sur des cellules cancéreuses. Elle a été menée sur trois lignées cancéreuses radiorésistantes. Deux lignées de cancer du sein : ZR-75.1 présentant des formes différentes de la protéine Ku-70, une protéine impliquée dans la réparation de l'ADN. Et une lignée de cancer du rein : Caki-1.

Toxicologie des nanoparticules

Avant de valider les potentielles applications des nanomatériaux, il est primordial de tester leur toxicité. Car quelle que soit l'utilisation future des nanoparticules testées, leur devenir dans les milieux biologiques étant une question sans cesse soulevée [172, 173]. Il est donc indispensable de réaliser des tests permettant d'évaluer les différents paramètres cellulaires *in vitro* et de mesurer la pharmacocinétique du composé.

Comme nous l'avons abordé précédemment, les applications des nanoparticules sont très nombreuses et leur présence dans notre environnement est permanente tant par leur nombre que par leur diversité. La toxicologie des nanoparticules constitue donc un défi majeur étant donné le manque de connaissance flagrant des dangers et des risques de ces composés sur la santé humaine. Et doit être envisagée préalablement aux études précliniques et cliniques.

Pour cela il est nécessaire de définir l'exposition humaine aux nanoparticules selon deux axes : le type de nanoparticule impliqué et le type d'exposition.

Exposition humaine

Il faut distinguer les nanoparticules naturelles des nanoparticules manufacturées. Les poussières de tempêtes, d'éruptions volcaniques, d'incendies, etc représentant près de 90% de l'ensemble des nanoparticules auxquelles nous sommes continuellement exposés ; tandis que l'activité humaine urbaine et industrielle produit des nanoparticules auxquelles nous sommes variablement exposés. Il sera alors possible de définir le danger associé, qui sera combiné à l'exposition pour définir le risque lié à un type de nanoparticule.

On doit en même temps définir trois grandes classes d'exposition : une que l'on pourrait qualifier de passive, qui peut concerner tout être humain, la seconde active, dans le cas d'une administration volontaire (utilisation médicale par exemple) et la troisième qui concerne les travailleurs.

L'exposition passive est consécutive à la présence d'un individu dans un environnement contaminé par des nanoparticules (aux abords d'une usine d'incinération par exemple). Dans ce cas, l'exposition est très complexe car il est impossible d'identifier un seul type de nanoparticule puisqu'elles sont trouvées sous forme de mélange dans l'environnement. La contamination est alors directe (habits, emballage alimentaire) ou indirecte (dégradation des nanomatériaux ou des produits en contenant par exemple). Elle

se fait possible par inhalation, ingestion ou passage transcutané. Actuellement il n'existe aucune possibilité de quantification efficace.

L'exposition active quant à elle correspond à l'administration volontaire de nanoparticules dans l'organisme. Dans ce cas, la nanoparticule est plus facilement identifiable de même que la dose d'exposition.

Cependant, entre ces deux grandes voies d'exposition, on peut définir une voie intermédiaire qui est l'exposition des personnes travaillant sur des sites utilisant ou produisant des nanoparticules. Dans ce cas, on ne peut pas parler d'exposition volontaire mais l'activité de ces individus en contact avec des nanoparticules augmente considérablement le risque d'exposition (chercheurs dans les laboratoires, industries de production ou d'utilisation de nanoparticules). Ici encore, l'identification du type de nanoparticule est aisée car on est rarement en présence d'un mélange complexe. Mais leur concentration est souvent beaucoup plus importante. La contamination peut alors avoir lieu par toutes les voies possible, l'inhalation restant la voie principale d'exposition (formation d'aérosols dispersés dans l'environnement) et va dépendre du degré de confinement et de ventilation des locaux dans lequel les nanoparticules sont utilisées. Les étapes de nettoyage des équipements en contact avec les nanoparticules lors de leur manipulation sont également une source de contamination. Il n'existe cependant pas, à ce jour, de registre d'exposition comme pour les produits cancérogènes, et encore moins de limites d'exposition.

La Figure 22 qui symbolise le cycle de vie des nanoparticules, depuis leur synthèse jusqu'à leur recyclage en passant par leur utilisation et leur éventuelle dissémination dans l'environnement. Ceci explique d'une part la difficulté à définir le type de nanoparticule auquel est exposée une catégorie d'individus, mais également pourquoi, les nanoparticules ne sont jamais trouvées seules dans l'environnement.

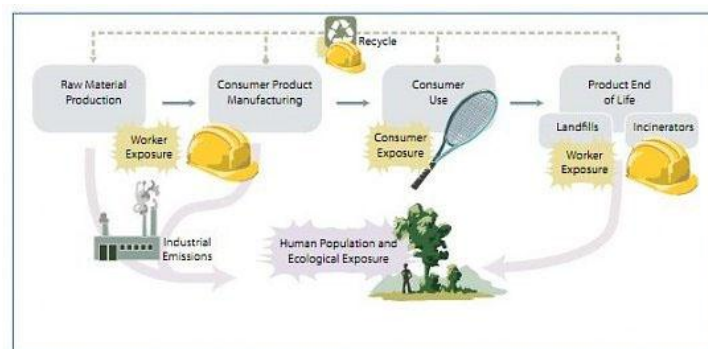


Figure 22 Cycle de vie des nanoparticules

La logique d'approche pour l'étude de la toxicité des nano-composés sera donc différente selon le type de population étudiée. L'exposition du grand public aux nanoparticules sera traitée différemment du cas des travailleurs exposés à un composé plus facilement identifiable par sa nature et sa voie de pénétration dans l'organisme (inhalation, contact cutané, ingestion,...). Dans le cas de traitements aux malades, bien que la toxicité

des composés soit importante à connaître, il faut aussi prendre en compte la balance bénéfice/risque inhérente à tous les médicaments, notamment en oncologie.

Propriétés de surface

Une fois le type d'exposition et la nature du composé définis, il faut considérer qu'un matériau inerte et non toxique dans sa version macroscopique peut tout à fait présenter, dans sa version nanométrique, une très grande réactivité vis à vis de l'environnement dans lequel il est placé [174, 175]. L'exemple qui illustre parfaitement ce comportement est l'or. A la taille microscopique que nous connaissons tous, l'or est un matériau inerte ne présentant pas de réactivité particulière. Cependant, les nanoparticules d'or sont très réactives vis à vis de l'environnement dans lequel elles sont placées, ce qui explique par exemple leur intérêt dans des applications médicales telles que l'imagerie [176].

Cette grande différence de comportement qui peut être observée entre des matériaux de taille microscopique et nanométrique s'explique par la surface spécifique qui est bien supérieure pour les nanoparticules. La Figure 23 montre l'évolution du rapport surface/volume qui augmente de façon significative quand la taille de la particule diminue. De même, le pourcentage de molécules en surface constituant la particule augmente au fur et à mesure que le diamètre de la particule diminue. Ainsi la réactivité et l'énergie de surface des nanoparticules sont très supérieures aux particules microscopiques. Cela conduit à des propriétés physico-chimiques différentes entre les deux tailles bien que les molécules de base soient les mêmes. Il a par exemple été montré que pour une particule constituée de molécules sphériques de 5Å dont le diamètre est de 20nm, la surface spécifique pouvait atteindre 300 m²/g (selon la masse volumique) [177, 178]. Outre le fait que la réactivité de surface des nanoparticules est impliquée dans la définition de leurs propriétés physico-chimiques, elle va également intervenir dans leur stabilité en suspension conduisant notamment à leur agrégation.

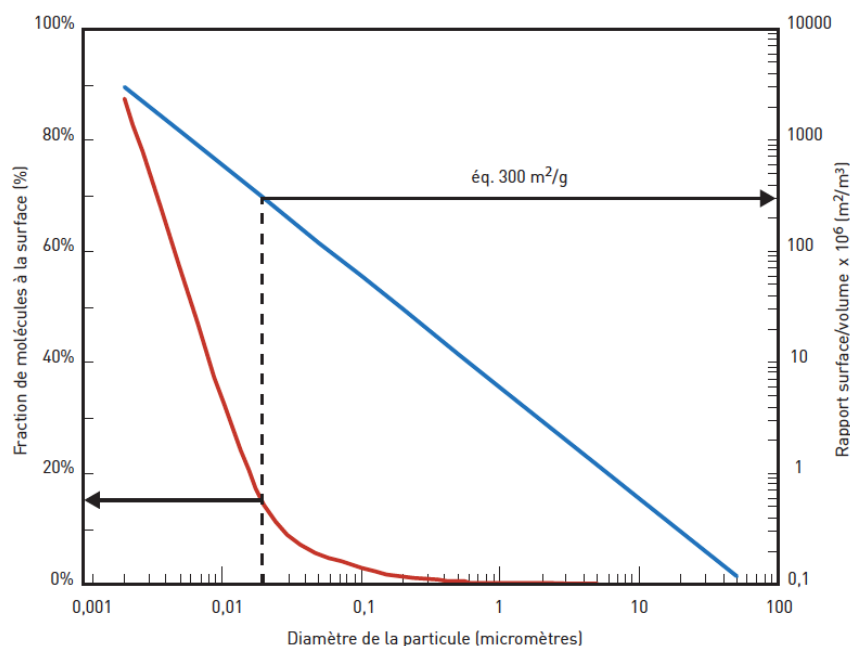


Figure 23 Evolution de la surface spécifique en fonction de la taille des particules (d'après Witschger et Fabriès, INRS, 2005)

C'est pour cela que l'AFSSET (précurseur de l'ANSES) dans un rapport daté de 2010 dessine les contours de ce que doit être l'évaluation de la toxicité des nanoparticules. Il est établi que chaque nanoparticule doit être étudiée « au cas par cas, produit par produit, usage par usage ». Cette position reprend ainsi la recommandation européenne 424(2008/345/CE) qui considère que l'approche par des techniques de toxicologie conventionnelle n'est pas envisageable à grande échelle dans la mesure où, faute de connaissances suffisantes, chaque nanoparticule doit être considérée comme un objet singulier.

L'extrapolation d'un effet biologique observé pour une nanoparticule à une autre nanoparticule considérée comme similaire est alors interdite. Et l'accumulation de données de toxicité de nanoparticules, dans des conditions standardisées qui permettent la comparaison entre toutes les études est primordiale.

Comme nous allons le voir dans un prochain paragraphe, de nouveaux outils ont été mis au point, notamment des approches à hauts débits comme premier tri des effets biologiques.

Si l'identification de la voie et du composé de l'exposition est extrêmement importante, la connaissance des caractéristiques du ou des composés étudiés l'est également.

Caractérisation des nanoparticules

Avant toute étude biologique de l'effet de nanoparticules il est indispensable de mener un certain nombre de tests afin d'établir leur comportement dans l'eau mais également dans les milieux biologiques de l'étude. Cette étape, dont les modalités seront détaillées plus loin, est cruciale afin de garantir une bonne interprétation des données obtenues et surtout d'autoriser la comparaison entre les différentes études publiées [179].

En 2008, une initiative a été lancée aux Etats-Unis en réponse aux nombreuses demandes lors de congrès internationaux à propos de la toxicologie des nanoparticules. Elle a pris la forme d'un site internet : www.characterizationmatters.org qui propose une série de recommandations pour la caractérisation des nanoparticules avant l'étude de leur toxicité. Il s'agit des étapes jugées minimales pour la bonne conduite des études et la reproductibilité des résultats. Même s'il ne s'agit que de grandes lignes, cette initiative marque cependant la première étape vers ce qui pourrait être une normalisation des pratiques.

Les principales recommandations données sont les suivantes :

- la composition générale du matériau :
 - espèce chimique, structure cristalline
 - composition de la surface
 - pureté après synthèse
- aspect général du matériau :
 - forme
 - taille, distribution
 - agglomération, agrégation
- paramètres physiques :
 - surface spécifique
 - réactivité de surface
 - charge de surface
- comportement en suspension
 - taille, diamètre hydrodynamique
 - charge de surface (Potentiel ζ)
 - stabilité à court et « long » terme
 - ces mesures sont à réaliser dans l'eau et dans les différents milieux biologiques dans lesquels le matériau sera étudié, à température ambiante mais également à la température d'étude (37°C pour une étude cellulaire *in vitro* par exemple)

Les trois premières parties de ces recommandations portent sur l'étude des particules sous forme de poudre alors que la dernière partie énonce les paramètres des

particules en suspension dans un liquide. Cette différence est importante car elle est souvent à l'origine du manque d'information autour des caractéristiques des nanoparticules dans les différentes études publiées. En effet, il est fréquent de ne trouver dans un article que les informations communiquées par le fournisseur, donc pour des particules sous forme sèche. Cependant, étant donné le comportement singulier des nanoparticules en suspension, cela ne constitue qu'une information tronquée de leur état au cours de l'étude. Il a ainsi été rapporté le biais induit qui, au-delà du problème de comparaison et de reproductibilité des résultats, est préjudiciable à notre connaissance globale de la toxicité des nanoparticules [180, 181].

Le protocole de mise en suspension permettant d'obtenir la meilleure stabilité possible du composé étudié doit être noté et décrit en précisant notamment : le type de liquide de mise en suspension, l'utilisation ou non d'énergie pour la favoriser (vortex, sonification).

Aujourd'hui, des règles plus précises ont été établies afin de favoriser le recours systématique à ce processus de mise en suspension. On peut ainsi citer une norme de l'AFNOR publiée en 2008 qui définit les bases de la caractérisation des nanoparticules dans le cadre de l'étude de leur toxicité.

Plusieurs initiatives scientifiques ont également été prises récemment, dont le consortium européen NANoREG qui vise à définir et à mettre au point des tests réglementaires pour l'étude de la toxicité des nanoparticules et pour lequel la mise en suspension, la caractérisation et les conditions d'utilisation occupent une place toute particulière.

L'OCDE a récemment publié des règles de bonne pratique pour la réalisation de l'étude de la toxicité des nanoparticules (ENV/JM/MONO(2012)40, 2012). Plusieurs points sont définis comme primordiaux en terme de caractérisation de la suspension dont la dispersion et la stabilité, l'agglomération et l'agrégation des particules ainsi que la charge de surface.

Ce point de l'harmonisation des conditions de préparation et d'étude des nanoparticules est primordial. En effet, on constate que le nombre de publications portant sur ce sujet a littéralement explosé avec une augmentation exponentielle depuis les années 2000. Cependant, on peut considérer que les publications antérieures à 2010 sont peu fiables notamment à cause de l'absence de caractérisation rigoureuse préalable à l'étude [182].

Au laboratoire, l'ensemble des paramètres inhérents au comportement des nanoparticules en suspension est étudié.

Une fois leurs caractéristiques établies, il est alors possible de procéder convenablement à l'étude de leur toxicité.

Analyse de la toxicité

Les nanoparticules semblent ouvrir un champ d'applications infini, cependant, la question de leur toxicité doit (devrait) être posée avant toute utilisation. Malheureusement, aujourd'hui nous sommes loin d'observer cette suite logique et le tableau proposé est plutôt celui d'un jeu « de chat et souris » entre industriels et législateurs avec les chercheurs comme arbitre. Bien qu'un peu caricaturale, cette description illustre la situation avec d'un côté un type de nanoparticules présentant des propriétés intéressantes pour une application donnée, de l'autre le législateur qui se doit de répondre aux questions soulevées par l'utilisation de ces composés. Et qui, pour cela, doit s'appuyer sur des éléments vérifiés. C'est à ce niveau que les scientifiques interviennent en fournissant les résultats des études qui ont pu être menées. Cependant, en l'absence d'harmonisation des pratiques décrites précédemment, il est parfois difficile, pour une nanoparticule donnée de décrire un effet avec objectivité. On peut par exemple citer le cas des nanoparticules d'argent dont l'effet antibactérien et antifongique a été maintes fois démontré [183-186]. Un rapport de l'ANSES publié en Mars 2015 à propos des nanoparticules d'argent apporte des éléments à propos de cette classe de nanoparticules dont les effets toxiques sont très contradictoires. Cette publication met deux points en avant : le premier est que malgré une utilisation importante des nanoparticules d'argent aussi bien dans des emballages alimentaires que dans des produits textiles, il existe un doute quant à l'absence de toxicité de ces composés. Mais le deuxième point, pointe du doigt l'absence de message clair à la lecture de l'ensemble des publications étudiant la toxicité des nanoparticules d'argent et donc l'impossibilité pour les experts de l'agence de conclure. Le principe de précaution, souvent appliqué dans ce genre de situation est donc ici rappelé.

L'étude de la toxicité des nanoparticules est donc un domaine extrêmement rigoureux nécessitant de porter une attention toute particulière aux conditions dans lesquelles elle est réalisée.

Seront donc maintenant abordés les différents paramètres qu'il est objectivement recommandé d'étudier afin de définir convenablement les effets biologiques des nanoparticules. La logique globale de l'étude reprendra celle de la toxicologie conventionnelle puisqu'elle débutera par un large tri tant sur le plan des doses que sur celui de la durée d'exposition. Ces doses et temps remarquables seront ensuite repris afin d'investiguer plus précisément les éventuels mécanismes mis en jeu.

Cependant, à la différence de la toxicologie conventionnelle, la nanotoxicologie doit composer avec les singularités de comportement des nanoparticules conduisant notamment à des interférences avec les tests, rendant alors leur interprétation impossible [182, 187-191]. Il est donc nécessaire d'effectuer pour chaque test une série de contrôles négatifs afin de s'assurer de l'absence d'interférence entre les nanoparticules étudiées et le test.

Le choix dans la dose constitue la base d'une étude de toxicologie en générale mais prend une autre dimension dans le cas de la nanotoxicologie. Ce choix doit être fait en se basant sur l'exposition supposée de l'organe étudié. Cette évaluation est difficilement quantifiable et transposable et souvent non prise en compte. Dans le cas de l'inhalation des nanoparticules il faut soit prendre en compte l'exposition « réelle » dans le cas de l'étude de l'exposition passive de travailleurs par exemple ; soit établir la dose qui sera administrée, dans le cas de l'exposition active pour un traitement [192, 193]. Pour l'évaluation de la dose à utiliser *in vitro*, on pourra également raisonner en définissant trois niveaux : le moins spécifique qui est la dose administrée, l'exposition effective et la plus spécifique qui est la dose intracellulaire [194]. Dans les deux cas, l'exercice n'est pas évident et il a été montré que souvent les concentrations choisies le sont sans réelle justification scientifique et sont donc supérieures à la réalité [195]. Un exemple de ce décalage qui est parfois observé entre la dose choisie pour une étude et la réalité est une étude menée en 2008, pour laquelle des souris ont été exposées à du TiO₂ P25 par instillation intra-trachéale. Pour cette étude, la dose équivalente reçue par certaines souris est de 7,5 mg soit près de 17,5 g à l'échelle humaine (soit un volume supérieur à celui d'un bécher de 100 mL) [196].

Un autre facteur à prendre en compte est la sédimentation des nanoparticules, qui est quasi systématique. En effet, la richesse des milieux de culture en protéines et sels conduit à une modification de la taille et de la stabilité des nanoparticules en suspension [179, 197]. C'est pourquoi il est maintenant d'usage, pour les études *in vitro* d'exprimer les doses en unité de surface d'exposition (c'est à dire la surface spécifique donc la surface totale de l'échantillon) par unité de surface exposé (la surface du tapis cellulaire exposé). On peut ainsi s'affranchir, lors des calculs de dilution, du volume de milieu de culture utilisé dans chaque format d'étude (les plaques 6, 12, 24, 96 puits notamment) et ne se concentrer que sur la quantité effective de nanoparticules déposée par unité de surface d'étude. Cependant, connaître la surface spécifique d'un échantillon de nanoparticule est loin d'être facile. Mais pour que le calcul soit fiable, il est nécessaire que les nanoparticules aient une forme parfaitement régulière, dont l'air de surface est mesurable et surtout qu'elles ne s'agrègent pas entre elles, modifiant alors la surface totale de l'échantillon. Ce dernier paramètre étant particulièrement difficile à maîtriser en milieu biologique, une autre alternative pour l'expression de la dose est possible. Ainsi, même sans raisonner en terme de surface spécifique d'exposition, il est possible d'avoir une correspondance fiable de la dose en l'exprimant en poids de nanoparticules déposées par unité de surface exposée. Les différentes doses sont alors exprimées en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ permettant de maîtriser deux paramètres : la quantité de nanoparticules déposée et la surface du support d'étude. Bien qu'il n'existe pas de consigne officielle à propos du format de l'unité, il est de plus en plus courant de trouver dans la littérature les concentrations exprimées ainsi. Une nouvelle fois, aucune règle fixe ne peut être établie étant donnée la différence de comportement d'un type de nanoparticule à un autre en terme de stabilité dans le milieu biologique, de sédimentation, de cinétique d'entrée dans les cellules, etc. La Figure 24 illustre cette problématique.

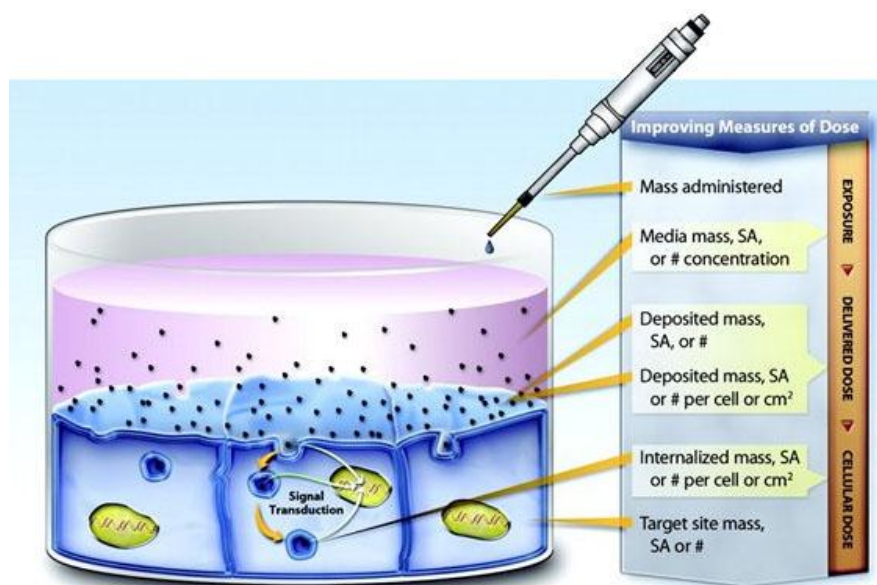


Figure 24 Evolution de la quantité de nanoparticules depuis la solution mère jusqu'à la cellule au fond du puits de culture. SA= Surface Area, #= Nombre de particules (d'après Teeguraden, 2007)

Une fois les doses positionnées, la première étape de screening permet de valider la gamme de dose d'une part et surtout d'identifier des doses et des temps remarquables. Pour ce faire, plusieurs approches peuvent être mises en place. Par la réalisation systématique de l'ensemble des tests décrit ci-dessous avec la totalité des concentrations et pour un grand nombre de temps d'exposition. Cette approche est extrêmement fastidieuse sans garantie de résultats.

Une autre stratégie consiste à mesurer en temps réel l'évolution de l'impédance cellulaire en fonction du temps pour l'ensemble des concentrations étudiées. Il existe plusieurs appareils permettant cette mesure dont l'*xCELLigence™* RTCA développé par la société ACEA Biosciences, Inc. et l'*ECIS* développé par la société Applied BioPhysics.

La mesure d'impédance ne fournissant qu'une indication de la réponse cellulaire globale, il convient de définir, aux temps et doses remarquables, les voies et mécanismes mobilisés dans cette réponse.

Pour ce faire, différents outils sont à notre disposition. Pour chacun d'eux, les temps et les doses remarquables sont étudiés. Le but est d'obtenir le plus de précisions possibles sur les mécanismes mis en jeu dans la réponse cellulaire à l'exposition aux nanoparticules. Ce sont donc les paramètres classiques de toxicologie comme la mortalité, le cycle cellulaire, le métabolisme général, ou encore l'intégrité membranaire qui sont étudiés. On étudiera également le mode d'entrée, sa cinétique, et les éventuelles capacités d'efflux des cellules.

Le stress oxydant induit, très largement corrélé à la toxicité des nanoparticules ainsi que la génotoxicité sont également des effets importants à quantifier.

On commence par un marquage au bleu trypan, colorant spécifiquement les cellules mortes, permettant une analyse statistique du nombre de cellules mortes au sein de la population totale.

Les tests colorimétriques conventionnels, en excluant toute interférence avec les composés nous renseignent ensuite sur la viabilité (Rouge Neutre), l'intégrité membranaire (relargage de LDH), l'activité mitochondriale (XTT et MTT), ainsi que l'activité métabolique (dosage SRB) des cellules.

Ensuite, la cytométrie en flux permet une approche statistiquement plus robuste de certains paramètres spécifiques comme la viabilité (incorporation de l'iodure de propidium (PI) ou de ToPr-3), le cycle cellulaire (également avec l'incorporation de PI ou de ToPro-3), ou encore le stress oxydatif (avec la sonde fluorescente H2DCFDA-CM), un facteur largement démontré comme étant associé à la toxicité des nanoparticules [198, 199]. Par cette technologie, il est également possible de détecter l'entrée dans les cellules de certaines nanoparticules. En effet, avec le canal SSC (Side Scatter Channel), on utilise la capacité des objets passant devant le capteur du cytomètre en flux à dévier la lumière. En temps normal ce paramètre permet d'évaluer la granulométrie des cellules. Mais Zucker et ses collègues ont démontré la proportionnalité entre une augmentation du SSC des cellules étudiées avec la présence dans leurs cytoplasmes de nanoparticules de dioxyde de titane [200, 201]. Cette méthode, bien que non applicable à l'ensemble des nanoparticules, reste un moyen efficace pour évaluer leur entrée dans les cellules.

La microscopie confocale permet d'étudier *in situ* le comportement des cellules suite à l'exposition aux nanoparticules. Il est par exemple possible de détecter les particules dans les cellules (qu'elles soient fluorescentes ou non) [202, 203]. C'est par microscopie également qu'on étudie la génotoxicité induite par le comptage des foyers γ H2AX dans les noyaux. Cette méthode a été démontrée comme sensible pour détecter les cassures doubles brins de l'ADN [204] et suffisamment puissante pour prédire la génotoxicité *in vivo* [205].

Face aux particularités des nanoparticules, à l'impossibilité d'utiliser à grande échelle les tests de toxicologie conventionnelle et à l'interdiction d'extrapolation des effets d'un composé à un autre, il est donc nécessaire de réinventer la toxicologie. Le terme de nanotoxicologie est d'ailleurs couramment utilisé pour définir cette nouvelle activité.

Cependant, malgré ces précautions, certains résultats obtenus *in vitro* sont difficilement extrapolables à l'animal et encore moins à l'Homme. Car si l'approche *in vitro* classique constitue un système simple dans le sens où un seul type cellulaire est exposé dans un milieu dont la composition est parfaitement maîtrisée et connue, la réactivité de surface dont il a été régulièrement question dans les paragraphes précédents nous prédit un

comportement totalement différent des nanoparticules dans un milieu de culture cellulaire et dans un organisme vivant.

Mais l'ensemble des méthodes utilisées le sont dans le cadre d'une étude *in vitro*, et la plupart du temps sur des lignées cellulaires immortalisées. Ce système, bien qu'il présente un certain nombre d'avantages que nous allons étudier, a également un certain nombre de limitations qui appellent l'utilisation soit de modèles animaux, soit de modèles *in vitro* dit alternatifs. Cette problématique sera abordée dans la prochaine partie de ce document.

Modèle cellulaire tridimensionnel de culture de poumon

Le terme de « modèle alternatif » est de plus en plus courant dans les communications scientifiques et législatives. Il signifie le recours à un autre procédé que l'étude sur un modèle animal. Il s'explique par la volonté politique des dirigeants du monde entier de permettre l'évaluation toxicologique des substances chimiques de façon rapide et fiable. Ceci implique la réduction de l'expérimentation animale parfois longue et toujours coûteuse, et posant un problème éthique. Cette transition est dictée par des règles qui seront décrites dans ce paragraphe. En contrepartie, la réduction de l'expérimentation animale implique l'existence de tests fiables et prédictifs des effets toxicologiques des composés chimiques sur l'Homme et sur son environnement.

Nous allons maintenant étudier les avantages et inconvénients de chacun de ces volets afin de définir le cadre du développement d'un modèle tridimensionnel de culture de cellules pulmonaires au cours de ce travail.

Etudes *in vitro* classiques

Depuis de nombreuses années, l'utilisation de monocultures de cellules adhérentes ou en suspension est le système de référence pour l'étude de la toxicité de composés car il permet d'étudier dans les détails et à haut débit les mécanismes mis en jeu suite à une exposition. On en distingue deux sous catégories.

- les cellules dites primaires (ou primo-culture de cellules), consiste à cultiver des cellules dérivants de tissus ou d'organes prélevées directement sur un organisme. On obtient ainsi une culture de cellules représentatives du tissu étudié. Un des inconvénients de ce système est la possibilité de dédifférenciation de certaines cellules limitant l'étude par la courte durée de vie de ces cultures. Se pose également un problème éthique de prélèvement et d'utilisation.
- les lignées cellulaires qui dérivent initialement de primo-culture de cellules qui ont été immortalisées. Cette étape d'immortalisation est réalisée par transfection ou mutation de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. Ces systèmes présentent l'avantage de la reproductibilité et d'une grande facilité d'utilisation. En revanche, la forte instabilité génétique de ce type de cellules associée à l'absence d'hétérogénéité existant au sein du tissu d'origine des facteurs limitent leur utilisation pour l'extrapolation des effets observés.

Voici certains, parmi les plus importants, des avantages et limitations de l'utilisation de ces systèmes pour l'étude de la toxicité de composés chimiques

Avantages

Dans ce genre de système, l'avantage majeur est de pouvoir travailler sur des cellules humaines et de contrôler total des conditions physico-chimiques et physiologiques pour l'exposition. En effet, les constituants du milieu ainsi que leurs concentrations sont parfaitement connus, au contraire d'environnements plus complexes comme le sont les organismes vivants. Cela permet une plus grande reproductibilité des tests. Ceci est particulièrement vrai pour l'étude des effets biologiques des nanoparticules dont on sait par exemple que la teneur en sels dans le milieu a un fort impact sur leur stabilité et leur agrégation.

De la même façon on peut contrôler les propriétés du composé pour l'exposition des cellules et moduler aisément le temps d'exposition. On peut alors remplacer le milieu dans lequel sont cultivées les cellules, action beaucoup plus aisée qu'*in vivo* où le temps d'exposition sera dépendant de la pharmacocinétique.

Avec les cellules cultivées en monocouche, il est plus aisé de déterminer les voies et les mécanismes d'actions mis en jeu suite à une exposition. L'association d'un système simple avec la multiplicité des tests à disposition permet une analyse fine où la modification d'un paramètre peut plus facilement être incriminée au composé. Ce qui n'est pas le cas dans un organisme complet où on cherche à observer une réponse globale, tant sur le plan de l'absorption, du métabolisme et de l'excrétion que sur celui de la toxicité. Dans un second temps, une analyse plus fine pourra être envisagée, une fois les premiers effets observés.

Enfin, l'étude de la toxicité par cette voie est le plus souvent facile à mettre en œuvre et peu coûteuse, particulièrement dans le cas de l'utilisation de lignées cellulaires immortalisées.

Cependant, un certains nombres de désavantages inhérents à ces modèles, limitent leur utilisation pour l'obtention de résultats prédictifs.

Limitations

Bien qu'elle permette une analyse fine des voies biologiques mises en jeux, l'étude *in vitro* en culture mono-cellulaire pose un certain nombre de problèmes, qui éloignent ces modèles de la « réalité ».

La première limitation à l'exploitation de résultats obtenus et l'extrapolation à des effets biologiques sur l'Homme réside, une nouvelle fois, dans un manque d'harmonisation et de standardisation. En effet, il n'est pas rare qu'une seule et même lignée soit cultivée dans des conditions différentes d'un laboratoire à un autre. Et la proposition d'un guide de bonne pratique de culture cellulaire en 2005 notamment n'a rien changé car il est très peu suivi [206, 207].

Malgré le fait que l'on se concentre uniquement sur certains organes voir même sur un échantillon de ceux-là, se présentent aussi plusieurs inconvénients. A commencer par la saturation en oxygène dissout dans le milieu qui est rapidement épuisé, conduisant à des conditions de cultures parfois proches de l'anaérobie, sans pour autant être dans des conditions d'hypoxie trouvées au sein de certaines tumeurs [208].

La pharmacocinétique n'est pas prise en compte dans ce genre d'étude ce qui rend difficile son extrapolation. L'effet toxique observé sur une lignée cellulaire représentative d'un organe ne sera pas nécessairement observé *in vivo* étant donné que la molécule pourra être dégradée avant son arrivée à l'organe ou alors tout simplement ne jamais l'atteindre. De même pour l'activité enzymatique responsable de l'activation ou l'inactivation de certains composés bien plusieurs approches ont été envisagées pour s'en rapprocher [209]. La Figure 25 illustre la comparaison entre modèles *in vitro* et *in vivo* dans le cas de l'étude de toxicité hépatique, organe pour lequel l'activité enzymatique est extrêmement importante [210, 211].

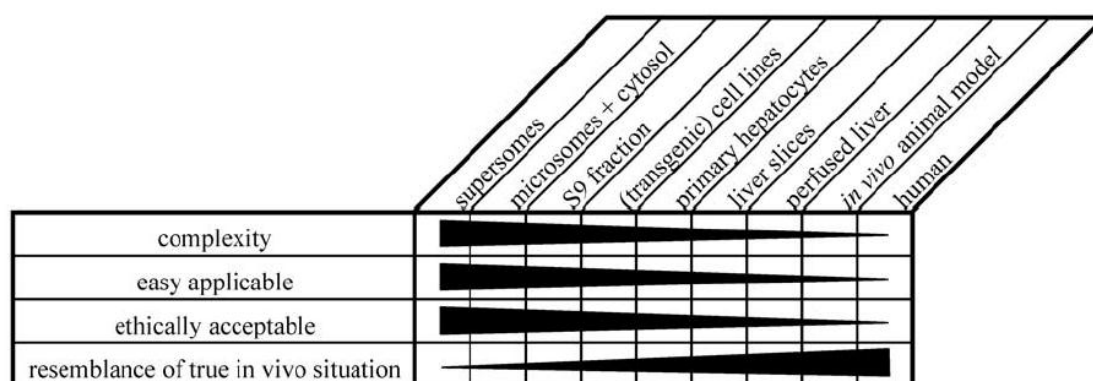


Figure 25 Modèles *in vitro* et *in vivo* et leur niveau de complexité et de ressemblance depuis l'Homme jusqu'aux enzymes isolées (d'après Bradon, et al. 2003)

La densité cellulaire des cellules cultivées en deux dimensions sur un support ainsi que leur capacité d'établir entre elles des jonctions, même à confluence (configuration rarement dépassée dans les cas d'études *in vitro*), n'atteint pas celle retrouvée au sein des différents tissus de l'organisme. Cette différence de densité modifie les interactions intercellulaires qui dans certains cas ne se résument qu'à un simple contact [212].

L'origine cancéreuse de la plupart des lignées cellulaires utilisées aujourd'hui en toxicologie pose également un problème. Les nombreuses mutations retrouvées dans ce type de cellules en font des modèles plus ou moins bien adaptés pour l'étude des effets biologiques de composés dans un organisme sain [17, 213], rendant l'extrapolation à l'organisme humain parfois difficile.

Se pose aussi la question, peu souvent soulevée, de l'authenticité des cellules utilisées pour une étude car elles auraient pu être contaminées ou même être

différentes de ce qu'elles sont censées être, l'exemple le plus emblématique étant les cellules HeLa [214, 215].

En complément de l'étude *in vitro* de la toxicité, est associée une approche *in vivo* par administration à des organismes vivants, la plupart du temps des rongeurs. L'expérimentation animale n'ayant pas été utilisée pour ce travail, nous nous contenterons d'en lister les avantages et inconvénients.

Expérimentation animale

Cette approche constitue une étude plus globale des effets biologiques du composé étudié, puisque lors de l'administration c'est l'ensemble des tissus de l'organisme de l'animal qui vont être exposés, ainsi que les réactions et interactions physiologiques [212]. Elle permet d'évaluer la sécurité d'utilisation, voir l'efficacité d'activité (dans le cas d'un hypothétique futur médicament), et permet de supporter la possibilité d'utilisation du composé étudié [216]. L'avantage est également de disposer de nombreux modèles utilisables pour les différentes études à mener (pathologiques ou non, possédant des cibles spécifiques humaines ou non, etc).

L'expérimentation animale est depuis de nombreuses années un passage obligé sur le chemin de l'évaluation de la sécurité d'un composé. De nombreux modèles mathématiques, statistiques ont été mis au point afin d'être en mesure d'extrapoler au mieux les effets observés à l'organisme humain [217-219], cependant cette extrapolation est parfois très difficile. En effet, elle doit être prise avec une infinie prudence, on rappellera l'exemple du Thalidomide dont l'effet tératogène n'avait pas été détecté chez la souris, elle reste à ce jour la meilleure étape entre la mécanistique cellulaire et l'Homme.

Cependant, malgré le recul sur la mise en place de ces approches, il n'en demeure pas moins qu'elle est lourde et contraignante. La conséquence est le manque de connaissance de la reproductibilité des études qui ne sont pas répétées indéfiniment [212].

De plus, la complexité du système rend difficile l'interprétation des résultats qui sont d'ailleurs d'avantage concentrés sur l'occurrence d'effets pathologiques sans réellement se préoccuper de la physiologie mécanistique basique de cet effet. Par exemple, un composé entrant aisément dans une cellule cultivée *in vitro* pourra ne pas en être capable dans des cellules similaires *in vivo*. Ceci est principalement dû à une possible modification préalable du composé, ainsi qu'aux jonctions et à la densité cellulaires *in vivo* très différentes de celles observées *in vitro* [220, 221].

L'utilisation de l'expérimentation animale malgré ces limitations abonde dans le sens du statisticien anglais George Box qui affirmait, dans un autre contexte : « tous les modèles sont faux, certains sont utiles ».

Règle des 3 R

Parallèlement à cela, sous l'impulsion de l'Europe et de l'Amérique du Nord, s'est développée depuis la fin des années 1950, une volonté de rendre l'expérimentation animale plus éthique, en optimisant les études. Cette démarche a donné naissance à ce que l'on appelle la règle des 3R pour Réduire, Raffiner et Remplacer qui fixe un cadre à la mise en place et à la conduite des études *in vivo*. Elle s'est matérialisée en Europe (directive n°2010/63/UE) et en France (décret n° 2013-118), constituant de véritables mesures pour la réalisation de l'expérimentation animale au sein des organismes publics de recherche.

Réduire : les recommandations portent sur une diminution du nombre d'animaux en limitant le recours à l'expérimentation animale pour les études indispensables et leurs répétitions inutiles. Un comité d'éthique évalue le protocole préalablement détaillé et peut y apporter certaines modifications afin d'en rationaliser la conception [222].

Raffiner : ce volet concerne la conduite de l'expérience en elle-même, ainsi que les méthodes utilisées. L'expérience doit être planifiée au mieux afin d'éviter le stress des animaux, de limiter leur souffrance en favorisant des techniques non invasives comme l'imagerie et en leur administrant des soins pré, péri et post opératoires. La définition de « points limites » est une notion nouvelle, dont le non-respect entraîne l'arrêt de l'étude. Il est aussi encouragé de limiter l'expérimentation à l'étude d'effets aigus plutôt que chroniques, dont la durée permettra de réduire la souffrance des animaux. L'utilisation de méthodes statistiques robustes est également une possibilité afin d'exploiter au mieux les résultats en évitant les doublons [223].

Remplacer : ce point, qui est plus un principe qu'une réelle directive, encourage le développement de méthodes alternatives *in vitro* ou *in silico* à l'expérimentation animale, chaque fois que cela est possible. La validation préalable est indispensable au remplacement. De très nombreux modèles sont aujourd'hui à l'étude, du plus simple au plus complexe. Son but est la mise au point d'un modèle permettant l'obtention de résultats similaires à ceux de l'expérimentation animale (données de sécurité par exemple), facile à manipuler, favorisant la répétition et la multiplicité des tests.

Modèles alternatifs

Généralités

Nous allons détailler dans ce paragraphe quelques uns des modèles *in vitro* alternatifs à l'expérimentation animale actuellement à l'étude.

Le but du développement d'un tel modèle doit prendre en compte plusieurs éléments. Il doit être capable de fournir des informations prédictives dans les sens où les données recueillies peuvent être rapportées à des effets observables chez l'Homme. Il doit être plus complexe que les modèles de culture monocellulaire en deux dimensions habituellement utilisés. Il devra également fournir des résultats reproductibles et être adaptable à un format d'étude haut débit.

L'approche la plus courante est l'ajout d'une dimension au système d'étude. La grande majorité des modèles alternatifs en développement utilise le concept de culture tridimensionnelle. La troisième dimension permet d'envisager différemment l'étude *in vitro*. On obtient par exemple la formation d'une structure organisée ou pseudo-organisée avec la présence d'interactions intercellulaires nouvelles ou bien la coopération entre différents types cellulaires dans le cas d'une co-culture.

Il a ainsi été montré que le passage d'un mode de culture 2D vers 3D induit une modification importante des cellules en terme de morphologie, de capacités d'interaction cellules-cellules ou cellules-matrice et également de différenciation [224, 225].

Ces modèles alternatifs ouvrent une troisième voie pour l'étude d'une réponse biologique à un traitement ou à la progression tumorale en se plaçant à la jonction entre l'approche *in vitro* classique et très mécanistique, celle *in vivo* plus globale.

Avantages

Le premier avantage d'un modèle tridimensionnel cellulaire est de présenter une structure géométriquement et spatialement parfaitement définie qui peut être facilement observable et mesurable, contrairement à un tapis cellulaire en deux dimensions capable de s'étendre à l'infinie. De plus, la culture tridimensionnelle a pour conséquence quasi-systématique d'être composée de cellules hétérogènes par leur phénotype, leur vitesse de prolifération ou de mort, permettant de se rapprocher de ce qui peut être observé dans un tissu humain. Cela est particulièrement utile dans le cas de l'étude d'un modèle tumoral.

L'hétérogénéité ajoutée à la présence éventuelle de plusieurs types cellulaires distincts peut conduire à une réponse différente à l'exposition à certains composés. Par exemple la lignée de cancer du sein MDA-MB-231, dont la sensibilité cisplatine est inférieure quand elles sont cultivées en 3D plutôt qu'en 2D. Cette différence de réponse a été montrée comme étant due à une augmentation de la production de TGF- β 1 par les cellules en 3D, une protéine connue pour être impliquée dans la modulation de la réponse au traitement de certaines cellules tumorales. De plus l'IC50 établie avec le modèle tridimensionnel se

rapproche plus de celui observé chez l'Homme que celui obtenue avec le modèle 2D classique [226].

Enfin, la formation de jonctions intercellulaires observables lors du passage du 2D au 3D, ainsi que la polarisation des cellules permet de se rapprocher d'une organisation observée dans les tissus humains. La Figure 26 montre l'importance de la structuration en 3D pour obtenir la polarisation et une activité plus physiologique des cellules étudiées.

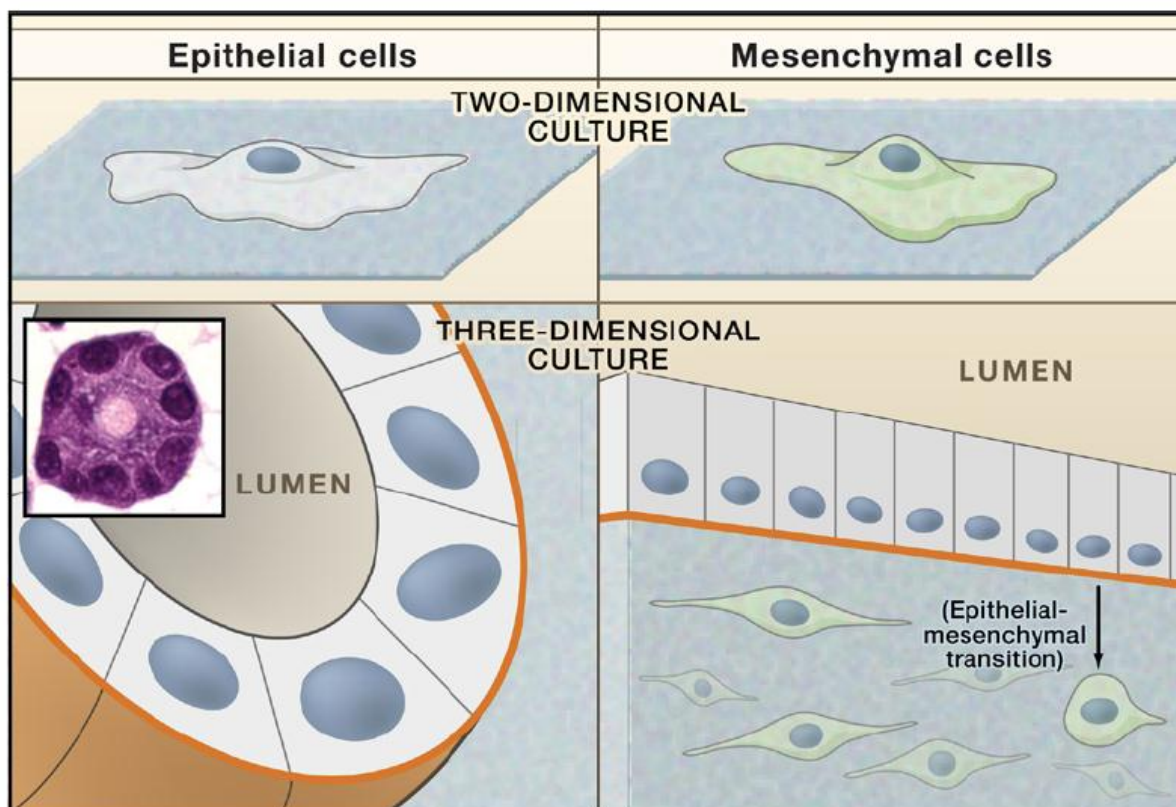


Figure 26 Organisations des cellules dans des modèles 2D et 3D (d'après Yamada et al, 2007)

Des mutations génétiques caractéristiques de certains cancers ont également été observées, notamment pour le cancer colorectal et son statut muté de *K-ras* qui apparaît lors du passage en trois dimensions [227].

La capacité du modèle à fournir aux cellules un microenvironnement est aussi un élément important. Cela est d'autant plus vrai pour l'étude du développement tumoral et de la réponse à un traitement pour lesquels ce microenvironnement joue un rôle important [228, 229]. La reconstitution peut alors, comme nous allons le voir, prendre plusieurs formes, depuis l'apport artificiel de constituants mimant cet environnement favorable au développement, jusqu'à sa constitution naturelle par les cellules grâce au mode de culture.

Le développement de ce type de modèle est important car elle va influencer sur le résultat obtenu. Par exemple, l'inclusion dans une matrice semi-solide de collagène d'une

cellule unique, d'un petit agrégat cellulaire ou d'un gros agrégat va conduire à des résultats différents [230].

Certains modèles aboutissent à la formation de nécrose cellulaire au sein de la structure 3D. Ceci est dû à l'absence d'un système vasculaire, permettant une oxygénation et à une élimination des déchets uniquement passive [231]. Dans le cas de l'étude de la progression tumorale ou de sa réponse à un traitement, le gradient d'hypoxie est d'un intérêt particulier [232].

Nous allons maintenant voir les principales différentes approches pour le développement de modèles alternatifs. L'accent sera mis sur les modèles utilisés pour l'étude de la progression tumorale et le screening de molécules actives.

Présentation des principales approches

Comme nous venons de le voir, face aux limitations des approches *in vitro* classiques, le manque de reproductibilité et le coût important des études *in vivo*, ainsi que la volonté politique de les réduire au strict minimum, la nécessité de développer des modèles alternatifs robustes et prédictifs est essentiel. Depuis plusieurs années maintenant, les progrès en biologie cellulaire et en ingénierie des tissus ont permis l'augmentation importante de l'étude de modèles de culture cellulaire en trois dimensions.

Ces nouvelles techniques ont abouti à la mise au point de modèles de plus en plus complexes contenant plusieurs types cellulaires, avec l'aide de supports nutritifs ou non qui permettent l'étude reproductible et le plus souvent réaliste de ce que pourrait être la réponse *in vivo* à un traitement donné. Ceci est d'autant plus vrai dans le cas de l'étude du cancer lorsque le modèle utilise des cellules humaines, et que sa caractérisation permet de montrer un réel mimétisme avec le cancer étudié [233].

Agrégation cellulaire spontanée

Cette approche, plus connue sous le terme de sphéroïde a été la première décrite pour établir une culture cellulaire en trois dimensions, et est à ce jour vraisemblablement la plus utilisée.

Elle est basée sur la capacité des cellules épithéliales à s'agréger spontanément afin de former des structures plus ou moins sphériques. On distingue d'ailleurs agrégation homotypique (avec le même type cellulaire) et hétérotypique (avec un autre type cellulaire), qui a son importance dans le processus de migration des cellules cancéreuses avec notamment l'adhésion avec les cellules endothéliales).

La réalisation de ce type de structure nécessite un environnement favorable à l'interaction intercellulaire qui n'a normalement pas lieu dans des conditions de culture en deux dimensions. Par exemple le cas de la lignée d'adénocarcinome pulmonaire A449 est intéressant : cultivées en deux dimensions, les cellules se multiplient jusqu'à atteindre la confluence mais aucune structure tridimensionnelle n'est observée. En revanche quand les

cellules sont placées dans une matrice semi-solide, on observe rapidement la formation de sphères, organisées et polarisées [234].

D'une manière générale, la formation de sphéroïdes est possible à l'utilisation d'une matrice semi-solide permettant le développement dans les trois dimensions des cellules qui vont ensuite s'organiser. De même la culture des cellules dans des bioréacteurs rotatifs comme celui développé par la NASA par exemple qui permettent, par des phénomènes physiques de mouvement des fluides et de microgravité, de favoriser l'agrégation cellulaire [235, 236].

La Figure 27 résume l'ensemble des méthodes d'obtention des sphéroïdes. A noter que la particularité de ces structures est l'organisation spatiale des cellules à laquelle s'ajoute un gradient de prolifération qui diminue de l'extérieur vers l'intérieur et l'apparition d'une lumière au cœur suite à la mort nécrotique progressive des cellules n'ayant pas accès aux éléments nutritifs ni à l'oxygène du milieu. La Figure 28 montre l'évolution de l'organisation des sphéroïdes, depuis l'agrégation des cellules jusqu'au modèle complexe final.

Les sphéroïdes peuvent être constitués d'un ou de plusieurs types cellulaires, et sont parfaitement adaptés à une utilisation pour un screening de la toxicité ou de l'efficacité antitumorale de molécules en haut débit, certains sont d'ailleurs déjà commercialisés comme modèle de screening de molécules actives. Par exemple la société InSphéro s'est spécialisée dans le développement de ces modèles pour des études précliniques. L'apparition de cellules nécrotiques au centre des structures en 3D limite malgré tout dans le temps leur utilisation ; cela pourra avoir un intérêt particulier en cancérologie où des cellules nécrotiques et des zones hypoxiques au sein des tumeurs peuvent être observées [237]. La limitation majeure de ces modèles est qu'ils ne peuvent pas être maintenus plus d'une quinzaine de jours et que par conséquent des traitements chroniques ou des suivis sur le long terme pour étudier l'émergence de possibles cellules résistantes ne sont pas possibles.

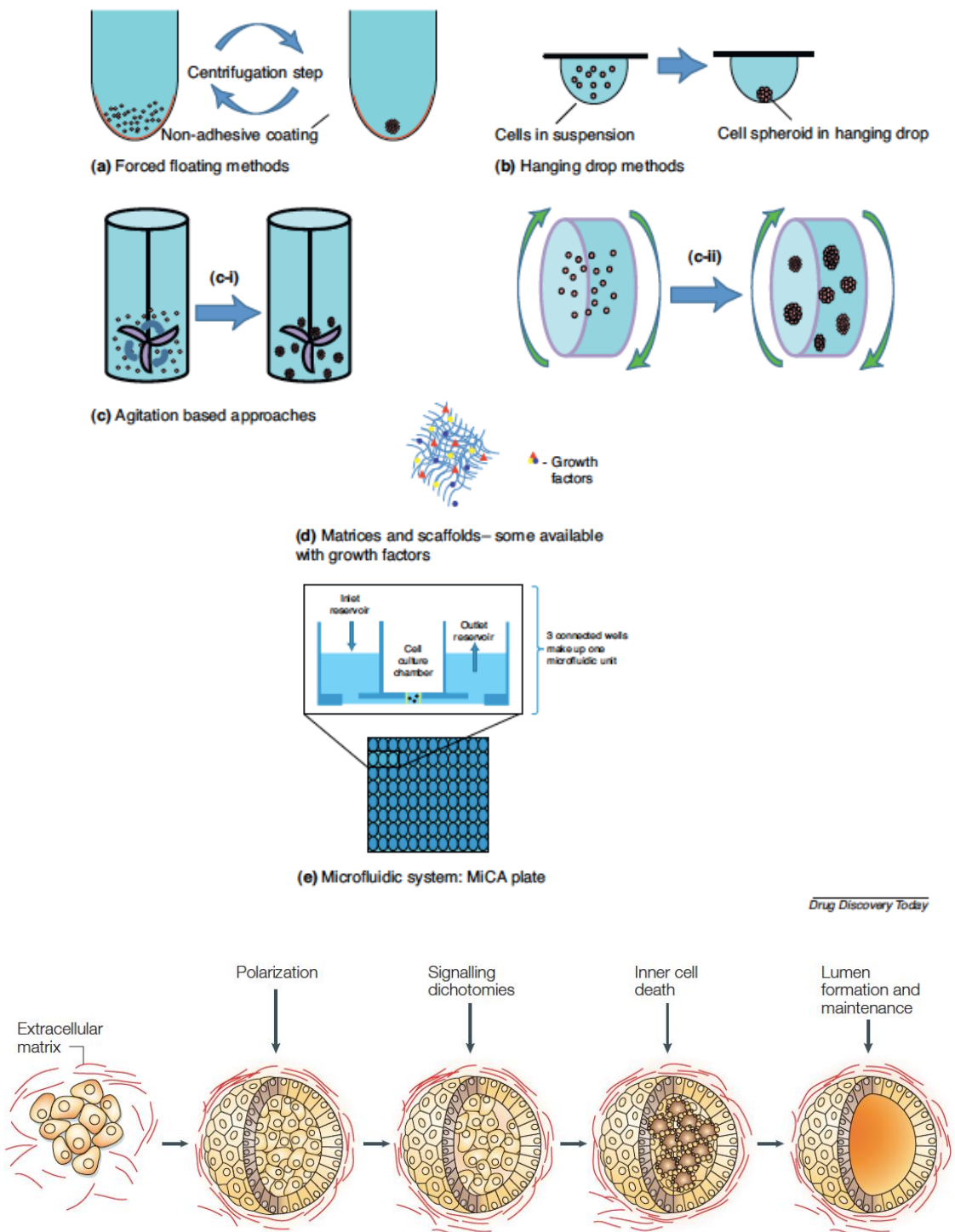


Figure 28 Etapes de formation d'un sphéroïde (d'après Debnath et al, 2005)

Matrices semi-solides biocompatibles

Sur le principe des tuteurs utilisés pour faciliter le développement de certaines plantes, des matrices biocompatibles ont été imaginées et développées pour favoriser la formation de structures cellulaires tridimensionnelles [238]. Elles sont la plupart du temps poreuses et vont permettre aux cellules de former le maillage nécessaire à la formation de l'organisation tridimensionnelle du modèle.

Il existe deux type de matrices : naturelles et artificielles. Les matrices naturelles sont les premières à avoir été utilisées et restent les plus simple. Elles sont constituées de protéines composant la matrice extracellulaire naturelle dont la plus courante est le collagène. On pourra ajouter des facteurs de croissance ou de différenciation pour faciliter la formation de la structure.

Les matrices artificielles sont quant à elles un moyen de simuler la présence de matrice extracellulaire. Elles sont constituées soit de molécules naturelles comme le collagène, soit de polymères synthétiques comme l'acide polylactique [239]. Cependant, dans la grande majorité des cas, la matrice ne sera constituée que d'un seul type de protéine de la matrice extracellulaire, occultant la complexité de sa composition.

Ces matrices sont la plupart du temps biodégradables et ne servent donc qu'à l'initiation de l'organisation tridimensionnelle. Outre leur emploi pour la réalisation de modèles *in vitro*, ce genre de matrice est également très utilisé pour la reconstruction tissulaire [240, 241].

Organe ex-vivo

L'utilisation d'organes ou de fragments d'organes maintenus dans des conditions physiologiques le temps d'une étude est également une approche alternative à l'expérimentation animale. La nécessité de réunir l'ensemble des conditions favorables de température, d'environnement et de perfusion nécessaires à la conservation du tissu, la durée de l'étude sera limitée à quelques jours (passé ce délai, la souffrance cellulaire est réelle et des modifications importantes du tissu sont observables) [242-244]. Les coupes d'organes issus de patients sont, à l'heure de la médecine personnalisée, particulièrement adaptées à l'étude de la réponse aux molécules actives dans le domaine de la cancérologie [245-247].

Synthèse et perspectives

Toutes ces approches de culture cellulaire en 3D permettent donc de se rapprocher des conditions physiologiques des organes humains pour l'étude de leur exposition à différents traitements. Egalement de limiter, autant que faire ce peu, le recours à l'expérimentation animale par l'obtention de données de sécurité qui soient les plus prédictives possibles.

Cependant, dans la majorité des cas, l'obtention de structures cellulaires en trois dimensions nécessite l'utilisation de matrices biocompatibles facilitant leur formation et parfois même des facteurs de croissance pour stimuler la réorganisation. L'utilisation de telles matrices peut donc être également un facteur limitant puisque les cellules en sont dépendantes et suivront son architecture.

Un autre facteur limitant de la plupart des modèles 3D utilisés est le temps de l'étude. En effet dans le cas des sphéroïdes les cellules ont tendance à se nécroser par le centre, ce qui pourra être un facteur intéressant mais difficile à maîtriser. Dans le cas des

coupes d'organe, une dérive est observée au bout de quelques jours, empêchant une étude à long terme.

Malgré une grande volonté politique et scientifique de développer des structures capables de remplacer l'expérimentation animale, le modèle parfait n'a pas encore été développé mais certaines pistes intéressantes semblent pouvoir être creusées.

Pour ce travail, nous nous sommes intéressés au poumon d'une part pour son rôle de premier rempart vis-à-vis de notre environnement. Plus particulièrement dans le cas de l'exposition aux nanoparticules, nous avons vu précédemment qu'il était primordial de connaître leurs effets. Et que compte tenu du nombre et de la diversité des nanoparticules auxquelles l'Homme est potentiellement exposé, le recours à l'expérimentation animale en première intention pour tester la toxicité est totalement exclue. Aujourd'hui les études ne permettent pas encore de dégager des tendances claires de dangers liés à l'inhalation des nanoparticules.

Il a été établi une correspondance entre la taille des particules inhalées et la profondeur qu'elles peuvent atteindre dans l'arbre respiratoire (Figure 29).

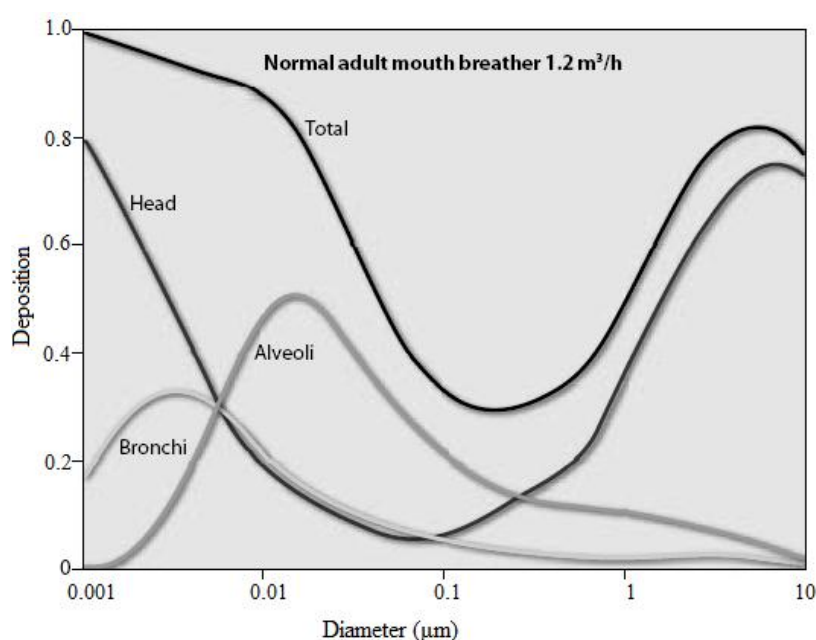


Figure 29 Efficacité de dépôt de nanoparticules en fonction du compartiment de l'arbre respiratoire (d'après Theophanides 2011)

Nous nous sommes donc concentrés sur la création d'un modèle en 3D de cellules de l'épithélium alvéolaire, principales cibles des nanoparticules inhalées.

D'autre part un modèle 3D de cancer pulmonaire humain présente aussi un intérêt majeur pour tester l'efficacité potentielle des MILs et des H-NDs. En effet, il s'agit de tumeurs difficiles, et l'inhalation représente une voie privilégiée permettant de réduire la toxicité agents thérapeutiques, en comparaison à une administration systémique.

Objectifs généraux

Les paragraphes précédents ont permis de mettre en avant les particularités des nanoparticules et de leurs principales applications, notamment dans le domaine médical.

Deux types de nanoparticules ont plus précisément été abordés : les nanodiamants hydrogénés et les Matériaux de l'Institut Lavoisier qui ont été au cœur de ce travail.

Ces deux types de nanoparticules sont une parfaite illustration de l'atout que représentent certaines nanoparticules pour enrichir l'arsenal thérapeutique afin de pallier les problèmes de résistance aux traitements de certaines cellules cancéreuses.

Les Matériaux de l'Institut Lavoisier sont des nanoparticules organométalliques poreuses dont les capacités d'encapsulation de molécules actives sont très importantes. Associées à un phénomène de dégradation spontané et prolongé dans le temps, ces caractéristiques font des MILs de fabuleuses plateforme pour véhiculer des médicaments jusqu'aux cellules cibles.

L'objectif est ici de montrer la biocompatibilité de ces composés par une étude *in vitro*. La balance bénéfice/risque est un élément important à prendre en compte pour le développement d'un candidat médicament. Cependant, une toxicité trop importante ne peut être acceptée et sera préjudiciable à une utilisation future de ce candidat. C'est pourquoi il est indispensable d'étudier les effets et les mécanismes cellulaires mis en jeu en réponse à une exposition à ces composés.

Nous nous sommes donc intéressés à la toxicité éventuelle des MILs dans différentes lignées d'intérêt pour les futures applications.

Les nanodiamants hydrogénés quant à eux, grâce à leur fonctionnalisation de surface possèdent la capacité d'interagir avec les photons de l'irradiation afin d'en potentialiser les effets cytotoxiques et génotoxiques sur les cellules cancéreuses. L'objectif de ce travail est de valider ce postulat physico-chimique dans un système biologique *in vitro*. La voie suspectée comme responsable de la potentialisation des effets de l'irradiation est l'induction massive de stress oxydant. C'est donc ce mécanisme qui va être étudié tout particulièrement, ainsi que les voies cellulaires qui en dépendent.

En parallèle de ces travaux, la question de la toxicité des nanoparticules revêt un intérêt tout particulier étant données les très nombreuses applications envisagées. Elle est d'autant plus importante que le caractère unique des nanoparticules oblige l'étude de leur toxicité de façon indépendante et systématique. Le laboratoire est particulièrement investi dans l'étude de la toxicité des nanoparticules et les résultats de deux études seront présentés dans les prochains paragraphes.

La première constitue l'évaluation de la toxicité de nanodiamants carboxylés sur un grand nombre de lignée cellulaires. L'intérêt de ces particules est important pour de multiples applications

industrielles et biologiques et la démonstration de leur innocuité est indispensable avant de les envisager. L'ensemble des paramètres vitaux cellulaires ont été étudiés afin parfaitement caractériser la réponse à l'exposition de ces cellules aux nanodiamants carboxylés.

La deuxième vise à montrer le rôle important que peut jouer des nanoparticules de dioxyde de titane inhalées sur les effets de la radiothérapie. Ce type de nanoparticules étant particulièrement utilisé dans des produits cosmétiques, d'alimentation et de construction, leur présence dans notre environnement est très importante. Cette étude illustre l'importance d'évaluer les effets biologiques des nanoparticules et d'anticiper, autant que faire se peut, leur interaction avec d'autres événements biologiques comme une irradiation thérapeutique. Il s'agit ici d'une approche uniquement toxicologique et non médicale.

Enfin, face aux besoins rencontrés pour l'évaluation de la toxicité, de nouveaux outils sont nécessaires. Ces outils sont de nouvelles techniques ou de nouveaux tests permettant d'évaluer la toxicité des nanoparticules dont les propriétés physico-chimiques sont si particulières. Les nouveaux outils sont également des modèles cellulaires qui pourront permettre d'étudier le comportement des composés et leurs effets sur les cellules à court et à long terme.

L'objectif est ici de concevoir, développer et caractériser un modèle de culture cellulaire tridimensionnel de poumon. Ce modèle permettra ainsi de répondre aux directives gouvernementales en matière d'étude de toxicité.

Résultats

Les Matériaux de l'Institut Lavoisier

Après la présentation des MILs, de leur mode de synthèse et de leurs multiples applications potentielles, une question demeure cependant : celle de la toxicité de ces composés. En effet, bien que certaines études aient démontré de façon rapide l'absence de cytotoxicité des MILs *in vitro* et *in vivo* [80, 102], aucune étude approfondie n'a été menée pour évaluer leur toxicité et les éventuels mécanismes mis en jeu par leur utilisation.

C'est dans ce contexte que nous avons souhaité étudier la cytotoxicité et la génotoxicité des MIL-100 à base de fer, d'aluminium ou de chrome.

Il a été décidé de mener cette étude sur quatre lignées cellulaires différentes : deux de poumons (A549 et Calu-3) comme représentatives d'un organe d'exposition en cas d'inhalation (une des voies d'administration envisagée pour certaines molécules à vectoriser). Nous avons également deux lignées hépatiques (HepG2 et Hep3B) représentatives d'un organe de passage et surtout d'accumulation des composés en cas d'administration systémique.

Nous avons débuté notre étude par une première étape de screening par mesure de l'impédance cellulaire fin de définir des doses et des temps remarquables. A partir de ces éléments, la deuxième étape a consisté à étudier l'ensemble des paramètres généraux de la cellule, dont la mort cellulaire, le cycle cellulaire, le stress oxydatif, l'intégrité membranaire notamment. La génotoxicité a également été étudiée dans le cas de la lignée Hep3B, pour laquelle une mortalité importante avait été observée à la suite de l'exposition au MIL-100(Fe).

Enfin, nous nous sommes assurés que les MILs étaient bien entrées dans les cellules, condition *sine qua non* de l'absence de toxicité induite dans le cas où aucun effet n'est observé.

Les résultats obtenus confirment deux choses :

- Premièrement, les MILs entrent très rapidement dans les cellules, de façon concentration dépendante. Ceci quel que soit la lignée, confirmant ce qui avait été observé pour quelques lignées sans réelle notion de cinétique et de concentration [80, 88].
- deuxièmement, les MILs démontrent leur biocompatibilité puisqu'aux doses utilisées en thérapeutique, aucune toxicité à court ou à long terme n'a été observée.

***In vitro* biocompatibility of mesoporous metal (III; Fe, Al, Cr) trimesate MOFs nanocarriers**

Romain Grall^a, Tania Hidalgo,^b Jozo Delic,^a Alfonso Garcia-Marquez,^b Sylvie Chevillard^{a*} and Patricia Horcajada^{b*}

^aLaboratoire de Cancérologie Expérimentale, Service de Radiobiologie Expérimentale et Innovations Technologiques, Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Fontenay-aux-Roses, 8 Route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses, France.

^bInstitut Lavoisier, CNRS UMR 8180, Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, 45 Av. des Etats-Unis, 78035 Versailles cedex, France.

ARTICLE EN COURS DE SOUMISSION

ABSTRACT

The high porosity and versatile composition of the benchmarked mesoporous metal(Fe, Al, Cr) trimesate metal-organic frameworks (MIL-100(Fe, Al, Cr)) make them very promising solids in different strategic industrial and societal domains (separation, catalysis, biomedicine, etc) ^[1-4]. In particular, the MIL-100(Fe) nanoparticles (NPs) have recently revealed as a one of the most promising and innovative next generation tools enabling multidrug delivery to overcome cancer resistance. Here we analyzed the *in vitro* toxicity of the potential drug nanocarrier MIL-100(Fe) NPs and the effect of the constitutive cation by comparing its cytotoxicity with that one of its Cr and Al analogue NPs. Lung (A549 and Calu-3) and hepatic (HepG2 and Hep3B) cell lines were selected considering pulmonary, ingestion or intravenous exposure modes. First, the complete physicochemical characterization (structural, chemical and colloidal stability) of the MIL-100(Fe, Al, Cr) NPs was performed in the cell culture media. Then, their cytotoxicity was evaluated on the four selected cell lines using a combination of methods from cell impedance, cell survival/death and ROS generation to DNA damage for measuring genotoxicity.

INTRODUCTION

Exceptional and regular porosities together with an extraordinary structural and compositional versatility have made Metal-Organic Frameworks (MOFs) very promising candidates for industrially and societally relevant domains (separation, catalysis, sensing, etc.) [1, 2, 4-12]. The recent emergence of nanometric porous MOFs (nanoMOFs) in the biomedical field have attracted a great interest owing to their amphiphilic internal microenvironment, well-adapted to the adsorption of diverse guests (drugs, biological gases, cosmetics, nucleic acids) [3, 4, 13-16]. Of particular relevance is the development of highly efficient and biocompatible nanocarriers for cancer treatment [17, 18]. However, important toxicological concerns have arisen from these promising applications, notably in biomedicine. The physicochemical properties of nanoMOFs (composition, size, molecular weight, surface chemistry...) might play a key role in the nanomaterial's performance in terms of biocompatibility, biodistribution, and biodegradability and hence, toxicity and efficacy [19-24].

Therefore, prior to any bioapplication of nanoMOFs, it is of high relevance to investigate their toxicity profile [25]. To the best of our knowledge only two studies have been reported dealing with the *in vivo* toxicity of few nanoMOFs. Few of us reported for the first time the evaluation of the *in vivo* toxicity of high doses (220 mg.kg^{-1}) of three Fe-nanoMOFs based on different organic ligands [(MIL-100 (trimesate), MIL-88A (fumarate) and MIL-88B_4CH₃ (tetramethylterephthalate)] [26] administered intravenously to rats, evidencing a lack of severe toxicity (behavioral, histological, biochemical, enzymatic parameters, etc.) from 1 day to up to 3 months. Besides, the nanoMOF biodegradation into their constitutive components (linker and iron) was confirmed, observing an excretion via urine and feces without any metabolization. These very encouraging results have opened new perspectives for improving treatments in nanomedicine based on nanoMOFs [26, 27]. Despite these promising results obtained with few iron carboxylates and due to the high versatility of these solids, many factors could influence their toxicity such as their topology, composition, biological stability, particle size and surface properties, among others. Therefore, the understanding of the main parameters governing the toxicity of nanoMOFs is of high relevance. In this sense, a second work dealing with the screening of the *in vivo* toxicity of nine nanoMOFs with different structures and compositions in zebrafish embryos was recently reported by Ruyra *et al.* [28], concluding a wide variation of the toxicity of the different nanoMOFs and ii) highlighting the influence of the cation leaching coming from the hybrid network degradation.

Given the great variety and number of nanoMOFs and their application domains ^[29-34], it is impossible to study their toxicity using *in vivo* assays for ethical, temporal and economic reasons. *In vitro* studies are an interesting alternative to screen the nanoMOF toxicity, providing additional mechanistic insights into toxicity pathways. In fact, cytotoxicity of a series of porous nanoMOFs with different compositions and structures have been recently evaluated in different cell lines (J774, HeLa, Caco-2, HL-60, HepG2, MCF7...),^[28, 35-37] concluding that i) the MOFs NPs exhibit lower cytotoxicity as compared to that of other commercialized nanosystems, and ii) a strong dependence between the MOF composition and the cytotoxicity occurs. In particular, Co, Ni or Mg-based nanoMOFs showed no marked cytotoxicity on HepG2 and MCF7 cells, whereas nanoMOFs containing Cu, Mn or Zn seemed to be highly cytotoxic (at 200 μ M). In addition, the cellular specific response obtained after exposure with different nanoMOFs, clearly indicated cell line specific responses due to both cellular origin and genetic background. Among the nanoMOFs, the mesoporous metal(III) trimesate MIL-100 series (MIL stands for Material of Institut Lavoisier) is particularly interesting. Their cubic structure based on trivalent metal octahedra (Fe ^[38], Al ^[39], Cr ^[40], V ^[41], Sc ^[42], Tb ^[43]) trimers linked to trimesate anions exhibits an important porosity (BET surface area and pore volume of 2400 m².g⁻¹ and 1.2 cm³.g⁻¹, respectively) associated to two types of mesoporous cages (~25 and 29 Å) accessible by microporous windows (~5 and 8.5 Å). Their high thermal (300 °C) and chemical stability (organic solvent, water under reflux) together with the presence of unsaturated Lewis acid metal sites (CUS) or, even, redox sites ^[44, 45], make them interesting candidates for a vast number of domains such as CO₂ capture ^[46], H₂ storage ^[47], gas separation ^[45], catalysis ^[38], xylene separation ^[48], N/S compound removal ^[49], energy-efficient dehumidification ^[50], drug delivery and imaging ^[51, 52] and so on. Notably, the MIL-100(Fe) have revealed as one of the most promising drug nanocarrier due to (i) its exceptional loading capacity of several therapeutic molecules, (ii) their controlled release and (iii) its advantageous imaging properties.

In the present work, considering the promising outcomes of the MIL-100 NPs, a selection of three MIL-100 nanoparticulate systems based on different metals (Fe, Al, Cr) has been tested for *in vitro* toxicity in order to i) understand the more relevant mechanisms involved on the MIL-100 NPs toxicity, in particular, the role of the cation release. In this sense, the nature of the cation could either damage the cells, through the formation of reactive oxygen species (ROS), or at the opposite, could favor the interaction and neutralization of ROS. Overall, the presence of the cation could alter the cellular homeostasis ^[53-57]; and ii) reveal attractive

features for future applications in relevant fields, notably biomedicine thought their administration by inhalation, intravenous and gastro-intestinal routes. In addition, pulmonary route is one of the major exposure modes to NPs. Thus, cytotoxicity studies were conducted on a series of four human epithelial cell lines chosen to mimic targeted tissues (*i.e.* lung and liver). Thus, two lung (A549 and Calu-3) and two hepatic cell lines (HepG2 and Hep3B) were tested, selecting the Hep3B as the only one that does not express p53 (the guardian of the genome), which allows estimating NPs toxicity in a highly stress sensitive context.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis and physicochemical characterization of MIL-100(Fe), MIL-100(Al) and MIL-100(Cr) NPs

First, the synthesis of MIL-100 NPs based on different trivalent cations (Fe, Al or Cr) was successfully performed using an efficient and green microwave-assisted hydrothermal route [58, 59]. These particles were fully characterized by different techniques, including X-ray powder diffraction (XRPD), dynamic light scattering (DLS), ζ -potential and transmission electron microscopy (TEM), in order to provide qualitative and quantitative parameters to associate to their cytotoxicity. XRPD patterns (Figure 1) show the characteristic diffraction peaks of MIL-100 structure, with however broad reflections in agreement with the presence of small crystals. TEM images (Figure 1) show well-faceted NPs for MIL-100(Fe) and (Al) of around 150 and 300 nm diameter. In contrast, more or less spherical and smaller NPs (~25 nm) are observed for the MIL-100(Cr), with however an important aggregation between them.

The analysis of the particle size and ζ -potential was initially performed in water and ethanol suspensions, showing in all cases quite monodispersed particles (Table 1). Particle size of MIL-100(Fe) and (Al) NPs is in agreement with the TEM observations (~150 and 300 nm, respectively). The larger particle size of MIL-100(Cr) NPs in comparison with the microscopy images (80 ± 41 vs. ~25 nm, respectively) seems to be related with an important aggregation phenomenon in the colloidal solution, as well as already observed in the dry state (Figure 1).

Except for the MIL-100(Fe) NPs, in which the particle size was not significantly different in both solvents (139 ± 25 and 168 ± 10 nm in water and ethanol, respectively), the dimension of MIL-100(Al, Cr) NPs seems to be larger when dispersed in water than in ethanol (249 ± 28 vs. 147 ± 41 nm and 142 ± 63 vs. 80 ± 41 nm for the MIL-100(Al) and (Cr), respectively). This

might be related with the lower absolute value of the surface charges (Table 1). It is well known that absolute ζ -potential values closer to the neutral charge (usually $< [30]$ mV) lead to higher aggregation effect as a consequence of the absence of enough electrostatic repulsions to stabilize the colloids. Additionally, it was previously proposed that this aggregation phenomenon could be associated with a higher dynamic formation of the MOF in water than in ethanolic solutions ^[58].

Regarding the ζ -potential measurements, the external surface of these MIL-100(Fe, Al, Cr) NPs would be rationally formed from a combination of partially coordinated carboxylate/carboxylic acids and metal octahedral trimers, whose coordination sphere could typically be ensured by trimesate moieties and OH, F or H₂O terminal groups. The negative charge associated to the MIL-100(Fe) surface in both solvents suggests a higher proportion of iron than carboxylate/carboxylic acid, in agreement with previously reported NPs treated with KF (see experimental section) ^[59]. This KF treatment, used for the complete removal of non-reacted ligand, provoke the replacement of partially coordinated linkers on the outer surface by F⁻ anions to the metallic centers, leading to negative charges. In contrast, the highly positive superficial charges obtained in ethanol solutions of MIL-100(Al) and (Cr) NPs as well as their slightly positive or negative ζ -potential values in water, respectively, might indicate the presence on their outer surfaces of an important fraction of linkers, either pending carboxylate and/or carboxylic acid groups (Table 1). The acidification of the pH when NPs were dispersed in water solution from 6.0 to ~4.5 seems to support this hypothesis.

Colloidal stability

Both, particle size and nature of the surface have major impact on the interaction of MIL-100 NPs with the biological structures, conditioning their physiological colloidal stability, cell uptake, biodistribution or toxicity, among others. For better understanding the NP-cell interactions, the colloidal stability of MIL-100(Fe, Al, Cr) NPs was assessed by monitoring the NP size and surface charge over time under the conditions used for the culture of the selected cells (FBS-supplemented-DMEM and -MEM, at 37 °C; Figure 2).

On the whole, the initial particle size of MIL-100(Fe, Al, Cr) NPs in the cell culture media was similar or slightly larger than in pure water with polydispersity values ~ 0.3 (252 ± 32 vs. 255 ± 21 nm; 311 ± 35 vs. 291 ± 24 nm and 146 ± 32 vs. 153 ± 49 nm for Fe-, Al- and Cr-based MIL-100 NPs, respectively). This is probably related with the adsorption of proteins, coming

from the cell culture media, on the external surface of the NPs. The formation of a protein corona onto the MIL-100 NPs surface, mainly based on the serum albumin (the most abundant protein within the mammals serum), is supported by ζ -potential values of around -10 mV for all the MIL-100(Fe, Al, Cr) NPs. Previous studies of MIL-100(Fe) NPs in presence of a phosphate buffer (PBS) supplemented with bovine serum albumin (BSA) already displayed an important reduction of the ζ -potential from -31 mV in PBS to -10 mV in BSA-PBS^[59].

In addition, despite slight differences on the chemical composition of DMEM and MEM media, the MIL-100 NPs exhibited similar initial particle size and superficial charge regardless the cell culture media, facilitating the direct comparison of cytotoxicity between the different selected cell lines (see below). Except for the MIL-100(Cr) NPs suspended in MEM, the particle size of MIL-100(Fe, Al, Cr) NPs remained constant along the time (up to 48 h). The important colloidal stability of these NPs in the cell culture media could be explained by the presence of the protein corona by avoiding the interparticle attraction through the introduction of new steric hindrance repulsions^[59]. In contrast, although the particle size of MIL-100(Cr) NPs in MEM medium did not significantly change up to 24 h, at 48 h it increased from 153 ± 4 to 274 ± 39 nm. This aggregation phenomenon could be explained by the progressive decrease of the absolute superficial charge, from around -10 to -4 mV. One could tentatively attribute the ζ -potential modification to the replacement of the protein by other components of the medium. Additionally, this effect of the neutralization of the surface charge is also observed when the MIL-100(Cr) NPs were suspended for 48 h in DMEM, reaching ζ -potential values similar to MIL-100(Cr) NPs in MEM after 24 h (-6.0 mV). Note here that at this value, MIL-100(Cr) NPs seem to be colloiddally stable.

Therefore, for further comparisons of potential cytotoxic effects of MIL-100 NPs, one can conclude that MIL-100(Fe) and (Al) NPs exhibit a similar particle size (230 ± 22 and 320 ± 36 nm, respectively) and ζ -potential (*ca.* -10 mV) with a suitable colloidal stability in both DMEM and MEM culture media up to 48 h. The MIL-100(Cr) NPs show smaller dimensions (146 ± 17 nm) and good colloidal stability up to 24 h regardless the culture media, with however a significant aggregation effect at 48 h in MEM medium associated to a decrease of the absolute ζ -potential value (from -10 to -4 mV).

Chemical stability.

A crucial point to take into account for a successful and prolonged drug delivery is the provision of chemical stability to the nanocarrier in biological environment. These nanosystems must be stable in the desired physiological media for an extended period of time in order to reach the target, without compromising the cell viability. In this sense, the chemical stability of MIL-100(Fe, Al, Cr) NPs has been investigated in both cell culture media by assessing the leaching of the constitutive organic linker (trimesic acid) by high-performance liquid chromatography (HPLC) (Figure 3).

Interestingly, with the exception of the MIL-100(Al) NPs in MEM, all the NPs show an important stability in the cell culture media with low degradations (< 6% after 48 h of exposition). In particular, less than 1% degradation was detected for the MIL-100(Cr) NPs after a contact time of 48 h in both media, in agreement with the slower exchange constant rate of the chromium ion (see rate constant for the exchange of a coordinated water molecule of the first coordination shell of a given metal ion of $[M(H_2O)_6]^{3+} = 10^0, 10^{-2}$ and 10^{-6} , for $M = Al, Fe, Cr$)^[60]. In contrast, the degradation profile of MIL-100(Al) NPs in MEM reached almost 80% at 48 h. Considering the considerably higher stability of these NPs in DMEM (~6% degradation), this dramatic instability in MEM might be related with the medium composition. Indeed, MEM comprises a different switterionic organic buffering agent (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid or HEPES) and sodium pyruvate, as well as additional non-essential amino acids in comparison with DMEM. The presence of highly complexant groups in the chemical structure of HEPES (sulfate, heterocyclic nitrogen, hydroxyl) and sodium pyruvate (carboxylate), able to compete by the cation coordination with the constitutive metal, could partially explain the lower stability of MIL-100(Al) NPs in MEM. Despite the MEM composition, the iron and chromium based MIL-100 NPs were chemically stable in this medium due probably to their slower exchange constant rates^[60].

Thus, with the exception of the MIL-100(Al) NPs in MEM medium, the rest of the NPs present an important stability under conditions used for the cytotoxicity assays.

***In vitro* biocompatibility of MIL-100(Fe, Al, Cr) NPs: Real-time follow-up of cellular impedance**

The *in vitro* toxicity of MIL-100(Fe, Al, Cr) NPs on cell growth and proliferation/viability and support adherence was measured by performing a real-time monitoring of cell impedance using the xCELLigence[®] system (ACEA Biosciences, San Diego, CA), which is a powerful

and sensitive high-throughput method for the real time simultaneous screening of several cell lines at different concentrations ^[59], without any interaction between NPs and the signal ^[37]. The four selected cell lines (A549, Calu- 3, HepG2 and Hep3B) were exposed for 72 h to different concentrations of MIL-100(Fe, Al Cr) NPs (6, 32 and 64 $\mu\text{g.cm}^{-2}$, corresponding to 10, 50 and 100 μg of NPs *per mL*; Figure 4). Note that the expression of doses in $\mu\text{g.cm}^{-2}$ was chosen to get a more accurate comparison between cell lines and all experiments performed in this study. Thus, after exposure, the variation of cellular impedance was measured by the Cellular Index (CI), an arbitrary unit that integrates possible variations in cellular morphology, viability and proliferation. Except for the Hep3B cell line, no significant differences of the CI values were observed after the exposure to MIL-100(Fe, Al, Cr) NP in comparison to unexposed control cells. These results are in agreement with the absence of severe cytotoxicity of the MIL-100, whatever the metal (Fe, Al, Cr) ^[37]. In contrast, the CI of Hep3B cell line significantly decreased after exposure to all MIL-100(Fe, Al, Cr) NPs, notably for the MIL-100(Fe) NPs. Contrary to the *a priori* higher toxicity of chromium compounds, the cytotoxicity of MIL-100(Fe, Al, Cr) seems to be independent on the nature of the cation ^[61, 62]. In addition, the specific cytotoxicity of Hep3B cell line does not come from the culture media or degradation kinetics of the MIL-100 NPs since, except for A549 which was cultivated in DMEM, the other three cell lines were cultivated in MEM medium. In this sense, the important degradation of the MIL-100(Al) NPs in MEM (~80% of degradation after 48 h; Figure 3) leading to a high aluminum leaching (~26.2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ or 16.7 $\mu\text{g.cm}^{-2}$) does not induce cytotoxicity in Calu-3 and HepG2 cell lines, ruling out the influence of the leaching of the metal and organic linker on the cytotoxic effect of MIL-100 NPs. Thus, the higher toxicity of the Hep3B cell line in comparison with the rest of cells might be related with intrinsic properties. Indeed, as previously mentioned, the absence of p53 expression in Hep3B cells, acting an essential repairing of the genome integrity, could be explained the evidenced higher toxicity of MIL-100(Fe, Al, Cr) NPs on these cells.

In any case, since modification of CI integrates different possible cell perturbation further experiments were conducted for measuring cell death, cell cycle, oxidative stress and genotoxicity. Considering the progressive degradation of the MIL-100 NPs under physiological conditions ^[50, 51, 63], and based on the degradation profiles (Figure 3) shorter exposure times (up to 24 h) were selected for all the following experiments in order to take into account mostly the primary effects induced by the "entire" MILs NPs and not by the degradation products.

Cell viability

As CI integrates different cell parameters such as viability, morphology and membrane potentials, the cell viability was also measured by flow cytometry after ToPro-3 cell exposure, which permits to discriminate alive from dead cells since this dye incorporates into DNA of dead cells ^[64]. Cells were analyzed after 2 and 24 h of contact time at two doses (6 and 64 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) of MIL-100(Al, Fe, Cr) NPs (Figure 5). Aminated polystyrene nanobeads (PSB-NH₂) were chosen as cell death positive control since they have been recently identified as one of four nanomaterials with an important acute toxicity profile ^[65], associated to cell membrane damage^[66] and activation of inflammasome pathway ^[67]. While PSB-NH₂ effectively induced significant cytotoxicity on A549, Calu-3 and HepG2 lines (up to 100% of cell death) after 24 h of exposure, the highest concentration (64 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) of MIL-100(Al, Fe, Cr) NPs did not induce any significant cytotoxic effect neither at 2 nor 24 h of incubation, in agreement with the absence of significant cytotoxicity observed by xCELLigence technique (Figure 4). In contrast, a significant increase of Hep3B cell death (15 and 39% at 2 and 24 h, respectively) was observed after exposure at the higher concentration (64 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) of MIL-100(Fe) NPs. Once again, these results are in accordance with the data obtained by xCELLigence (Figure 4), indicating a toxicity associated to the iron based NPs. Taking into account that no significant toxicity was detected for neither the MIL-100(Al) or (Cr) NPs, the lower viability observed in MIL-100(Fe) might be related with the iron cation either within the particle or released to the medium ($\sim 6\%$ of degradation corresponding to $2.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ or $1.2\ \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ of metal).

Cell internalization of MIL-100 NPs

To fully interpret cytotoxicity data, specifically in absence of cellular effects, it is important to analyze the cellular internalization of MIL-100 NPs ^[68]. In addition, the cell uptake of the MIL-100(Fe) drug nanocarrier is crucial to deliver their active cargo.^[69] Thus, the interaction/internalization between cells and MIL-100(Fe, Al, Cr) NPs was firstly studied by flow cytometry in terms of modification of the cell granularity through the measurement of side scatter parameter (SSC) (Figure 6 and S1), as previously described for other nanoparticulate systems such as WC-Co and TiO₂ NPs ^[64, 70, 71]. Two concentrations of MIL-100(Fe, Al, Cr) NPs (6 and 64 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) were incubated with the A549, Calu-3, Hep3B and

HepG2 cell lines for 2 and 24 h. It should be mentioned the significant SCC increase observed after exposure of Hep3B cells at the higher dose of MIL-100 NPs (Figure 6), which may indicate an important cell uptake of MIL-100 NPs, in accordance with previously published MIL-100(Fe) internalization onto fetal cervical carcinoma HeLa or mice macrophages J774 cell lines using confocal microscopy^[37]. Indeed such a comparison gives only a tendency since confocal microscopy is not a quantitative method, cell lines are quite different and macrophages are specifically in charge of detoxication. However, the cell granulometry did not significantly change upon the MIL-100(Fe, Al, Cr) NPs incubation with A549, Calu-3 and HepG2 cell lines (Figure 6), indicating that either NPs are not in interaction/internalized or that SSC is not well-adapted to assess the MIL-100 NPs uptake (as it is the case for other NPs, such as SiO₂^[72]).

To elucidate if MIL-100(Fe, Al, Cr) NPs entered into these cells, we exposed Calu-3 cells to the MIL-100(Fe) NPs advantageously labelled with the fluorophore furazan (see Experimental section) to track the particles by both flow cytometry and video-confocal microscopy. Note that this polar fluorophore i) is strongly associated to the MIL-100(Fe) NPs, being almost no released from NPs to the culture media, and ii) is not able to penetrate into the cells, as recently published^[14, 37]. Calu-3 cell line was chosen to more precisely explore the MIL-100(Fe) uptake since its cell granulometry upon the contact with the NPs is strictly comparable to that of control cells, suggesting the absence of any NPs cell interaction/uptake (Figure 6). As seen in Figure 6, a rapid (almost immediate) concentration-dependent penetration of MIL-100(Fe) NPs into the Calu-3 cells was observed both by flow cytometry and confocal microscopy.

Finally, considering the less favorable case of Calu-3 cells and the similarities between the three MIL-100(Fe, Al, Cr) NPs in terms of ζ -potential and particle size in the cell culture media, one could extrapolate that, even if the SSC is not significantly increased as compared to control cells (Figure 6), MIL-100 NPs are internalized by the A549, Calu-3 and HepG2 cell lines.

Oxidative stress: generation of reactive oxygen species (ROS)

Oxidative stress is often related with NPs cytotoxicity^[73, 74]. Moreover, ROS quantification following exposure is of great interest, especially in the case of metal-based NPs that could induce oxidative stress and cytotoxicity. Despite the absence of toxicity for A549, Calu-3 and HepG2 cell lines, oxidative stress was analyzed after exposure of the 4 cell lines with MIL100(Fe, Al, Cr) NPs. ROS production was monitored using the H₂DCFDA-CM probe

(see experimental section), which is firstly internalized within the cells in its reduced state. This reduced form may be then oxidized in presence of different oxygen species into a detectable and quantifiable fluorescent form. The level of intracellular oxidative stress is proportional to the fluorescence intensity. Hydrogen peroxide (H_2O_2) was used as positive control (6.6 mM). To ensure that MIL-100 NPs themselves did not induce any effect on the collected signal, a negative control was systematically performed at the highest concentration ($64 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$) in absence of $\text{H}_2\text{DCFDA-CM}$ probe (not shown). No significant ROS production was induced after 2 h of incubation with MIL-100(Al, Fe, Cr) NPs, as compared to the control group, with the exception of Hep3B cells exposed to the highest concentration of MIL100(Fe) NPs (Figure 7). In this case, a significant increase of ROS after 2 h of exposure, up to 1.8 fold the basal level, was evidenced, pointing out the putative role of the oxidative stress generated by the MIL-100(Fe) NPs on the Hep3B cells. This ROS production might be associated with the redox character of iron in comparison with either chromium or aluminum. (see spontaneous standard potential E^0 (volts) $\text{Fe}^{3+}(\text{aq}) + e^- \rightarrow \text{Fe}^{2+}(\text{aq}) = 0.77$ in comparison with negative non-spontaneous processes in Al^{3+} or Cr^{3+}). It is well-known that iron is able to promote the generation of hydroxyl radicals or other reactive species (Haber-Weiss and Fenton's reaction) ^[75-77]. The ROS production generated by the MIL-100(Fe) NPs is however strongly dependent both on the cell line and on the time/concentration.

Bearing in mind first the influence of the cell line on the ROS, except for the Hep3B cells, the rest of the tested cells (A549, Calu-3 and HepG2) did not exhibit any ROS induction. This is in agreement with the more sensitive character of the Hep3B line. In this sense, some of us have recently evidenced a significant increase of the ROS upon the exposure of human promyelocytic leukemia HL-60 cell line to $250 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ of MIL-100(Fe) NPs ^[78].

Considering the influence of the time and concentration, only high doses led to ROS induction (100 vs. $10 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$), in accordance with recent results obtained with HL-60 cells (250 vs. $25 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$). It is noteworthy that no oxidative stress was detected at longer times (24 h), indicating a transient oxidative effect, in agreement with the reversible increase of the oxidative stress, previously evidenced after the intravenous administration of high doses of MIL-100(Fe) NPs to rats ^[26]. Longer contact times can either be associated *in vitro* to higher ROS production depending on the cell line and nanoMOF doses (no ROS at ≤ 8 h while ROS production at 24 h in HL-60) ^[78].

Cell cycle analysis

The cell cycle, almost no studied in MOFs, is an important parameter to point out since, even without direct induced cytotoxicity, the proliferative capacity of the cells can be disturbed indicating cell damages. The impact of the three MIL-100 NPs on cell cycle was studied using ToPro3 (TP3) staining by flow cytometry using FlowJo software (see experimental section). The NPs were incubated at two concentrations (6 and 64 $\mu\text{g.cm}^{-2}$) for 2 and 24 h with the four cell lines (Figure 8). PSB-NH₂ NPs have been used as positive control since these NPs induced strong cell cytotoxicity^[79]. Remarkably, no significant modification of the cell cycle was noticed in the four tested cell lines exposed to the MIL-100(Fe, Al, Cr) NPs regardless the cation and the cell line.

Thus, the absence of cytotoxicity described previously for A549, Calu-3, HepG2 (MIL-100(Fe, Al, Cr) NPs) and Hep3B (only MIL-100(Al, Cr) NPs) cell lines is confirmed again since no modification of cell proliferation was observed. Concerning the more sensitive Hep3B cells exposed to the highest dose (64 $\mu\text{g.cm}^{-2}$) of MIL-100(Fe), the cell cycle remained unchanged, although a transient increase of oxidative stress was observed together with increased mortality. This is reliable with a specificity of this cell line that does not express p53 protein, a major actor for the regulation of the cell cycle after a stress^[80]. Normally in p53 wild type cells, after ROS induced DNA damages, this protein arrests cell cycle for proper initiation of DNA repair before any cell division, a crucial point essential for maintaining genome integrity.

Overall, MIL-100(Al, Fe, Cr) NPs do not alter cell cycle of A549, Calu-3, HepG2 and Hep-3B cell lines after 2 and 24 h. Indeed this result was expected after exposure with the MIL-100s that induce neither cytotoxicity nor ROS. The absence of cell cycle arrest after exposure of Hep3B cells to the highest dose of MIL-100(Fe), despite de oxidative stress, is related to the absence of P53. It could explain also the observed cytotoxicity assuming that the ROS induced DNA damages in Hp3B cells are not repair before cell division.

Genotoxicity: DNA damages

The above experiments have confirmed the absence of toxicity for the MIL-100(Fe, Al, Cr) NPs on the tested cell lines, with the exception of one condition: Hep3B exposed to a high dose MIL-100(Fe) NPs (64 $\mu\text{g.cm}^{-2}$) where a significant increase of cell death together with a ROS production was observed. Taking into account that the potential genotoxicity of different nanoparticulate systems has been established through oxidative stress^[81], we here studied whether oxidative stress followed by cell death after Hep3B exposure with MIL-100(Fe) NPs could result from DNA damages. Thus, DNA strand breaks were quantified by labeling the

Ser129 phosphorylation of histone variant H2AX. The phosphorylation of this histone, which is specifically recruited at the sites rounding double strand breaks, is considered to be the most sensitive method for monitoring DNA damages^[82] as well as a powerful approach to predict *in vivo* genotoxicity^[83]. Note here that, to the best of our knowledge no genotoxicity studies dealing with nanoMOFs have been reported so far. Thus, Figure 9 shows the results obtained for Hep3B exposed for 24 h to MIL-100(Fe, Al, Cr) NPs at two doses (6 and 64 $\mu\text{g.cm}^{-2}$). No significant increase of the number of γ -H2Ax *foci per nuclei* was observed, except for MIL-100(Fe) at the highest concentration (64 $\mu\text{g.cm}^{-2}$), in which the median comes from 3 to 5 *foci per nuclei* ($0.001 < p < 0.05$). Considering that these cells lack p53 (contrary to HepG2 cell line) and that only one DNA double strand break may be fatal for cell integrity, this relatively low level of DNA damages should be related with the observed ROS increase and, therefore, to subsequent cell death induced by MIL-100(Fe) at the highest concentration. These results are also consistent with the xCELLigence curves, where CI is diminished in a concentration dependent way (Figure 4).

CONCLUSIONS

Based on the high potential industrial and societal interest of MIL-100 solids, the aim of this study was to determine and understand the toxicity of the Fe, Al and Cr-based MIL-100 NPs. To ensure safety prior to any applications, we addressed the question of the influence of the metal to trigger different cellular response using four human cell lines. Considering a pulmonary, ingestion or intravenous exposure mode, two pulmonary and two hepatic cell lines were basically selected.

Despite the initial significantly different particle size and ζ -potential of the NPs, physicochemical characterization in the physiological media (the used cell culture media: DMEM and MEM) evidenced i) a similar superficial charge and particle size, except for the smaller dimensions of MIL-100(Cr) NPs, ii) an high colloidal stability from 24 to 48 h and iii) an important chemical stability, with very low degradation rates, except for the MIL-100(Al) NPs exclusively in contact with the MEM medium.

By measuring cell impedance, cell survival/death, ROS generation and the level of DNA damage, we found that MIL-100(Fe, Al, Cr) NPs do not induce *in vitro* cell toxicity, even at high doses in the p53 wild type cell lines (A 549 and Calu-3 (lung) and HepG2 (liver)). The only toxic effect of MIL-100(Fe) NPs was observed in the hepatocarcinoma cell line Hep3B,

which is highly sensitive due to its absence of TP53 expression, the guardian of the genome. However, even if adverse effects are detected in the most sensitive cell line Hep3B, it has to be balanced with three major facts: 1) the doses that will be used for medical applications will be greatly lower than those used in this study, 2) for drug delivery in pathologies others than cancer, cells will be p53 wild type like A549, Calu-3 and HepG2, 3) in dynamic conditions, such as a living being, the progressively degraded MIL-100(Fe) NPs will be excreted, thus limiting an accumulation, as previously described ^[51]. These data also indicate that for cancer drug delivery, since numerous tumors are mutated for p53, the MIL-100(Fe) NPs drug carriers could be more efficient for inducing cell death (as compared to drug alone).

These original data confirm that MIL-100 NPs are able to enter into the cells. The possibility of controlling the drug concentrations parameters, allows following future experiments based on the drug containing MIL-100(Fe) NPs to target diseases through NPs inhalation, intravenous or ingestion.

Altogether, our data point out a high cell tolerance for MIL-100(Fe, Al, Cr) NPs that should be further documented by *in vivo* studies before their use in the biomedical field or other important industrial fields.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials.

Iron(III) chloride hexahydrate (97 %), 1,3,5-benzene tricarboxylic acid (trimesic acid; 95 %), aluminium(III) nitrate nonahydrate (99.9%), trimethyl-1,3,5-trimesate, phosphate buffered saline (PBS) solution (0.01 M, pH=7.4), chromium(III) nitrate nonahydrate were purchased from Sigma-Aldrich. Ethanol (96 %) and methanol (99.9%) were obtained from VWR.

Nitric acid, ((R)-(-)-4-(3-aminopyrrolidino)-7-nitrobenzofurazan (furazan). Similarly, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (2.5 μ M; DCFH-DA), L-glutamine (2 mM), Tris/EDTA (10 mM, pH 7.4) were purchased from Life Technologies. Heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), dimethylsulfoxide (DMSO; $\geq$ 99.7 %) and penicillin/streptomycin (100 U.mL⁻¹) were provided by Fischer. Lipopolysaccharide (LPS; InvivoGen, San Diego, CA), phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA; Abcam, Biochemicals). All materials were used as received without further purification.

Synthesis and characterization of MIL-100(Fe, Al, Cr) NPs

Synthesis of MIL-100(Fe) NPs. MIL-100(Fe) NPs were synthesized following a microwave-assisted hydrothermal method according to a previously reported procedure ^[58]. 2.43 g (9.01 mmol) of iron(III) chloride hexahydrate and 0.84 g (4.00 mmol) of trimesic acid were dissolved in 30 mL of distilled water. The reaction was treated with a heating ramp of 30 seconds to 130 °C and then, maintained for 5 minutes and 30 seconds (1600 W). Activation or purification of MIL-100(Fe) NPs consisted of successive washing steps by centrifugation (14500 rpm, 10 min) and re-dispersion of the NPs in aliquots of water (once) and absolute ethanol (5 times). Further activation was carried out by re-dispersing 2.5 g of the NPs in 20 mL of an aqueous KF solution (0.1 M). Then, the suspension was stirred for 1 h 40 min under stirring and ambient conditions. Finally, NPs were collected by centrifugation (14500 rpm, 10 min) and washed two times with 20 mL of water and once with 20 mL of absolute ethanol. Activated MIL-100(Fe) NPs were stored wet with few droplets of absolute ethanol ^[59].

Synthesis of MIL-100(Al) NPs. MIL-100(Al) NPs were hydrothermally synthesized by a microwave-assisted route as mentioned before ^[58]. Briefly, a solution of 1.43 g (5.68 mmol) of aluminum nitrate nonahydrate, 1.21 g (4.82 mmol) of trimethyl-1,3,5- trimesate and 4 mL of nitric acid (4 M) were dissolved in 20 mL of distilled water under vigorous stirring. The reaction was heated at 210°C for 30 min using a hydrothermal microwave-assisted method (400 W). The resulting mixture was cooled down with an ice bath and recovered by centrifugation (10500 rpm, 20 min). MIL 100(Al) NPs were then activated by dispersing the collected NPs into 50 mL of methanol overnight under vigorous stirring. The activated solid was recovered by centrifugation at 10500 rpm for 20 min, exchanged twice with ethanol and kept wet for storage.

Synthesis of MIL-100(Cr) NPs. The synthesis of MIL-100(Cr) NPs was carried following a previously reported microwave-assisted hydrothermal method ^[58]. 2.40 g (5.99 mmol) of chromium nitrate nonahydrate and 0.84 g (4.00 mmol) of trimesic acid were dissolved in 30 mL of distilled water under moderate stirring. The reaction was thermally treated with a heating ramp of 4 minutes to 200 °C (800 W) and kept at this temperature for one minute. The resulting mixture was cooled down with an ice bath and dispersed in 20 mL of water, being centrifuged after (10500 rpm, 15 min). The activation of MIL-100(Cr) consisted on the dispersion of 500 mg of the recovered as-synthesized solid in 20 mL of ethanol for 5 min and centrifuged at 4000 rpm for 15 min. From the liquid fraction obtained, a new

centrifugation is performed (10500 rpm, 20 min), keeping the solid and re-dispersing it in 20 mL of ethanol and centrifuged once again. This procedure was repeated two more times.

Prior to use, the MIL-100(Fe, Al, Cr) NPs were redispersed in 50 mL of the selected solvent, the solid was recovered by centrifugation at 10500 rpm for 15 minutes and the liquid fraction discarded. Note that for the experiments NPs were weighted wet based on the wet: dry ratio previously determined from NPs dry at 100 °C overnight.

Encapsulation of furazan. The encapsulation of ((R)-(-)-4-(3-aminopyrrolidino)-7-nitrobenzofurazan (here called furazan) was performed according to a previously reported procedure^[37]. Briefly, furazan was encapsulated by soaking 50 mg of the NPs (based on the dried weight) in 10 mL of a furazan containing solution ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) under vigorous stirring for 2 h at room temperature. The furazan@NPs were recovered by centrifugation (15000 rpm, 10 min) and five times washed with 10 mL of water.

Physicochemical characterization. Dynamic Light Scattering (DLS) distribution and ζ -potential were analyzed by on a Zetasizer Nano (Malvern Instruments). Size is given as the mean size distribution corresponding with the hydrodynamic diameter of the NPs. Samples were prepared by dispersing the NPs at $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in the desired media by using an ultrasound tip (30 % amplitude for 30 s; Digital Sonifer 450, Branson). Fourier transform infrared (FTIR) spectra were collected using a Nicolet 6700 instrument (Thermo scientific, USA) in the $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$ range using powdered samples. Thermogravimetric analyses (TGA) were performed on a Perkin Elmer Diamond TGA/DTA STA 6000 in the $25\text{-}600 \text{ }^{\circ}\text{C}$ temperature range under a $3 \text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ scan rate and O_2 flow of $20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. X-Ray powder diffraction (XRPD) patterns were collected using a high-throughput D8 Advance Bruker diffractometer working on transmission mode and equipped with a focusing Göbel mirror producing Cu K α 1 radiation ($\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$) and a Lynxeye detector. Data were collected at room temperature in the $2^{\circ} < 2\theta < 30^{\circ}$ range with a step width of 0.02° . N_2 sorption isotherms were obtained at 77 K using a BELsorp Maxi (Bel, Japan). Prior to the analysis, *ca.* 30 mg of dry sample were outgassed under primary vacuum at $140 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 3h.

Quantification of trimesic acid by high performance liquid chromatography (HPLC). Release of the trimesic acid was monitored in a reversed phased HPLC system Waters Alliance E2695 separations module from Waters with a Sunfire-C18 reverse-phase column

(5 μ m, 4.6 $\times$ 150 mm from Waters) and equipped with a variable-wavelength photodiode array detector Waters 2998 and controlled by Empower software. The mobile phase consisted of a mixture of 45 % v/v methanol in PBS solution (0.04 M, pH 2.5), injecting 50 μ L as sample volume under a flow rate at 1 mL $\cdot$ min⁻¹ and 25 °C column-temperature. The standards used for the calibration curve consisted of trimesic acid solutions in the different complete cell culture media (FBS supplemented-DMEM and -MEM) with a concentration range from 25.00 to 0.39 μ g $\cdot$ mL⁻¹ (correlation coefficient > 0.99). Chromatogram of standards showed a retention time for the trimesic acid of 3.6 min with an absorption maximum at 215 nm. Degradation kinetics of the NPs were obtained in the different media (FBS supplemented-DMEM and -MEM) at 37 °C according to a previously reported procedure [63] and represented as the wt % of the linker released, considering the maximum of degradation of 100 % when the total amount of the linker was released in the medium.

Colloidal stability tests. MIL-100(Fe, Al, Cr) NPs were dispersed at 0.5 mg $\cdot$ mL⁻¹ in FBS supplemented-DMEM or -MEM by using an ultrasound tip (30 % amplitude for 30 s). Evolution of the NP mean size distribution and the surface charge were followed as a function of time by dynamic light scattering (DLS) and ζ -potential.

In vitro studies.

Cell lines and cell culture.

The human A549 cell line (ATCC[®] CCL-185[™]) was routinely grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) with glutamax supplemented with 10% (v/v) inactivated fetal bovine serum (FBS) and 1 mM antibiotic-antimycotic (Invitrogen, Carlsbad, CA). This medium is considered complete DMEM. Human Hep3B cells (ATCC number[®] HB-8064[™]), HepG2 cell line (ATCC number[®] HB-8065[™]) and Human Calu-3 cell line (ATCC number[®] HTB-55[™]) were cultured at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air, cultured in modified Eagle medium (MEM) supplemented with 10% (v/v) inactivated fetal bovine serum.

Human Calu-3 cells (ATCC number[®] HTB-55[™]) were also maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air using modified Eagle medium (MEM) supplemented with 15% (v/v) inactivated fetal bovine serum, 5 mL of 200 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), 1% (v/v) 100 mM sodium pyruvate (Sigma- Aldrich), 1% (v/v) 1 M HEPES (Sigma-Aldrich) and 1 mM antibiotic-antimycotic (Invitrogen). This medium is also considered to be complete MEM.

Cell exposure.

MILs NPs were suspended in water and dispersed. This suspension was diluted in appropriate culture medium to obtain final concentrations for cell treatment. Cells were exposed for 2 and 24 h with MIL-100 NPs final concentrations from 6 to 64 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (corresponding to 10 to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), depending on the assay. Test concentrations were selected according to previous studies ^[4, 51] performed *in vivo* and were dramatically increased in order to attest the toxicity or the absence of toxicity at ultra-high doses.

xCELLigence® (real-time follow-up).

Impedance measurements principle has been well described in our previous studies^[64]. Adherents A549 and Hep3B cell lines were seeded 24h in E-plates prior the assay at a density of 5×10^3 cells *per* well, whereas Calu-3 and HepG2 cell line were plated 48h before the treatment at a density of 15×10^3 cells and 10×10^3 cells/well respectively. After 30 min of incubation at 37°C, the cells were placed in a Real-Time Cell Analyzer (RTCA) station (ACEA Biosciences, San Diego, CA). During the first 24h, the impedance was measured every 5 min for 6 h (corresponding with *adhesion phase*) and after this time, the measurement was performed every 10 min (proliferation phase). After at least 24h of growth, different concentration of MIL-100s NPs (6, 32 and 64 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) were exposed to cells and monitored the impedance every 5 min for 6 h (corresponding as *early effects*), and then every 10 min for 74 h (known as *late effects*). The background of the E-plates (specific 96 wells microplates covered with electrodes; ACEA Biosciences, San Diego, CA) was determined as control where 150 μL of each cell suspension was added in a final volume of 200 μL of media.

Measurement of MIL-100-cell interactions, cell death, and NP release

Following 2 and 24 h treatments of the tested cell lines with MIL-100 NPs, supernatants were collected and the cells were trypsinized for 5 min. Trypsin was inactivated by the addition of complete medium, collected, and added to the corresponding supernatant. The tubes were then centrifuged for 5 min at 300xg and the pellet was resuspended in 500 μL of PBS (+MgCl₂, +CaCl₂) containing 5% FBS and then transferred to flow cytometry-compatible tubes (BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ). Multi-parametric analyses were performed on a BD FacsCalibur using FlowJo 7.5.5 software (Ashland, OR). An initial analysis was done on size/granulometry parameters to collect living and dead cells and to remove fragmented cells. Granulometry parameter is given by the SSC channel (Side Scatter Channel) and the interaction between NPs and cells is proportional to an increase of the

SSC, as previously described by Zucker and colleagues ^[71]. This first step allowed us to determine the gate where at least 2×10^4 events per replica were recorded. Upon these gated events, the To-Pro3 (Molecular Probes[®], Invitrogen; Carlsbad, CA) signal was subsequently collected on FL4 (λ_{em} : 661/16 nm) after He-Ne laser excitation at 635 nm and was used for the analysis of cell viability since this dye is compatible with the equipment and with nanoparticle detection. The results were reported as the mean distribution of the cells combining SSC and To-Pro3 measurements as described in our previous study ^[64].

MIL-100 NPs internalization using confocal videomicroscopy. For each experiment, 40×10^4 Calu-3 cells were plated on 14 mm uncoated glass bottom dishes (Ref P12G-1.5-14-F, MatTek) for at least 48 h prior to the experiment. The cells were then treated at different times (15 min, 24 h) with MIL-100 NPs at concentrations of 6 and 64 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Fluorescent images were captured through a Plan Fluor 63X objective (NA: 1.4) on a Nikon A1 confocal laser scanning videomicroscope. Images have been acquired sequentially every 10 min up to 24h with a pixel format of 1200 x 1200 and a resolution in the x,y dimensions of 60 nm/pixel and 0.3 μm /pixel in the z dimension.

Measurement of ROS level

The cells were seeded in 6-well plate (TPP) 24h before the treatment exposure at different cell density (15×10^4 cells with A549 cells, 40×10^4 cells in Calu-3 cell line, 30×10^4 in case of HepG2 cells and 10×10^4 Hep3B cells). The medium was replaced with the different concentrations of MIL-100. Cells treated with H_2O_2 (mixed with PBS ($^+\text{MgCl}_2$, $^+\text{CaCl}_2$) containing 5% FBS) during 15 min were considered as positive control for all four cell lines, whereas non-treated cells were considered as negative control negative. After 15min of incubation time, supplier's instructions were followed to measure ROS intra-cellular level with CM- H_2DCFDA probe (Life Technologies). Acquisitions were performed on a BD FacsCalibur using CellQuest Pro software and then monoparametric analyses were performed using FlowJo 7.5.5 software. During the acquisitions, the initial analysis was done using size/granulometry parameters. This first step allowed us to determine the gate where at least 2×10^4 events *per* replica were recorded. Finally upon these gated events, the CM- H_2DCFDA (Molecular Probes[®], Invitrogen; Carlsbad, CA) signal was collected using the FL1 channel (λ_{em} : 525/50 nm) after an air-cooled Argon Ion laser excitation at 488 nm (15 mW).

Cell cycle analysis.

Adherent cell lines were put in contact with at different incubation times (2 and 24 h) with MILs NPs. After each time, the cells were washed and trypsinized for 5 min. Trypsin was inactivated by adding complete medium, cells were centrifuged for 5 min at 300 x g. After the centrifugation, the cells were resuspended in 1 mL of PBS ($^{+}$ MgCl₂, $^{+}$ CaCl₂, containing 5% FBS). The resuspended cells were then fixed via the dropwise addition of 3 mL of 70% ethanol and the tubes were placed at -20°C overnight. The fixed cells were then centrifuged for 5 min at 300xg and resuspended with 300 µL of mix containing [PBS ($^{+}$ MgCl₂ $^{+}$ CaCl₂) + 5% of FBS + ToPro3 (at 0.5 µM final) + RNase A (50 µg/mL final)] in each tube. Finally, the tubes were kept at 4°C for 30min to adequately stain of the DNA. Mono-parametric analyses were performed the next day on a BD FacsCalibur using FlowJo 7.5.5 software. The first analysis was done using size/granulometry parameters, allowing us to determine the gate where 2×10^4 events *per* replica were recorded. Upon these gated events, the ToPro3 signal (Molecular Probes®, Invitrogen Carlsbad, CA) was collected on the FL4 channel (λ_{em} : 642/61 nm) He-Ne laser excitation at 635 nm. The FL4 signal was plotted as FL4-W vs FL4-A in a dot-plot graph which allowed to discriminate doublets (e.g. a G1 doublet from a G2/M single) or cellular aggregates^[84]. The results were reported as the mean distribution.

Genotoxicity through the measurement of γ -H2Ax-foci. Hep3B cell line was seeded in 8-well plate (Lab-Tek™ II Chamber Slide™ (Nunc) 24 h before exposure with the stimulus. The NPs treatments were prepared at doses of 6 and 64 µg/cm² and put it in contact with cells for 24 h. After this incubation time, the protocol applied is already described in detail in our previous study^[64]. The quantification of γ -H2Ax foci was performed by confocal microscopy, as described in previous studies^[64].

Statistical analysis. The statistical analysis selected for xCELLigence® analysis, MILs NP/cell interactions measurements by flow cytometry and cell cycle analysis, a Student's t-test was performed for each exposure condition compared to non-exposed cells. In case of the quantification and number comparison of γ -H2Ax foci, Wilcoxon rank test was employed based on 200 observations for each condition.

1. REFERENCES

- [1] J. Lee, O. K. Farha, J. Roberts, K. A. Scheidt, S. T. Nguyen, J. T. Hupp, *Chemical Society reviews* 2009, 38, 1450.
- [2] Y. Cui, Y. Yue, G. Qian, B. Chen, *Chemical reviews* 2012, 112, 1126.
- [3] I. Imaz, M. Rubio-Martinez, J. An, I. Sole-Font, N. L. Rosi, D. Maspoch, *Chemical communications* 2011, 47, 7287.
- [4] P. Horcajada, R. Gref, T. Baati, P. K. Allan, G. Maurin, P. Couvreur, G. Ferey, R. E. Morris, C. Serre, *Chemical reviews* 2012, 112, 1232.
- [5] H. C. Zhou, S. Kitagawa, *Chemical Society reviews* 2014, 43, 5415.
- [6] S. Qiu, M. Xue, G. Zhu, *Chemical Society reviews* 2014, 43, 6116.
- [7] J. Liu, L. Chen, H. Cui, J. Zhang, L. Zhang, C. Y. Su, *Chemical Society reviews* 2014, 43, 6011.
- [8] Z. Hu, B. J. Deibert, J. Li, *Chemical Society reviews* 2014, 43, 5815.
- [9] S. R. Meyers, M. W. Grinstaff, *Chemical reviews* 2012, 112, 1615.
- [10] T. H. Tran-Thi, R. Dagnelie, S. Crunaire, L. Nicole, *Chemical Society reviews* 2011, 40, 621.
- [11] J. Rocha, L. D. Carlos, F. A. Paz, D. Ananias, *Chemical Society reviews* 2011, 40, 926.
- [12] M. D. Allendorf, C. A. Bauer, R. K. Bhakta, R. J. Houk, *Chemical Society reviews* 2009, 38, 1330.
- [13] J. Della Rocca, D. Liu, W. Lin, *Accounts of chemical research* 2011, 44, 957.
- [14] C. Tamames-Tabar, A. García-Márquez, M. J. Blanco-Prieto, C. Serre, P. Horcajada, in *Bio- and Bioinspired Nanomaterials*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014, 83.
- [15] C. He, K. Lu, D. Liu, W. Lin, *Journal of the American Chemical Society* 2014, 136, 5181.
- [16] W. Morris, W. E. Briley, E. Auyeung, M. D. Cabezas, C. A. Mirkin, *Journal of the American Chemical Society* 2014, 136, 7261.
- [17] A. Wicki, D. Witzigmann, V. Balasubramanian, J. Huwyler, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2015, 200, 138.
- [18] S. Ramishetti, L. Huang, *Therapeutic delivery* 2012, 3, 1429.
- [19] J. H. Adair, M. P. Parette, E. I. Altinoglu, M. Kester, *ACS nano* 2010, 4, 4967.
- [20] P. P. Adiseshiaiah, J. B. Hall, S. E. McNeil, *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology* 2010, 2, 99.
- [21] Y. Diebold, M. Calonge, *Progress in retinal and eye research* 2010, 29, 596.
- [22] E. Fattal, Tsapis, *Clinical Translational Imaging* 2014.
- [23] M. Ferrari, *Nature reviews. Cancer* 2005, 5, 161.
- [24] V. Weissig, T. K. Pettinger, N. Murdock, *International journal of nanomedicine* 2014, 9, 4357.
- [25] Regulation, (EC), No, 1907/2006; O. L, 396, of, 12, 2006.
- [26] T. Baati, L. Njim, F. Neffati, A. Kerkeni, M. Bouttemi, R. Gref, M. F. Najjar, A. Zakhama, P. Couvreur, C. Serre, P. Horcajada, *Chemical Science* 2013, 4, 1597.
- [27] T. Baati, P. Horcajada, R. Gref, P. Couvreur, C. Serre, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2011, 56, 758.
- [28] À. Ruyra, A. Yazdi, J. Espín, A. Carné-Sánchez, N. Roher, J. Lorenzo, I. Imaz, D. Maspoch, *Chemistry – A European Journal* 2015, 21, 2508.
- [29] Q. L. Zhu, Q. Xu, *Chemical Society reviews* 2014, 43, 5468.
- [30] W. Lu, Z. Wei, Z. Y. Gu, T. F. Liu, J. Park, J. Park, J. Tian, M. Zhang, Q. Zhang, T. Gentle, 3rd, M. Bosch, H. C. Zhou, *Chemical Society reviews* 2014, 43, 5561.
- [31] V. Guillermin, D. Kim, J. F. Eubank, R. Luebke, X. Liu, K. Adil, M. S. Lah, M. Eddaoudi, *Chemical Society reviews* 2014, 43, 6141.
- [32] A. Mehdi, C. Reye, R. Corriu, *Chemical Society reviews* 2011, 40, 563.
- [33] J. M. Oh, D. H. Park, J. H. Choy, *Chemical Society reviews* 2011, 40, 583.
- [34] Z. Wang, S. M. Cohen, *Chemical Society reviews* 2009, 38, 1315.
- [35] T. Chalati, P. Horcajada, P. Couvreur, C. Serre, M. Ben Yahia, G. Maurin, R. Gref, *Nanomedicine* 2011, 6, 1683.

- [36] L. Cooper, T. Hidalgo, M. Gorman, T. Lozano-Fernandez, R. Simon-Vazquez, C. Olivier, N. Guillou, C. Serre, C. Martineau, F. Taulelle, D. Damasceno-Borges, G. Maurin, A. Gonzalez-Fernandez, P. Horcajada, T. Devic, *Chemical communications* 2015, 51, 5848.
- [37] C. Tamames-Tabar, D. Cunha, E. Imbuluzqueta, F. Ragon, C. Serre, M. J. Blanco-Prieto, P. Horcajada, *Journal of Materials Chemistry B* 2014, 2, 262.
- [38] P. Horcajada, S. Surble, C. Serre, D. Y. Hong, Y. K. Seo, J. S. Chang, J. M. Greneche, I. Margiolaki, G. Férey, *Chemical communications* 2007, 2820.
- [39] C. Volklinger, D. Popov, T. Loiseau, G. Férey, M. Burghammer, C. Riekel, M. Haouas, F. Taulelle, *Chemistry of Materials* 2009, 21, 5695.
- [40] G. Férey, C. Serre, C. Mellot-Draznieks, F. Millange, S. Surble, J. Dutour, I. Margiolaki, *Angewandte Chemie* 2004, 43, 6296.
- [41] A. Lieb, H. Leclerc, T. Devic, C. Serre, I. Margiolaki, F. Mahjoubi, J. S. Lee, A. Vimont, M. Daturi, J.-S. Chang, *Microporous and Mesoporous Materials* 2012, 157, 18.
- [42] J. P. S. Mowat, S. R. Miller, A. M. Z. Slawin, V. R. Seymour, S. E. Ashbrook, P. A. Wright, *Microporous and Mesoporous Materials* 2011, 142, 322.
- [43] Y. K. Park, S. B. Choi, H. Kim, K. Kim, B. H. Won, K. Choi, J. S. Choi, W. S. Ahn, N. Won, S. Kim, D. H. Jung, S. H. Choi, G. H. Kim, S. S. Cha, Y. H. Jhon, J. K. Yang, J. Kim, *Angewandte Chemie* 2007, 46, 8230.
- [44] A. Vimont, J. M. Goupil, J. C. Lavalley, M. Daturi, S. Surble, C. Serre, F. Millange, G. Férey, N. Audebrand, *Journal of the American Chemical Society* 2006, 128, 3218.
- [45] J. W. Yoon, Y. K. Seo, Y. K. Hwang, J. S. Chang, H. Leclerc, S. Wuttke, P. Bazin, A. Vimont, M. Daturi, E. Bloch, P. L. Llewellyn, C. Serre, P. Horcajada, J. M. Greneche, A. E. Rodrigues, G. Férey, *Angewandte Chemie* 2010, 49, 5949.
- [46] P. L. Llewellyn, S. Bourrelly, C. Serre, A. Vimont, M. Daturi, L. Hamon, G. De Weireld, J. S. Chang, D. Y. Hong, Y. Kyu Hwang, S. Hwa Jhung, G. Férey, *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 2008, 24, 7245.
- [47] M. Latroche, S. Surble, C. Serre, C. Mellot-Draznieks, P. L. Llewellyn, J. H. Lee, J. S. Chang, S. H. Jhung, G. Férey, *Angewandte Chemie* 2006, 45, 8227.
- [48] Z. Y. Gu, X. P. Yan, *Angewandte Chemie* 2010, 49, 1477.
- [49] M. Maes, M. Trekels, M. Boulhout, S. Schouteden, F. Vermoortele, L. Alaerts, D. Heurtaux, Y. K. Seo, Y. K. Hwang, J. S. Chang, I. Beurroies, R. Denoyel, K. Temst, A. Vantomme, P. Horcajada, C. Serre, D. E. De Vos, *Angewandte Chemie* 2011, 50, 4210.
- [50] Y. K. Seo, J. W. Yoon, J. S. Lee, Y. K. Hwang, C. H. Jun, J. S. Chang, S. Wuttke, P. Bazin, A. Vimont, M. Daturi, S. Bourrelly, P. L. Llewellyn, P. Horcajada, C. Serre, G. Férey, *Advanced materials* 2012, 24, 806.
- [51] P. Horcajada, T. Chalati, C. Serre, B. Gillet, C. Sebrie, T. Baati, J. F. Eubank, D. Heurtaux, P. Clayette, C. Kreuz, J. S. Chang, Y. K. Hwang, V. Marsaud, P. N. Bories, L. Cynober, S. Gil, G. Férey, P. Couvreur, R. Gref, *Nature materials* 2010, 9, 172.
- [52] P. Horcajada, C. Serre, M. Vallet-Regi, M. Sebban, F. Taulelle, G. Férey, *Angewandte Chemie* 2006, 45, 5974.
- [53] L. L. Brunton, D. K. Blumenthal, I. L. O. Buxton, K. Parker, *Manual of Pharmacology and Therapeutics*, 2008.
- [54] C. Exley, P. Siesjo, H. Eriksson, *Trends in immunology* 2010, 31, 103.
- [55] S. Lu, R. Duffin, C. Poland, P. Daly, F. Murphy, E. Drost, W. Macnee, V. Stone, K. Donaldson, *Environmental health perspectives* 2009, 117, 241.
- [56] J. I. Mujika, F. Ruiperez, I. Infante, J. M. Ugalde, C. Exley, X. Lopez, *The journal of physical chemistry. A* 2011, 115, 6717.
- [57] J. C. Rutherford, A. J. Bird, *Eukaryotic cell* 2004, 3, 1.
- [58] A. García Márquez, A. Demessence, A. E. Platero-Prats, D. Heurtaux, P. Horcajada, C. Serre, J.-S. Chang, G. Férey, V. A. de la Peña-O'Shea, C. Boissière, D. Grosso, C. Sanchez, *European Journal of Inorganic Chemistry* 2012, 2012, 5165.

- [59] E. Bellido, M. Guillevic, T. Hidalgo, M. J. Santander-Ortega, C. Serre, P. Horcajada, *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 2014, 30, 5911.
- [60] L. Helm, A. E. Merbach, *Chemical reviews* 2005, 105, 1923.
- [61] D. Beyersmann, A. Hartwig, *Archives of toxicology* 2008, 82, 493.
- [62] D. Bagchi, M. Bagchi, S. J. Stohs, *Molecular and cellular biochemistry* 2001, 222, 149.
- [63] D. Cunha, M. Ben Yahia, S. Hall, S. R. Miller, H. Chevreau, E. Elkaïm, G. Maurin, P. Horcajada, C. Serre, *Chemistry of Materials* 2013, 25, 2767.
- [64] V. Paget, J. A. Sergent, R. Grall, S. Altmeyer-Morel, H. A. Girard, T. Petit, C. Gesset, M. Mermoux, P. Bergonzo, J. C. Arnault, S. Chevillard, *Nanotoxicology* 2014, 8 Suppl 1, 46.
- [65] X. Z. Wang, Y. Yang, R. Li, C. McGuinness, J. Adamson, I. L. Megson, K. Donaldson, *Nanotoxicology* 2014, 8, 465.
- [66] P. Ruenaroengsak, P. Novak, D. Berhanu, A. J. Thorley, E. Valsami-Jones, J. Gorelik, Y. E. Korchev, T. D. Tetley, *Nanotoxicology* 2012, 6, 94.
- [67] O. Lunov, T. Syrovets, C. Loos, G. U. Nienhaus, V. Mailander, K. Landfester, M. Rouis, T. Simmet, *ACS nano* 2011, 5, 9648.
- [68] E. Frohlich, *International journal of nanomedicine* 2012, 7, 5577.
- [69] B. Yameen, W. I. Choi, C. Vilos, A. Swami, J. Shi, O. C. Farokhzad, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2014, 190, 485.
- [70] V. Paget, H. Moche, T. Kortulewski, R. Grall, L. Irbah, F. Nessler, S. Chevillard, *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 2014.
- [71] R. M. Zucker, E. J. Massaro, K. M. Sanders, L. L. Degn, W. K. Boyes, *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 2010, 77, 677.
- [72] J. A. Sergent, V. Paget, S. Chevillard, *The Annals of occupational hygiene* 2012, 56, 622.
- [73] S. Hussain, S. Garantziotis, F. Rodrigues-Lima, J. M. Dupret, A. Baeza-Squiban, S. Boland, *Advances in experimental medicine and biology* 2014, 811, 111.
- [74] F. Marano, S. Hussain, F. Rodrigues-Lima, A. Baeza-Squiban, S. Boland, *Archives of toxicology* 2011, 85, 733.
- [75] F. Haber, J. Weiss, *The Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Iron Salts*, Vol. 147, 1934.
- [76] A. Samuni, M. Chevion, G. Czapski, *The Journal of biological chemistry* 1981, 256, 12632.
- [77] H. J. H. Fenton, *Journal of the Chemical Society, Transactions* 1894, 65, 899.
- [78] E. Bellido, T. Hidalgo, M. V. Lozano, M. Guillevic, R. Simon-Vazquez, M. J. Santander-Ortega, A. Gonzalez-Fernandez, C. Serre, M. J. Alonso, P. Horcajada, *Advanced healthcare materials* 2015.
- [79] V. Paget, S. Dekali, T. Kortulewski, R. Grall, C. Gamez, K. Blazy, O. Aguerre-Chariol, S. Chevillard, A. Braun, P. Rat, G. Lacroix, *PloS one* 2015, 10, e0123297.
- [80] N. D. Lakin, S. P. Jackson, *Oncogene* 1999, 18, 7644.
- [81] N. Singh, B. Manshian, G. J. Jenkins, S. M. Griffiths, P. M. Williams, T. G. Maffei, C. J. Wright, S. H. Doak, *Biomaterials* 2009, 30, 3891.
- [82] C. E. Redon, A. J. Nakamura, O. A. Martin, P. R. Parekh, U. S. Weyemi, W. M. Bonner, *Aging* 2011, 3, 168.
- [83] D. J. Smart, K. P. Ahmed, J. S. Harvey, A. M. Lynch, *Mutation research* 2011, 715, 25.
- [84] R. Nunez, *Current issues in molecular biology* 2001, 3, 67.

Table 1. Particle size and ξ -potential of MIL-100(Fe), MIL-100(Al) and MIL-100(Cr) NPs in different media together with their pore surface.

	Medium	MIL-100(Fe)	MIL-100(Al)	MIL-100(Cr)
Size (nm) (PdI)	H ₂ O	139±25	249±28	142±63
		(0.1)	(0.2)	(0.2)
	EtOH	168±10	237±41	80±41
		(0.1)	(>0.3)	(0.1)
	DMEM	252±32	311±41	146±32
		(>0.3)	(>0.3)	(0.3)
	MEM	255±21	291±24	153±49
		(0.3)	(>0.3)	(0.3)
ξ -potential (mV)	H ₂ O	-26±4	+9±1	-15±3
	EtOH	-30±2	+34±7	+32±11
	DMEM	-11±2	-10±1	-10±1
	MEM	-11±1	-12±1	-10±1
BET surface(m ² •g ⁻¹)*		1530	1510	1400

* Brunauer-Emmett-Teller (BET) surface area

Figure 1. XRPD patterns of MIL-100(Fe), MIL-100(Al) and MIL-100(Cr) NPs and TEM images

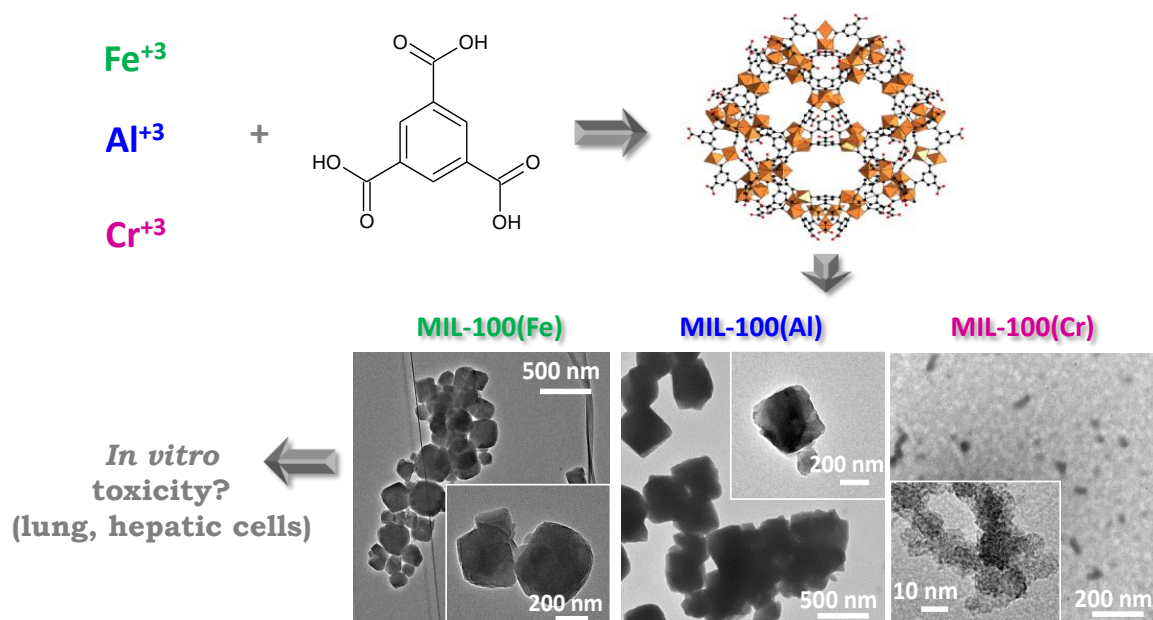


Figure 2. **A)** Colloidal stability of MIL-100(Fe), MIL-100(Al) and MIL-100(Cr) NPs in cell culture media (DMEM and MEM) at 37 °C. Stability is represented as the average of particle size evolution over time period. **B)** ζ -potential of MIL-100(Fe), MIL-100(Al) and MIL-100(Cr) NPs in cell culture media as function of time at 37 °C.

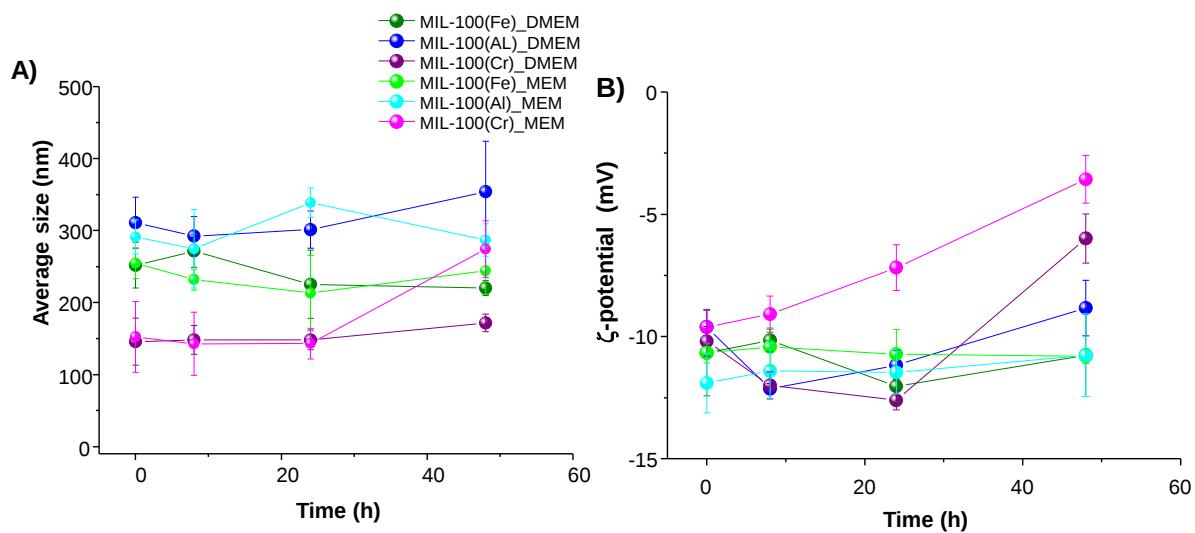


Figure 3. Degradation kinetics of MIL-100(Fe), MIL-100(Al) and MIL-100(Cr) NPs at 37 °C as a function of time in different cell culture media (DMEM and MEM). Degradation is represented as the wt% of the linker released in the medium, considering the maximum of degradation of 100 % when the total amount of linker in the NP is released in the medium.

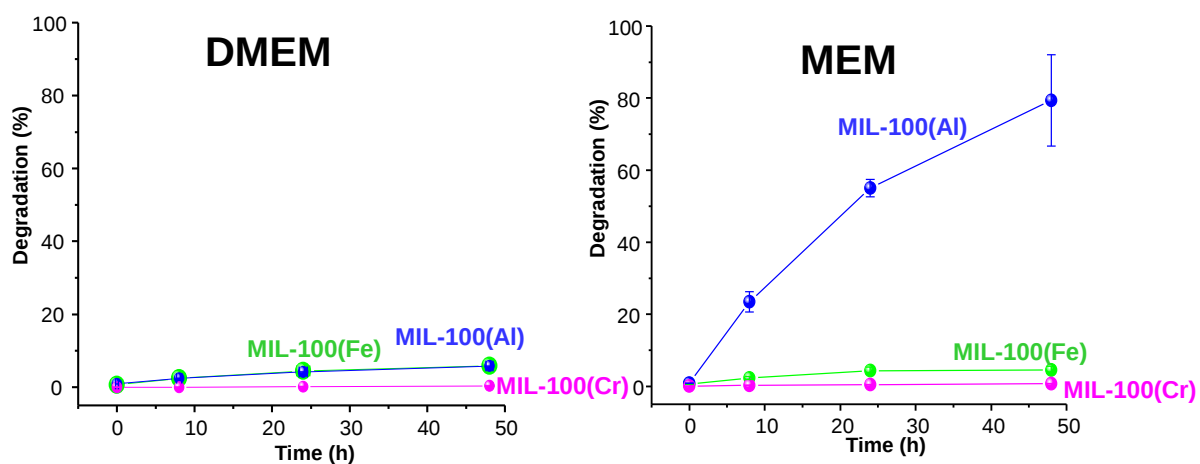


Figure 4. Real-time monitoring of cells exposed to H-NDs and/or irradiation to measure the cell index. Real-time monitoring of the cell index in A549, Calu-3, HepG2 and Hep3B cells exposed to three dose levels of MIL-100(Fe), MIL-100(Al) and MIL-100(Cr) NPs. Impedance measurements (one representative experiment among three independent experiments is shown) were carried out for 80 h and the cell index values were normalized at time 0 to avoid inter-well variability prior to the addition of NPs. “Control” cells were not exposed to MIL-100 NPs.

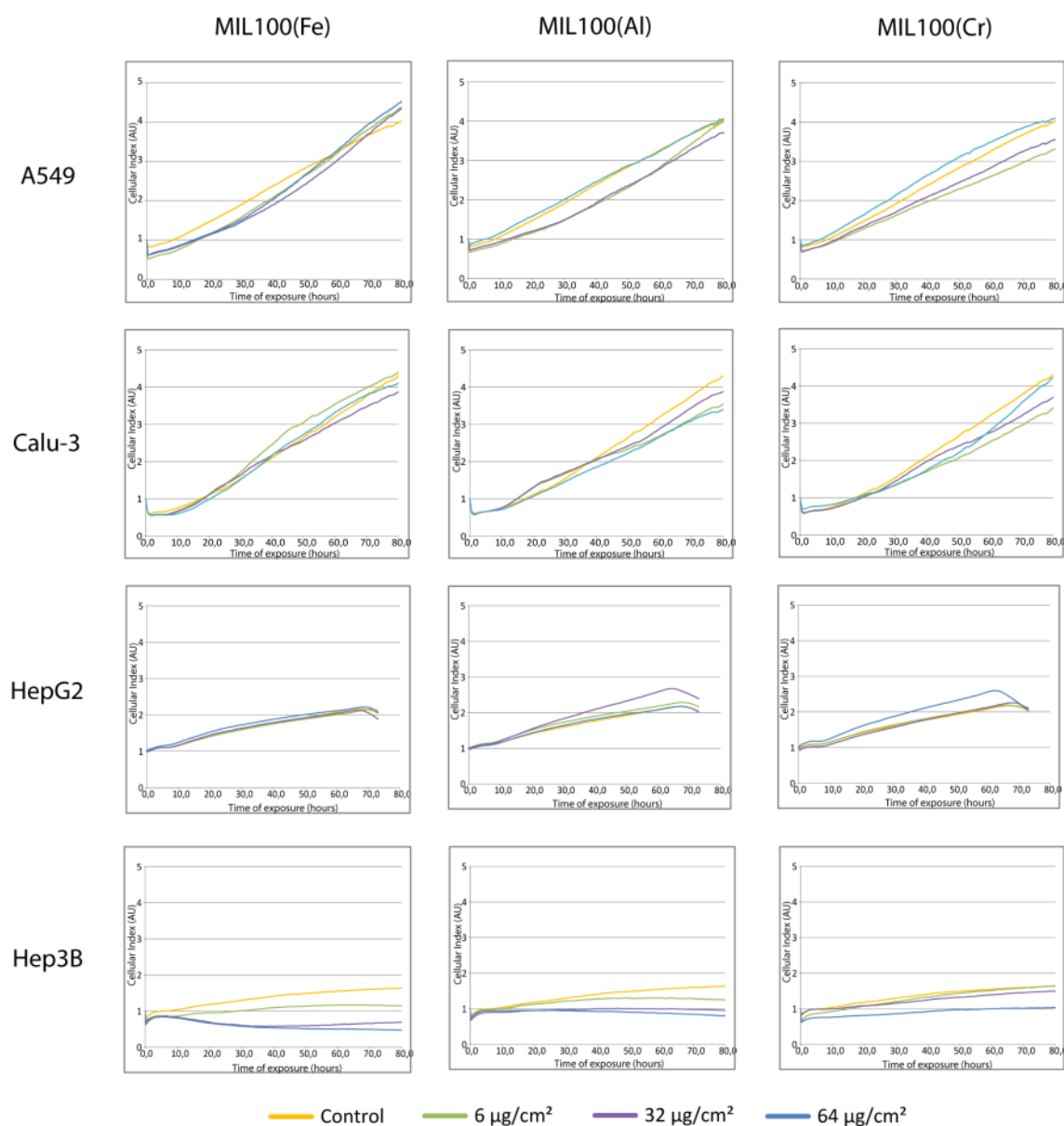
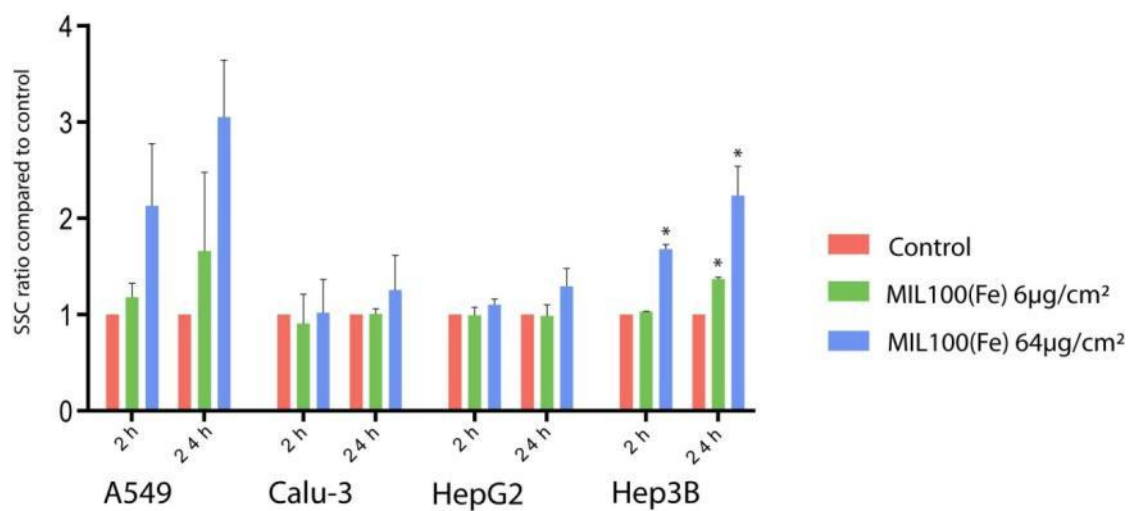


Figure 6. MIL100 internalization into the cells. Flow cytometry analysis of cell granularity by measuring side scatter parameter (SSC) of A549, Calu-3, HepG2 and Hep3B cells exposed to MIL-100(Fe) NPs at two doses (6 and 64 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) for 2 and 24 h.



Supplementary Figure 1. MIL100 internalization into the cells. Flow cytometry (A) and confocal microscopy (B) analyses of MIL-100(Fe) NPs loaded with Furazan. Calu-3 cells were exposed to NPs at two dose levels for 2 and 24 h.

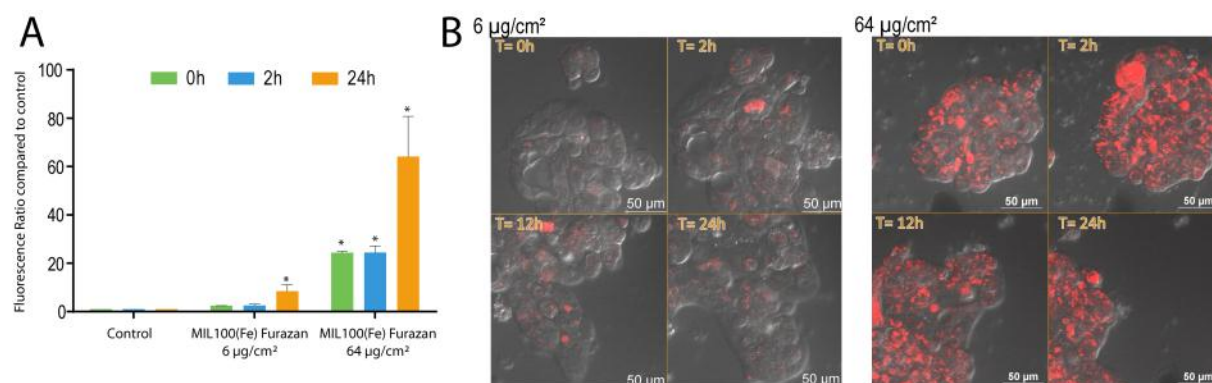


Figure 5. Cell death induction after MIL-100(Fe, Al, Cr) treatments. Cell death measurements of A549, Calu-3, HepG2 and Hep3B cells exposed to 6 and 64 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of MIL-100 NPs. Cell death induction is represented as the percentage of dead cells among the entire population. Cell counts were taken at 2 and 24 h after treatment. Dead cells labeled by ToPro-3 were counted by flow cytometry (FacsCalibur). “Control” cells were not exposed to MIL-100 NPs. Statistical analysis was performed for each exposure condition compared to non-exposed cells (Student's t-test, * $p < 0.01$).

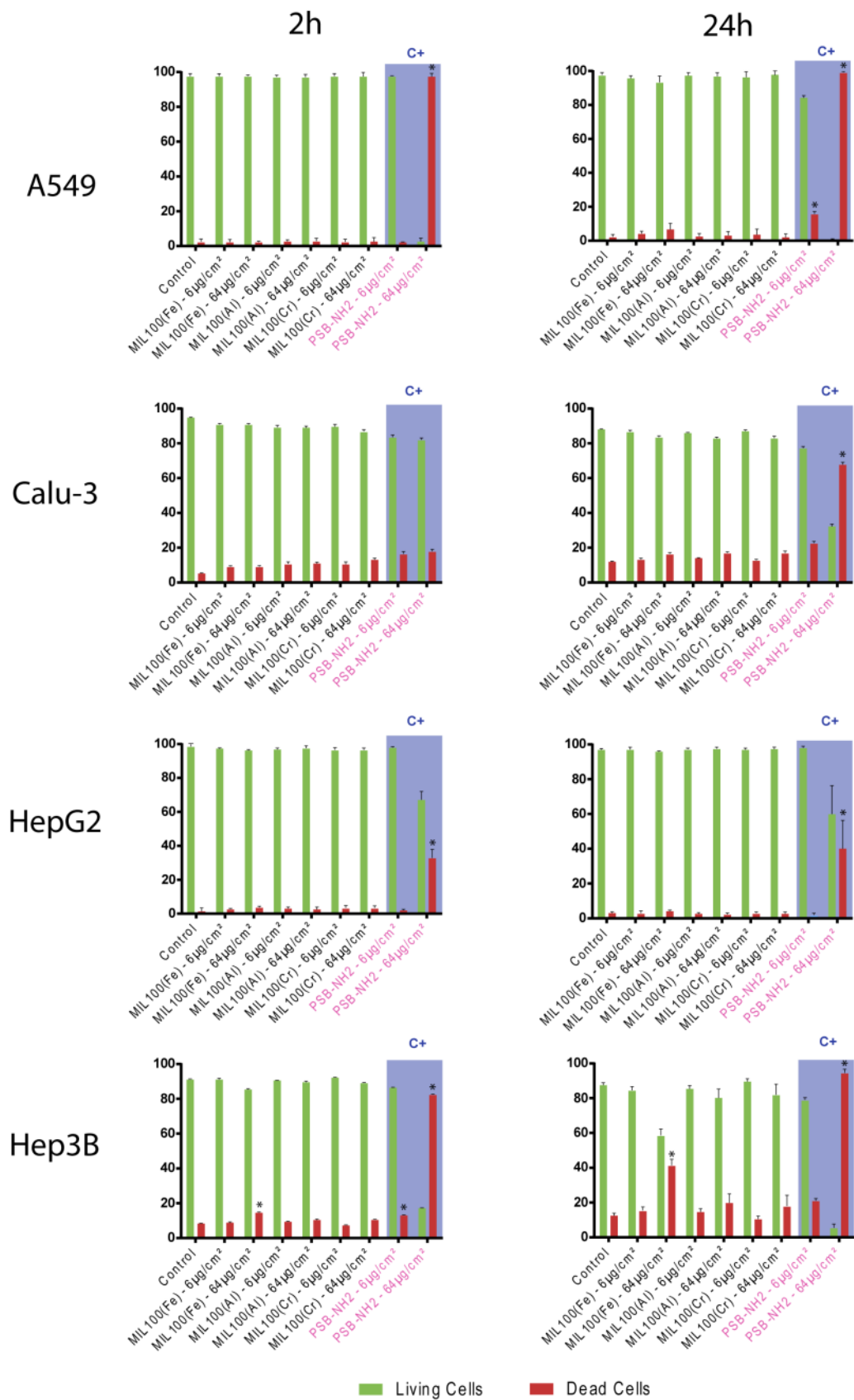


Figure 7. Intracellular generation of reactive oxygen species (ROS) by MIL-100 treatments. A549, Calu-3, HepG2 and Hep3B cells were treated for 2 h with MIL-100(Fe, Al, Cr) NPs (6 and 64 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Control (basal level) cells were not exposed to MIL-100 NPs. The ROS level was monitored by measurement of the fluorescence intensity of an oxidized fluorescent probe. Ratios as compared to the basal level are here reported. Statistical analysis was performed for each exposure condition compared to non-exposed cells (Student's t-test, $*p < 0.01$).

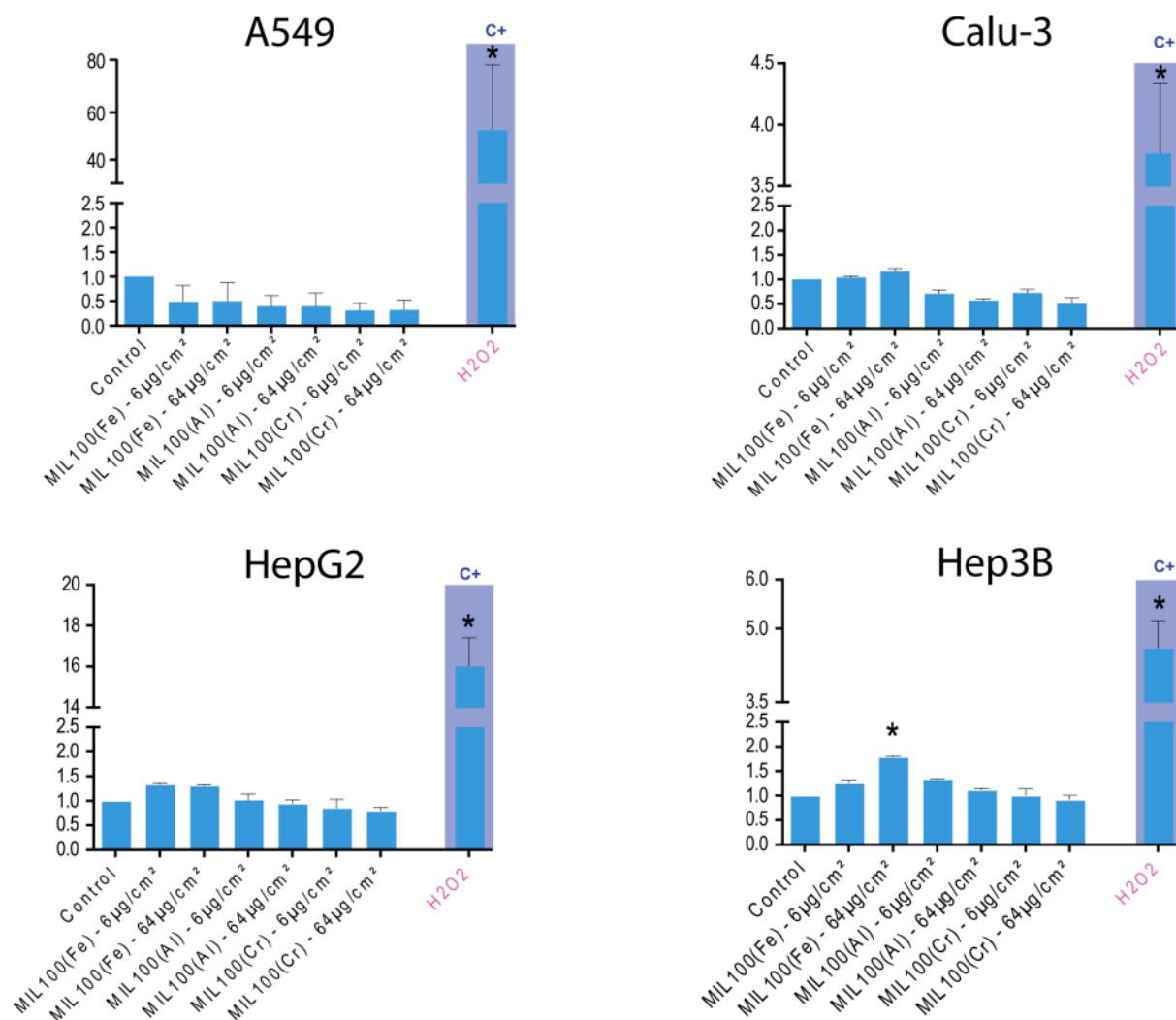


Figure 8. Cell cycle checkpoint activation following MIL100 and/or irradiation treatments. Cell cycle analysis of A549, Calu-3, HepG2 and Hep3B cells exposed to 6 and 64 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of MIL100. Control cells were not exposed to MIL100. PSB-NH₂ nanobeads were used as been used as positive control. Cell cycle checkpoint activation was evaluated by flow cytometry (FacsCalibur) 2 and 24 h after treatment. Statistical analysis was performed for each exposure condition compared to non-exposed cells (Student's t-test, * $p < 0.01$).

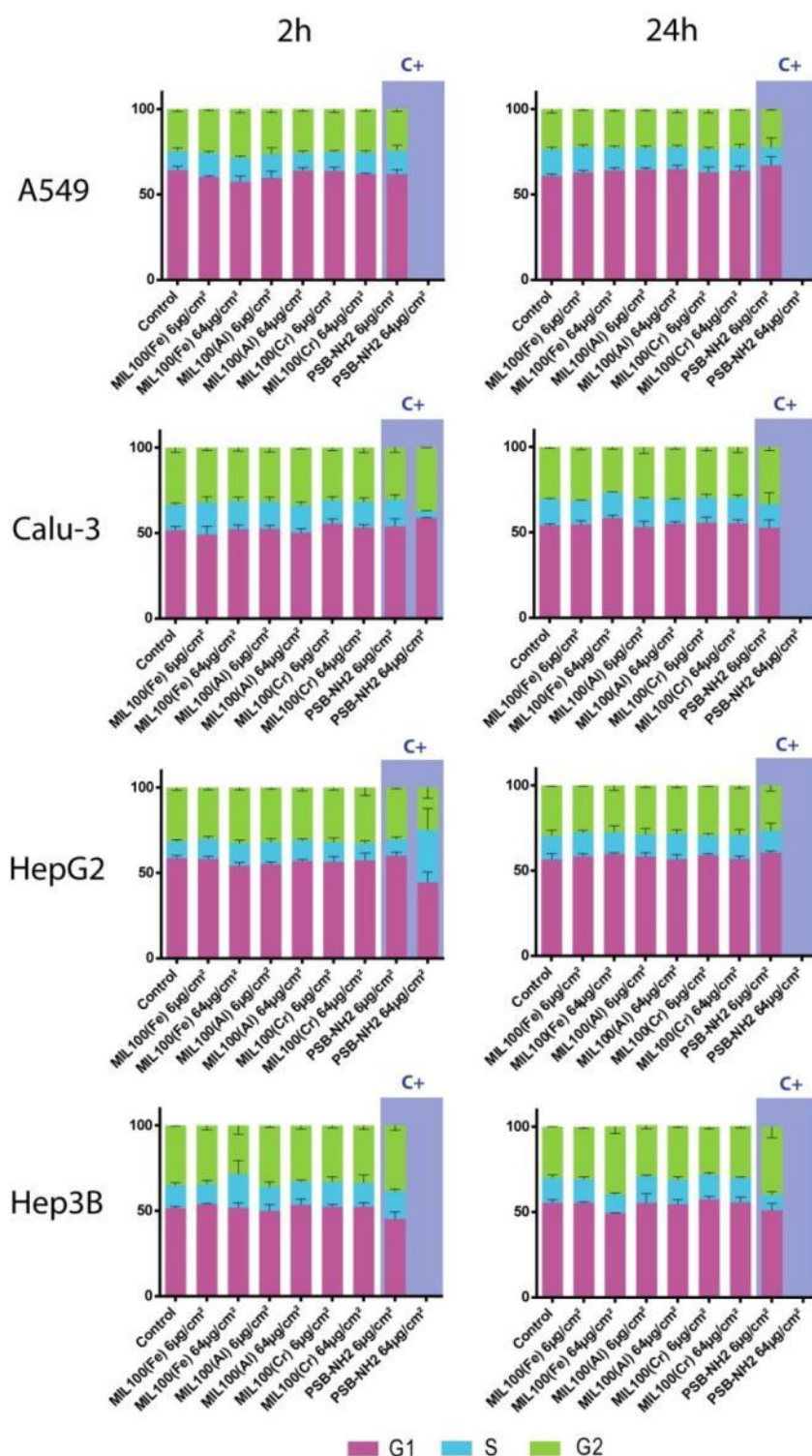
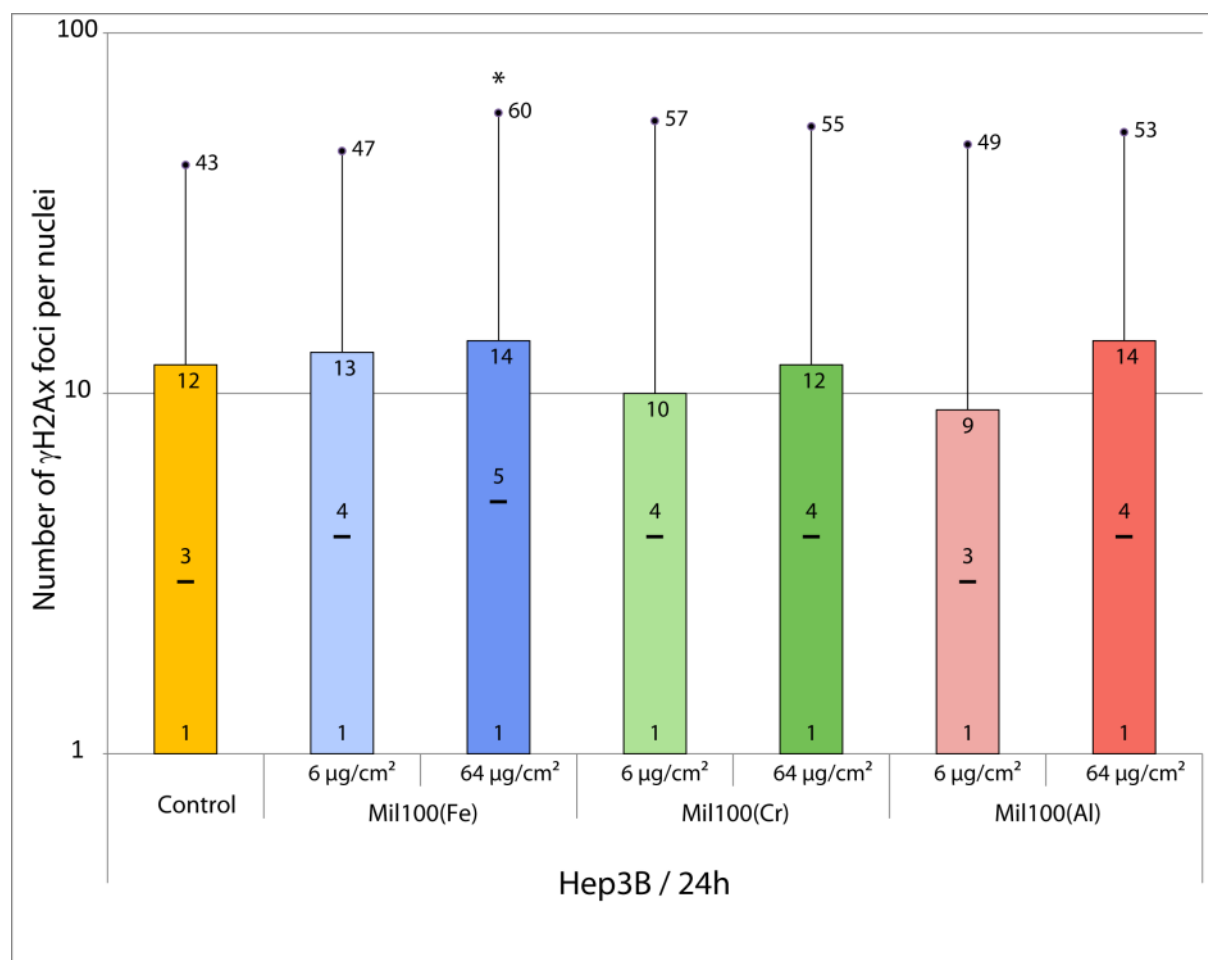


Figure 9. H-ND genotoxicity measured by γ -H2Ax foci counts. γ -H2Ax foci were counted in Hep3B cells exposed to MIL-100(Fe) NPs for 24 h. “Control” cells were not exposed to MIL-100(Fe). Counts were performed on at least 100 cells *per* condition and results are depicted as distribution values of the number of foci obtained for each tested condition (the median is also reported for each sample as well as 25th and 75th percentile and lowest and highest value). A Wilcoxon rank test (comparisons *versus* control cells not exposed to NPs) was used to determine statistical significance (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).



Toxicologie des nanoparticules

La toxicologie des nanoparticules est exigeante mais absolument nécessaire. Pour évaluer le danger lié à l'exposition aux nanoparticules omniprésentes dans notre environnement. Egalement pour attester le biocompatibilité de nanoparticules candidates à des applications industrielles, textiles et surtout médicales.

Lors de mon travail j'ai participé à plusieurs études de la toxicité de nanoparticules. Deux en particulier seront présentées ici.

Biocompatibilité des nanodiamants

Les nanodiamants possèdent de multiples atouts pour diverses applications comme cela a été précédemment décrit. Cependant, l'attestation de leur biocompatibilité est essentielle avant toute utilisation.

C'est l'objet de ce travail pour lequel la toxicité de nanodiamants de 20 et de 100 nm a été étudiée dans six lignées cellulaires humaines. Ces lignées ont été choisies comme étant représentatives des principaux organes susceptibles d'être en contact avec ces composés. Tout d'abord deux lignées hépatiques : HepG2 et Hep3B mais également deux lignées rénales : Caki-1 et Hek293, une lignée intestinale : HT-29 et une lignée pulmonaire : A549.

La cytotoxicité et la génotoxicité des nanodiamants ont été analysées sur une très large gamme de concentration allant de 10 à 250 $\mu\text{g/mL}$. Cette étude est une illustration de ce que doit être le cheminement depuis la première étape de screening jusqu'à la quantification des dommages à l'ADN en passant par la mortalité, le métabolisme, l'intégrité membranaire et le cycle cellulaire. L'entrée des nanoparticules dans les cellules a également été mesurée.

Les résultats obtenus montrent d'une part que les nanodiamants entrent effectivement dans les cellules et l'absence de toxicité quelque soit la lignée et la dose d'autre part. Des nanoparticules de polystyrène aminées ont été utilisées comme témoin positif de cytotoxicité et génotoxicité.

Ces résultats permettent donc d'affirmer la biocompatibilité des nanodiamants et autorisent leur étude pour les nombreuses applications auxquelles ils sont promis. Egalement il positionne ces particules comme composés de référence de non toxicité pour des études futures de nanotoxicologie.

ORIGINAL ARTICLE

Carboxylated nanodiamonds are neither cytotoxic nor genotoxic on liver, kidney, intestine and lung human cell lines

V. Paget^{1*}, J. A. Sergent^{1*}, R. Grall¹, S. Altmeyer-Morel¹, H. A. Girard², T. Petit², C. Gesset², M. Mermoux³, P. Bergonzo², J. C. Arnault², and S. Chevillard^{1,4}

¹CEA, Institute of Cellular and Molecular Radiobiology, Laboratory of Experimental Cancerology, CEA, Fontenay-aux-Roses, France, ²CEA, LIST, Diamond Sensors Laboratory, Gif-sur-Yvette, France, ³CNRS-INPG-UJF, Laboratory of Electrochemistry and Physical Chemistry of materials and interfaces, Saint Martin d'Hères, France, and ⁴Nano Safety Platform, CEA, Grenoble, France

Abstract

Although nanodiamonds (NDs) appear as one of the most promising nanocarbon materials available so far for biomedical applications, their risk for human health remains unknown. Our work was aimed at defining the cytotoxicity and genotoxicity of two sets of commercial carboxylated NDs with diameters below 20 and 100 nm, on six human cell lines chosen as representative of potential target organs: HepG2 and Hep3B (liver), Caki-1 and Hek-293 (kidney), HT29 (intestine) and A549 (lung). Cytotoxicity of NDs was assessed by measuring cell impedance (xCELLigence® system) and cell survival/death by flow cytometry while genotoxicity was assessed by γ -H2Ax foci detection, which is considered the most sensitive technique for studying DNA double-strand breaks. To validate and check the sensitivity of the techniques, aminated polystyrene nanobeads were used as positive control in all assays. Cell incorporation of NDs was also studied by flow cytometry and luminescent N–V center photoluminescence (confirmed by Raman microscopy), to ensure that nanoparticles entered the cells. Overall, we show that NDs effectively entered the cells but NDs do not induce any significant cytotoxic or genotoxic effects on the six cell lines up to an exposure dose of 250 μ g/mL. Taken together these results strongly support the huge potential of NDs for human nanomedicine but also their potential as negative control in nanotoxicology studies.

Keywords

Confocal and Raman microscopy, cytotoxicity, flow cytometry, genotoxicity, impedancemetry, nanodiamonds

History

Received 13 May 2013
Revised 24 September 2013
Accepted 4 October 2013
Published online 22 November 2013

Introduction

Nanodiamonds (NDs) are one of the most promising nanocarbon materials and are highly suitable for biomedical applications (Krueger, 2011; Vijayanthimala & Chang, 2009). A key asset of NDs resides in their carbon-related surface chemistry (Arnault et al., 2011). Their functionalization is facilitated by a large variety of carbon-related groups present on their surface (Krueger, 2006), like carboxylic acids (Huang & Chang, 2004), hydroxyl groups (Krueger et al., 2008) and C–H bonds (Girard et al., 2010), starting points towards amidation, esterification, silanization or diazonium (Girard et al., 2011) grafting routes. In this context, NDs have already been biofunctionalized with proteins, peptides, oligonucleotides (Vial et al., 2008) or used as a therapeutic carrier with paclitaxel (Liu et al., 2010) or doxorubicin (Huang et al., 2007) in cancer treatments. Additionally, NDs can serve as a bifunctional device via their embedded luminescent N–V center (Chang et al., 2008; Neugart et al., 2007), which is perfectly photostable and well adapted to imaging in organisms and cell cultures (Zhang et al., 2009), as recently shown for biolabeling

and delivery of siRNA to Ewing sarcoma cells (Alhaddad et al., 2011). N–V centers are formed by a nitrogen atom associated to a vacancy in the diamond lattice. These defects exhibit photoluminescence properties, emitting in the red wavelength range under green irradiation (Jelezko & Wrachtrup, 2006).

Until now, several short- and long-term *in vitro* (Liu et al., 2009; Schrand et al., 2007b; Vijayanthimala et al., 2009) as well as *in vivo* (Lin et al., 2012; Mohan et al., 2010; Vijayanthimala et al., 2012; Yuan et al., 2009) studies have shown that NDs are non-cytotoxic, and better tolerated by cells than other nanocarbon materials (Schrand et al., 2007a; Yu et al., 2005; Zhang, et al., 2012). For instance, NDs introduced into *Caenorhabditis elegans* worm were stable, non-toxic and did not cause any detectable stress to the worms (Mohan et al., 2010). In mice, intravenous injection of 50 nm NDs led to long-term entrapment in the liver and the lung (Yuan et al., 2009), but no mice showed any abnormal symptoms. Similarly, subcutaneous and intraperitoneal injection of 100 nm NDs in rats led to accumulation of NDs in retention organs over one month with no impact on the rats' viability (Vijayanthimala et al., 2012). However, a slight surface-dependent genotoxicity of NDs was recently reported on embryonic stem cells (Xing et al., 2011).

Nevertheless, there is no extensive study combining cytotoxicity and genotoxicity of NDs reported in the literature. The present study focuses on the characterization of *in vitro* cytotoxicity and genotoxicity of NDs perfectly characterized in terms of size and surface chemistry. The cellular induced effects of two

*These authors contributed equally to this work

Correspondence: S. Chevillard, Ph.D, Lab Manager, CEA, Institute of Cellular and Molecular Radiobiology, Laboratory of Experimental Cancerology, 18 route du Panorama, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France. Tel: +33 1 46 54 88 89. Fax: +33 1 46 54 88 86. E-mail: sylvie.chevillard@cea.fr

sets of perfectly characterized commercial NDs, differing in their overall diameters, respectively 20 nm (ND-20 nm) and 100 nm (ND-100 nm), but exhibiting the same surface chemistry (carboxylated) were investigated in six human cell lines: HepG2 and Hep3B (liver), Caki-1 and Hek-293 (kidney), HT29 (intestine) and A549 (lung).

It is now well described that nanoparticles display several singular physicochemical properties that can bias the results of conventional toxicity assays (Holder et al., 2010; Kroll et al., 2012; Stone et al., 2009). However, up to now, there has been no consensus regarding models and tests that should be used to analyze the *in vitro* toxicity of nanoparticles. Therefore, as a first screening of ND cytotoxicity, we chose a method based on measurement of cell impedance (xCELLigence, ACEA Biosciences, San Diego, CA), since it has been shown that nanoparticles alone do not induce artifactual variation of impedance (Sergeant et al., 2012). This technique permits real-time monitoring of the effects of nanoparticles on cell morphology, proliferation, adhesion and membrane potential. To check whether or not NDs entered the cells, we performed Raman microscopy and flow cytometry analysis according to the method previously described for TiO₂ nanoparticles (Zucker & Daniel, 2012; Zucker et al., 2010). Flow cytometry allowed us to discriminate viable cells, containing or not nanoparticles, and dead cells. Finally, using immunofluorescence detection of nuclear γ -H2Ax foci, considered the most sensitive method for detecting DNA double-strand breaks (Mah et al., 2010), we also analyzed ND genotoxicity.

Overall results indicate that both ND-20 and -100 nm entered the cells, and are neither cytotoxic nor genotoxic on liver, kidney, intestine and lung human cell lines at doses ranging from 10 to 250 μ g/mL. Our findings clearly emphasize not only the potential of NDs for medical applications but also their potential as future negative reference nanoparticles for nanotoxicology.

Material and methods

Materials

Nanodiamonds (NDs) synthesized from a milling process of macroscopic crystallites were from Van Moppes (Syndia® SYP 0-0.02: ND-20 nm and Syndia® SYP 0-0.1: ND-100 nm). NDs were initially dispersed in ultrapure water (18.2 M Ω cm⁻²) by sonication (Hielscher UP400S, 300 W, 24 kHz) for 2 h with cooling at a concentration of 5 mg/mL (0.5% w:w). In order to eliminate contaminants (bacteria, etc) during the preparation of ND suspensions; the 5 mg/mL stock suspensions were first annealed at 95 °C for 20 min before use in culture medium. Then, prior to cell exposure, the diluted suspensions (in complete culture medium) were first tested for 72 h at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air to check for the absence of contaminant growth.

Orange fluorescent 52 nm aminated polystyrene nanobeads (λ_{ex} : 488 nm, λ_{em} : 550–590 nm) (PS-NH₂ Ref. AMOF050NM) were from Magsphere Inc. PS-NH₂ nanobeads were suspended at a concentration of 1 mg/mL in DMEM medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum and 1% (v/v) penicillin–streptomycin (Invitrogen).

Nanoparticle characterization

Hydrodynamic diameters and zeta potentials of the nanoparticles were measured at 37 °C using DLS by a Malvern NanoZS with a 173° backscattered angle. The DLS measures were performed at 37 °C in order to be close to the cells exposure conditions and were performed using the manufacturer's calibration procedures. The average value of at least three measurements was taken at a given condition and error bars are reported on the plots.

Experiments on water dispersion were done with the initial suspensions diluted to 500 μ g/mL. A small amount of the initial suspension was diluted in MEM to reach a final concentration of 0.5 mg/mL of NDs in MEM. All samples were stabilized for 10 min at 37 °C before recording. The hydrodynamic diameters of orange fluorescent 52 nm aminated polystyrene nanobeads were also measured using the same procedure. Measurements were performed in water and in complete DMEM medium (used for the Caki-1 cell line in all exposure experiments). Experiments were performed with the initial suspensions diluted to 1 mg/mL.

FT-IR spectra were measured in transmission mode using a Thermo Nicolet 8700 spectrometer. KBr pellets were prepared with ND-20 and -100 nm. KBr pellets containing NDs were dried at 350 K using a primary vacuum system (10⁻³ mTorr) for 24 h before IR measurements in a home-made IR vacuum cell equipped with KBr windows and a heater.

Cell lines and cell culture

Human A549 cells (ATCC number: CCL-185™), Caki-1 cells (ATCC number: HTB-46™), HEK293 cells (ATCC number: CRL-1573™) and HT-29 cells (ATCC number: HTB-38™) were routinely grown at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air, in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) glutamax supplemented with 10% (v/v) inactivated fetal bovine serum and 1 mM antibiotic–antimycotic (Invitrogen). This medium is considered as complete DMEM. Human HepG2 cells (ATCC number: HB-8065™) and Hep3B cells (ATCC number: HB-8064™) were routinely grown at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air, in modified Eagle medium (MEM) supplemented with 10% (v/v) inactivated fetal bovine serum, 5 mL of 200 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich), 1% (v/v) 100 mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich), 1% (v/v) 1 M HEPES (Sigma-Aldrich) and 1 mM anti–anti (Invitrogen). This medium is considered as complete MEM.

XCCelligence (real-time follow-up)

Impedance measurement is a dimensionless parameter termed Cell Index (CI) which is derived as a relative change in measured electrical impedance to represent cell status. Several features of CI are taken into account in the measure: (i) when cells are not present or are not well-adhered on the electrodes, the CI is zero (ii) under the same physiological conditions, when more cells are attached on the electrodes, the CI values are larger. Thus, CI is a quantitative measure of cell number present in a well (iii) additionally, change in a cell status, such as cell morphology, cell adhesion or cell viability will lead to a change in CI.

Background of the E-plates (specifics 96 wells microplates covered with electrodes) (ACEA Biosciences) was determined in 50 μ L of medium and subsequently 150 μ L of each cell suspension was added (5 $\times$ 10³ cells/well for Caki-1 and A549 cell lines, 1 $\times$ 10⁴ cells/well for the other cell lines were seeded on each well). Cells were incubated for 30 min at 37 °C and E-plates were placed in the Real-Time Cell Analyzer (RTCA) station (ACEA Biosciences). Cells were grown for at least 24 h, with impedance measured every 5 min for 6 h (adhesion phase), then every 15 min (proliferation phase). After at least 24 h, cells were exposed to ND-20 nm and -100 nm at concentrations of 10, 100, 250 and 500 μ g/mL and were monitored again every 5 min for 6 h (early effects), and then every 10 min for 24 h (late effects). Cell index (CI) raw data values were calculated as follows: $Z_i - Z_0$ [Ohm]/15 [Ohm]; where Z_0 is the background resistance and Z_i is the individual time point resistance. Normalized cell index was also calculated by the software at the selected normalization time point, which was chosen as time just before the addition of

nanoparticles in order to minimize inter-wells variability before the beginning of exposure.

Flow cytometry

After 24-h treatments, cells were washed and trypsinized for 5 min. Trypsin was inactivated by adding complete medium, cells were centrifuged for 5 min at 300g and then resuspended in 500 μ L of medium with serum in flow cytometry-compatible tubes (BD 352058). Multi-parametric analyses were performed on BD FacsCalibur using FlowJo 7.5.5 software (Ashland, OR). A first analysis was done on size/granulometry parameters, to collect living and dead cells and to remove fragmented cells. This first step allowed us to determine the gate where at least 2×10^4 events per replica were recorded. Then upon these gated events, the To-Pro3 (Molecular Probes, Invitrogen) signal was collected on FL4 (λ_{em} : 661/16 nm) after He–Ne laser excitation at 635 nm and was used for the analysis of cell viability since this dye is compatible without interference with the equipment and with nanoparticle detection. The results were reported as the mean distribution of cell fluorescence, obtained for three replicas (with at least 2×10^4 gated events per replica). Combining SSC and To-Pro3 measurements, a bi-parametric representation was then possible and distinguished three kinds of cell populations: living cells without nanoparticles (To-Pro3-negative/SSC-negative cells), living cells with nanoparticles (To-Pro3-negative/SSC-positive cells) and dead cells (To-Pro3-positive). To-Pro3-positive and SSC-positive cut-offs were determined for events recorded in the gate in control cells.

Raman microscopy

The measurements were performed using an InVia Renishaw spectrometer equipped with a CCD array detector, using the 514.5 nm line of an Ar ion laser. The laser power was held constant throughout the experiments with generally a few mW incident on the samples. Long-working-distance $50\times$ and $20\times$ (numerical aperture (NA) 0.5 and 0.25, respectively) optics were used to focus the laser on the sample surface and collect the scattered light. Samples were mounted on a computer-controlled XYZ stage, movable in 100 nm steps. Depth profiles were obtained using the $50\times$ objective, with an apparent depth resolution of a few microns.

“Wide-field” (or global) Raman images were obtained using the same spectrometer. Here, the laser beam was defocused to illuminate a disk-shaped area on the sample, and the resulting Raman scattered light was filtered and focused to produce the image directly on the CCD detector. The tunable filters were dielectric filters with a $\approx 20\text{ cm}^{-1}$ band-pass. The sizes of the illuminated areas were about 30 and 80 μ m for $50\times$ and $20\times$ objectives, respectively. Images were only roughly corrected for inhomogeneous laser illumination in the analyzed area. Again, for Raman imaging, the excitation source was systematically the 514.5 nm line from an Ar⁺ laser. Images were obtained by centering the dielectric filter at 1332 cm^{-1} , i.e. at the diamond Raman frequency. However, better contrast between the diamond particles and cells was obtained by centering the dielectric filter at about 3500 cm^{-1} , using the native strong nitrogen-induced photoluminescence of the diamond nanoparticles. The acquisition times of the wide field images were only a few minutes.

Genotoxicity (γ -H2Ax-foci)

In total, 3×10^4 cells were seeded on Lab-TekTM II Chamber SlideTM 8 wells (Nunc) at least 24 h before exposure (Hep3B, Caki-1 and A549 cell lines) or 48 h (for HepG2, HEK293 and HT29 cell lines). As positive control, Caki-1 cells were plated at

least 24 h before irradiation. At time 0, cells were γ -irradiated at 5 Gy using a ¹³⁷Cs irradiation unit at a dose rate of $\sim 2\text{ Gy/min}$, and then immediately fixed to proceed to staining. For ND exposure, cells were treated for 24 h with nanoparticles at doses of 250 and 500 $\mu\text{g/mL}$. After treatment, cells were washed and fixed for 15 min with 4% PFA, washed twice with 200 μ L of 1X PBS and then permeabilized for 10 min at room temperature in [$1 \times$ PBS and 0.1% Triton]. We labeled nuclei with Hoechst 33342 (λ_{ex} : 350 nm, λ_{em} : 461 nm) and γ -H2Ax with Alexa Fluor[®] 488 (λ_{ex} : 495 nm, λ_{em} : 519 nm) (Supplemental Figure S7a). Cells were blocked in [$1 \times$, 0.025% PBS, 10% goat serum (Jackson ImmunoResearch)] for 1 h at room temperature, then incubated for 75 min at room temperature with 1:500 of monoclonal γ -H2Ax antibody [Anti-phospho-Histone H2Ax (Ser139), clone JBW301, 05-636, Upstate Millipore], washed thrice with 300 μ L of [$1 \times$ PBS, Triton 0.025 %] and then incubated at room temperature for 45 min with 1:500 dilution of Alexa Fluor[®] 488 goat anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen) as a secondary antibody. Samples were washed thrice with 300 μ L of [$1 \times$ PBS, 0.025% Triton] and cells were incubated at 37 °C for 20 min with 200 μ L of [$1 \times$ PBS and 0.1 $\mu\text{g/mL}$ Hoechst 33342 (Molecular Probes, Invitrogen)]. Finally, Lab-TekTM Chamber SlideTM 8 wells were washed thrice with 300 μ L of [$1 \times$ PBS, 0.025% Triton] before mounting in ProLong[®] Gold antifade reagent (Molecular Probes, Invitrogen) in order to proceed to confocal microscopy visualization.

Confocal microscopy and γ -H2Ax foci counts

Fixed and labeled cells were photographed with an ACS APO 40X oil CS (NA 1.15) objective under a fluorescence confocal microscope (Leica TCS SPE, Wetzlar, Germany) equipped with four diode lasers (405, 488, 532 and 635 nm). The spectral sliders were set in sequential mode and excitation wavelengths decreasing to maximize the signal and reduce spectral overlap. All the details concerning the acquisitions are reported in Supplemental Figure S7b. Each analysis was done on at least 100 cells and at least six images of each condition were analyzed. Confocal microscopy optical slice sections of 8–20 μ m were recorded from the apical to the basal pole of the cells, each acquisition containing nine stacks. Images were prepared and stacked with ImageJ software (Bethesda, MD) (Abramoff et al., 2004) by using the stacks tool. The TIFF images were converted into 8 bits before performing foci counts. Cell Profiler software (Cambridge, MA) (Carpenter et al., 2006) was used for the detection and scoring of foci in Alexa Fluor images.

Statistical analysis

To compare the number of γ -H2Ax foci a Wilcoxon rank test based on at least 200 observations for each condition was performed.

Results

Characterization of nanoparticles

Two commercial sets of NDs were studied herein, the first composed of NDs ranging up to 20 nm (ND-20 nm), the second set limited to a maximum diameter of 100 nm (ND-100 nm). Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) of both sets was performed to characterize their respective surface chemistries. Figure 1 presents FT-IR spectra of ND-20 nm and ND-100 nm, which were recorded in transmittance mode. In order to evaluate the polydispersity of the samples, size distribution measurements were undertaken by dynamic light scattering (DLS; Figure 2). For so-called ND-20 nm, 90% of the particles had diameters between 15 and 30 nm with a maximum lying around 20 nm (Figure 2a). In the suspension of ND-100 nm, 90 % of the particles ranged from 40 to 80 nm, with a maximum at 50 nm (Figure 2b). DLS

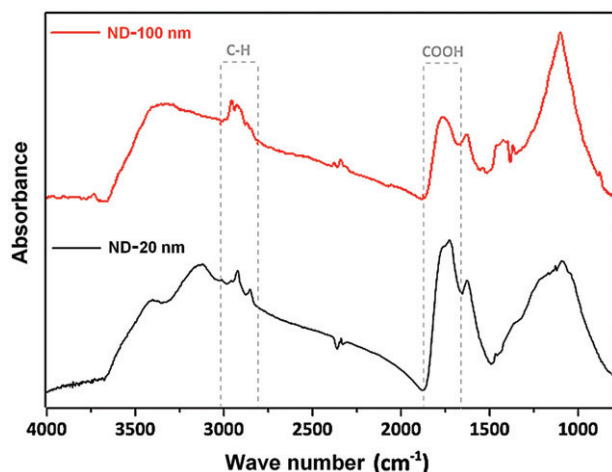


Figure 1. FT-IR spectra of NDs. FT-IR spectra of ND-20 nm (black curve) and ND-100 nm (red curve) recorded in transmittance mode.

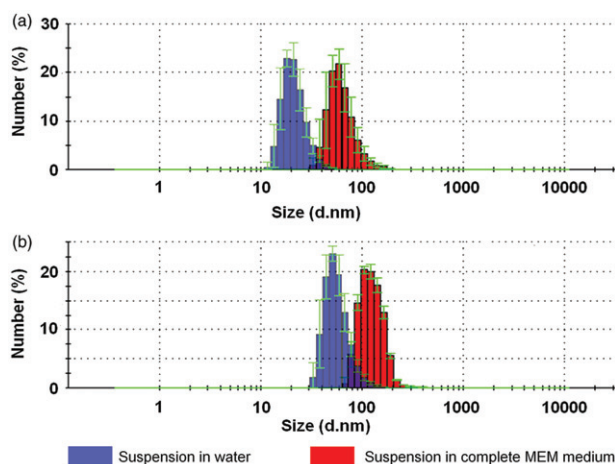


Figure 2. DLS measurements of NDs. Size distribution of ND-20 nm (a) and ND-100 nm (b) measured by DLS. Histograms in blue correspond to the suspension in water, histograms in red to the suspensions in complete MEM medium.

measurements were also recorded in complete culture medium. In Figure 2, the size distribution for both NDs increased, probably because of moderate ND aggregation due to the increase in ionic strength and the adsorption of proteins on the ND surface. DLS measurements of cytotoxic positive control PS-NH₂ nanobeads were also performed in water and in complete culture medium (Supplemental Figure S1).

Cytotoxicity

ND cytotoxicity was first evaluated by analyzing the variation of cell impedance after cell exposure (xCELLigence). Cells were seeded on dedicated plates at least 24 or 48 h before exposure (depending on cell type adhesion properties and doubling time) so that they were in the exponential growing phase at the beginning of exposure. The xCELLigence cell index (CI) was recorded every 5 min during the first 6 h of treatment and then every 10 min up to 24 h. Each measurement was standardized according to the control CI value measured just before the addition of nanoparticles, taken as starting point (t_0). For all cell lines, exposure to ND-20 or -100 nm did not induce significant cellular effects at concentrations from 10 to 500 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 3), except for ND-20 nm at 500 $\mu\text{g/mL}$, which led to a limited but significant

decrease in growth of Caki-1 cells (Figure 3c-1). As a comparison with known cytotoxic nanoparticles, Real-time xCELLigence monitoring of Caki-1 cells exposed for 24 h to concentrations from 0.5 to 50 $\mu\text{g/mL}$ of 50 nm PS-NH₂ nanobeads are shown in Supplemental Figure S2a. A significant dose-dependent variation of CI was detected 6 h after exposure of Caki-1 cells to 50 nm PS-NH₂ nanobeads at 12.5 $\mu\text{g/mL}$, the cytotoxicity increased at 24 h (Supplemental Figure S2a).

Flow cytometry: cytotoxicity and cells-NDs interactions

Flow cytometry was also used to estimate cell viability/death simultaneously, if nanoparticles either interacted with the cell membrane or entered the cells. Flow cytometry experiments were assessed at the highest ND concentration (500 $\mu\text{g/mL}$) in order to corroborate the absence of significant cytotoxicity observed through xCELLigence method. Cell death was detected by To-Pro-3 labeling (FL4) and cells-NDs interaction (within and/or around the cells) was estimated as function of the modification of Side Scatter (SSC) that reflects modification in the cells granulometry (Supplemental Figures S3 and S4). The shift of the SSC signal for measuring cells-ND interactions is sensitive since the signal remains significant for NDs exposure at 10 $\mu\text{g/mL}$ (Supplemental Figure S4). An example of biparametric analysis of the interactions/mortality (SSC/FL4) of Caki-1 cells exposed to NDs is reported in Supplemental Figure S5 and clearly shows the absence of cell mortality even at the very high dose of 500 $\mu\text{g/mL}$ NDs (Table 1). The cut-offs for ND-positive cells and for dead cells were defined and set up as compared to control condition (Supplemental Figure S5b). After exposure to NDs, similar results were obtained for the six tested cell lines. Whatever the cell line, ND-20 and -100 nm entered the cells and do not induce any significant cell mortality as compared to control cells (Student's *t*-test, $p < 0.01$). However, according to the cell line, the percentage of ND-positive cells was variable (Table 1). As positive controls, flow cytometry cell mortality was measured after exposure of Caki-1 cells with PS-NH₂ 50 nm nanobeads at 0.5, 12.5 and 50 $\mu\text{g/mL}$ (Supplemental Figure S2c). In accordance with the xCELLigence profiles (Supplemental Figure S2a) cell mortality is clearly observed (Supplemental Figure S2c). However, it should be mentioned that, it was not possible to verify that PS-NH₂ 50 nm nanobeads entered the cells because, due to physical-chemical specificities of PS-NH₂ 50 nm nanobeads, these nanoparticles did not induce any shift in SSC signal (Supplemental Figure S2c).

Raman and photoluminescence microscopy

Raman experiments were performed to reinforce the usefulness of flow cytometry in the detection of intracellular NDs. An example of Raman analysis of a HepG2 cell exposed to ND-20 nm is presented on Figure 4, showing an optical image (a) and the corresponding photoluminescence (PL) image (b) recorded at about 3500 cm^{-1} from the 514.4 nm excitation wavelength, i.e. in a spectral region where the emission intensity of the [N-V] centers is high. Each bright spot in the PL image indicates the location of a diamond nanoparticle, as clearly confirmed by the Raman analysis which exhibited the expected diamond signal at about 1330 cm^{-1} at each bright spot. Also an example of a Raman spectrum acquired in a HepG2 cell is presented on Figure 4c, the depth profile recorded above a diamond particle being represented on Figure 4d. The signal maximum is located a few microns below the cell surface, indicating that the particles entered the cell. Note that using this particular excitation wavelength, the Raman response of the nanocrystals is by far higher than that of the cells. Also -COOH groups were not observed in our Raman spectroscopy experiments, probably due to the fact that they may

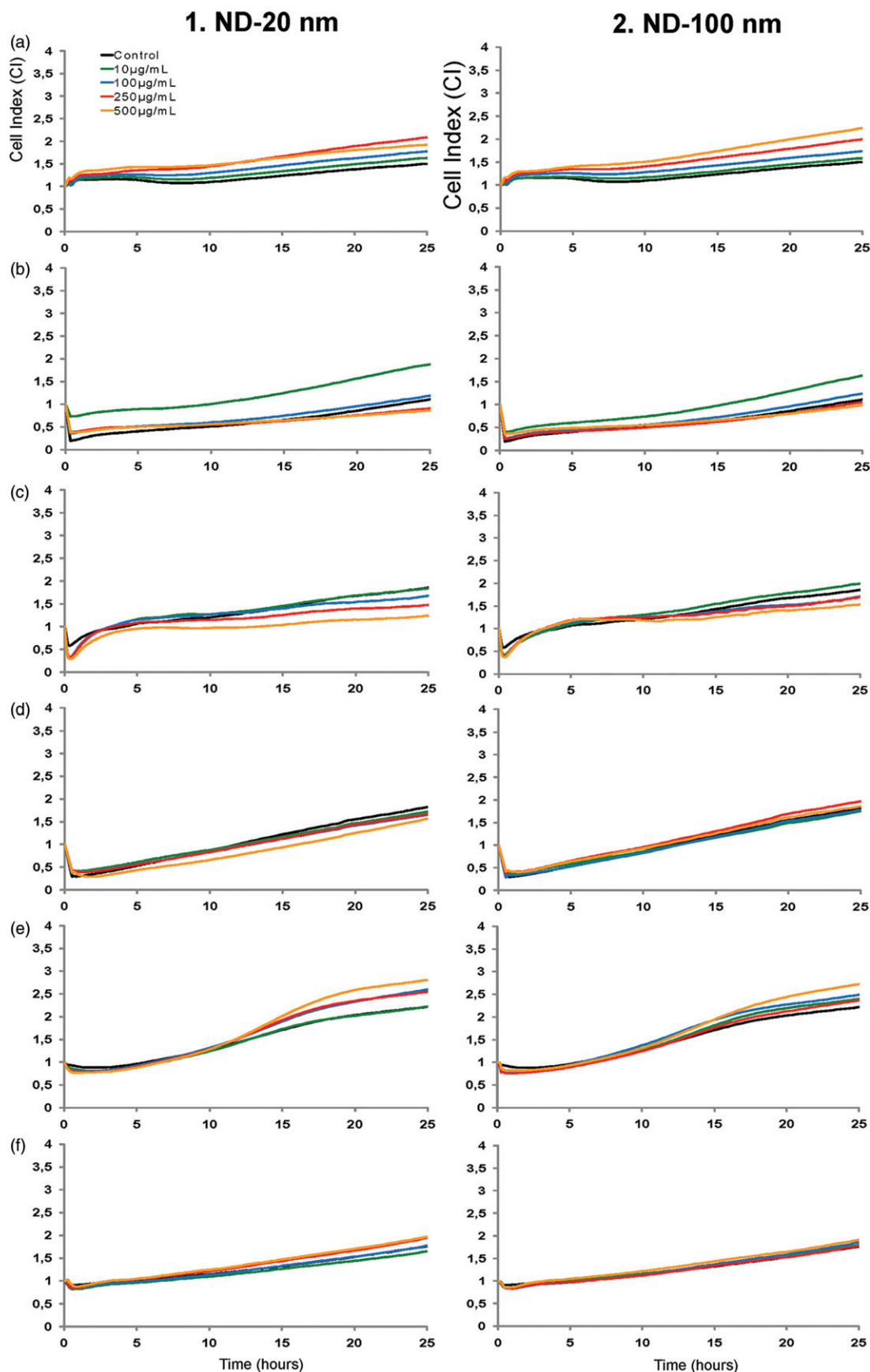


Figure 3. Cell index real-time monitoring and viability of cells exposed to ND-20 and -100 nm. Cell index real-time monitoring and viability of HepG2 (a), Hep3B (b), Caki-1 (c), HEK293 (d), HT29 (e) and A549 (f) cells exposed to ND-20 nm (column 1) and ND-100 nm (column 2). Impedance measurements (one representative experiment among three independent experiments) were carried out for 24 h and cell indices were normalized at time 0 to ensure there was no inter-well variability prior to the addition of nanoparticles. Control cells were not exposed to NDs.

Table 1. Cell-NDs interactions measured by flow cytometry.

		Living cells NDs-		Living cells NDs+		Dead cells	
		(%)	± SD	(%)	± SD	(%)	±SD
HepG2	Control	94.6	0.2	1.5	0.3	3.9	0.5
	ND-20 nm	91.9	2.0	2.8	0.8	5.3	1.1
	ND-100 nm	78.1	2.4	18.4	1.8	3.5	0.6
Hep3B	Control	94.1	0.2	1.8	0.2	4.1	0.1
	ND-20 nm	62.9	2.5	28.3	3.7	8.8	1.2
	ND-100 nm	27.6	2.2	63.8	2.9	8.6	1.8
Caki-1	Control	92.7	2.5	2.8	0.5	4.5	3.0
	ND-20 nm	64.6	1.0	27.6	2.5	7.7	1.5
	ND-100 nm	31.5	4.1	61.8	1.4	5.3	1.8
HEK293	Control	95.9	0.5	1.5	0.1	2.6	0.5
	ND-20 nm	46.9	2.5	50.0	2.7	3.1	1.0
	ND-100 nm	9.5	2.2	87.0	1.7	3.5	0.4
HT29	Control	93.8	0.4	1.9	0.1	4.3	0.4
	ND-20 nm	82.4	0.9	7.6	1.6	10.0	1.4
	ND-100 nm	71.7	0.7	20.4	1.1	7.9	1.1
A549	Control	97.4	0.1	1.6	0.3	1.0	0.2
	ND-20 nm	44.4	3.0	53.8	3.0	1.8	0.1
	ND-100 nm	3.3	0.3	95.2	0.4	1.5	0.1

Cell-ND interactions measured by flow cytometry for HepG2, Hep3B, Caki-1, HEK293, HT-29 and A549 cells exposed for 24 h to 20 and 100 nm NDs at 500 µg/mL. Percentages of positive and negative cells were determined by ND-induced change in SSC signal. Percentages of dead cells were determined by means of the To-Pro3 signal in the FL4 channel.

Data represent the mean percentage ± SD of three independent experiments. Whatever the cell line, ND-20 and -100 nm entered the cells and do not induce any significant cell mortality as compared to control cells (Student's *t*-test, *p* < 0.01).

be very much weaker than the diamond bands. Raman microscopy confirms flow cytometry data, ND-20 and -100 nm (data not shown) entered the cells.

Genotoxicity of NDs

Genotoxicity was measured according to the distribution of the number of γ-H2Ax foci per nucleus (Figure 5). Irradiation was used as positive control (Supplemental Figure S6). The overall results show that ND-20 and -100 nm at 250 µg/mL did not induce any genotoxicity whatever the cell lines (Figure 5). Faint genotoxicity was observed after exposure to the highest dose of 500 µg/mL (Figure 5) while 5 Gy irradiation induced highly significant genotoxicity (Supplemental Figure S6).

Discussion

NDs are either produced by detonation synthesis or a milling process (Krueger, 2011). Detonation synthesis leads to the smallest particles, with diameters generally not exceeding 10 nm, which are quasi-monodispersed, and their surface is often contaminated with amorphous carbon and/or graphitic domains resulting in problems with their fluorescence. In this study, we thus focused on NDs synthesized through a milling process from HPHT or CVD crystals. Such particles well reflect the general needs of the biological community, with suitable diameters ranging from 10 to 100 nm, combined with a clean surface chemistry free of impurities and the possibility of carrying stable fluorescent centers. However, inherent to the method of synthesis is the fact that such particles generally

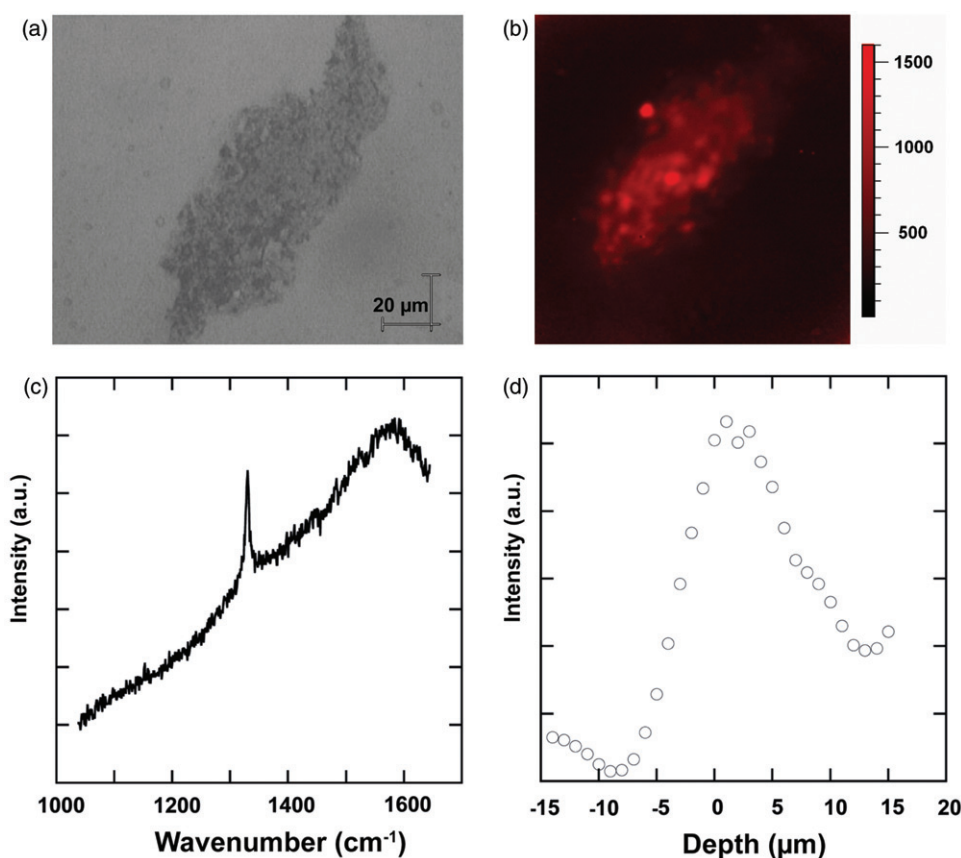


Figure 4. Example of photoluminescence and Raman microscopy of a HepG2 cell exposed to ND-20 nm. Optical image (a) and corresponding photoluminescence (PL) image recorded at about 3500 cm⁻¹ from the 514.4 nm excitation wavelength of a HepG2 cell (b). Each bright spot in the PL image indicates the location of a diamond nanoparticle. The diamond particle size was 20 nm. The two images are slightly offset (a and b). Example of Raman spectrum acquired in a HepG2 cell (c). The diamond particle size was 20 nm. Raman depth profile recorded above a diamond particle (d). The z-scale origin was approximately the cell surface.

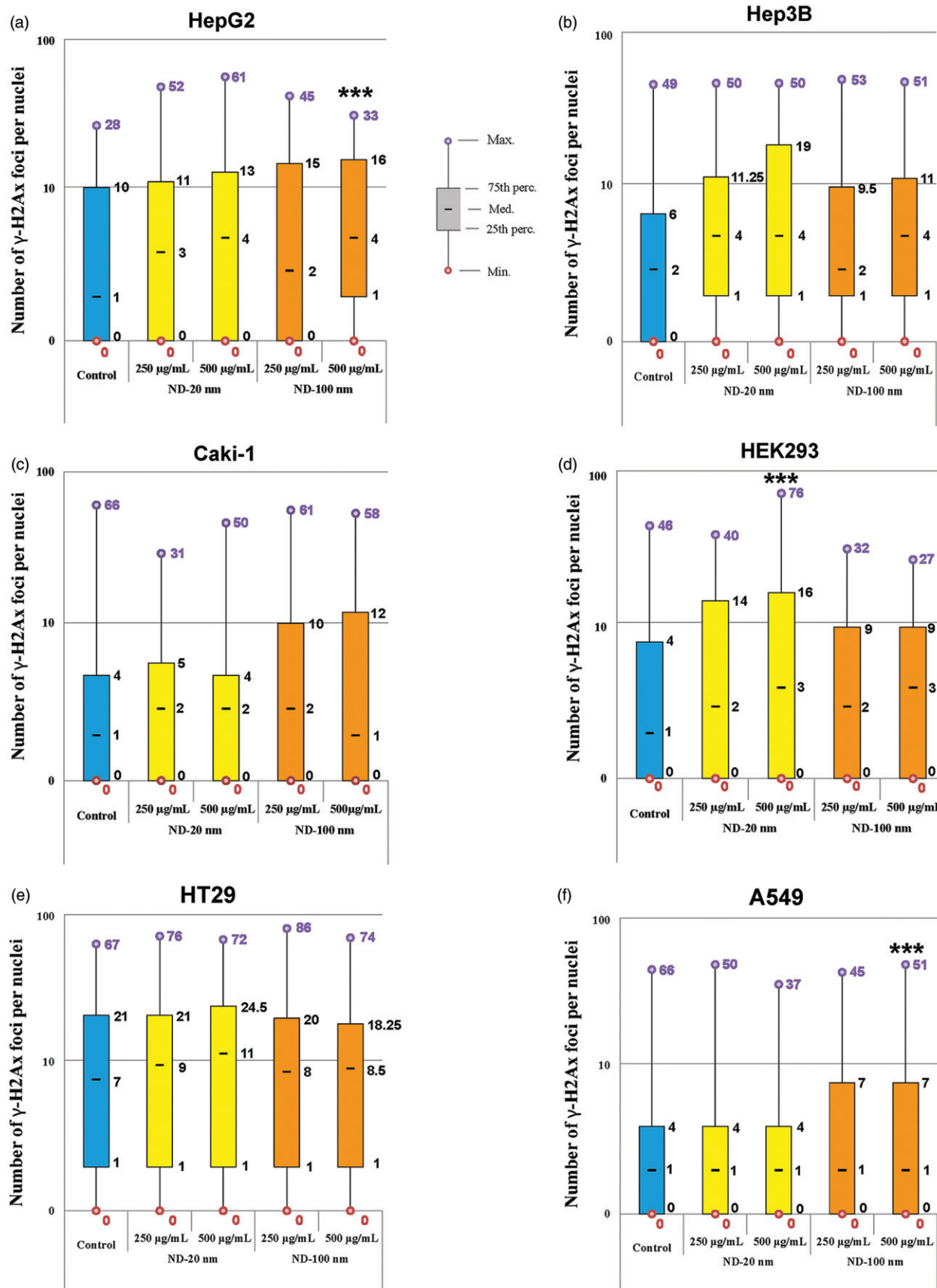


Figure 5. ND-20 and -100 nm genotoxicity measured by γ -H2Ax foci counts. Counts were performed on at least 200 cells per condition and results are depicted as box plot distribution values [minimum (min), maximum (max), median, 25th and 75th percentiles (25th and 75th perc.)] of the number of foci obtained in each tested condition. A Wilcoxon rank test (comparisons versus control cells not exposed to NPs) was performed (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

present a higher polydispersity than detonation NDs, as they are composed of crystal fragments.

Two commercial sets of NDs were studied herein, the first composed of NDs ranging up to 20 nm (ND-20 nm), the second set limited to a maximum diameter of 100 nm (ND-100 nm). Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) of both sets was initially performed to characterize their respective surface chemistries. FT-IR spectra of each set are reported in Figure 1. Note that these spectra were recorded after 24 h of drying in order to remove contaminating water. As a first result, this characterization revealed that the two samples exhibited a similar surface chemistry. The main characteristic concerned the large band between 1700 and 1800 cm^{-1} , attributed to C=O stretching in carboxylic groups. On the high frequency side of this band, the marked dip in the absorbance can be attributed to resonant Mie scattering of ND aggregates in the KBr pellet, as recently revealed by Bassan et al. (2010). A peak related to C–O stretching was also visible between 1050 and 1100 cm^{-1} , attributed to the presence of both alcohol (confirmed by the large band between 3000 and 3600 cm^{-1} due to O–H stretching) and/or ether groups on the surface of the nanoparticles. Some C–H stretching was also present between 2800 and 3000 cm^{-1} , linked to a very limited amount of amorphous carbon lying on the surface of the NDs. The two sets of NDs thus exhibited a similar oxidized surface chemistry, dominated by carboxylic groups, with a very limited contamination by amorphous carbon as confirmed by Raman spectroscopy. Additionally, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analysis revealed no metallic impurities, the samples being exclusively composed of carbon, oxygen and nitrogen (down to the detection limit of XPS, i.e. 0.5 at%; Girard et al., 2010).

In order to gain further insight into the apparent polydispersity of the samples, size distribution measurements were undertaken by dynamic light scattering (DLS), as shown in Figure 2 for both samples. Initial suspensions in water were characterized. For so-called ND-20 nm, 90% of the particles had diameters between 15 and 30 nm with a maximum lying around 20 nm (Figure 2a). In the suspension of ND-100 nm, 90% of the particles ranged from 40 to 80 nm, with a maximum at 50 nm (Figure 2b). Therefore, these two sets of NDs presented two distinct populations of particles, with a narrow distribution for each set and a very limited overlap between them.

DLS measurements coupled with electrophoresis were used to measure the surface potential (E_{ZETA}), mainly reflecting the surface chemistry of the particles. For both sets of NDs, values of $E_{\text{ZETA}} = -45$ mV were measured in pure water (pH = 6) at 500 $\mu\text{g/mL}$. These negative values are in agreement with the presence of surface carboxylic groups already revealed by the FT-IR characterizations, as the carboxylate form prevails at such a pH and confers a negative surface charge on the particles (Girard et al., 2011).

While the colloidal stability of the nanoparticles is extremely sensitive to the ionic strength of the solvent, suspension in biological medium generally induces an aggregation of the particles. In order to assess the dispersion of the NDs at 500 $\mu\text{g/mL}$ in the cell culture medium, DLS measurements were recorded in MEM + serum. As shown in Figure 2, the size distribution for both NDs increased, probably because of moderate ND aggregation due to the increase in ionic strength and the adsorption of proteins on the ND surface, up to 60 nm and 100 nm for ND-20 nm and ND-100 nm, respectively. Note that this phenomenon is also reflected by the decrease in surface charge, with a value of $E_{\text{ZETA}} = -10$ mV. However, this aggregation remains very limited for both samples, and does not affect the relevance of this study. As a comparison, one can consider the 50 nm PS-NH₂ nanobeads used as positive control, which showed a high aggregation state,

with two size distribution at 350 and over 1000 nm (87 and 13% of the nanobeads, respectively) when dispersed in complete culture medium, relative to the similar measurement performed in water (Supplemental Figure S1).

To date, no extensive study combining cytotoxicity and genotoxicity of NDs is reported in the literature. This study focuses on the characterization of *in vitro* cytotoxicity and genotoxicity of 20 and 100 nm HPHT NDs perfectly characterized in terms of size and surface chemistry. The two sets of perfectly characterized NDs were investigated in six human cell lines: HepG2 and Hep3B (liver), Caki-1 and Hek-293 (kidney), HT29 (intestine) and A549 (lung) using NDs concentrations (from 10 to 500 $\mu\text{g/mL}$) in the same range of doses used in other studies from literature (up to 400 μg ; Schrand et al., 2007b; Xing et al., 2011; Yu et al., 2005). Also this study includes orange fluorescent 52 nm aminated polystyrene nanobeads as positive control, in order to demonstrate the high sensitivity of the techniques used, but also to benchmark the absence of NDs cytotoxicity and genotoxicity. Indeed aminated polystyrene nanobeads were recently identified as one of four materials with an acute toxicity profile (Wang et al., 2013), including cytotoxicity and membrane damage (Ruenraroengsak et al., 2012) and activation of the inflammasome pathway (Lunov et al., 2011).

To analyze NDs cytotoxicity, we used real-time monitoring xCELLigence system, which is a useful sensitive method for screening simultaneously many cell lines at different concentrations (Ke et al., 2011), without artifactual variation on the signal when dealing with nanoparticles (Otero-Gonzalez et al., 2012; Sergeant et al., 2012). For the six cell lines tested in this study, exposure to ND-20 or -100 nm did not induce significant cellular effects at concentrations from 10 to 500 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 3), except for ND-20 nm at 500 $\mu\text{g/mL}$, which led to a limited but significant decrease in growth of Caki-1 cells (Figure 3c-1). Regarding the Hep3B and HepG2 cell lines, a significant increase in CI value at the lowest concentration (10 $\mu\text{g/mL}$, green curve) for the two diameters of NDs (Figure 3b-1 and b-2), and a dose-dependent increase in CI values (Figure 3a-1 and a-2) were observed, respectively. However, these increases in CI value are more attributable to changes in cell morphology or in membrane potential than to cytotoxic effects, as deduced from cell survival measured by flow cytometry.

On the other hand, real-time xCELLigence monitoring of Caki-1 cells exposed for 24 h to concentrations from 0.5 to 50 $\mu\text{g/mL}$ of 50 nm PS-NH₂ nanobeads are shown in Supplemental Figure 2a. Significant dose-dependent variations of CI were detected after 6 h exposure of Caki-1 cells to 50 nm PS-NH₂ nanobeads at 12.5 $\mu\text{g/mL}$, the cytotoxicity being emphasized after 24 h (Supplemental Figure 2a and b). These results clearly testify to the high sensitivity of xCELLigence monitoring and demonstrate the very limited cytotoxic effects of NDs on the six human cell lines analyzed.

As CI variations could reflect variations in cell viability, morphology and membrane potentials of cells, we analyzed cell viability by measuring To-Pro-3 DNA staining by flow cytometry (Van Hooijdonk et al., 1994). Furthermore, by measuring light scattering deviation (SSC deviation) as described by (Zucker et al., 2010; Zucker & Daniel, 2012) for TiO₂ nanoparticles, flow cytometry was also used to check, simultaneously to cell viability, if nanoparticles either interacted with the cell membrane or entered the cells. This approach was possible due to NDs optical properties which induce substantial light reflection (increase of SSC), as previously described for TiO₂ nanoparticles (Zucker et al., 2010). Indeed, an example of biparametric analysis of the interactions/mortality of Caki-1 cells exposed to NDs is reported in Supplemental Figure 5 and clearly shows the absence of cell mortality even at the very high dose of 500 $\mu\text{g/mL}$ NDs (Table 1).

After exposure to NDs, similar results were obtained for the six tested cell lines. Whatever the cell line, ND-20 and -100 nm entered the cells, but, according to the cell line, the percentage of ND-positive cells was variable, but without any ND-induced cell death (Table 1). For each cell line, we always observed more ND-100 nm-positive cells as compared with ND-20 nm. However, this could be related to the sensitivity of detection together with different nanoparticle agglomeration within the cells rather than true differences in cellular accumulation (Table 1). The detection of nanoparticles within the cells using flow cytometry is more qualitative than quantitative. It is not pertinent to make the distinction between dead cells with or without nanoparticles since, depending on the mechanisms of cell death and the stage of death, both alteration of membrane fluidity and membrane disruption could lead to the loss of nanoparticles.

Nevertheless, to validate flow cytometry NDs detection, Raman spectroscopy was recently used to track NDs in various biomedical studies (Cheng et al., 2007; Perevedentseva et al., 2007). We therefore used this technique to reinforce the usefulness of flow cytometry in the detection of intracellular NDs. A typical Raman spectrum of a diamond nanoparticle with a grain size higher than *ca.* 15 nm exhibits a sharp peak at about 1332 cm^{-1} which is the characteristic phonon mode of the sp^3 bonded cubic structure. The “diamond peak” is isolated and its scattering cross-section is quite large, meaning that it can be used for the location of the diamond nanoparticles. Raman experiments were performed on HepG2 cells exposed for 24 h to ND-20 nm (Figure 4), conditions for which we found the lowest ND-positive signal by flow cytometry. ND-20 nm-treated HepG2 cells effectively present the diamond specific Raman sharp peak at about 1332 cm^{-1} , and since the z-scale origin was approximately the cell surface, we can conclude that NDs are located within the cells. Indeed, the signal maximum is located a few microns below the cell surface, indicating that the particles entered the cell. Note that using this particular excitation wavelength, the Raman response of the nanocrystals is by far higher than that of the cells. Some mapping of the cell was performed by raster scanning the sample with point spacing of about $1\text{ }\mu\text{m}$. However, such scans were time-consuming – a few hours were necessary to complete the measurements. To reduce the acquisition times, global or wide-field Raman imaging was preferred. Moreover, because the diamond Raman spectrum was superimposed on a high luminescence background due to N–V centers, a much better contrast was obtained centering the filters at about 3500 cm^{-1} from the exciting 514.5 nm incident radiation, in a wavelength range where the photoluminescence background is intense. In Figure 4b, each bright spot indicates the location of a diamond nanoparticle, as clearly confirmed by the Raman analysis which exhibited the expected diamond signal at about 1330 cm^{-1} at each bright spot.

As we have shown that NDs were internalized by cells after 24 h of exposure, genotoxicity was measured at the same time according to the distribution of the number of γ -H2Ax foci per nucleus (Figure 5). H2Ax method was chosen as it is a very sensitive method to detect DNA double strand breaks (Redon et al., 2011) and powerful to predict *in vivo* genotoxicity (Smart et al., 2011). Results are depicted as box plot distribution values of the foci number obtained in each tested condition. Irradiation was used as positive control (Supplemental Figure S6) since radiation exposure induces a number of DNA double-strand breaks that is directly correlated with the dose (Jakob & Durante, 2012). So it can be seen that exposure to ND-20 and -100 nm at $250\text{ }\mu\text{g/mL}$ did not induce any genotoxicity whatever in the cell lines (Figure 5). Faint genotoxicity was observed after exposure to the highest dose of $500\text{ }\mu\text{g/mL}$, which makes no sense but was tested in trying to find “something wrong” with the NDs. These

results are in agreement with published data reporting that the DNA damage caused by NDs is much less severe than that caused by multi-walled carbon nanotubes, for example (Xing et al., 2011), or by SiO_2 in the same cell lines (Paget et al., 2011; Sergeant et al., 2012).

Since we do not observe any cytotoxicity and genotoxicity after cell exposure with ND-20 and -100 nm, it was of main importance to include positive controls to benchmark the data and to check the sensitivity of the techniques used in this study. Aminated polystyrene nanobeads were chosen since they were recently identified as one of four nanomaterials with an acute toxicity profile (Wang et al., 2013), including cytotoxicity and membrane damage (Ruenaroengsak et al., 2012) and activation of the inflammasome pathway (Lunov et al., 2011). We showed that PS-NH₂ nanobeads induced cytotoxicity after exposure of Caki-1 cells in range of doses similar (IC₅₀ around $25\text{ }\mu\text{g/mL}$ in our study) to those observed in previously published papers (IC₅₀ between 31 and $50\text{ }\mu\text{g/mL}$, according to the cell lines; Wang et al., 2013). It should be mentioned that, unfortunately, PS-NH₂ nanobeads do not have optical properties permitting to analyze their presence around and/or within the cells by measuring SSC deviation by flow cytometry.

Interestingly it was shown (Wang et al., 2013) that unmodified and carboxylated polystyrene nanoparticles have a negative zeta potential while aminated polystyrene nanoparticles have a positive zeta potential ($+43\text{ mV}$ in water in our study for PS-NH₂ 50 nm nanobeads). Wang et al. suggest that the high positive charge of aminated polystyrene nanoparticles could be associated, at least in part, with their high toxicity. The “quite” inert structure of NDs together with their carboxylated surface that confers a negative zeta potential, similar to that of carboxylated polystyrene nanobeads, could explain why NDs are neither cytotoxic nor genotoxic. However, further toxicity investigations are obviously needed by testing different surface chemistries (sp^2 domains, positive zeta potential) of NDs to confirm this proposal.

Conclusions

To summarize, the toxicity of NDs with the same surface chemistry but different diameters was investigated. As revealed by flow cytometry and Raman spectroscopy, ND-20 and -100 nm enter lung, kidney, colon and liver human cell lines, but do not alter cell viability and are not genotoxic even at very high doses ($500\text{ }\mu\text{g/mL}$). As a comparison, previous work has shown that, at equivalent mass concentrations, SiO_2 -25 nm nanoparticles are nine times more genotoxic at a 10 times lower concentration (Paget et al., 2011). Moreover, this study revealed that flow cytometry is a very sensitive and useful method for detection of NDs in cells, as previously described for TiO_2 nanoparticles.

Combined with the reported promising *in vivo* studies, which of course still need to be complemented, this absence of *in vitro* toxicity in six human cell lines already confirms the huge potential of NDs toward medical applications. Bearing in mind the facilities for grafting DNA, RNA or drugs at their surface and their intrinsic stable luminescence, NDs definitely represent a powerful candidate in the nanocarbon family for both diagnostic and therapeutic applications, their surface being functionalizable on demand.

Acknowledgements

The authors would like to thank A. Crisci for the Raman experiments.

Declaration of interest

The authors declare that they have no competing financial interests. This study was funded by the French national research program NANOTRANS, the NanoSciences CEA-Transverse program, Dim

C'Nano idf, the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety ANSES and the European Commission [BOOSTER project (BiO-dOSimetric Tools for triagE to Responders), project number 242361, call number SEC-2009-4.3-02].

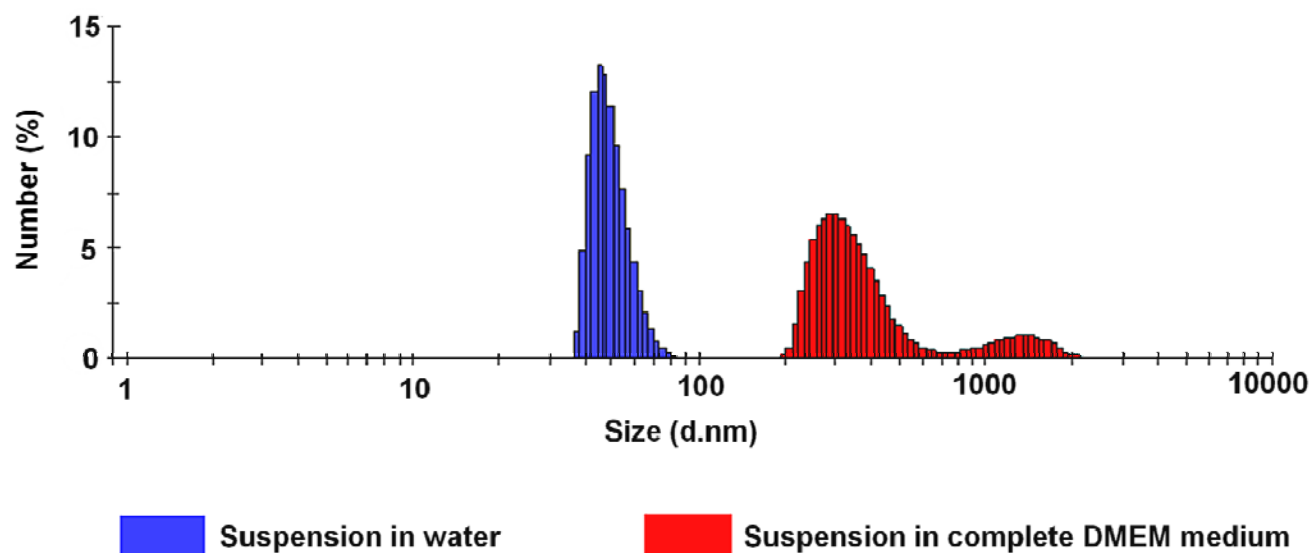
References

- Abramoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ. 2004. Image processing with ImageJ. *Biophoton Int* 11:36–42.
- Alhaddad A, Adam MP, Botsoa J, Dantelle G, Perruchas S, Gacoin T, et al. 2011. Nanodiamond as a vector for siRNA delivery to Ewing sarcoma cells. *Small* 7:3087–95.
- Arnault JC, Petit T, Girard H, Chavanne A, Gesset C, Sennour M, Chaigneau M. 2011. Surface chemical modifications and surface reactivity of nanodiamonds hydrogenated by CVD plasma. *Phys Chem Chem Phys* 13:11481–7.
- Bassan P, Kohler A, Martens H, Lee J, Byrne HJ, Dumas P, et al. 2010. Resonant Mie scattering (RMieS) correction of infrared spectra from highly scattering biological samples. *Analyst* 135: 268–77.
- Carpenter AE, Jones TR, Lamprecht MR, Clarke C, Kang IH, Friman O, et al. 2006. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol* 7:R100:1–11.
- Chang YR, Lee HY, Chen K, Chang CC, Tsai DS, Fu CC, et al. 2008. Mass production and dynamic imaging of fluorescent nanodiamonds. *Nat Nanotechnol* 3:284–8.
- Cheng CY, Perevedentseva E, Tu JS, Chung PH, Cheng CL, Liu KK, et al. 2007. Direct and in vitro observation of growth hormone receptor molecules in A549 human lung epithelial cells by nanodiamond labeling. *Appl Phys Lett* 90:163903:1–3.
- Girard HA, Arnault JC, Perruchas S, Saada S, Gacoin T, Boilot JP, Bergonzo P. 2010. Hydrogenation of nanodiamonds using MPCVD: a new route toward organic functionalization. *Diamond Relat Mater* 19: 1117–23.
- Girard HA, Petit T, Perruchas S, Gacoin T, Gesset C, Arnault JC, Bergonzo P. 2011. Surface properties of hydrogenated nanodiamonds: a chemical investigation. *Phys Chem Chem Phys* 13: 11517–23.
- Holder AL, Goth-Goldstein R, Lucas D, Koshland CP. 2010. Particle-induced artifacts in the MTT and LDH viability assays. *Chem Res Toxicol* 25:1885–92.
- Huang H, Pierstorff E, Osawa E, Ho D. 2007. Active nanodiamond hydrogels for chemotherapeutic delivery. *Nano Lett* 7:3305–14.
- Huang LC, Chang HC. 2004. Adsorption and immobilization of cytochrome c on nanodiamonds. *Langmuir* 20:5879–84.
- Jakob B, Durante M. 2012. Radiation dose detection by imaging response in biological targets. *Radiat Res* 177:524–32.
- Jelesko F, Wrachtrup J. 2006. Single defect centres in diamond: a review. *Phys. Status Solidi* 203:3207–25.
- Ke N, Wang X, Xu X, Abassi YA. 2011. The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods Mol Biol* 740:33–43.
- Kroll A, Pillukat MH, Hahn D, Schnakenburger J. 2012. Interference of engineered nanoparticles with in vitro toxicity assays. *Arch Toxicol* 86: 1123–36.
- Krueger A. 2011. Beyond the shine: recent progress in applications of nanodiamond. *J Mater Chem* 21:12571–8.
- Krueger A, Stegk J, Liang Y, Lu L, Jarre G. 2008. Biotinylated nanodiamond: simple and efficient functionalization of detonation diamond. *Langmuir* 24:4200–4.
- Kruger A. 2006. Hard and soft: biofunctionalized diamond. *Angew Chem Int Ed Engl* 45:6426–7.
- Lin YC, Perevedentseva E, Tsai LW, Wu KT, Cheng CL. 2012. Nanodiamond for intracellular imaging in the microorganisms in vivo. *J Biophoton* 5:838–47.
- Liu KK, Wang CC, Cheng CL, Chao JI. 2009. Endocytic carboxylated nanodiamond for the labeling and tracking of cell division and differentiation in cancer and stem cells. *Biomaterials* 30:4249–59.
- Liu KK, Zheng WW, Wang CC, Chiu YC, Cheng CL, Lo YS, et al. 2010. Covalent linkage of nanodiamond-paclitaxel for drug delivery and cancer therapy. *Nanotechnology* 21:315106:1–14.
- Lunov O, Syrovets T, Loos C, Nienhaus GU, Mailander V, Landfester K, et al. 2011. Amino-functionalized polystyrene nanoparticles activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages. *ACS Nano* 5: 9648–57.
- Mah LJ, El-Osta A, Karagiannis TC. 2010. GammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* 24:679–86.
- Mohan N, Chen CS, Hsieh HH, Wu YC, Chang HC. 2010. In vivo imaging and toxicity assessments of fluorescent nanodiamonds in *Caenorhabditis elegans*. *Nano Lett* 10:3692–9.
- Neugart F, Zappe A, Jelesko F, Tietz C, Boudou JP, Krueger A, Wrachtrup J. 2007. Dynamics of diamond nanoparticles in solution and cells. *Nano Lett* 7:3588–91.
- Otero-Gonzalez L, Sierra-Alvarez R, Boitano S, Field JA. 2012. Application and validation of an impedance-based real time cell analyzer to measure the toxicity of nanoparticles impacting human bronchial epithelial cells. *Environ Sci Technol* 46: 10271–8.
- Paget V, Sergeant J, Chevillard S. 2011. Nano-silicon dioxide toxicological characterization on two human kidney cell lines. *J Phys Conf Ser* 304: 012080:1–11.
- Perevedentseva E, Cheng CY, Chung PH, Tu JS, Hsieh YH, Cheng CL. 2007. The interaction of the protein lysozyme with bacteria *E. coli* observed using nanodiamond labelling. *Nanotechnology* 18: 315102:1–7.
- Redon CE, Nakamura AJ, Martin OA, Parekh PR, Weyemi US, Bonner WM. 2011. Recent developments in the use of gamma-H2AX as a quantitative DNA double-strand break biomarker. *Aging (Albany NY)* 3:168–74.
- Ruenraroengsak P, Novak P, Berhanu D, Thorley AJ, Valsami-Jones E, Gorelik J, et al. 2012. Respiratory epithelial cytotoxicity and membrane damage (holes) caused by amine-modified nanoparticles. *Nanotoxicology* 6:94–108.
- Schrand AM, Dai L, Schlager JJ, Hussain SM, Osawa E. 2007a. Differential biocompatibility of carbon nanotubes and nanodiamonds. *Diamond Relat Mater* 16:2118–23.
- Schrand AM, Huang H, Carlson C, Schlager JJ, Omacr Sawa E, Hussain SM, Dai L. 2007b. Are diamond nanoparticles cytotoxic? *J Phys Chem B* 111:2–7.
- Sergeant JA, Paget V, Chevillard S. 2012. Toxicity and genotoxicity of Nano-SiO₂ on human epithelial intestinal HT-29 cell line. *Ann Occup Hyg* 56:622–30.
- Smart DJ, Ahmedi KP, Harvey JS, Lynch AM. 2011. Genotoxicity screening via the gammaH2AX by flow assay. *Mutat Res* 715:25–31.
- Stone V, Johnston H, Schins RP. 2009. Development of in vitro systems for nanotoxicology: methodological considerations. *Crit Rev Toxicol* 39:613–26.
- Vaijayanthimala V, Chang HC. 2009. Functionalized fluorescent nanodiamonds for biomedical applications. *Nanomedicine (Lond)* 4: 47–55.
- Vaijayanthimala V, Cheng PY, Yeh SH, Liu KK, Hsiao CH, Chao JI, Chang HC. 2012. The long-term stability and biocompatibility of fluorescent nanodiamond as an in vivo contrast agent. *Biomaterials* 33: 7794–802.
- Vaijayanthimala V, Tzeng YK, Chang HC, Li CL. 2009. The biocompatibility of fluorescent nanodiamonds and their mechanism of cellular uptake. *Nanotechnology* 20:425103:1–9.
- Van Hooijdonk CA, Glade CP, Van Erp PE. 1994. TO-PRO-3 iodide: a novel HeNe laser-excitable DNA stain as an alternative for propidium iodide in multiparameter flow cytometry. *Cytometry* 17:185–9.
- Vial S, Mansuy C, Sagan S, Irinopoulou T, Burlina F, Boudou JP, et al. 2008. Peptide-grafted nanodiamonds: preparation, cytotoxicity and uptake in cells. *Chembiochem* 9:2113–9.
- Wang XZ, Yang Y, Li RF, McGuinness C, Adamson J, Megson IL, Donaldson K. 2013. Principal component and causal analysis of structural and acute in vitro toxicity data for nanoparticles. *Nanotoxicology*. doi:10.3109/17435390.2013.796534.
- Xing Y, Xiong W, Zhu L, Osawa E, Hussin S, Dai L. 2011. DNA damage in embryonic stem cells caused by nanodiamonds. *ACS Nano* 5: 2376–84.
- Yu SJ, Kang MW, Chang HC, Chen KM, Yu YC. 2005. Bright fluorescent nanodiamonds: no photobleaching and low cytotoxicity. *J Am Chem Soc* 127:17604–5.
- Yuan Y, Wang X, Jia G, Liu J-H, Wang T, Gu Y, et al. 2009. Pulmonary toxicity and translocation of nanodiamonds in mice. *Diamond Relat Mater* 19:291–9.
- Zhang B, Li Y, Fang CY, Chang CC, Chen CS, Chen YY, Chang HC. 2009. Receptor-mediated cellular uptake of folate-conjugated

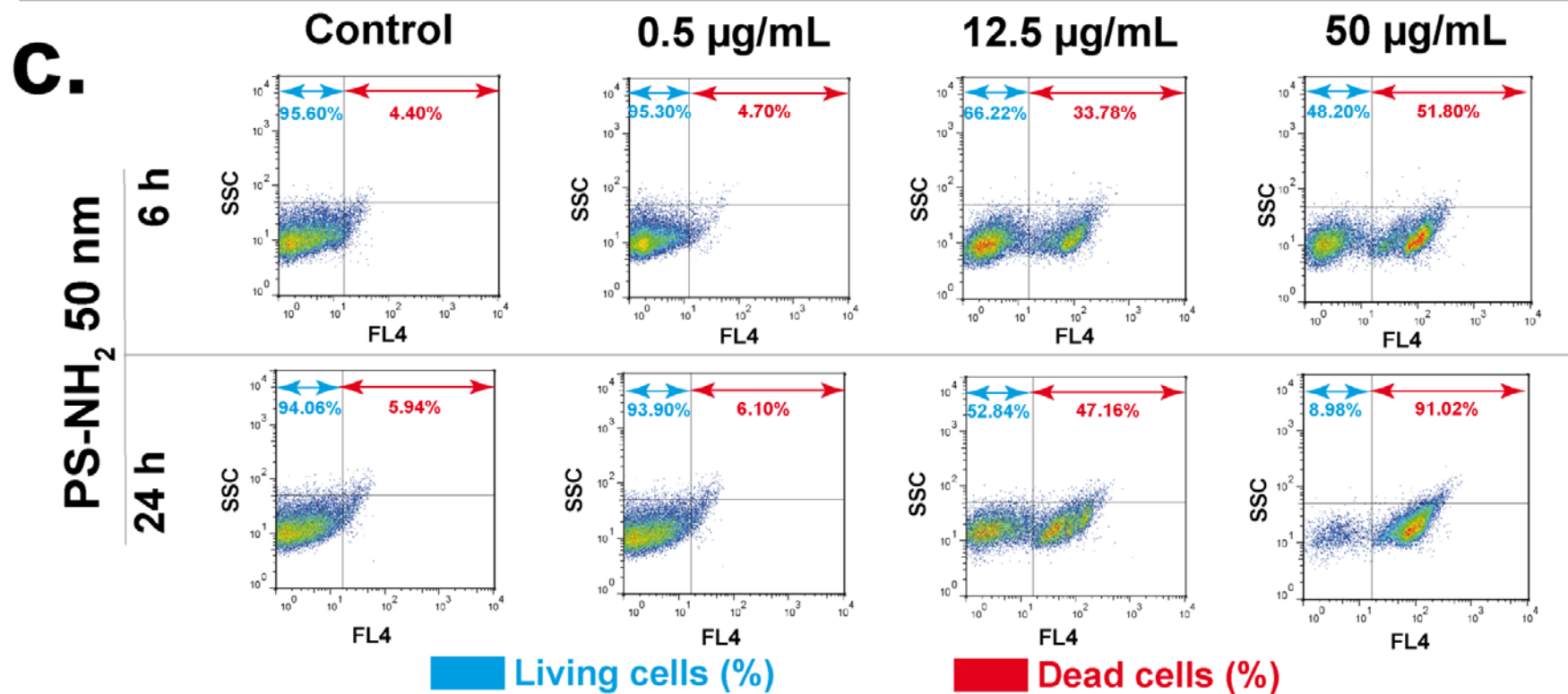
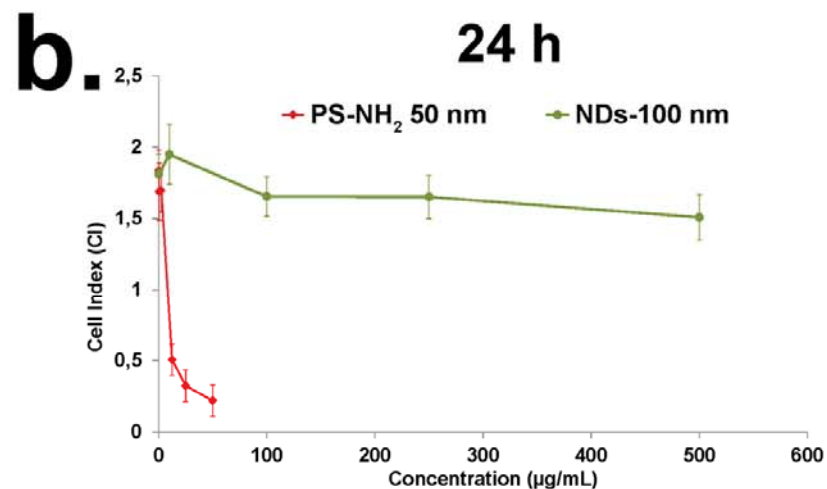
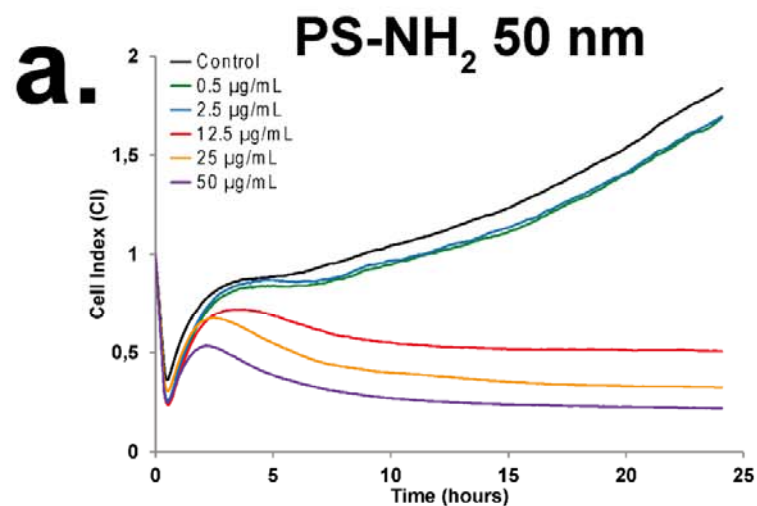
- fluorescent nanodiamonds: a combined ensemble and single-particle study. *Small* 5:2716–21.
- Zhang X, Hu W, Li J, Tao L, Wei Y. 2012. A comparative study of cellular uptake and cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes, graphene oxide, and nanodiamond. *Toxicol Res* 1:62–8.
- Zucker RM, Daniel KM. 2012. Detection of TiO₂ nanoparticles in cells by flow cytometry. *Methods Mol Biol* 906:497–509.
- Zucker RM, Massaro EJ, Sanders KM, Degn LL, Boyes WK. 2010. Detection of TiO₂ nanoparticles in cells by flow cytometry. *Cytometry A* 77:677–85.

Supplementary material available online

Supplementary 1–7

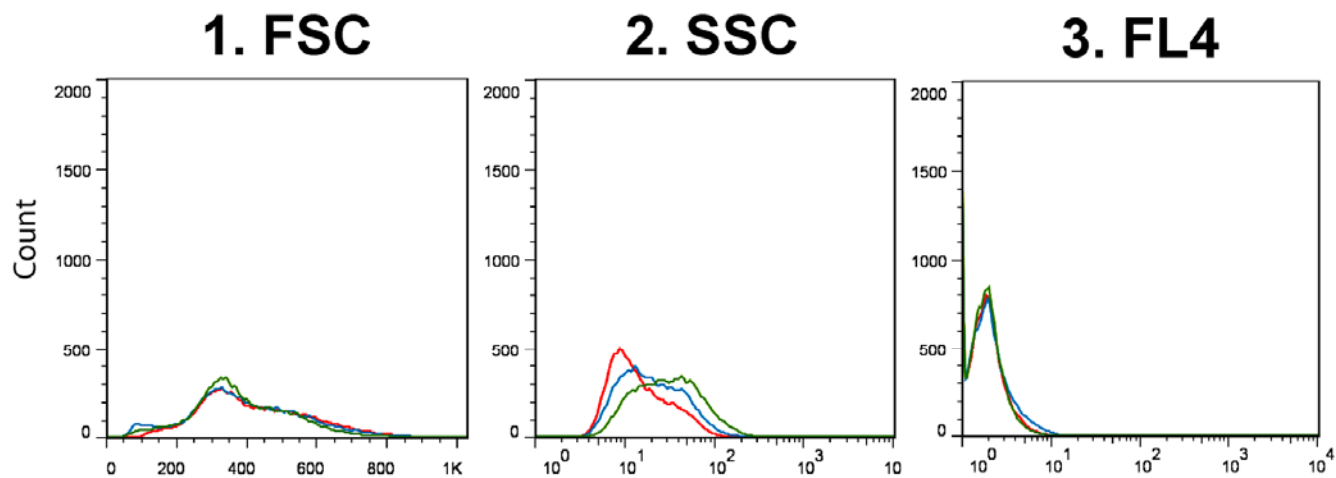


Supplementary 1. DLS measurements of PS-NH₂ nanobeads. Histograms in blue correspond to one representative measurement (of three independent experiments) of the suspension in water, histograms in red corresponding to the suspension in complete DMEM medium. PS-NH₂ nanobeads show a high aggregation state, with two size distribution at 350 and over 1000 nm (87 and 13% of the nanobeads, respectively) when dispersed in complete culture medium, relative to the similar measurement performed in water.

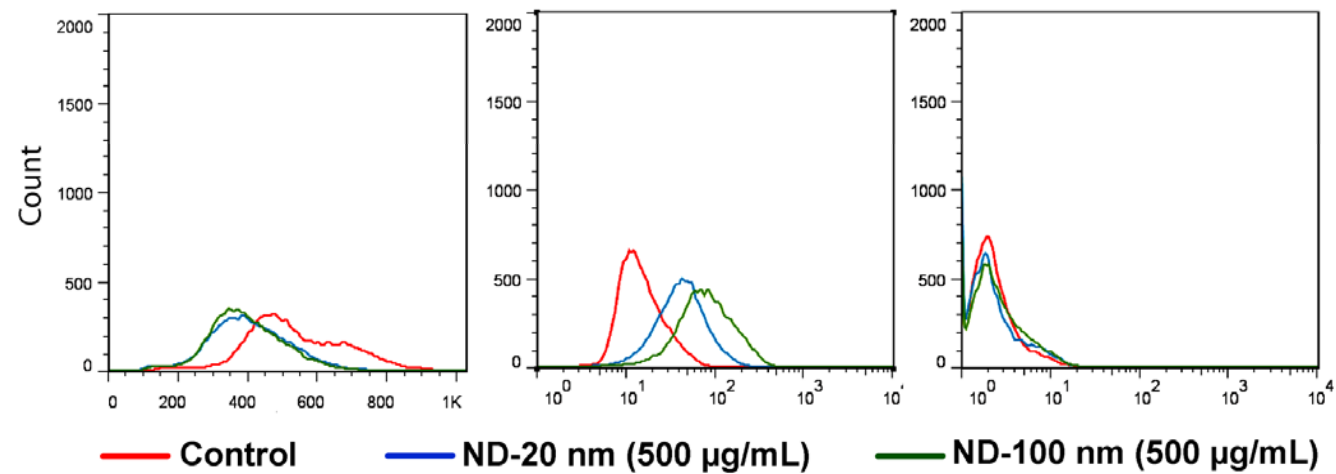


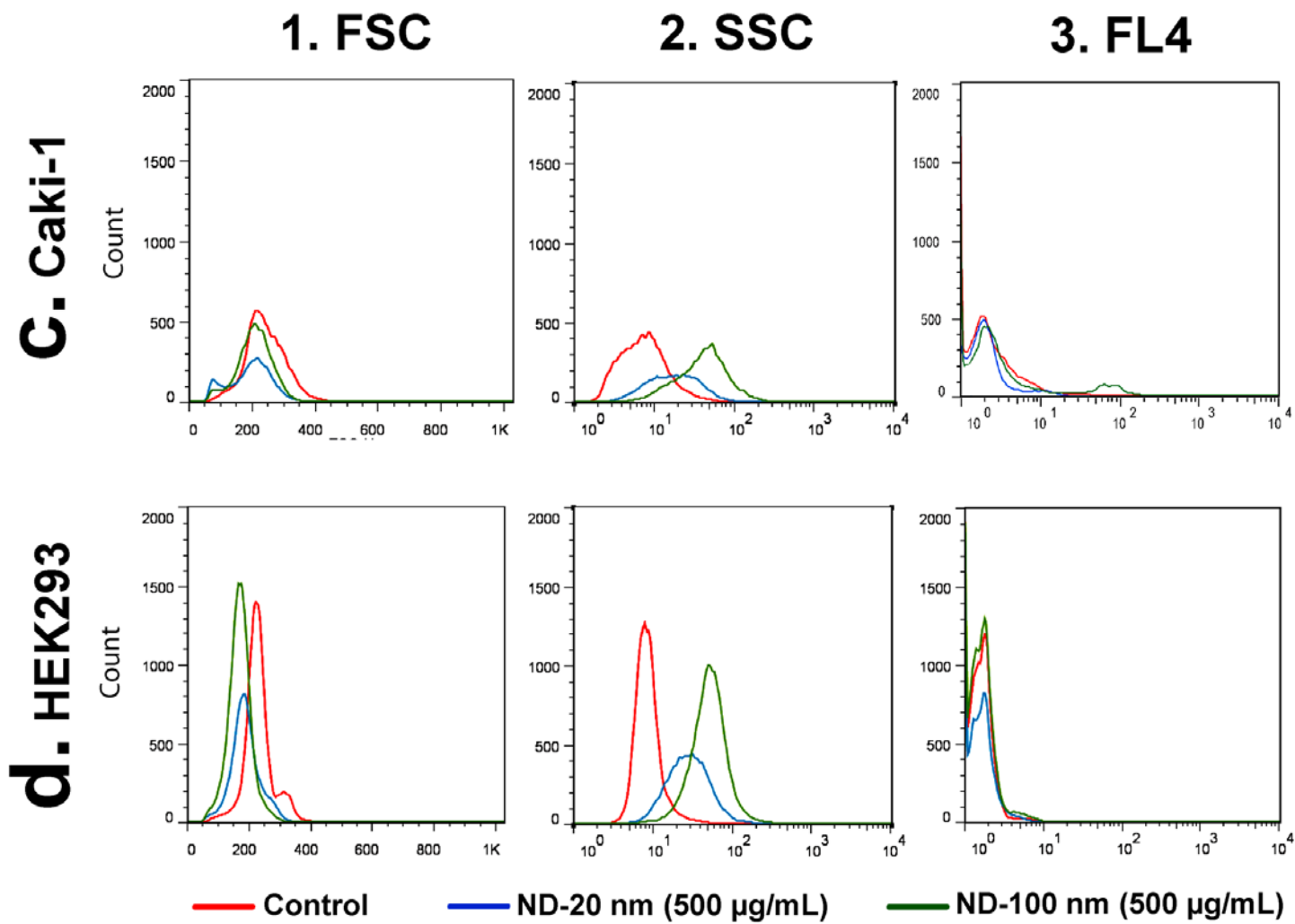
Supplementary 2. NP positive control for xCELLigence flow cytometry. One representative experiment among three independent experiments for Caki-1 cells exposed for 24 h to PS-NH₂ 50 nm nanobeads (which were used as positive control). Representation of CI values for Caki-1 cells after 24 h of exposure to NDs-100 nm (green curve) or to PS-NH₂ 50 nm aminated nanobeads (red curve) (b). Compared with the slight effects of ND-100 nm after 24 h of exposure, PS-NH₂ nanobeads induced a strong and dose-dependent decrease in cell index (CI) values over time (a), indicating the high sensitivity of the method in detecting cytotoxic effects, especially as regards the range of concentrations tested. Indeed, cytotoxic effects were observed from 12.5 µg/mL after only 6 h of exposure (a), compared with ND-100 nm where no significant effects were observed in Caki-1 cells for concentrations up to 500 µg/mL (b). Flow cytometry cell mortality induced at 6 and 24 h by PS-NH₂ 50 nm nanobeads in Caki-1 cells is depicted in (c). Cell death was detected by To-Pro-3 (FL4). Cell mortality percentages (c) obtained for the three concentrations tested (0.5, 12.5 and 50 µg/mL) at 6 and 24 h are fully in accordance with the xCELLigence profiles (a). Finally, compared with NDs, PS-NH₂ 50 nm nanobeads did not induce an increase in SSC signal (c) in exposed cells.

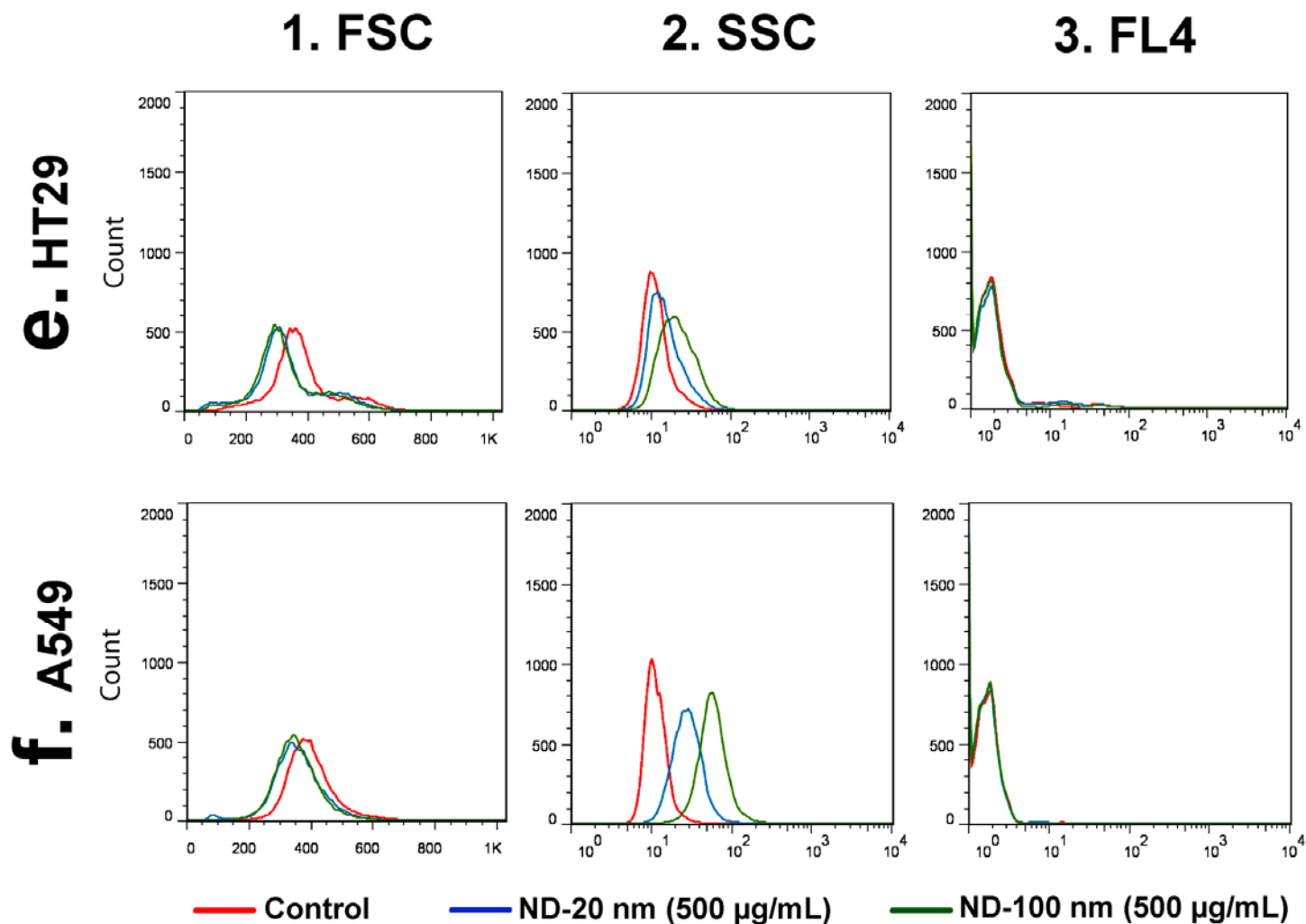
a. HepG2



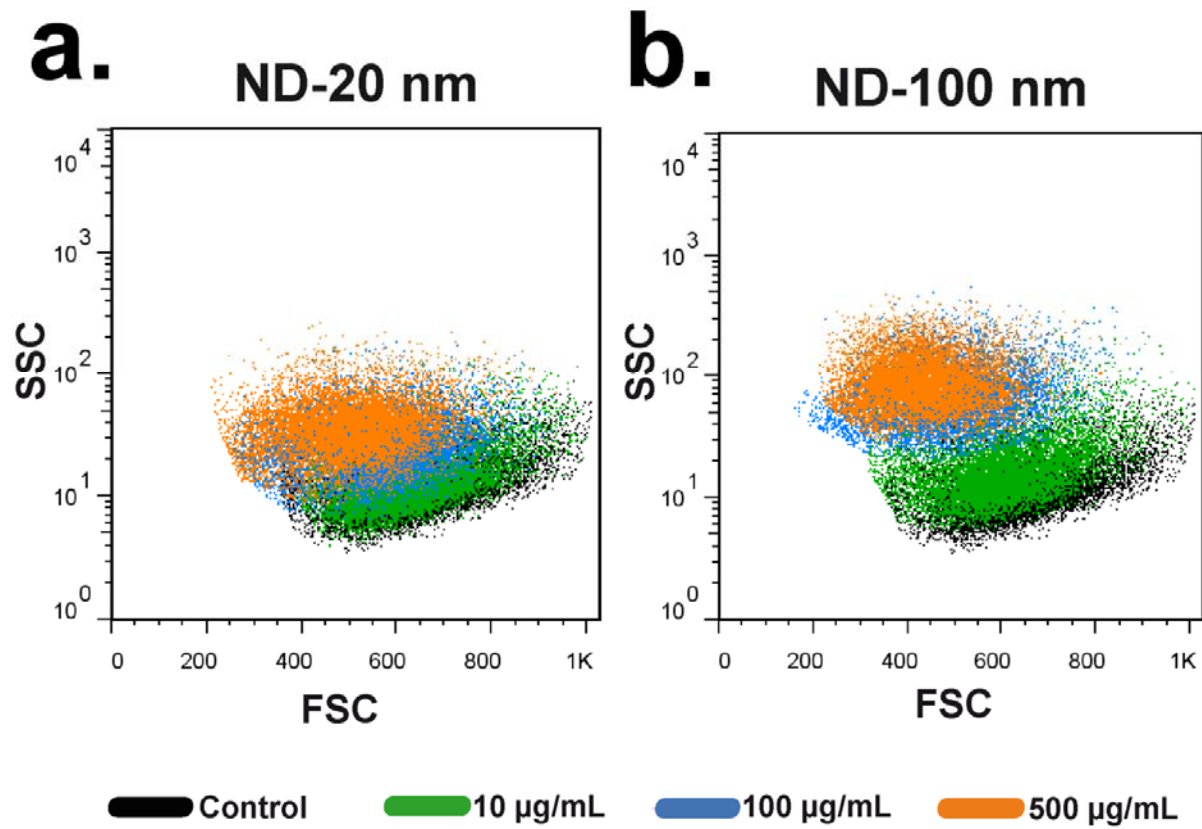
b. Hep3B



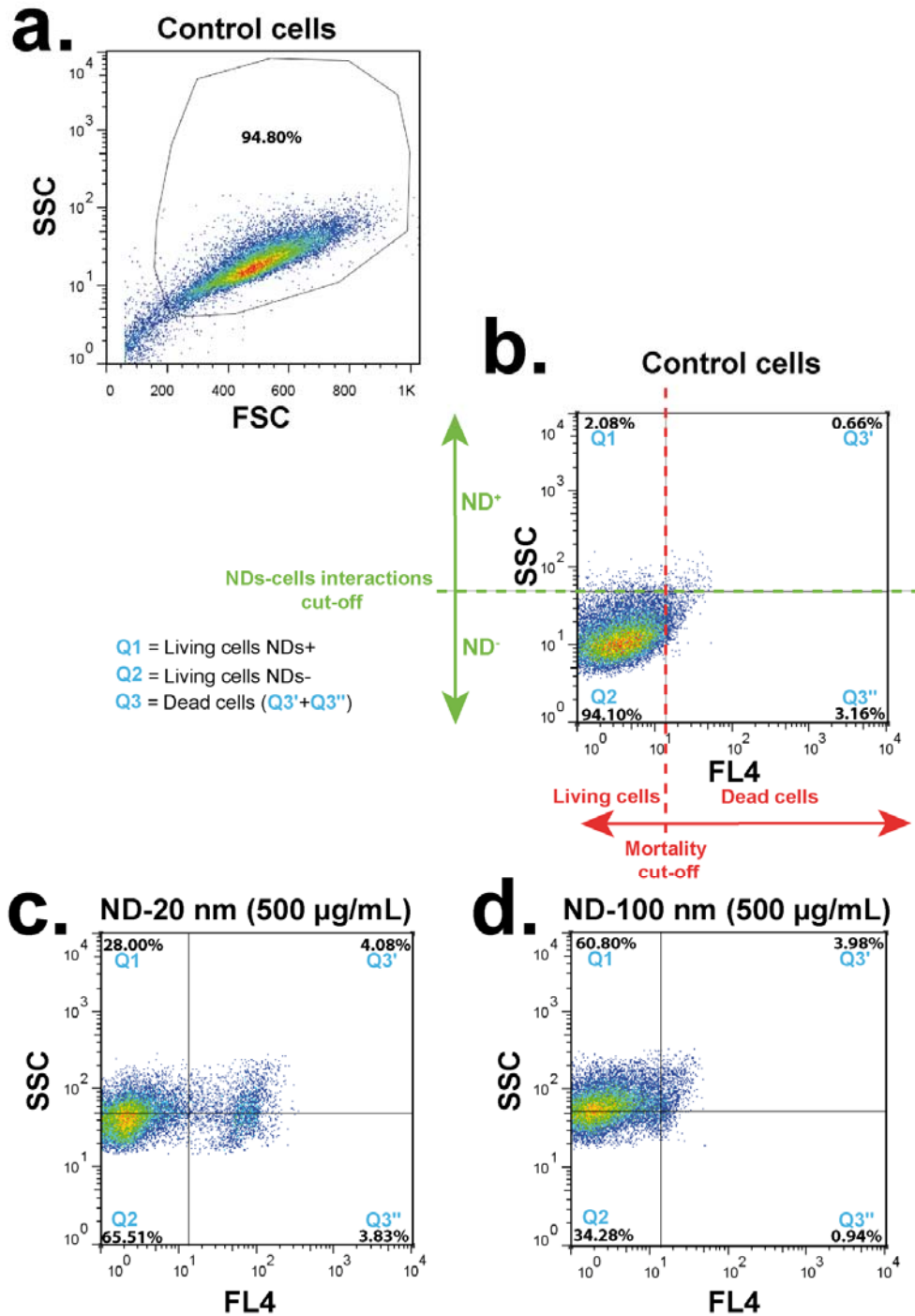




Supplementary 3. Flow cytometry monoparametric analysis. Mono-parametric analysis of FSC (size of cells) (column 1), SSC (granulometry of cells) (column 2), and FL4 (mortality) (column 3) channels represented in histogram for HepG2 (a), Hep3B (b) and Caki-1 (c), HEK293 (d), HT29 (e) and A549 (f) cell lines. While small variations were observed on FSC channel (linear scale) but also on FL4 channel (logarithmic scale), strong variations were observed for SSC channel, indicating a drastic change in the cytoplasmic complexity in exposed cells to NDs.



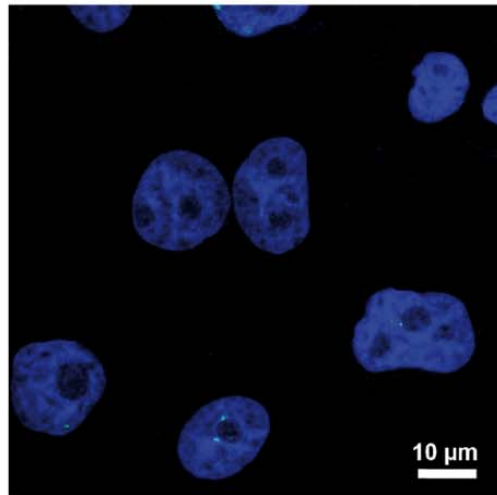
Supplementary 4. Validation of flow cytometry approach in ND-cell interactions. FSC versus SSC analysis (a) is presented for Caki-1 cells exposed to ND-20 nm (a) and to ND-100nm (b). Flow cytometry sensitivity allowed detection of Caki-1 cell-ND interactions from 10 µg/mL (green) compared with non-exposed cells (black). The SCC signal increased with increasing concentration (100 µg/mL in blue and 500 µg/mL in orange).



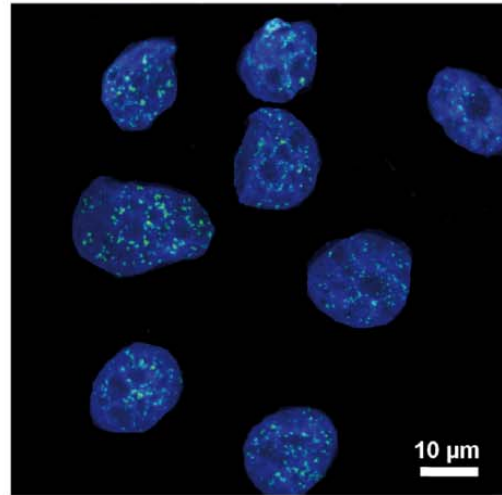
Supplementary 5. Relationship between ND-Caki-1 cell interactions and cell death. FSC versus SSC analysis is presented for non-exposed cells (a). Bi-parametric analysis (b) of cell death detected by To-Pro-3 (FL4) versus increase of SCC signal for Caki-1 control cells (b), Caki-1 cells exposed for 24 h to ND-20 nm (c) and to ND-100 nm (d). Living cells NDs+, living cells NDs- and dead cells correspond to Q1, Q2 and Q3, respectively. The cut-offs (b) for ND-positive cells (green line) and for dead cells (red line) were defined and set up as compared to control condition.

a.

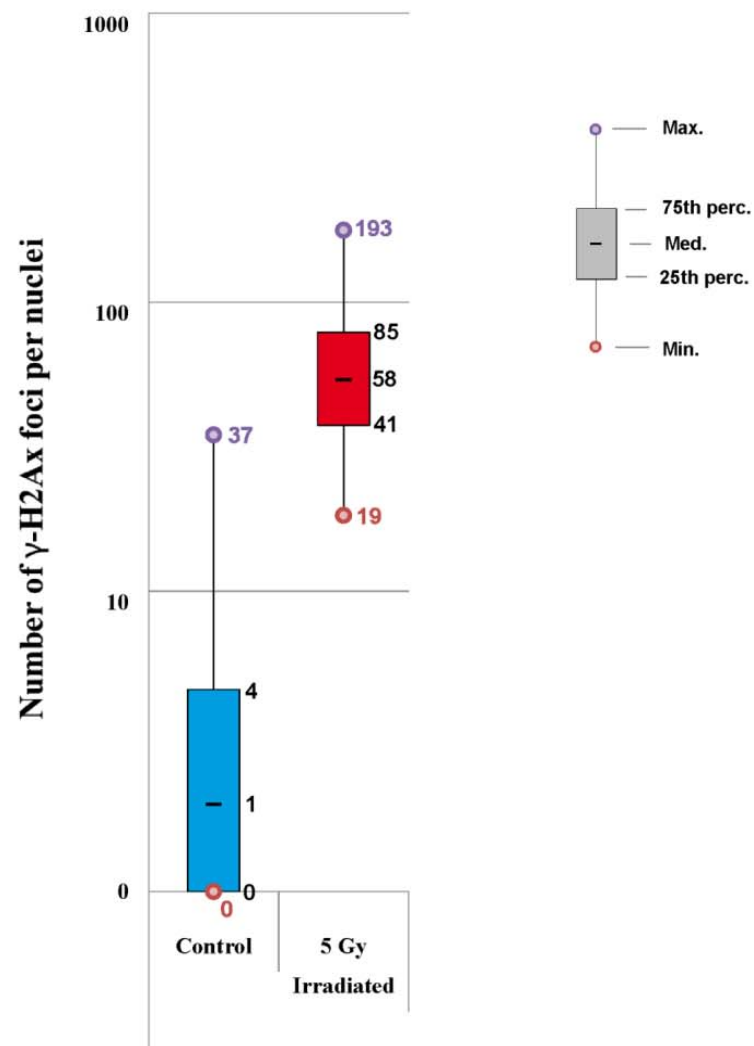
1. Control



2. Irradiation 5 Gy



b.



Supplementary 6. Positive control for H2Ax. Examples of staining for Caki-1 control cells (a) and Caki-1 cells irradiated at 5 Gy (b). Gamma H2Ax foci counts (c) for Caki-1 control cells (blue rod) and Caki-1 cells irradiated at 5 Gy (red rod) were performed on at least 200 cells per condition and results are depicted as box plot distribution values [minimum (min), maximum (max), median, 25th and 75th percentiles (25th and 75th perc.)] of the foci number obtained in each tested condition. A Wilcoxon rank test (comparison versus non-irradiated cells) was performed (***, $p < 0.001$).

a. Characteristics of the dyes used in this study

Dye	Staining	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
Hoechst 33342	Nucleus	350	461
Alexa Fluor® 488	γ -H2Ax	495	519

b. Ordering of sets and conditions used for confocal microscopy acquisitions

Set number	Dye	Staining	Laser used (nm)	Wavelengths gathering used (nm)	Laser power used (%) (upon the 2mW (theoretical max.) delivered by the system)
1	Alexa Fluor® 488	γ -H2Ax	488	500-535	15
2	Hoechst 33342	Nucleus	405	420-470	7

Supplementary 7. Fluorophore characteristics and confocal microscopy settings. Dye characteristics (a) and settings used for confocal microscopy (b).

Effet toxique du dioxyde de titane photo-activé

Cette étude constitue une approche différente de la précédente. Le dioxyde de titane (TiO_2) est un composé très utilisé sous sa forme nanométrique dans de multiples applications industrielles et cosmétiques. La capacité d'interaction très forte avec les photons des rayonnements UV de ces nanoparticules en fait de formidables agents protecteurs aussi bien pour le revêtement de bâtiments que pour les crèmes solaires. L'omniprésence de ce composé pousse malgré tout à se poser la question de sa toxicité sur notre organisme, et n'a à ce jour pas de réponse objective.

Cependant, plusieurs études font aujourd'hui état de la toxicité de ce composé dans des cellules qui y sont exposées en même temps qu'à un rayonnement UV. Nous nous sommes donc questionné quant à l'occurrence d'une telle synergie entre des nanoparticules de TiO_2 et les photons de radiation ionisante. En effet, nous sommes tous sujets à l'exposition à de telle radiation qu'elles soient à faible dose pour certains actes d'imagerie médicale, ou à plus forte dose au cours d'un protocole de radiothérapie.

Nous avons donc étudié les effets de cette double exposition dans des lignées pulmonaires, organe susceptible d'être en contact avec des nanoparticules de TiO_2 inhalées. Les lignées bronchique (Calu-3) et alvéolaire (A549) ont été exposées à une gamme de dose « réaliste » de nano- TiO_2 P25 concomitante à une irradiation à 4 Gy. La nano- TiO_2 P25 est une nanoparticule commerciale, utilisée dans différentes applications.

Les résultats montrent que le traitement concomitant entraîne des dommages plus importants que ceux observés pour l'un ou l'autre des traitements séparés.

Cette étude tend à montrer l'importance de la nanotoxicologie non pas seulement en vue d'applications précises mais surtout pour évaluer le risque associé à l'usage de nanoparticules, de leur présence dans notre environnement et de l'interaction possible avec bon nombre de nos activités quotidiennes. L'identification des dangers, associée à la connaissance de l'exposition est essentielle à l'établissement des risques associés à l'utilisation des nanoparticules.

TiO₂ nanomaterials contamination could modify normal tissue and tumor responses to
radiotherapy through photocatalysis

R. Grall¹, V. Paget^{1,*}, J. Delic^{1,*}, H. A. Girard², J.C. Arnault², S. Chevillard^{1, §}

¹ CEA, Institute of Cellular and Molecular Radiobiology, Laboratory of Experimental
Cancerology, CEA, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France

² CEA, LIST, Diamond Sensors Laboratory, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

[§] Corresponding author

Correspondence: Sylvie Chevillard, Ph.D and lab manager
CEA, Institute of Cellular and Molecular Radiobiology,
Laboratory of Experimental Cancerology
18 route du Panorama
F-92265 Fontenay-aux-Roses.
Phone: (+33) 1 46 54 88 89
Fax: (+33) 1 46 54 88 86
E-mail: sylvie.chevillard@cea.fr

E-mail addresses:

RG: romain.grall@cea.fr

HAG: hugues.girard@cea.fr

VP: vincent.paget@cea.fr

JCA: jean-charles.arnault@cea.fr

JD: jozo.delic@cea.fr

SC: sylvie.chevillard@cea.fr

KEYWORDS : TiO₂ nanoparticles, photocatalysis, radiation sensitivity

ARTICLE EN COURS DE SOUMISSION

Abstract

Among nanomaterials (NMs) titanium dioxide (TiO_2) are one of the most manufactured NMs and they are already present in many consumer products including cosmetics skin care products and textiles. TiO_2 photoactivation is very attractive for many applications related to UV filtering, air and water remediation and thus TiO_2 NMs are included in numerous products that should be microbial free. TiO_2 photoactivation generates reactive oxygen species (ROS) by mechanisms well documented. Regarding hazards and risk of TiO_2 NMs for human health, exposures may occur during both manufacturing and use, and inhalation and dermal routes are important way of NMs exposure. Cytotoxicity of TiO_2 NMs is matter of controversy depending on the biological models, on the type of TiO_2 NMs and on the biological endpoints. However, the National Institute for Occupational Safety and Health and the International Agency for Research of Cancer have classified TiO_2 NMs as potential occupational carcinogen by inhalation as a possible carcinogenic for human, respectively. Since the photoactivation of TiO_2 NMs generates ROS known to be cytotoxic and genotoxic, the hazards related to TiO_2 NMs photoactivation after occupational (application of skin care products or inhalation) should be addressed. Photoactivation could occurred on skin after non ionizing UV natural sun light exposure, but also potentially on all normal tissues exposed to IR at low doses for diagnostic imaging (X ray, mammography and scanner) or at high doses in case of radiotherapy. In the present work we addressed the question whether TiO_2 NMs could modify the response of normal tissue and of cancer after IR exposure.

Introduction

The use of nanomaterials (NMs) has dramatically increased in the last decades and they are now present in a huge number of engineered products. Among NMs, titanium dioxide (TiO_2) is the one of the most manufactured NMs in worldwide with annual production of 10,000 t [1, 2]. The bulk form of TiO_2 is biologically inert however at the nanosized scale it presents specific physical, chemical and biological properties, in part related to its surface reactivity [3], which rendered it attractive in many fields of industry : plastics, papers, inks, medicines, food products, cosmetics, toothpastes and skin care products. TiO_2 nanoparticles are increasingly applied in cosmetics, textiles and plastics as ultraviolet radiation scavenger.

Regarding hazards and risk of TiO_2 NMs for human health, exposures may occur during both manufacturing and use, via any of the major point-of-entry routes. Indeed inhalation and dermal routes are important way of NMs exposure/contamination in work place and occupational settings whereas oral contamination is more specific to diet. It is estimated that more than 150 TiO_2 NMs containing cosmetic items would have long-term dermal contact and that a typical diet leads to ingestion of 300-400 mg/day of TiO_2 NMs. However, TiO_2 habits inhalation has gained special concern [4] since, dependent on NMs lifespan and on how the NMs are attached/included into their matrix, NMs could be liberated in ambient atmosphere. After inhalation and depending on their size, NMs distribute along the respiratory tract. Inhaled NMs preferentially deposit in the alveolar region of the lungs, with a maximum at 20 nm diameter. Below that size, increasing fractions deposit in the airways of the head and thorax according to their increasing diffusivity with decreasing size (ref). After initial adsorption TiO_2 NMs can translocate and thus can reach all the body through systemic distribution [5]. Data on human TiO_2 NMs absorption through the respiratory tract are not yet available.

Among the TiO_2 NMs specific physical- chemical properties, its properties of photoactivation is very attractive for many applications related to UV filtering, air and water remediation and thus TiO_2 NMs are included in numerous products that should be microbial free. Their effectiveness in deactivating pollutants and killing microorganisms relate to photoactivation that generates reactive oxygen species (ROS) by mechanisms well documented in few papers [6, 7]. Briefly, when the energy of incident photons is larger than the band gap of NMs (3.2 eV for TiO_2 , i.e. UV light), electrons can be provided to the conduction band that leads the presence of holes in the valence band. Reactions between electrons or holes and surrounding molecules lead to ROS production. Li et al. investigated the mechanisms related to ROS production for TiO_2 NMs compared to other metal-oxide NMs [8] and three types of ROS were detected: superoxide radicals, hydroxyl radicals and singlet oxygen.

Regarding medical applications, the photocatalysis activation of TiO_2 generates ROS that are cytotoxic and genotoxic and thus can be used for killing tumor cells through the induction of membrane alteration, lipid bilayer disruption and oxidized DNA damages. The process of ROS production through the photoactivation of TiO_2 NMs was shown to be effective after exposure to non-ionizing radiation, either visible light or UVA [9, 10]. Taking advantage of this ROS generation, promising outcomes are expected for TiO_2 NMs-UV photodynamic therapy for endobronchial and esophageal tumours [11]. In comparison, only few studies have addressed the photocatalysis activity of TiO_2 after exposure to ionizing radiation (IR) at higher energies, such as X-rays or gamma-rays. Even if the effect is less effective compared to UV illumination, due to the weaker absorption of photons at higher energies, a photo-electrochemical process still occurs under X-ray exposure [12]. In the medical field, the exposure titanium oxide based nanotubes or earth doped titania

nanoparticles increases the effectiveness of X-ray irradiation for killing tumor cells *in vitro* [13, 14].

Regarding hazards and risks for human health, cytotoxicity and genotoxicity of TiO₂ NMs is matter of controversy and depending on the biological models, on the type of TiO₂ NMs, on the techniques used according to the biological endpoints, positive and negative results have been published [5, 15, 16]. However, the National Institute for Occupational Safety and Health [17] has determined that TiO₂ is potential occupational carcinogen by inhalation and the International Agency for Research of Cancer [18] has classified the TiO₂ as a possible carcinogenic for human (group 2B).

Since the photoactivation of TiO₂ NMs generates ROS known to be cytotoxic and genotoxic, the hazards related to TiO₂ NMs photoactivation after occupational (application of skin care products or inhalation) should be addressed. Photoactivation could occurred on skin after non ionizing UV natural sun light exposure, but also potentially on all normal tissues exposed to IR at low doses for diagnostic imaging (X ray, mammography and scanner) or at high doses in case of radiotherapy. In case of radiotherapy, the dose delivery is indeed higher in the tumor however surrounding normal tissues in the field of exposure are also exposed.

In the present work we addressed the question whether TiO₂ NMs could modify the response of normal tissue and of cancer after IR exposure by analyzing the potential modification in radiation sensitivity of immortalized human breast cells, that could be considered as normal cells (ref) and two human lung adenocarcinoma cell lines A549 and Calu-3 co-exposed to TiO₂ NMs and gamma rays. The dose of 4 Gy for gamma irradiation was chosen because it compatible with doses used in radiotherapy and because it does not induce any cytotoxicity in the chosen cellular models. Regarding the doses of TiO₂ NMs, they are fully compatible to what is expected in case of lung contamination by inhalation [19].

Material and methods

Cell lines and cell culture.

The human alveolar type II-like A549 cell line (ATCC[®]CCL-185[™]) was routinely grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) with glutamax. The human tracheo-bronchial epithelial Calu-3 cell line (ATCC number[®]HTB-55[™]), one of the airway cell lines commonly used for bronchial epithelial cell studies, was cultured in modified Eagle medium (MEM). The W1 cell line was obtained after immortalization, through *hTERT* expression, of HMECs cells derived from a reduction mammoplasty tissue sample from a woman without known breast pathology.. The W1 cell line is cultivated in DMEM supplemented with 10% (v/v) inactivated fetal bovine serum and cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air.

For measurement of impedance, cells were seeded (5×10^3 cells/well for the A549 cell line, 10^4 cells/well for Calu-3 cell line, 2×10^3 cells/well for W1) on E-plates (specific 96 well microplates) (ACEA Biosciences) in a final volume of 200 μ L of medium.

For flow cytometry, cells were seeded in 6-well plate (TPP) 24h before the exposure at different cell density (15×10^4 cells for A549 cells, 4×10^5 cells for Calu-3 cells xx for W1 and XX for 16HBE).

Cell exposure

TiO₂ P25 NMs (Sigma-Aldrich[®]) were suspended in water and dispersed according to the EU Framework 7 Programme NANoREG 1 recommendations. This suspension was diluted in appropriated culture medium at a final concentration of 10 mg/mL. Test concentrations were selected according preliminary dose-ranging studies, and thus cells were exposed for 2 h and 24 h with TiO₂ NMs final concentrations 6, 16, 32, 48 and 64 μ g/cm² (10, 25, 50, 75 and 100 μ g/mL), which is the range of doses used in other studies [20]. All experiments were

performed using surface area as a dose metric because surface area is considered to be the most appropriate metric for assessing NM toxicity *in vivo* and *in vitro* [21].

γ -Ionizing Irradiation

Cells were irradiated immediately after being exposed to TiO₂ NMs in a ¹³⁷Cs source irradiation unit (IBM637, CisBio International, Gif sur Yvette, France) at 1.61 Gy.min⁻¹. The dose of 4 Gy has been chosen as a sub-toxic dose according to a dose response curve (data not shown).

xCELLigence[®] (real-time follow-up)

Impedance measurement is a dimensionless parameter termed Cell Index (CI), which is derived as a relative change in measured electrical impedance to represent cell status. Several features of CI are taken into account in the measure: (i) when cells are not present or are not well-adhered on the electrodes, the CI is equal to zero (ii) under the same physiological conditions, when the number of attached cells increases on the electrodes, CI values increase also. Thus, CI is a quantitative measure of living cell number in a well (iii) additionally, change in a cell status, such as cell morphology, cell adhesion or cell viability will lead to CI modifications.

Principle of usefulness in cell biology and compatibility with ionizing irradiation were reported [22]. Background impedance signal of the E-plates (specific 96 well microplates) (ACEA Biosciences) was determined with 50 μ L of medium alone. Subsequently 5×10^3 10^4 and 2×10^3 cells were added in each well in a volume of 150 μ l for A549, Calu-3 and W1, respectively. Cells were incubated for 30 min at 37°C and E-plates were placed in the Real-Time Cell Analyzer (RTCA) station (ACEA Biosciences). After 27 h, 48h of culture for A549, Calu-3 and W1, respectively (in order to reach same number of cells per well), cells

were exposed to TiO₂ NMs followed or not by an irradiation at 4 Gy. Cells were then monitored every 5 min for 6 h (early effects), and then every 10 min for 96 h (late effects). Cell index (CI) raw data values were calculated as follows: $Z_i - Z_0$ [Ohm]/15[Ohm]; where Z₀ is the background resistance and Z_i the individual time point resistance. Normalized cell index was also calculated by the software at the selected normalization time point, which was chosen as time just before cell treatment.

Flow cytometry

TiO₂ NMs incorporation and cell mortality

Beside analyzing cell viability, it is important to analyze the cellular internalization of NMs to fully interpret cytotoxicity data. We analyzed TiO₂ NMs interaction/internalization terms of modification of the cell granularity through the measurement of side scatter parameter (SSC) (by flow cytometry as previously described) [23]. After 24 h of exposure, cells were washed and trypsinized for 5 min. Trypsin was inactivated by adding complete medium, cells were centrifuged for 5 min at 300xg and then resuspended in 500 µL of medium with serum in flow cytometry-compatible tubes (BD 352058). Multi-parametric analyses were performed on BD FacsCalibur using FlowJo 7.5.5 software. A first analysis was done on size/granulometry parameters, to collect living and dead cells and to remove fragmented cells. This first step allowed us to determine the gate where at least 2×10^4 events per replica were recorded. Then upon these gated events, the propidium iodide (PI to a final concentration of 20 µg/ml) signal was collected on FL2 (λ_{em} : 585/42 nm) after an air-cooled Argon Ion laser excitation at 488 nm (15 mW) and was used for the analysis of cell viability [24] since this dye is compatible and does not interfere neither with the equipment nor with P25 TiO₂ NMs.

The results were reported as the mean distribution of cell fluorescence, obtained for 3 replicas (with at least 2×10^4 gated events per replica). Combining SSC and PI measurements, a bi-parametric representation was then possible and permitted to distinguish living cells without nanoparticles (PI-negative/SSC-negative cells), living cells with nanoparticles (PI-negative/SSC-positive cells) and dead cells (PI-positive). PI-positive and SSC-positive cut-offs were determined according to the gate used for detecting control cells.

CM-H₂DCFDA is a useful indicator for ROS in cells. This probe passively diffuses into cells, where its acetate groups are cleaved by intracellular esterases and its thiol-reactive chloromethyl group reacts with intracellular glutathione and other thiols. Subsequent oxidation yields a fluorescent adduct that can be analyzed by flow cytometry. However, the ROs induced after NMs exposure could occur very rapidly after exposure but also very transiently. Consequently, it has been shown that the conventional protocol and pre-incubation of cells with probe is not adapted for detecting early ROS formation just after NMs exposure [25-27]. Consequently, for measuring ROS, 15 minutes before irradiation we co-exposed cells with both P25 TiO₂ NMs (6.46 and 32.26 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and CM-H₂DCFDA (6.67 μM final). Exposure with H₂O₂ was used as ROS positive control and ROS was also measured in absence of incubation with CM-H₂DCFDA probe (however we add the same volume of solvent (DMSO)) to check if TiO₂ NMs could interfere with the measure.

After radiation exposure, cells were trypsinized for 5 min re-suspended in complete medium, centrifuged for 5 min at 300xg and then resuspended in 500 μL of PBS 1X (+MgCl₂ +CaCl₂) containing 5% of FBS. All samples were placed on ice in the dark until acquisition. It should be mentioned that we also performed P25 TiO₂ NMs (6.46 and 32.26 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and CM-H₂DCFDA (6.67 μM final) co exposure on already trypsinized cells in order to reduce the delay for measuring ROS.

Acquisitions were performed on a BD FacsCalibur using CellQuest Pro software and then mono-parametric analyses were performed using FlowJo 7.5.5 software. During the acquisitions, the initial analysis was done using size/granulometry parameters. This first step allowed us to determine the gate where at least 2×10^4 events per replica were recorded. Then upon these gated events, the CM-H₂DCFDA signal was collected using the FL1 channel (λ_{em} : 525/50 nm) after an air-cooled Argon Ion laser excitation at 488 nm (15 mW).

Statistical analysis. The statistical analysis selected for xCELLigence[®] analysis, TiO₂ NMs/cell interactions measurements by flow cytometry and cell cycle analysis, a Student's t-test was performed for each exposure condition compared to non-exposed cells.

Results

Real time cellular index

We screened the toxicity of TiO₂ NMs, combined or not with radiation exposure, by monitoring cell impedance (RTCA xCELLigence[®]) [28, 29]. The cellular index as a function of time reflects a real-time integrative measure of the morphology, proliferation, growth and membrane potential of cells. One could note that impedance E-plates are compatible with gamma-irradiation and TiO₂ NMs exposure, alone or in combination, [22]. Thus the impedance was measured simultaneously for untreated control cells, irradiated, or TiO₂ NMs exposed cells and finally for cells co-exposed to both TiO₂ NMs and irradiation.

Cells were exposed to five concentrations of TiO₂ NMs: 10, 25, 50, 75 and 100 µg/mL, corresponding to 6, 16, 32, 48 and 64 µg/cm² respectively. Concerning A549 cells, the results show an absence of toxicity even at the highest dose level, since no significant modification of the cellular index is observed (Figure 1A). In agreement with previously published data, we do not observe any cytotoxicity after a 4 Gy radiation exposure alone (Figure 1B). When

exposed to both TiO₂ NMs and 4 Gy irradiation, the cellular index of A549 cells remains constant or faintly decreases as compared to radiation alone. Calu-3 cells seem to be more sensitive, since exposure to TiO₂ NMs alone induces a decrease of cellular index (Figure 1C). The co-exposure of Calu-3 cells with both TiO₂ NMs and radiation provokes a higher decrease of the cellular index, even at the lowest dose, indicating a more cytotoxic effect of the double treatment (Figure 1D). Regarding the W1 normal cells, TiO₂ NMs alone induce an increase of CI as compared to control cells (Figure 1 E), reflecting probably a modification of cell morphology whereas radiation alone does not induce any modification of cellular impedance (Figure 1 F). However, the double exposure appears to be highly cytotoxic since even at the lowest dose of NMs (6 µg/mL) the cellular impedance is drastically reduced (Figure 1 F).

Thus, to further explore the biological effects of TiO₂ NMs combined with irradiation, we next evaluated cell death, cell cycle progression and induction of ROS.

NMs uptake and cell death

The first step before cytotoxicity measurement following exposure to nanoparticles is to attest that they actually enter into the cells. Nanoparticles entrance into cells is associated with a modification of intracellular granulometry and can be measured by the deviation of the SSC channel [23]. As seen in Figure 2A, TiO₂ NMs entered into the three cell lines, however, they enter more efficiently in A549 and W1 than in Calu-3 cells, always in a concentration dependent way.

The cytotoxicity of TiO₂ NMs nanoparticles combined or not with ionizing radiation has been analyzed by measuring PI labeling which is proportional to cell death (Figure 2B). As expected, based on xCELLigence[®] data, ionizing radiation exposure at 4 Gy did not significantly affect A549, and Calu-3 cell viability 24 h after exposure (Figure 2B). A549

cells exposed to TiO₂ NMs alone or combined with irradiation did not die at 24 and 72 h after exposure (Figure 2B), despite the huge quantity of NM within the cells (Figure 2A). Regarding Calu-3 cells exposed to TiO₂ NMs alone, no significant increase of cell death was observed (Figure 2B), however when these cells are co-exposed to both nanoparticles and irradiation, cells death occurred as function of the dose specifically at 72h post-exposure (Figure 2B). Cell mortality of W1 cells is detectable as soon as 24 h after the combined treatment is more pronounced at 72 h according to XCelligence data.

Overall, TiO₂ NMs increase the radiation sensitivity of Normal W1 and cancer Calu-3 cells in term of mortality. However the Calu3-cell line seems to be more sensitive to NMs than A549, since their rate of mortality is higher despite a much smaller quantity of internalized NMs.

Cell cycle

Depending on the cell lines, it is well known that radiation could induce cell cycle arrest. A549 is relatively radiation resistant and following IR exposure (4 Gy) we do not observe any cell cycle alteration while a blockage in G₂ phase was observed after Calu-3 exposure. Concerning exposure of cells to both TiO₂ NMs and ionizing radiation, for A549 a G1 blockage occurred with the highest dose of NMs and for Calu-3 the exposure with NMs does not influence the cell cycle arrest induced by radiation alone. W1 is more sensitive since NMs alone induced a G1 arrest, radiation alone a G2 arrest and finally the combined exposure a double arrest in G1 and G2, the G2 blockage being more intense than those induced by radiation alone.

ROS

To check if ionizing radiation combined to TiO₂ P25 NMs would induce a higher oxidative stress compared to NMs or radiation alone, we analyzed Calu-3 cells, since they integrate

higher number of NMs compared to A549. Radiation alone and TiO₂ NMs alone did not induce significant intracellular ROS, but co-exposure of cells to both NMs and gamma radiation induced a faint but reproducible dose dependent oxidative stress (Figure 4).

Discussion

Currently in the field of nanomedicine, many studies are conducted to develop nanoparticles that could specifically sensitized radiation resistant tumors. All developments in this area benefits from the photoactivation of NMs make for example of gold and gadolinium that generate ROS and kill tumor cells. The challenge is to target NMs into tumors and to minimize MNs entry into normal cells for protecting healthy tissues.

Here the question is different, since we would like to study if TiO₂ NMs coming from non-controlled occupational contamination can be hazardous for people receiving radiotherapy due to their photocatalytic activity. Effectively occult contamination does occur since TiO₂ NMs are widely used in industrial and consumer products and of course people can be directly exposed with food and cosmetics but also by inhalation.

The photocatalysis activity of TiO₂ has been well documented after non ionizing radiation (visible light and UVA) exposure. In the present work, we test the radiation induced cytotoxicity of the P25 TiO₂ NMs after ionizing radiation exposure since it is among the most photochemically active commercially available TiO₂ products. Gamma radiation is electromagnetic radiation that can penetrate almost anything less dense than lead, it penetrates any part of the body and potentially causes damages in any organ or any cell. In case of radiotherapy, the maximum level of dose is delivered to the tumor but healthy tissues in the irradiation field are also exposed.

We show that commercial TiO₂ NMs alone do not induce any cytotoxicity on the pulmonary human A549 cell lines as previously shown [30, 31], whereas they seem to be cytotoxic on Calu-3 and the on the normal W1 cell lines in absence of photo-activation. However, the combined exposure of TiO₂ NMs with gamma rays, at doses that do not induce any toxicity, neither for radiation alone nor for TiO₂ alone, increases the radiation sensitivity of the two human pulmonary cell lines A549 and Calu-3. The Calu-3 cells mimic the *in vivo* serous cells in that they form an epithelium that secretes a layer of mucous that covers the apical surface. The increased cytotoxicity of the combined exposure is due to the induction of cell mortality and ROS production. Importantly, the range of doses of TiO₂ NMs used for cell exposure (6 – 64 µg/cm²) is compatible with what is expected for a full working lifetime exposure to 20 nm spherical TiO₂ NMs (49 µg/cm²) or for a 24 h exposure to 1 mg/cm³ aerosol concentration of TiO₂ NMs ranged from 0.061 to 0.15 mg/ml for 5-100 nm NMs [19]. The combined exposure of TiO₂ NMs and radiation induced a stronger cytotoxicity compared to radiation or NMs alone as seen by the increased of cell mortality and cell cycle arrest.

Often the question of NMs hazards due to occupational contamination is raised regarding healthy people, but depending on the NMs chemical- physical characteristics, and specifically in case of averred or suspected photocatalytic activity, the question of hazards should be addressed on cohort of patients receiving treatments. In this work, we have shown that at doses consistent with those used per day in a classical radiation therapy regimen, the presence of TiO₂ NMs radiosensitize both human lung cancer cells and W1 normal immortalized cells.

The deleterious secondary effects of radiotherapy are associated to high toxicity of healthy tissues that can be explained in rare cases with patient's genetic susceptibilities but most often remain unexplained. Occult contamination by NMs presenting a photocatalytic activity, such as TiO₂ NMs, which is so widespread in usual products, may be at the origin of

some of these cases of high radiation sensitivity. The hazards of TiO₂ NMs contamination regarding the sensitivity of healthy tissues and of tumors in response to low doses of ionizing radiation used for diagnostic imaging deserve to be explored.

Acknowledgements

The authors declare no competing conflict of interests. This work was funded by the French national research program NANOTRANS, the NanoSciences CEA-Transverse program, the Dim C’Nano IdF, the EU Framework 7 Programme NanoReg 1 and the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety (ANSES). RG is a recipient of a fellowship from ANSES.

Author contributions

The author contributions were as follows – RG, VP, JD, HAG, JCA, and SC designed the research. HAG, JCA conducted the characterization of P25 TiO₂ NMs. RG, VP and JD conducted the biological and biochemical experiments. RG, VP, JD, HAG, JCA, and SC wrote the manuscript. All authors critically read and approved the final version of the manuscript.

References

1. Piccinno, F., et al., *Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world*. J Nanopart Res, 2012. **14**: p. 1109.
2. Luo, Z.X., et al., *Measurement and characterization of engineered titanium dioxide nanoparticles in the environment*. Journal of Zhejiang University SCIENCE A, 2014. **15**(8): p. 593-605.
3. Auffan, M., et al., *Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective*. Nat Nanotechnol, 2009. **4**(10): p. 634-41.
4. Ponce, A., *Nanomaterials and workplace health & safety. What are the issues for workers?* 2013.
5. Shi, H., et al., *Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data*. Part Fibre Toxicol, 2013. **10**: p. 15.
6. Long, T.C., et al., *Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity*. Environ Sci Technol, 2006. **40**(14): p. 4346-52.
7. Jovanovic, B., *Review of titanium dioxide nanoparticle phototoxicity: Developing a phototoxicity ratio to correct the endpoint values of toxicity tests*. Environ Toxicol Chem, 2015.
8. Li, Y., et al., *Mechanism of photogenerated reactive oxygen species and correlation with the antibacterial properties of engineered metal-oxide nanoparticles*. ACS Nano, 2012. **6**(6): p. 5164-73.
9. Xue, C., et al., *Nano titanium dioxide induces the generation of ROS and potential damage in HaCaT cells under UVA irradiation*. J Nanosci Nanotechnol, 2010. **10**(12): p. 8500-7.
10. Sanders, K., et al., *In vitro phototoxicity and hazard identification of nano-scale titanium dioxide*. Toxicol Appl Pharmacol, 2012. **258**(2): p. 226-36.
11. Ackroyd, R., et al., *The history of photodetection and photodynamic therapy*. Photochem Photobiol, 2001. **74**(5): p. 656-69.
12. Tamuraa, K.O., Y., et al., *X-ray induced photoelectrochemistry on TiO₂*. Electrochimica Acta, 2007. **52**(24): p. 6938–6942.
13. Townley, H.E., J. Kim, and P.J. Dobson, *In vivo demonstration of enhanced radiotherapy using rare earth doped titania nanoparticles*. Nanoscale, 2012. **4**(16): p. 5043-50.
14. Mirjolet, C., et al., *The radiosensitization effect of titanate nanotubes as a new tool in radiation therapy for glioblastoma: a proof-of-concept*. Radiother Oncol, 2013. **108**(1): p. 136-42.
15. Iavicoli, I., et al., *Toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles: a review of in vitro mammalian studies*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2011. **15**(5): p. 481-508.
16. Chen, T., J. Yan, and Y. Li, *Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles*. J Food Drug Anal, 2014. **22**(1): p. 95-104.
17. Health), N.N.I.f.O.S.a., *Occupational exposure to titanium dioxide*. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, National Institute of Occupational Safety and Health, DHHS (NIOSH), Cincinnati, Ohio, USA, 2011. **Publication No. 2011-160**.
18. Humans, I.W.G.o.t.E.o.C.R.t., *Carbon black, titanium dioxide, and talc*. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 2010. **93**: p. 1-413.
19. Gangwal, S., et al., *Informing selection of nanomaterial concentrations for ToxCast in vitro testing based on occupational exposure potential*. Environ Health Perspect, 2011. **119**(11): p. 1539-46.

20. Cho, W.S., et al., *Predictive value of in vitro assays depends on the mechanism of toxicity of metal oxide nanoparticles*. Part Fibre Toxicol, 2013. **10**(1): p. 55.
21. Duffin, R., et al., *Proinflammogenic effects of low-toxicity and metal nanoparticles in vivo and in vitro: highlighting the role of particle surface area and surface reactivity*. Inhal Toxicol, 2007. **19**(10): p. 849-56.
22. Ke, N., et al., *The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability*. Methods Mol Biol, 2011. **740**: p. 33-43.
23. Zucker, R.M., et al., *Detection of TiO₂ nanoparticles in cells by flow cytometry*. Cytometry A, 2010. **77**(7): p. 677-85.
24. Ross, D.D., et al., *Estimation of cell survival by flow cytometric quantification of fluorescein diacetate/propidium iodide viable cell number*. Cancer Res, 1989. **49**(14): p. 3776-82.
25. Chen, X., et al., *2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy*. Free Radic Res, 2010. **44**(6): p. 587-604.
26. Kuhnel, D., et al., *Comparative evaluation of particle properties, formation of reactive oxygen species and genotoxic potential of tungsten carbide based nanoparticles in vitro*. J Hazard Mater, 2012. **227-228**: p. 418-26.
27. Paget, V., et al., *Human Cell Line-Dependent WC-Co Nanoparticle Cytotoxicity and Genotoxicity: A Key Role of ROS Production*. Toxicol Sci, 2015. **143**(2): p. 385-97.
28. Dreesen, O., et al., *Lamin B1 fluctuations have differential effects on cellular proliferation and senescence*. J Cell Biol, 2013. **200**(5): p. 605-17.
29. Stallaert, W., et al., *Impedance responses reveal beta(2)-adrenergic receptor signaling pluridimensionality and allow classification of ligands with distinct signaling profiles*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e29420.
30. Chusuei, C.C., et al., *Cytotoxicity in the age of nano: the role of fourth period transition metal oxide nanoparticle physicochemical properties*. Chem Biol Interact, 2013. **206**(2): p. 319-26.
31. Kim, I.S., M. Baek, and S.J. Choi, *Comparative cytotoxicity of Al₂O₃, CeO₂, TiO₂ and ZnO nanoparticles to human lung cells*. J Nanosci Nanotechnol, 2010. **10**(5): p. 3453-8.

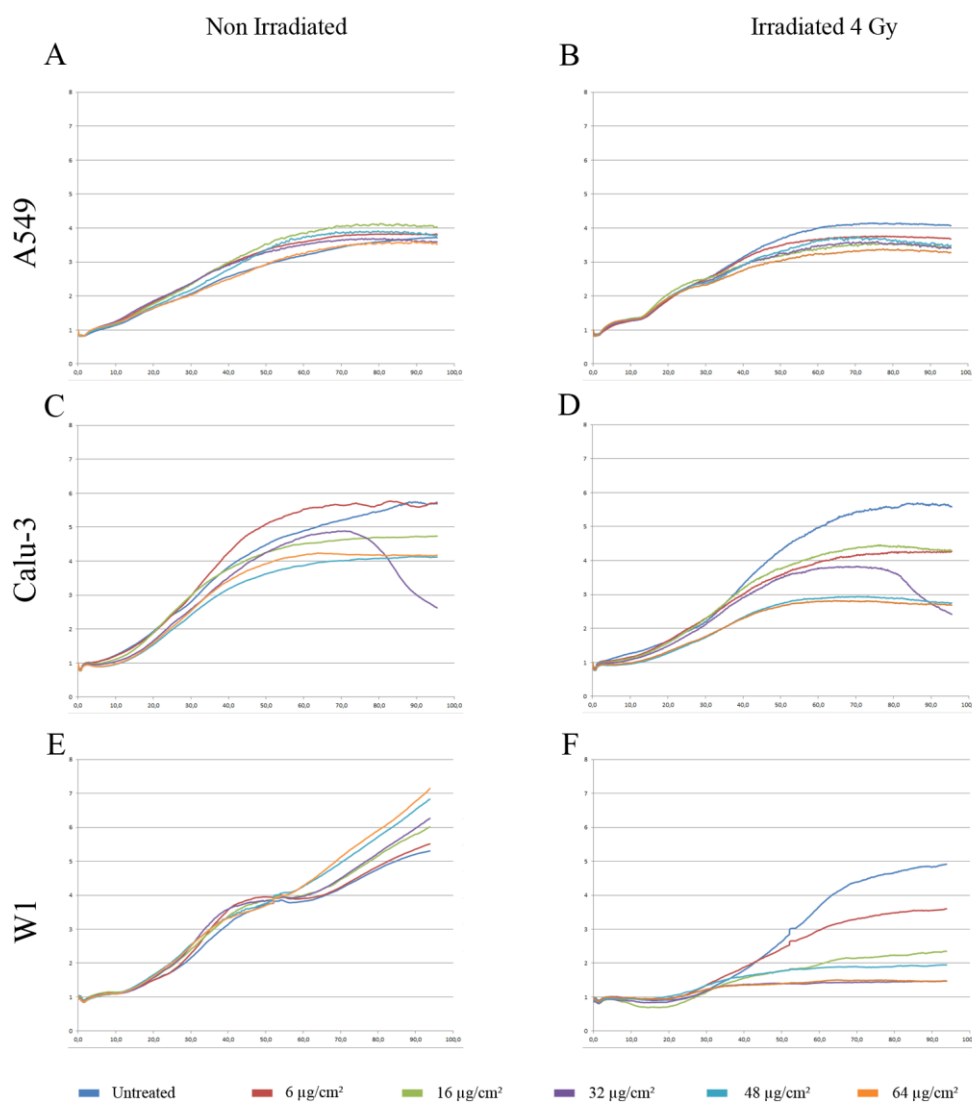


Figure 1. Real-time monitoring of cells exposed to TiO₂ P25 and/or irradiation to measure the cell index. Real-time monitoring of the cell index in A,B) A549, C,D) Calu-3, and E,F) W1 cells exposed to five dose levels of TiO₂ P25 with or without irradiation (4 Gy). Impedance measurements (one representative experiment among three independent experiments is shown) were carried out for 100 h and the cell index values were normalized at time 0 to avoid inter-well variability prior to the addition of nanoparticles. “Untreated” cells were not exposed to TiO₂ P25.

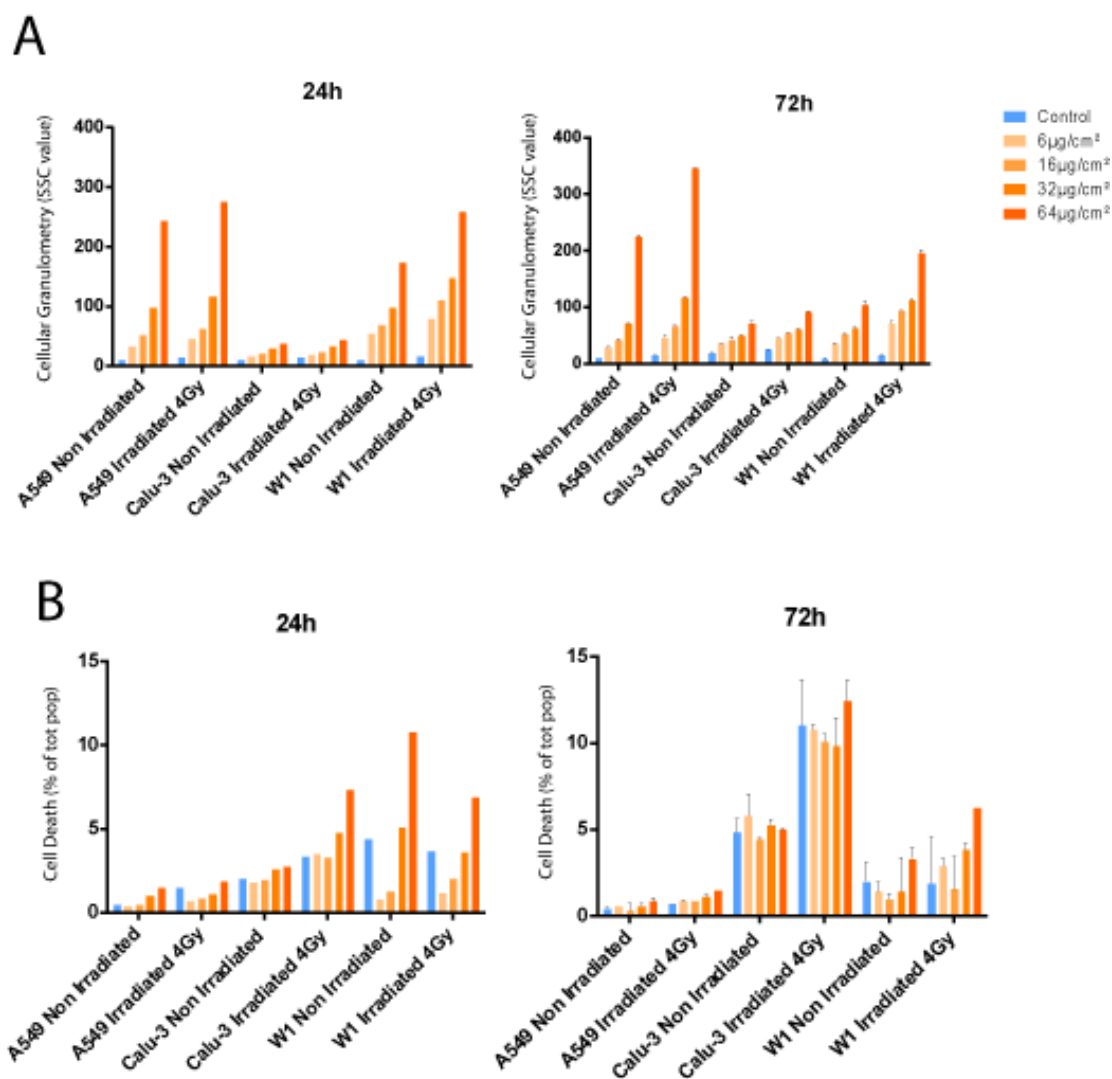


Figure 2. Cell death induction after TiO₂ P25 and/or irradiation treatments. C A) TiO₂ NMs internalization into the cells was quantified through modification of cellular granulometry. (Median of SSC channel has been reported). B) Cell death measurement performed by flow cytometry and Propidium Iodide labelling (percentage of the total population has been reported). “Control” cells were not exposed to TiO₂ NMs.

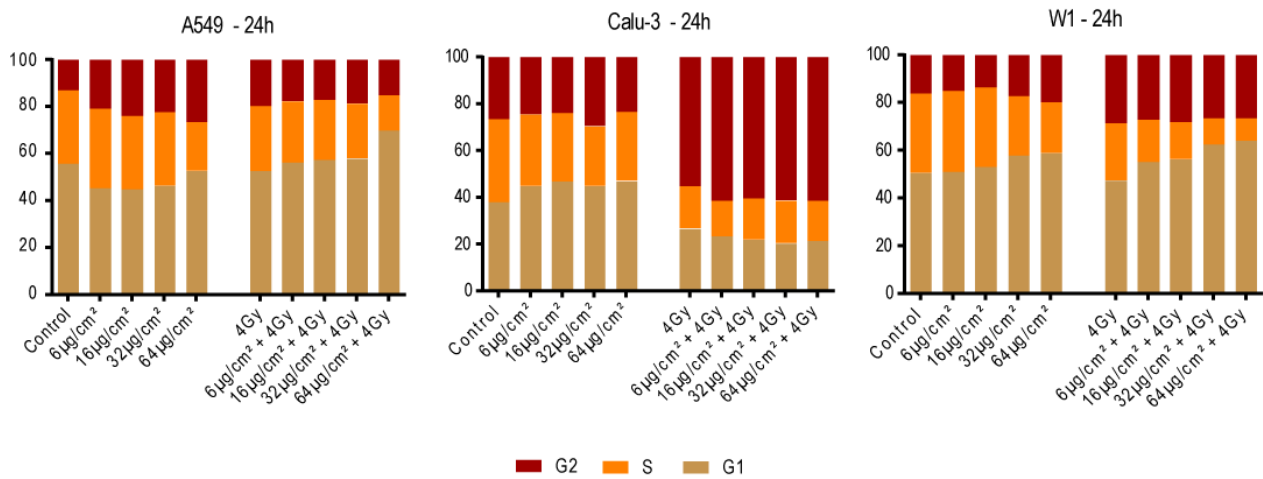


Figure 3. Cell cycle checkpoint activation following TiO₂ P25 and/or irradiation treatments. Cell cycle analysis of A549, Calu-3 and W1 cells exposed to 6, 16 and 32 µg/cm² of TiO₂ P25 combined or not with irradiation (4 Gy). “Control” and “4 Gy” cells were not exposed to TiO₂ P25. Cell cycle checkpoint activation was evaluated by flow cytometry (FacsCalibur) 24 h after treatment.

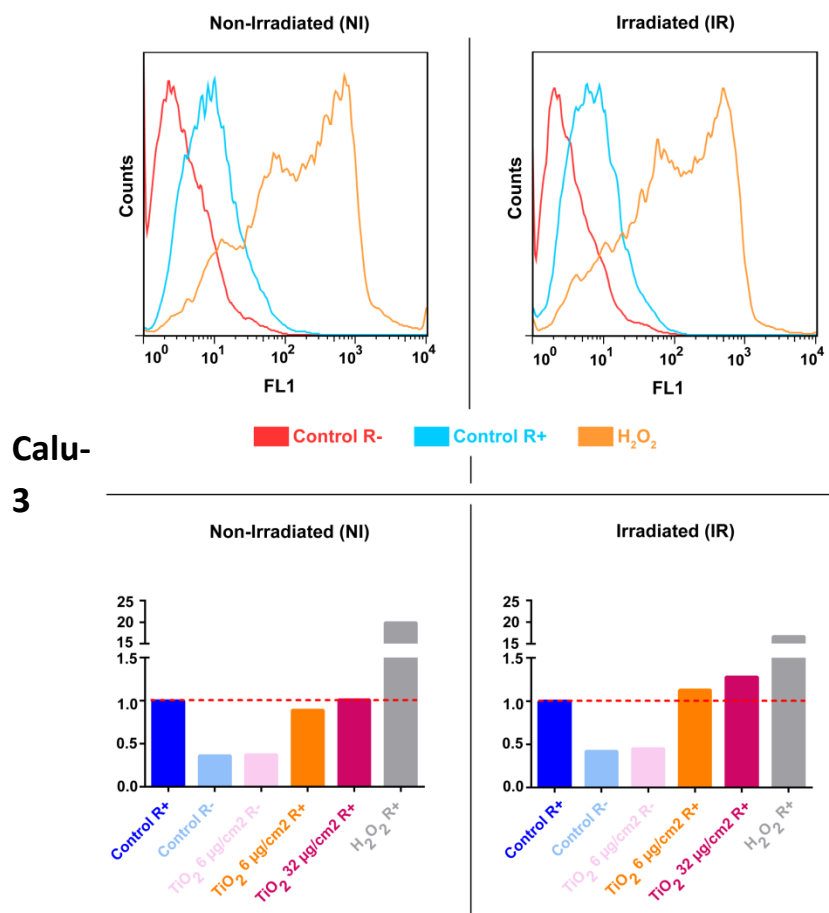


Figure 4. ROS induced by WC-Co NPs using an adapted protocol. Calu-3 cells were exposed for 15 min to TiO_2 P25 at 6 and 32 $\mu g/cm^2$. Cells exposed to H_2O_2 (6.6 mM) were used as a positive control. ROS were detected using CM-H2DCFDA probe on the FL1 channel. Possible interference between the CM-H2DCFDA probe and TiO_2 P25 was controlled. The data shown correspond to one representative experiment of three independent experiments.

Les nanodiamants hydrogénés comme potentialisateur de la radiothérapie

L'objectif de cette étude était de démontrer le potentiel de nanodiamants hydrogénés pour l'augmentation des effets de la radiothérapie sur des cellules cancéreuses radiorésistantes.

Elle fait suite à un brevet international déposé et accepté en janvier 2014 (présenté à ci-dessous) et qui montrait l'intérêt de ces composés dans quelques situations précises.

Dans le cas de ce travail, tout juste accepté pour publication, trois lignées cancéreuses ont été sélectionnées : une lignée rénale : Caki-1 et deux lignées mammaires : ZR75.1 possédant deux statuts de Ku70 différent (un naturel et un muté) leur conférant des capacités de réparation de l'ADN différentes.

Elle a débuté par une première étape de positionnement des doses de H-NDs qui a permis de montrer que dès la plus faible dose ($6\mu\text{g}/\text{cm}^2$, correspondant à $10\mu\text{g}/\text{mL}$), un effet significatif était observé en terme d'impédance cellulaire. C'est cette dose qui a été choisie pour la suite de notre étude.

Les résultats obtenus montrent plusieurs faits :

- premièrement, les lignées cellulaires utilisées sont bien résistantes à la dose d'irradiation utilisée, volontairement choisie comme étant subtoxique
- deuxièmement, les H-NDs seuls n'induisent pas de toxicité dans les différentes lignées testées, ceci jusqu'à des doses relativement élevées ($96\mu\text{g}/\text{cm}^2$ soit environ $150\mu\text{g}/\text{mL}$).
- troisièmement le traitement concomitant des H-NDs et de l'irradiation induit une toxicité, dès la plus faible dose de nanodiamants utilisée ($6\mu\text{g}/\text{cm}^2$).
- quatrièmement, le dosage des espèces radicalaires de l'oxygène confirme la production importante de stress oxydatif dans la cellule lors du double traitement par les H-NDs et l'irradiation.
- enfin, devant l'observation d'une cytotoxicité directe relativement faible, nous nous sommes intéressés à la voie biologique mise en jeu en réponse à ce double traitement. Le résultat démontre que l'exposition des cellules aux H-NDs et à l'irradiation, active une voie particulière : celle de la sénescence. Cette voie, bien qu'elle ne constitue pas une mort cellulaire à proprement parler constitue un arrêt irréversible de l'activité métabolique cellulaire [248]. Cette voie est depuis plusieurs années d'un intérêt tout particulier pour obtenir une place de choix dans l'arsenal thérapeutique anticancéreux [249-251].

Ces résultats montrent ainsi le réel intérêt des H-NDs dont le rôle de potentialisateur des effets de l'irradiation sur des cellules cancéreuses radiorésistantes, qui génèrent un

important stress oxydant intracellulaire et active une voie biologique particulière : la sénescence.



Impairing the radioresistance of cancer cells by hydrogenated nanodiamonds



Romain Grall ^a, Hugues Girard ^b, Lina Saad ^a, Tristan Petit ^b, Céline Gesset ^b,
Mathilde Combis-Schlumberger ^b, Vincent Paget ^a, Jozo Delic ^a, Jean-Charles Arnault ^b,
Sylvie Chevillard ^{a,*}

^a Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), IRCM, Laboratory of Experimental Cancerology (LCE), Fontenay aux Roses, France

^b Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), LIST, Diamond Sensors Laboratory, Gif-sur-Yvette, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 February 2015

Received in revised form

13 May 2015

Accepted 18 May 2015

Available online 20 May 2015

Keywords:

Hydrogenated nanodiamonds (H-NDs)

Radiation sensitization

Oxidative stress

γ -H2AX

Senescence

ABSTRACT

Hydrogenated nanodiamonds (H-NDs) exhibit a negative electron affinity that confers a high reactivity with oxygen species and a positive charge in aqueous solutions. It allows electron emission from H-NDs following irradiation by photons and in consequence may enhance the effects of radiation on cancer cells.

By using three human radioresistant cancer cell lines, we showed a potentialization of cytotoxicity after a co-exposure to H-NDs and irradiation; an event occurring through the induction of DNA damage and reactive oxygen species. This occurred together with a decrease in cell impedance, the activation of G₁/S, an unlocking of G₂ cell cycle check-points and early low cell death rate. At later stage of exposure, persistent increases in heterochromatinization, large γ -H2AX foci and β -galactosidase activity were detected providing evidence of cells' entrance into senescence. Similar potentialization was observed with neocarzinostatin (NCS), a radiomimetic drug.

This original finding underlines a wide clinical potential of H-NDs to intensify radiation effects on radio-resistant cancer cells.

© 2015 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Nanodiamonds (NDs) have gained increasing attention as an efficient drug delivery nanoplatform, for both diagnostic and therapeutic purposes [1–3]. Several *in vitro* [4–6] and *in vivo* [7–9] studies have shown that NDs are non-cytotoxic with an enhanced cell tolerance compared to other carbon nanoparticles. Depending on their production method, NDs are scalable with sizes ranging from 100 nm down to 5 nm. Moreover, luminescent nitrogen-vacancy (N–V) color photostable centers can be generated in the diamond lattice of NDs [4,10] and such fluorescent NDs can act as diagnostic biomarkers when functionalized with specific probes.

Because of these combined properties, NDs have attracted

growing interest as nano-vectors. The carbon-related surface chemistry of these particles provides an efficient and versatile platform for bio-conjugation that can be used in therapeutic applications [11–15]. For instance, carboxylated nanodiamonds exhibit a strong negative zeta potential when dispersed in water at a pH > 5 [16,17]. On the other hand, surface treatments such as plasma hydrogenation [18,19] or surface graphitization lead to positive zeta potential in aqueous suspension [16,20]. In both cases, the diameter of the particle is not affected. As a consequence, the tuning of the ND surface charge allowed the electrostatic loading of biomolecules such as siRNAs [11,21,22] or drugs including plant bioactive metabolites [23]. Another characteristic of NDs provided by their surface chemistry concerns their electronic properties. Indeed, hydrogenated detonation NDs have a negative electron affinity (NEA) that is similar to hydrogenated diamond films [24]. This property induces a strong interaction with water molecules leading to transfer doping [20]. This p-type conductivity of H-NDs was recently measured [25].

Our present study findings demonstrate that hydrogenated nanodiamonds (H-NDs) can act as active nanoparticles. Bearing an NEA that enables the emission of electrons, and when surrounded

* Corresponding author.

E-mail addresses: romain.grall@cea.fr (R. Grall), hugues.girard@cea.fr (H. Girard), lina2321986@hotmail.com (L. Saad), tristan.petit@helmholtz-berlin.de (T. Petit), celine.gesset@cea.fr (C. Gesset), mathilde.combis-schlumberger@centraliens.net (M. Combis-Schlumberger), vincent.paget@cea.fr (V. Paget), jozo.delic@cea.fr (J. Delic), jean-charles.arnault@cea.fr (J.-C. Arnault), sylvie.chevillard@cea.fr (S. Chevillard).

with oxygen-related adsorbents, H-NDs may act as an efficient source of reactive oxygen species (ROS) when excited with sub-bandgap energies, from UV to X-rays. Indeed, our experiments revealed that H-NDs can have a radiosensitizing effect on cancer cells by generating ROS in addition to those generated by ionizing irradiation. By testing radiation resistant human cancer cell lines, we established a higher generation of ROS leading to a greater cytotoxicity and genotoxicity when intracellular H-NDs were exposed to γ -rays as compared to radiation or H-NDs alone. This radiation sensitizing effect of H-NDs results in sustained DNA double strand breaks (DSBs), a cell cycle check-point switch from G₂/M to a G₁/S arrest, and finally in cell senescence. Of note, among the cancer cell lines we tested, those derived from a breast cancer were found to express a deregulated Ku70 gene involved in DSB DNA repair through non-homologous end-joining (NHEJ), which is normally active throughout all phases of cell cycle. In contrast, the renal cancer cell line is wild type for this gene. Hence, considering that single strand breaks (SSB) result in DSBs if not repaired, or if misrepaired, and that senescence was triggered in all cell lines tested, our data strongly suggest that ROS-induced G₁/S arrest is the specific event leading to senescence induction. Taken together, our data emphasize the wide potential of H-NDs in the development of new therapeutic strategies combining these nanoparticles with radiotherapy.

2. Results

2.1. Physical and chemical characteristics of H-NDs

Electron emission properties are conferred on NDs by the presence of hydrogenated terminations on their surface [20]. Such terminations can be efficiently created by plasma hydrogenation as described elsewhere [19]. Size and Zeta potential of H-NDs have been characterized after being dispersed in aqueous suspension by sonication (Table 1). For this purpose, a suspension of H-NDs at 1 mg/mL was used. As reported in our previous study [20], hydrogenated NDs dispersed in an aqueous solution are highly reactive toward oxygenated species, which leads to a conductive surface layer. A positive Zeta potential was measured in our current study (44 mV at pH = 7) consistent with our previous report [20].

The H-NDs were then dispersed in DMEM cell culture medium. The corresponding suspension exhibited an increase of the hydrodynamic radius whilst the Zeta potential dropped to -7 mV. These latter effects are likely related to adsorption of a corona of proteins on the H-NDs surface that might be at the origin of the slight aggregation [26,27].

2.2. Real-time cellular index (impedance)

We screened the cytotoxicity of H-NDs, combined or not with radiation exposure, by monitoring cell impedance (RTCA xCELLigence®) [28,29]. The cellular index as a function of time reflects a real-time integrative measure of the morphology, proliferation, growth and membrane potential of cells. Importantly, impedance cell dedicated culture plates are compatible with γ -irradiation

exposure and H-NDs alone do not interfere with this measurement [30,31]. Thus, the impedance value reflecting global cell “health” under standard *in vitro* cell culture conditions, was measured simultaneously for untreated (controls), irradiated, and H-ND-treated cells, and also for cells treated with both H-NDs and irradiation. We selected three cell lines: two breast cancer derived cell lines created in our laboratory harboring the conditional expression of Ku70, an essential protein in the classical NHEJ DNA repair pathway (ZR75.1_{Ku70wt} and ZR75.1_{Ku70mut}; Bouley et al., submitted) and a kidney cancer cell line (Caki-1).

In agreement with the previously established radioresistance of these cell lines by other approaches, they could also be considered resistant to 4 Gy irradiation using the xCELLigence® assay (Fig. 1). The evolution of the cellular index of the three untreated cell lines throughout 180 h was quite similar, indicating their close doubling times (Fig. 1). Cells were exposed to three different concentrations of H-NDs: 10 μ g/mL, 50 μ g/mL and 100 μ g/mL corresponding to 6 μ g/cm², 32 μ g/cm² and 64 μ g/cm², respectively. However, following single cell treatments, this method appeared less robust and divergent results were obtained between the tested cell lines since the cell indexes unexpectedly but significantly increased. The Caki-1 cells treated only by irradiation exhibited a higher (2-fold, see Table 2) cell index similar to the breast cancer derived cell lines treated by H-NDs alone (Fig. 1). This of course could not account for real cell behavior improved by these treatments but rather indicated a morphological change (i.e. cell shrinkage, not shown), and thus reflected global changes in the extracellular matrix (cell adhesion) without affecting long term cell proliferation or growth (as further validated by specific experimental approaches described below).

Overall, this new methodology showed some limitations in assessing multiparametric cellular toxicity (i.e. cell treatment affecting cell morphology and adhesion in addition to membrane potential, cell mass and proliferation for which it was initially dedicated). Nevertheless, the xCELLigence® approach allowed us to conclude that the potentially effective dose of H-NDs combined with irradiation or with the radio-mimetic drug neocarzinostatin could be as low as 6 μ g/cm². Thus, this dose was chosen to further characterize the biological effects of H-NDs through conventional and validated methods. Using irradiated cells as the controls (rather than untreated cells), co-exposure of cells to the same concentrations of H-NDs and to 4 Gy irradiation led to a decreased cellular index for the two more radio-resistant cells (Caki-1 and ZR75.1_{Ku70mut}). This observation was relevant to the level of induced cellular toxicity. Indeed, an identical increased effect was evidenced when the cells were simultaneously treated by H-NDs and the neocarzinostatin radiomimetic at 3.3 nM, a dose chosen as the equivalent to irradiation at 4 Gy (see Supplementary Data 1). This last observation is in agreement with the observed morphological alterations induced by irradiation that contributed to increased cell impedance since neocarzinostatin induces oxidative stress like irradiation (see below).

Thus, to further explore the biological effects of H-NDs, we next evaluated cell death, cell cycle control, the induction of ROS and DNA damage by applying this dose of H-NDs. We also assessed

Table 1
Polydispersity Indexes after sonication, Dynamic Light Scattering, and Zeta Potential of 1 mg/mL H-NDs suspended in water and complete media.

Suspension medium		Polydispersity index (PDI)	Dynamic light scattering (DLS)			Zeta potential	
			Hydrodynamic radius (nm)	%Number	SD	Value	SD
Water	Peak 1	0.311	16	100	± 5.5	44	± 4.92
	Peak 1	0.590	20	89.4	± 3.3	-7	± 0
	Peak 2		53	10.6	± 35.14		

^a DMEM medium with 10% vol/vol FBS (pH = 7).

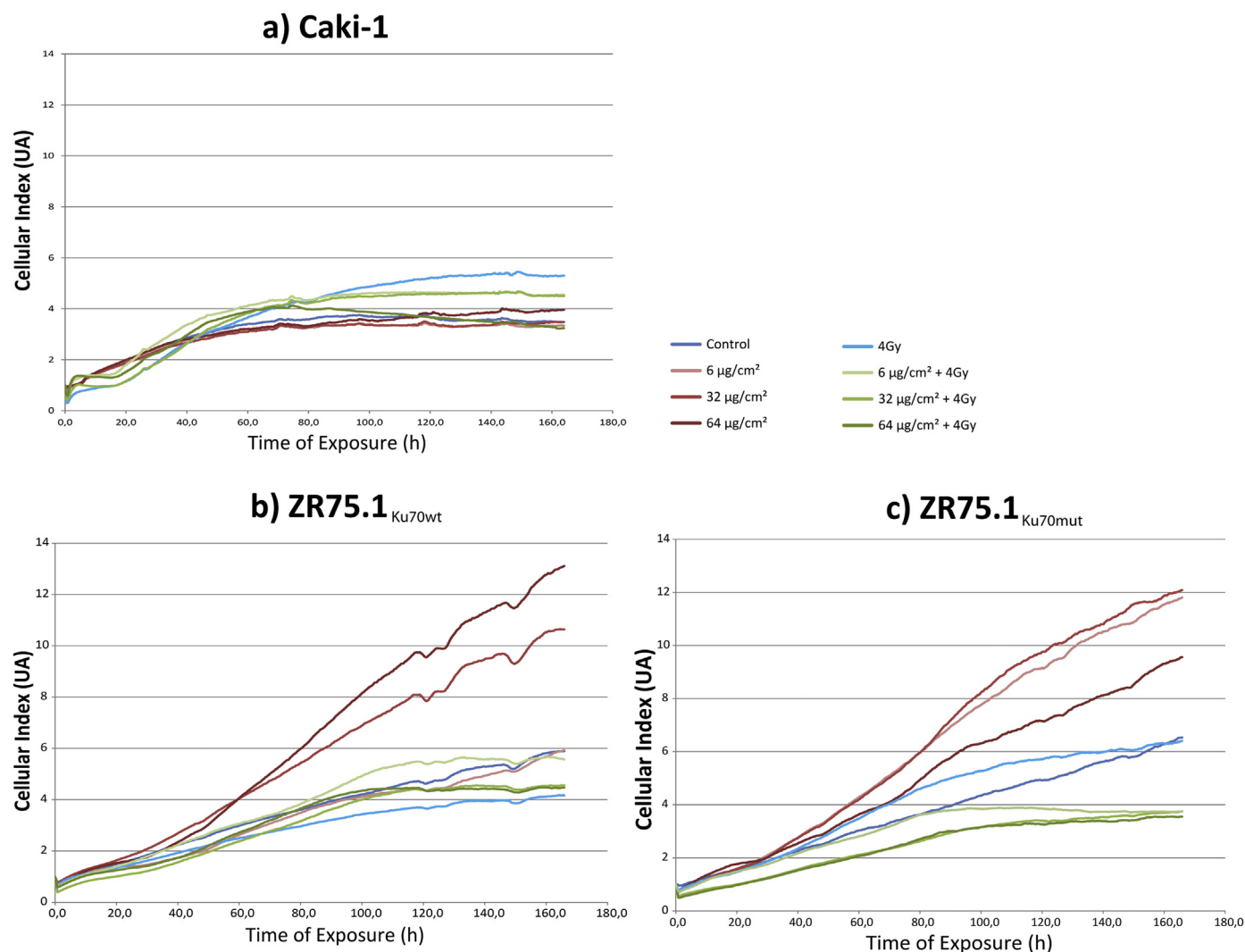


Fig. 1. Real-time monitoring of cells exposed to H-NDs and/or irradiation to measure the cell index. Real-time monitoring of the cell index in a) Caki-1, b) ZR75.1_{Ku70wt}, and c) ZR75.1_{Ku70mut} cells exposed to three dose levels of H-NDs with or without irradiation (4 Gy). Impedance measurements (one representative experiment among three independent experiments is shown) were carried out for 170 h and the cell index values were normalized at time 0 to avoid inter-well variability prior to the addition of nanoparticles. “Control” and “4 Gy” cells were not exposed to H-NDs.

whether cell growth arrest was due to entry into irreversible senescence.

2.3. Cell death assessment

The cytotoxicity of H-NDs alone or in combination with ionizing irradiation was analyzed by measuring trypan blue exclusion which indicates cell viability (Fig. 2). As expected, since we specifically tested a radiation resistant cell line, ionizing irradiation exposure at a 4 Gy dose did not significantly affect cell viability up to 72 h post-treatment. H-NDs alone induced only a 20% rate of cell death in the breast cancer lines and did not affect Caki-1 cell viability at all. However, a combined exposure of H-NDs (6 µg/cm²) and irradiation (4 Gy), significantly increased the rate of cell death in all three cell lines as compared to each single exposure (irradiation or H-NDs alone) with a stronger effect being observed for Caki-1 and ZR75.1_{Ku70mut} cells (Fig. 2).

2.4. Cell cycle check-point activation (flow cytometry)

Considering that ionizing irradiation activates cell cycle

checkpoints [32,33], we addressed whether a co-exposure to H-NDs and irradiation would activate specific cell cycle checkpoints. Indeed, upon exposure to radiation alone, an accumulation of cells in G₂/M phase was observed for all three cell lines at 24 h after exposure. This was expected since these three cell lines express all TP53 wild type. The intensity of the G₂ blockage depended on the radiation sensitivity of each cell line. Being the most resistant line, Caki-1 cells displayed a higher proportion of G₂/M arrested cells followed by ZR75.1_{Ku70mut} and ZR75.1_{Ku70wt} (Fig. 3). It should be noted that Caki-1 cells exhibited an additional blockage in G₁ phase. Interestingly, while exposure to H-NDs alone did not modify the cell cycle distribution of the three treated cell lines, the co-exposure to H-NDs and irradiation induced a partial lifting of G₂/M arrest leading to a higher proportion of cells with a G₁/S blockage, as compared to irradiation alone.

2.5. Early intracellular ROS levels

This prompted us to analyze the intracellular ROS level in Caki-1 cells which were selected for having a higher level of radiation resistance than the other two cell lines analyzed. As shown in

Table 2

Compilation of final cell event ratios. The ratios between the sample and control values were calculated for each experimental condition. The time points at the maximal observed effects were chosen. Irradiation (IR, 4Gy) only compares results between irradiation and control. IR + H-NDs (hydrogenated nanodiamonds) compares results between double cell treatment and IR only. NI, Non Irradiated.

xCELLigence	<i>Caki-1</i>	Time 160 h	NI			IR			IR + H-NDs		
			6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	64 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	96 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	0	6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	64 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	96 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$		
			0.95	0.87	0.83	1.39	0.86	0.85	0.62		
	<i>ZR75.1_{Ku70wt}</i>	Time 160 h	NI			IR			IR + H-NDs		
			6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	64 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	96 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	0	6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	64 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	96 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$		
			1.52	1.83	1.62	0.71	1.24	1.04	1.03		
	<i>ZR75.1_{Ku70mut}</i>	Time 160 h	NI			IR			IR + H-NDs		
			6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	64 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	96 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	0	6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	64 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	96 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$		
			1.02	1.23	0.89	0.46	0.79	0.77	0.75		
Cell Cycle	<i>Caki-1</i>	Time 24 h	H-NDs			IR			IR + H-NDs		
			G1	S	G2	G1	S	G2	G1	S	G2
			1.00	0.88	1.01	0.68	0.22	2.23	0.73	0.71	1.78
	<i>ZR75.1_{Ku70wt}</i>	Time 12 h	H-NDs			IR			IR + H-NDs		
			G1	S	G2	G1	S	G2	G1	S	G2
			1.19	0.72	0.48	0.94	0.44	2.22	1.07	0.45	1.55
	<i>ZR75.1_{Ku70mut}</i>	Time 12 h	H-NDs			IR			IR + H-NDs		
			G1	S	G2	G1	S	G2	G1	S	G2
			0.12	0.70	0.86	0.89	0.47	2.29	1.03	0.48	1.64
ROS	<i>Caki-1</i>	Time 1 h	H-NDs			IR			IR + H-NDs		
			Median			Median			Median		
			2.19			0.89			2.88		
H2AX	<i>Caki-1</i>	Time 2 h	H-NDs			IR			IR + H-NDs		
			Median			Median			Median		
			1			12			32		

Fig. 4A, one hour after cell exposure to irradiation alone, the ROS level was not significantly different from the controls (i.e. untreated cells). In contrast, as expected from the H-ND properties, the intracellular level of ROS significantly increased by 2- and 3-fold, after exposure to H-NDs and irradiation, respectively. Interestingly, it appeared that the higher concentration of H-NDs could also induce ROS upon entry into the cells.

2.6. DNA double strand breaks induction (γ -H2AX foci)

To verify whether exposure to H-NDs alone or in combination with irradiation could induce a higher level of DNA DSBs than radiation exposure only, phospho-S129-H2AX (γ -H2AX), a variant of histone H2A, undergoing phosphorylation at DNA DSBs sites, was assayed since it is considered to be the most sensitive marker of DNA DSBs [34–36]. As shown in Fig. 5, the number of γ -H2AX foci after irradiation was higher than the control cells and was found to be stable from 2 to 24 h. Remarkably, exposure to H-NDs alone did not induce γ -H2AX foci in the first couple of hours following

exposure but did so later (24 h) at the highest H-ND concentration (64 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Combined cell exposure to irradiation (4 Gy) and to H-NDs at low (6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and high (64 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) concentrations significantly increased the number of γ -H2AX foci following 2 h of exposure compared to untreated control cells or to cells exposed to radiation alone. However, at 24 h following treatment, the number of γ -H2AX foci, although higher than in control cells, was not significantly different between treatments (i.e. irradiation or H-NDs alone or in combination).

2.7. Late intracellular ROS level

To fully interpret DNA double strand breaks and specifically to understand why H-NDs alone induced DNA breaks at 24 h, we decided to analyze ROS levels 24 h after exposure to H-NDs alone or to H-NDs and radiation combined exposure (Fig. 4B). Moreover the level of DNA damages at 24 h is higher after exposure with H-NDs alone as compared to the combined exposure (Fig. 4A). To verify the

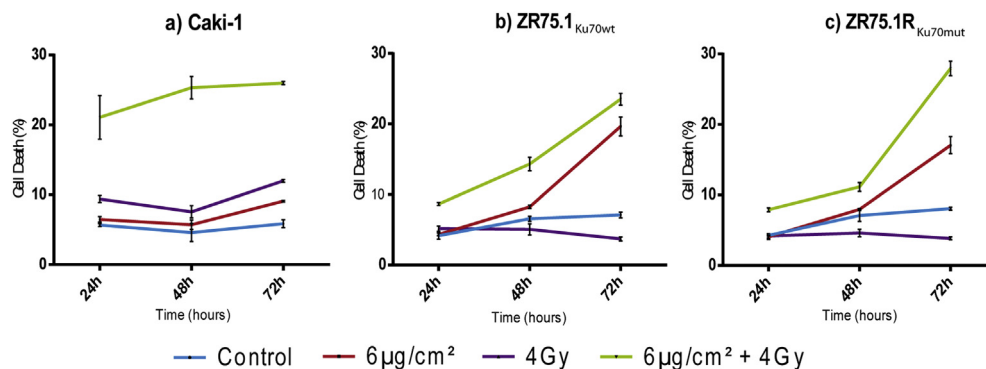


Fig. 2. Cell death induction after H-NDs and/or irradiation treatments. Cell death measurements of a) Caki-1, b) ZR75.1_{Ku70wt} and c) ZR75.1_{Ku70mut} cells, exposed to 6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of H-NDs combined or not with irradiation (4 Gy). Cell death induction is represented as the percentage of dead cells among the entire population. Cell counts were taken at 24, 48 and 72 h after treatment. At least 600 cells were counted for each condition. “Control” and “4 Gy” cells were not exposed to H-NDs.

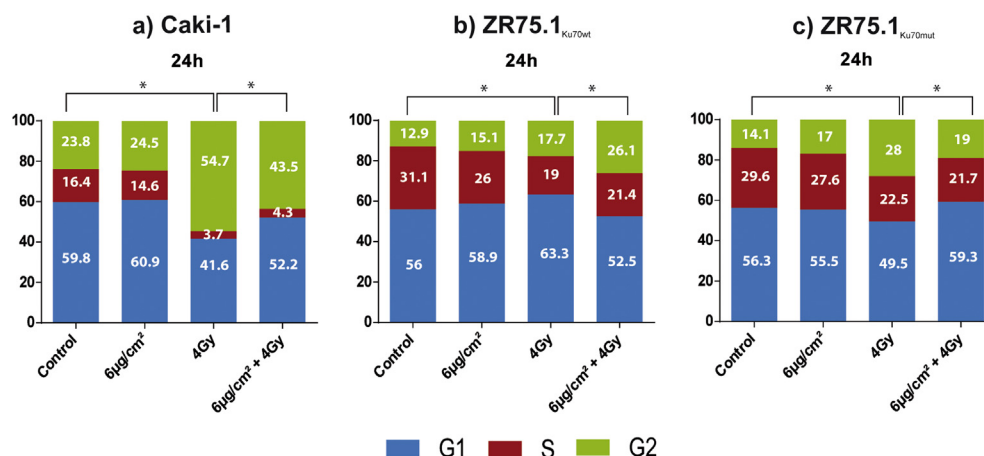


Fig. 3. Cell cycle checkpoint activation following H-NDs and/or irradiation treatments. Cell cycle analysis of a) Caki-1, b) ZR75.1_{Ku70wt}, and c) ZR75.1_{Ku70mut} cells exposed to 6 μg/cm² of H-NDs combined or not with irradiation (4 Gy). “Control” and “4 Gy” cells were not exposed to H-NDs. Cell cycle checkpoint activation was evaluated by flow cytometry (FacsCalibur) 24 h after treatment. Statistical analysis was performed for each exposure condition compared to non-exposed cells (Student’s t-test, *p < 0.01).

importance of H-NDs surface for explaining this intriguing result, as a control we compared ROS level after cell exposure to H-NDs or to H-NDs previously irradiated (before any contact with the cells) (Fig. 4B). Overall, it can be seen that i) the ROS level is persistent 24 h after the double exposure to H-NDs and radiation, ii) H-NDs alone induced a slight ROS increase at 24 h and it is effectively related to H-NDs surface since if nanoparticles are irradiated before cell contact, no more ROS are detectable.

The ROS levels observed 24 h after exposure could fully explained DNA double strand breaks at 24 h (Fig. 5).

2.8. Induction of senescence

After 72 h of exposure to H-NDs and irradiation, the cell lines we tested remained in culture without any apparent growth or cell death. Hence, we hypothesized that the senescence can be initiated by persistent DNA damage and act as a barrier to cell proliferation. Several hallmarks of cellular senescence have been described

previously [37–41] including β-galactosidase activation. As shown in Fig. 6A, β-galactosidase activity was found to increase in our three tested cell lines following 7 days of exposure to both H-NDs and radiation. As positive control of senescence, the three cell lines were treated with doxorubicin (140 nM) (Fig. 6C). To further confirm these data, two other markers of senescence were evaluated: the appearance of large persistent γ-H2AX foci and the hyper-methylation of a histone H3 (3-methyl-histone-H3K9) that is related to senescence-associated heterochromatinization (SAH). Representative images of the labeling of these two markers are presented in Fig. 6B. These results clearly demonstrated that at 7 days after co-exposure to H-NDs (6 μg/cm²) and gamma rays (4 Gy), Caki-1 cells displayed large γ-H2AX foci (green labeling) and the increased labeling of 3-methyl-Histone H3K9 (red labeling), indicating irreversibly entry into senescence.

To further highlight the potentialization of co-treatment with H-NDs and irradiation, the ratios of the obtained results between the samples and controls were compiled for all performed tests. These

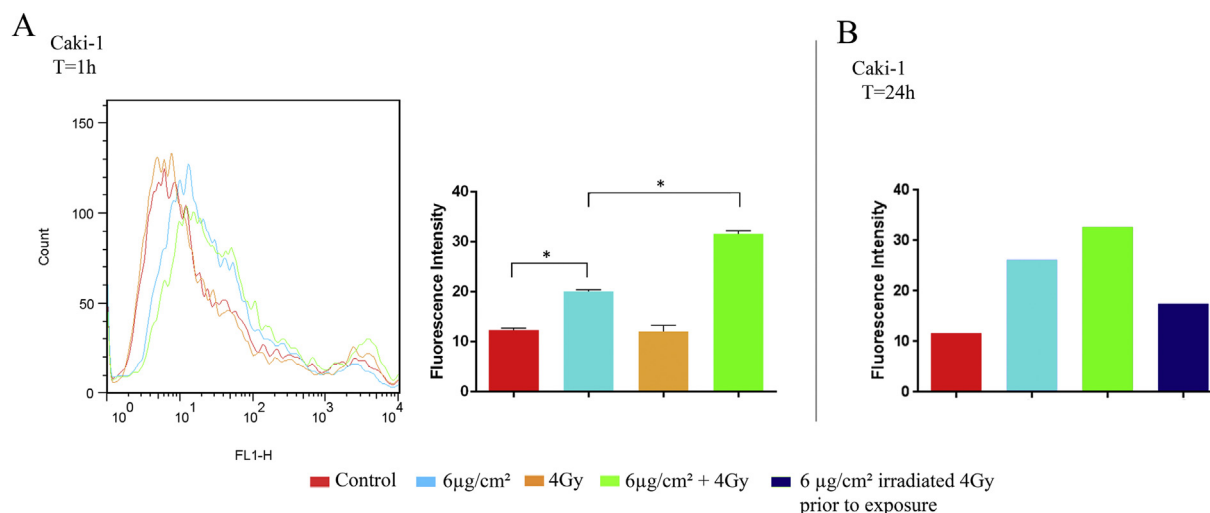


Fig. 4. Intracellular generation of reactive oxygen species (ROS) by H-NDs and/or irradiation treatments. (A) Caki-1 cells were treated for 1 h with H-NDs (6 μg/cm²) alone (blue) or in combination with irradiation (green). Control (basal level, red) and 4 Gy (orange) cells were not exposed to H-NDs. The ROS level was monitored by measurement of the fluorescence intensity (arbitrary units) of an oxidized fluorescent probe. The left part of the figure presents curves obtained after flow cytometry analysis. For the right part, the median fluorescence intensity of each sample is recorded. Statistical analysis was performed for each exposure condition compared to non-exposed cells (Student’s t-test, *p < 0.01). (B) Caki-1 cells were treated for 24 h in the same conditions and with H-NDs (6 μg/cm²) irradiated at 4 Gy prior to exposure.

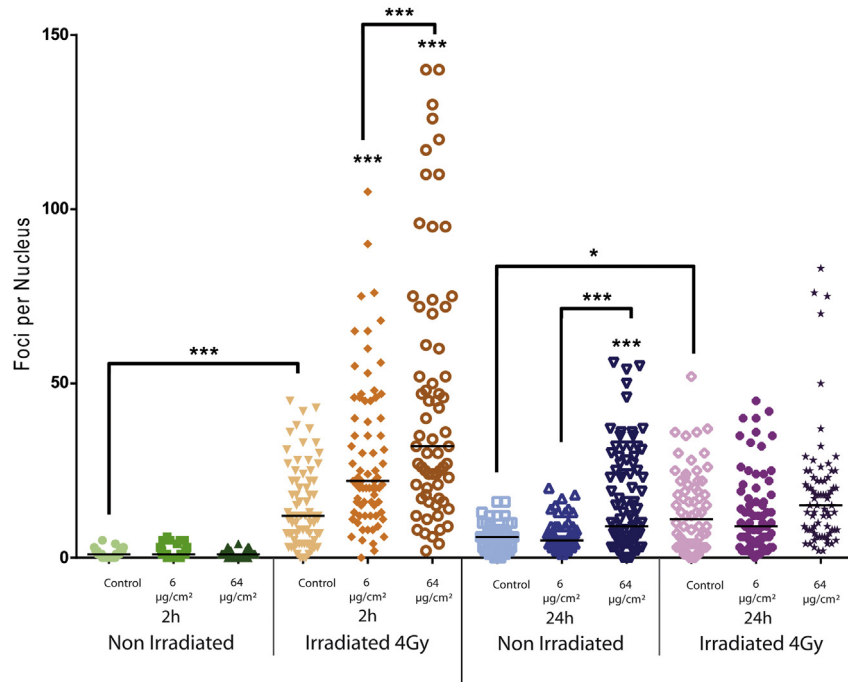


Fig. 5. H-ND genotoxicity measured by γ -H2Ax foci counts. γ -H2Ax foci were counted in Caki-1 cells exposed to H-NDs in combination or not with irradiation (4 Gy), for 2 and 24 h “Control” cells were not exposed to H-NDs. Counts were performed on at least 100 cells per condition and results are depicted as dot plot distribution values of the number of foci obtained for each tested condition (the median is also reported for each sample). A Wilcoxon rank test (comparisons versus control cells not exposed to NPs) was used to determine statistical significance (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

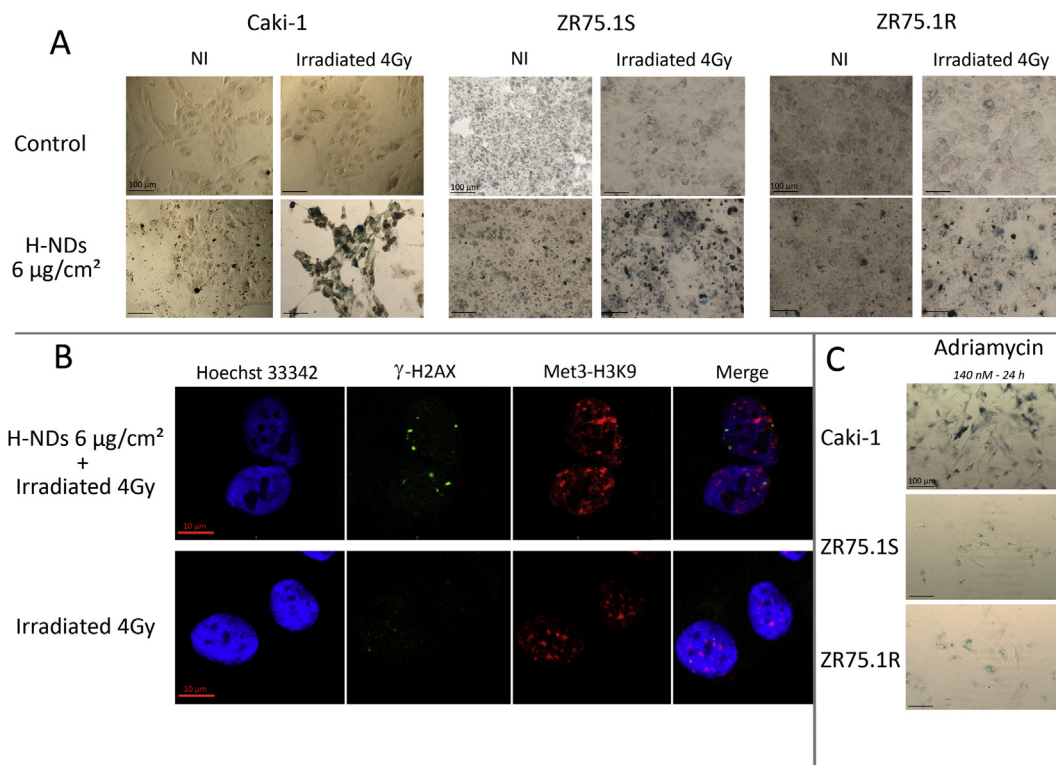


Fig. 6. (A) Induction of β -galactosidase activity following cotreatment with H-NDs and irradiation. β -galactosidase activity measurements in a) Caki-1, b) ZR75.1S, and c) ZR75.1R cell lines exposed for 7 days to H-NDs in combination or not with irradiation (4 Gy). Control cells were not exposed to H-NDs. **(B)** Measurement of senescence associated heterochromatinization (SAH) and the induction of persistent large γ -H2Ax foci in cells treated with H-NDs and irradiation. Caki-1 cells were exposed for 7 days to a) H-NDs (6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) combined with irradiation (4 Gy) or b) irradiation (4 Gy) only. **(C)** Positive control of senescence induction. All three cell lines have been exposed to adriamycin (140 nM) for 24 h.

ratios, indicated in Table 2, were calculated for the time points at which the observed effects were the most obvious. This allowed us to convert all of our previously described results into real number values. Indeed, these ratios were found to be consistent with our first hypothesis i.e. the co-exposure of cells to H-NDs and irradiation is a valid strategy for overcoming the radio-resistance of cancer cells.

As an illustration of our aforementioned observations, we calculated the cellular index ratios for each condition following 160 h of exposure (Table 2). Samples treated with H-NDs or radiation alone were compared to the control and those exposed to H-NDs and radiation were compared to the irradiated sample. These initial biological data suggested that the deleterious effects of DNA DSBs produced either by NCS or ionizing irradiation can be amplified by H-NDs.

3. Discussion

Our current data provide robust evidence for the potentialization of ionizing irradiation by H-NDs at doses as low as $6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; in parallel, H-NDs alone do not induce any cell cytotoxicity after 48 h of exposure at doses up to $96 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. These data are also consistent with the absence of ND toxicity already described in some studies of detonation ND biokinetics for 100 fold higher concentrations [42].

The co-exposure (H-NDs and radiation) leads to a higher level of intracellular ROS than either single treatment. Based on their characteristics, H-NDs in an aqueous environment are expected to adsorb a high level of oxygen-related species [43], thus acting as a potential source of ROS if activated by electron photoemission via ionizing radiation. Ionizing radiation is known to induce very early and transiently intra-cellular ROS that are no longer detectable at 30 min after exposure [44], explaining why we could not quantify any intra-cellular ROS 1 h after exposure. It also confirms the high level of oxidative stress generated within the cells by H-NDs especially after double treatment. Furthermore, the ROS level measured 1 h after treatment highlights a sustained production of ROS. Thus, the higher cytotoxic effect observed after the double exposure, in terms of cell death and cell cycle could be related to the increased ROS level generated by both H-NDs and irradiation.

This hypothesis is also compatible with data obtained when cells are exposed to both H-NDs and the radiomimetic drug neocarzinostatin (Supplementary Data 1). This drug physically interacts with DNA through its chromophore moiety and this interaction is followed by thiol activation and the ROS-dependent generation of carbon-centered radicals on deoxyribose [45–47]. Given that ionizing irradiation or neocarzinostatin induce both DNA SSBs and DSBs, through direct energy deposition and also indirectly through ROS generation followed by DNA alkylation, a second source of sustained ROS production (that may be otherwise tolerated by cells) generated by H-NDs may result in increased and sustained DNA damage.

The activation of a G_1/S cell cycle checkpoint also appears to be a specific effect of this associated cell treatment, as a consequence of a concomitant increase in DNA SSBs occurring in G_1 phase following the generation of ROS. DNA DSBs and SSBs are induced directly by ionizing radiation through energy deposition [33]. Indirectly, ionizing radiation also induces ROS (i.e. through water radiolysis) that alkylates DNA bases resulting in SSBs. These SSBs, if unrepaired, could lead to DSBs. This finding was consistent with the number of unrepaired DNA breaks that cause both G_1 and G_2/M cell cycle arrest (Fig. 3).

Our results suggested that ROS are spontaneously generated or induced once H-NDs enter the cells at a level that persists and is high enough to continuously induce DNA DSBs. In fact, considering

that cells exposed to H-NDs (at the highest concentration) alone showed a higher rate of γ -H2AX foci than control cells after 24 h, one could postulate a higher level of DNA DSB at this time point in cells co-exposed to H-NDs and to irradiation. Two non-exclusive hypotheses could arise as explanations: i) at 24 h after exposure, about 20% of Caki-1 cells have died, as assessed by trypan blue staining, and it can be assumed that these cells contained higher numbers of DNA breaks; or ii) once the cell is irradiated, H-NDs can no longer generate ROS and therefore do not induce DNA breaks in addition to those induced by irradiation alone. This second hypothesis has been confirmed in our current analyses, since the ROS level quantified in the cells exposed to H-NDs and irradiated prior to exposure was 50% lower than that measured in cells exposed to H-NDs alone (see Supplementary Data 2).

Consequently, we hypothesize that the cooperation between H-NDs and irradiation leads to a global increase in DNA SSBs and DSBs, in both cases initiated by ROS. In addition, DSBs initiated in this way may further contribute to *de novo* ROS generation [48]. These repeated loop-reactions might explain why persistent and large γ -H2AX foci were observed in cells exposed to both H-NDs and irradiation (Fig. 6B). Most importantly, following the same type of double cell treatment, we show from our results that activation of a G_1/S cell cycle checkpoint occurs in parallel with a G_2/M release initiated by irradiation exposure (Fig. 5). These two findings are consistent with the relatively low level of cell death we observed and indicate a predominant senescence process since it has been reported that sustained SSBs may also initiate γ -H2AX foci formation through chromatin structural reorganization [49].

The final outcome of this combination treatment is cellular senescence, a finding that may be of particular relevance for advancing future radiotherapy regimens, most notably the possibility of reducing the dose of irradiation and also overcoming the resistance of certain cancer cells to this therapy.

The activation of senescence by otherwise sub-lethal doses of irradiation is of particular interest and our results highlight a potentiation effect of H-NDs on irradiation in radio-resistant cells which has promising implications for future clinical approaches. Effectively the induction of senescence has been proposed as a potent tumor-suppressive irreversible process of particular interest in cases where chemo- and/or radio-therapy fail to induce cell death [50,51]. In this work we presented initiation of senescence as the final biological effect of H-NDs and irradiation in cancer cell lines displaying functional p53. In few other cell lines expressing mutated p53 or being p53 deficient, we did not observed senescence but rather increased cell death (data not shown).

Finally, all these biological effects resulting from H-NDs exposed to irradiation goes in line with the current and strong scientific emulation around hydrogenated diamond. Indeed, recent works of Hamers et al. summarized the possibility to easily photo-generate solvated electrons and/or radicals from its surface, opening the way to new promising applications for diamond, notably toward photo-catalysis [52,53]. In this context, we demonstrated here for the first time the potential of hydrogenated nanodiamond for radiosensitization of tumor cells. Compared to metallic high-Z nanoparticles (gold NPs, HfO_2 NPs), widely studied today because of their high photon absorption and consecutive radiation–matter interactions, H-NDs present several assets: (i) they benefit from their semiconductor behavior and negative electron affinity to photo-emit directly low-energy electrons into the surrounding medium, (ii) they exhibit a native positive zeta potential without any coating and (iii) they are surrounded with high amount of adsorbed oxygen-containing molecules [20]. H-NDs have promise indeed in improving the treatment of radiation resistant tumors but also could have impact on the radio-sensitive tumors by enabling lower doses of ionizing radiations to be used and thus

potentially reducing adverse side effects. For all these reasons, H-ND definitely constitutes a valuable candidate as radiosensitizing agent possibly associated with antisense molecular therapy.

4. Methods

4.1. Nanodiamonds

Detonation nanodiamonds (NDs) were provided by the Nano-carbon Research Institute.

4.2. Plasma hydrogenation of nanodiamonds

80–100 mg of NDs were deposited in a quartz tube and inserted in a plasma Downstream source (Sairem). High purity research grade N₂ hydrogen gas was injected in the tube at a pressure of 15 mbar and plasma was generated in the quartz tube with a microwave power of 300 W (2.45 GHz). During the plasma, the tube was air cooled and a smooth rotation is applied in order to mix the particles in the plasma. NDs were exposed to hydrogen plasma for 15 min and were cooled down under hydrogen, leading to H-NDs.

4.3. Preparation of nanodiamonds dispersions

H-NDs were dispersed in ultrapure water by sonication (Hielscher UP400S, 300W, 24 kHz) for 2h under cooling. Larger aggregates were removed from the solution by 1 h centrifugation at 4000 rpm. NDs are resuspended in water and not in PBS solution, that could be more compatible with cells, because too get its positive zeta potential and to disaggregate them, H-NDs need to be first sonicated in pure water. This is not possible directly in PBS due to its very high ionic strength.

4.4. Cell lines and cell culture

Caki-1 (ATCC number: HTB-46TM) and ZR75.1 cells were routinely grown at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air, in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) glutamax supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma–Aldrich), 1 mM penicillin-streptomycin (Invitrogen) and 1% (v/v) non-essential amino acids (Invitrogen). ZR75.1 cells (ATCC number: CRL-1500TM) were transfected using Amaxa Nucleofector (Lonza, France) with vectors containing cDNAs for the non-homologous end-joining DNA repair protein Ku70 as described elsewhere (Bouley et al., submitted). Stable populations of cells expressing either wild type or mutant Ku70 were established under hygromycin selection (125 µg/mL).

4.5. γ -Ionizing irradiation

Cells were irradiated immediately after being exposed to H-NDs in a ¹³⁷Cs source irradiation unit (IBL637, CisBio International, Gif sur Yvette, France) at 1.61 Gy min⁻¹. We used 4 Gy which has previously been reported as a sub-toxic dose [54,55], (Bouley et al., submitted).

4.6. xCELLigence[®] real-time follow-up

Refer to [Supplementary Data](#).

4.7. Determination of cell toxicity (trypan blue)

After treatments, dead cells were counted after 24, 48 and 72 h of exposure. At each time point, adherent cells and supernatant were collected. For each sample, at least 600 cells were counted

(living and dead cells) in a 50% V/V dilution of 0.04% Trypan Blue Solution (Sigma), to obtain the percentage of dead cells in the complete population.

4.8. Cell cycle check-points

Following 6, 12, 24 and 48 h of exposure, the supernatant was removed, and the cells were washed and trypsinized for 5 min. Cells were suspended at a density of 10⁶ cells/ml in PBS, fixed in 3 volumes of 70% ethanol (50% final concentration) and then incubated for 30 min at 4 °C. After centrifugation at for 5 min at 300 × g at 4 °C and 3 times washes in PBS, cells were treated with RNase A (DNase free) at a final concentration of 0.3 mg/ml in PBS and propidium iodide (PI) to a final concentration of 20 µg/ml. PI fluorescence was analyzed on a standard FacsCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA) with log acquisition in the FL2 (585/42 nm) channel after doublet discrimination. Statistical analysis of data was performed using FlowJo software (Treestar, Ashland, OR).

4.9. Measurement of reactive oxygen species (ROS)

15 × 10⁴ Caki-1 cells were seeded on 6 well plates (TPP) at least 27 h before exposure. After treatment, supplier's instructions were followed to measure ROS intra-cellular level with CM-H2DCFDA probe (Life Technologies). ROS level was analyzed on a standard FacsCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA) with log acquisition in the FL1 (530/30 nm) channel. Statistical analysis of the data was performed using FlowJo software (Treestar, Ashland, OR).

4.10. Genotoxicity and confocal microscopy γ –H2AX foci count

Refer to [Supplementary Data](#).

4.11. Induction of senescence: measurement of β -galactosidase activity and senescence associated heterochromatinization (SAH)

Refer to [Supplementary Data](#).

Author contributions

The author contributions were as follows – SC, JCA, JD and RG designed the research. HAG, TP, JCA, CG and MCS conducted the synthesis and characterization of H-NDs. RG, JD, VP and LS conducted the biological and biochemical experiments. SC, JCA, HAG, JD and RG wrote the manuscript. All authors critically read and approved the final version of the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no competing conflict of interests.

Acknowledgments

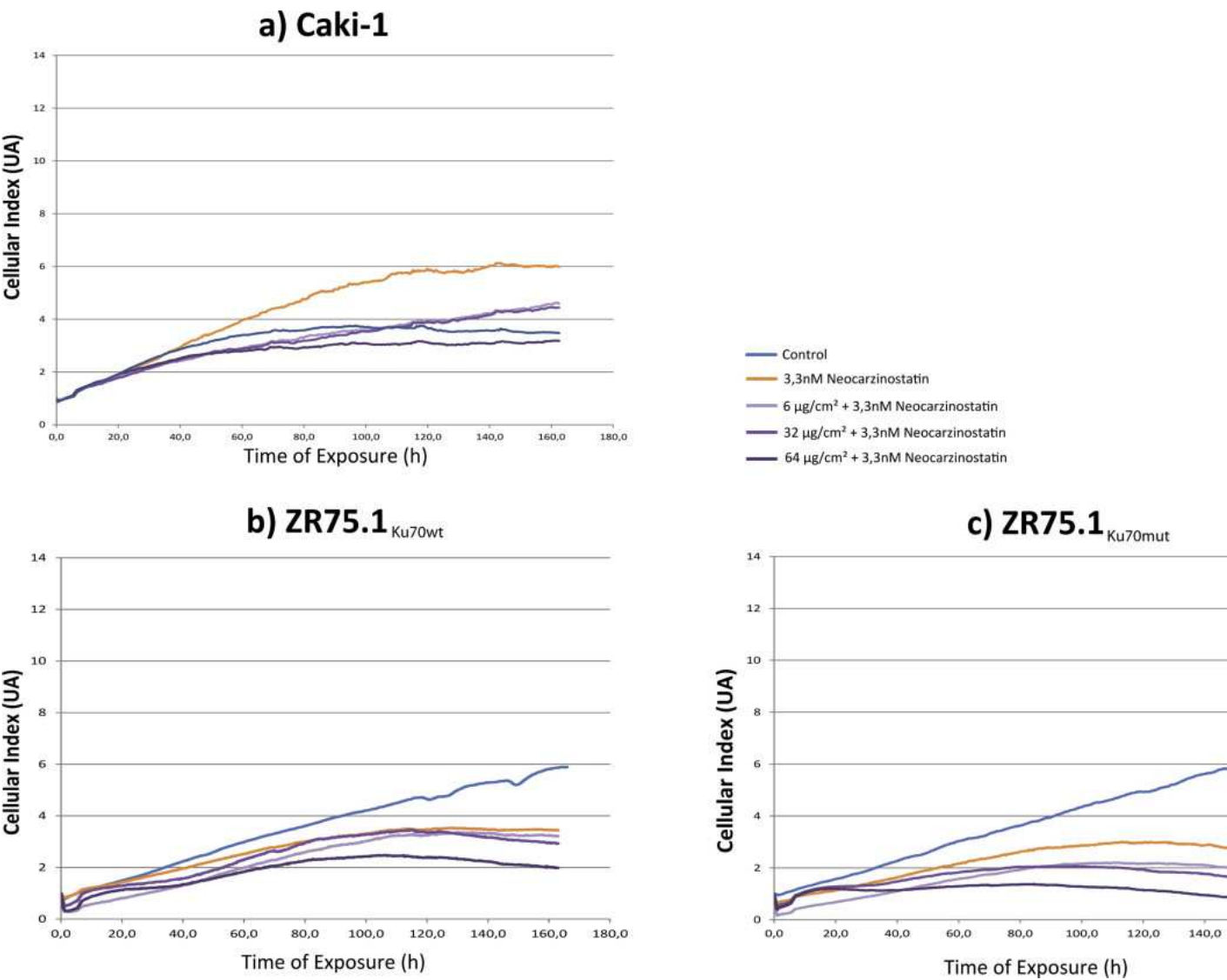
This work was funded by the French national research program NANOTRANS, the NanoSciences and Technology pour la Santé CEA-Transverse programs, the Dim C'Nano IdF (CP09-462), the EU Framework 7 Programme NANOREG 1 (310.584) and the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety (ANSES) (EST-2011/1/036). RG is a recipient of a fellowship from ANSES.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.05.034>.

References

- [1] K.K. Liu, W.W. Zheng, C.C. Wang, Y.C. Chiu, C.L. Cheng, Y.S. Lo, et al., Covalent linkage of nanodiamond-paclitaxel for drug delivery and cancer therapy, *Nanotechnology* 21 (2010) 315106.
- [2] J. Li, Y. Zhu, W. Li, X. Zhang, Y. Peng, Q. Huang, Nanodiamonds as intracellular transporters of chemotherapeutic drug, *Biomaterials* 31 (2010) 8410–8418.
- [3] E.K. Chow, X.Q. Zhang, M. Chen, R. Lam, E. Robinson, H. Huang, et al., Nanodiamond therapeutic delivery agents mediate enhanced chemoresistant tumor treatment, *Sci. Transl. Med.* 3 (2011) 73ra21.
- [4] J.I. Chao, E. Perevedentseva, P.H. Chung, K.K. Liu, C.Y. Cheng, C.C. Chang, et al., Nanometer-sized diamond particle as a probe for biolabeling, *Biophys. J.* 93 (2007) 2199–2208.
- [5] V. Paget, J.A. Sergeant, R. Grall, S. Altmeyer-Morel, H.A. Girard, T. Petit, et al., Carboxylated nanodiamonds are neither cytotoxic nor genotoxic on liver, kidney, intestine and lung human cell lines, *Nanotoxicology* 8 (S1) (August 2014) 46–56.
- [6] S.J. Yu, M.W. Kang, H.C. Chang, K.M. Chen, Y.C. Yu, Bright fluorescent nanodiamonds: no photobleaching and low cytotoxicity, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 17604–17605.
- [7] Y.R. Chang, H.Y. Lee, K. Chen, C.C. Chang, D.S. Tsai, C.C. Fu, et al., Mass production and dynamic imaging of fluorescent nanodiamonds, *Nat. Nanotechnol.* 3 (2008) 284–288.
- [8] U. Maitra, A. Jain, S.J. George, C.N. Rao, Tunable fluorescence in chromophore-functionalized nanodiamond induced by energy transfer, *Nanoscale* 3 (2011) 3192–3197.
- [9] A.M. Schrand, J.B. Lin, S.C. Hens, S.M. Hussain, Temporal and mechanistic tracking of cellular uptake dynamics with novel surface fluorophore-bound nanodiamonds, *Nanoscale* 3 (2011) 435–445.
- [10] I.P. Chang, K.C. Hwang, C.S. Chiang, Preparation of fluorescent magnetic nanodiamonds and cellular imaging, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 15476–15481.
- [11] A. Alhaddad, M.P. Adam, J. Botsoa, G. Dantelle, S. Perruchas, T. Gacoin, et al., Nanodiamond as a vector for siRNA delivery to Ewing sarcoma cells, *Small* 7 (2011) 3087–3095.
- [12] H.A. Girard, T. Petit, S. Perruchas, T. Gacoin, C. Gesset, J.C. Arnault, et al., Surface properties of hydrogenated nanodiamonds: a chemical investigation, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 11517–11523.
- [13] H. Huang, E. Pierstorff, E. Osawa, D. Ho, Active nanodiamond hydrogels for chemotherapeutic delivery, *Nano Lett.* 7 (2007) 3305–3314.
- [14] A. Krueger, D. Lang, Functionality is Key: recent Progress in the Surface Modification of Nanodiamond, *Adv. Funct. Mater.* 22 (2012) 890–906.
- [15] V.N. Mochalin, O. Shenderova, D. Ho, Y. Gogotsi, The properties and applications of nanodiamonds, *Nat. Nanotechnol.* 7 (2012) 11–23.
- [16] T. Petit, J.C. Arnault, H.A. Girard, M. Sennour, T.Y. Kang, C.L. Cheng, et al., Oxygen hole doping of nanodiamond, *Nanoscale* 4 (2012) 6792–6799.
- [17] V.Y. Dolmatov, Detonation-synthesis nanodiamonds: synthesis, structure, properties and applications, *Russ. Chem. Rev.* 76 (2007) 339–360.
- [18] J.C. Arnault, T. Petit, H. Girard, A. Chavanne, C. Gesset, M. Sennour, et al., Surface chemical modifications and surface reactivity of nanodiamonds hydrogenated by CVD plasma, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 11481–11487.
- [19] H.A. Girard, J.C. Arnault, S. Perruchas, S. Saada, T. Gacoin, J.P. Boilot, et al., Hydrogenation of nanodiamonds using MPCVD: A new route toward organic functionalization, *Diam. Relat. Mater.* 19 (2010) 1117–1123.
- [20] T. Petit, H.A. Girard, A. Trouve, I. Batonneau-Gener, P. Bergonzo, J.C. Arnault, Surface transfer doping can mediate both colloidal stability and self-assembly of nanodiamonds, *Nanoscale* 5 (2013) 8958–8962.
- [21] A. Alhaddad, C. Durieu, G. Dantelle, E. Le Cam, C. Malvy, F. Treussart, et al., Influence of the internalization pathway on the efficacy of siRNA delivery by cationic fluorescent nanodiamonds in the Ewing sarcoma cell model, *PloS one* 7 (2012) e52207.
- [22] M.Z. Chen, Q. X. H.B. Man, R. Lam, E.K. Chow, D. Ho, Nanodiamond Vectors Functionalized with Polyethylenimine for siRNA Delivery, *J. Phys. Chem. Lett.* 1 (2010) 3087–3095.
- [23] A. Gismondi, G. Reina, S. Orlanducci, F. Mizzoni, S. Gay, M.L. Terranova, et al., Nanodiamonds coupled with plant bioactive metabolites: a nanotech approach for cancer therapy, *Biomaterials* 38 (2015) 22–35.
- [24] J.B. Cui, J. R. L. Ley, Electron affinity of the bare and hydrogen covered single crystal diamond, *Surf. Phys. Rev. Lett.* 81 (1998) 429–432.
- [25] I. Kondo TN, V.N. Mochalin, J. Urai, M. Yuasa, Y. Gogotsi, Electrical conductivity of thermally hydrogenated nanodiamond powders, *J. Appl. Phys.* 113 (2013).
- [26] K. Rezwan, A.R. Studart, J. Voros, L.J. Gauckler, Change of zeta potential of biocompatible colloidal oxide particles upon adsorption of bovine serum albumin and lysozyme, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 14469–14474.
- [27] H. Yogasundaram, M.S. Bahniuk, H.D. Singh, H.M. Aliabadi, H. Uludag, L.D. Unsworth, BSA Nanoparticles for siRNA Delivery: Coating Effects on Nanoparticle Properties, Plasma Protein Adsorption, and In Vitro siRNA Delivery, *Int. J. Biomaterials* 2012 (2012) 584060.
- [28] O. Dreesen, A. Chojnowski, P.F. Ong, T.Y. Zhao, J.E. Common, D. Lunny, et al., Lamin B1 fluctuations have differential effects on cellular proliferation and senescence, *J. Cell Biol.* 200 (2013) 605–617.
- [29] W. Stallaert, J.F. Dorn, E. van der Westhuizen, M. Audet, M. Bouvier, Impedance responses reveal beta(2)-adrenergic receptor signaling pluridimensionality and allow classification of ligands with distinct signaling profiles, *PloS One* 7 (2012) e29420.
- [30] N. Ke, X. Wang, X. Xu, Y.A. Abassi, The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability, *Methods Mol. Biol.* 740 (2011) 33–43.
- [31] H.Y. Nam, M.W. Han, H.W. Chang, Y.S. Lee, M. Lee, H.J. Lee, et al., Radio-resistant cancer cells can be conditioned to enter senescence by mTOR inhibition, *Cancer Res.* 73 (2013) 4267–4277.
- [32] D. Deckbar, P.A. Jeggo, M. Lobrich, Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 46 (2011) 271–283.
- [33] P. Jeggo, M. Lobrich, Radiation-induced DNA damage responses, *Radiat. Prot. Dosim.* 122 (2006) 124–127.
- [34] C.E. Redon, A.J. Nakamura, O.A. Martin, P.R. Parekh, U.S. Weyemi, W.M. Bonner, Recent developments in the use of gamma-H2AX as a quantitative DNA double-strand break biomarker, *Aging (Albany NY)* 3 (2011) 168–174.
- [35] R. Scully, A. Xie, Double strand break repair functions of histone H2AX, *Mutat. Res.* 750 (2013) 5–14.
- [36] D.J. Smart, K.P. Ahmedi, J.S. Harvey, A.M. Lynch, Genotoxicity screening via the gammaH2AX by flow assay, *Mutat. Res.* 715 (2011) 25–31.
- [37] J. Campisi, Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21 (2011) 107–112.
- [38] J.R. Dorr, Y. Yu, M. Milanovic, G. Beuster, C. Zasada, J.H. Dabritz, et al., Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy, *Nature* 501 (2013) 421–425.
- [39] K.M. Aird, R. Zhang, Detection of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF), *Methods Mol. Biol.* 965 (2013) 185–196.
- [40] Z. Tu, K.M. Aird, R. Zhang, Chromatin remodeling, BRCA1, SAHF and cellular senescence, *Cell. Cycle* 12 (2013) 1653–1654.
- [41] M. Yamauchi, Y. Oka, M. Yamamoto, K. Niimura, M. Uchida, S. Kodama, et al., Growth of persistent foci of DNA damage checkpoint factors is essential for amplification of G1 checkpoint signaling, *DNA Repair* 7 (2008) 405–417.
- [42] R. Kaur, I. Badea, Nanodiamonds as novel nanomaterials for biomedical applications: drug delivery and imaging systems, *Int. J. Nanomedicine* 8 (2013) 203–220.
- [43] V. Chakrapani, J.C. Angus, A.B. Anderson, S.D. Wolter, B.R. Stoner, G.U. Sumanasekera, Charge transfer equilibria between diamond and an aqueous oxygen electrochemical redox couple, *Science* 318 (2007) 1424–1430.
- [44] M. Diehn, R.W. Cho, N.A. Lobo, T. Kalisky, M.J. Dorie, A.N. Kulp, et al., Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells, *Nature* 458 (2009) 780–783.
- [45] I.H. Goldberg, Free radical mechanisms in neocarzinostatin-induced DNA damage, *Free Radic. Biol. Med.* 3 (1987) 41–54.
- [46] L.S. Kappen, T.R. Lee, C.C. Yang, I.H. Goldberg, Oxygen transfer from the nitro group of a nitroaromatic radiosensitizer to a DNA sugar damage product, *Biochemistry* 28 (1989) 4540–4542.
- [47] Y. Kwon, Z. Xi, L.S. Kappen, I.H. Goldberg, X. Gao, New complex of post-activated neocarzinostatin chromophore with DNA: bulge DNA binding from the minor groove, *Biochemistry* 42 (2003) 1186–1198.
- [48] M.A. Kang, E.Y. So, A.L. Simons, D.R. Spitz, T. Ouchi, DNA damage induces reactive oxygen species generation through the H2AX-Nox1/Rac1 pathway, *Cell Death Dis.* 3 (2012) e249.
- [49] J.P. Banath, C.A. Banuelos, D. Klovov, S.M. MacPhail, P.M. Lansdorp, P.L. Olive, Explanation for excessive DNA single-strand breaks and endogenous repair foci in pluripotent mouse embryonic stem cells, *Exp. Cell Res.* 315 (2009) 1505–1520.
- [50] J. Campisi, Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism, *Trends Cell. Biol.* 11 (2001) S27–S31.
- [51] J. Campisi, J.K. Andersen, P. Kapahi, S. Melov, Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin. Cancer Biol.* 21 (2011) 354–359.
- [52] D. Zhu, L. Zhang, R.E. Ruther, R.J. Hamers, Photo-illuminated diamond as a solid-state source of solvated electrons in water for nitrogen reduction, *Nat. Mater.* 12 (2013) 836–841.
- [53] L. Zhang, D. Zhu, G.M. Nathanson, R.J. Hamers, Selective photoelectrochemical reduction of aqueous CO(2) to CO by solvated electrons, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 53 (2014) 9746–9750.
- [54] S. Ning, K. Trisler, B.W. Wessels, S.J. Knox, Radiobiologic studies of radioimmunotherapy and external beam radiotherapy in vitro and in vivo in human renal cell carcinoma xenografts, *Cancer* 80 (1997) 2519–2528.
- [55] A. Smyth, H.M. Reid, A.H. Baker, H. McGlynn, Modifications of the radiosensitivity of a renal cancer cell line as a consequence of stable TIMP-1 overexpression, *Int. J. Radiat. Biol.* 83 (2007) 13–25.



Développement d'un modèle tridimensionnel d'épithélium pulmonaire

Le but du travail présenté ci-dessous était donc de développer un modèle d'épithélium pulmonaire pour l'étude de l'exposition pulmonaire aux nanoparticules. Nous avons souhaité développer ce modèle à l'interface air-liquide afin de se rapprocher des conditions physiologiques. Le but étant également de s'affranchir de toute matrice extracellulaire artificielle et de facteurs de stimulation et de croissance cellulaire.

Le modèle que nous avons mis au point est réalisé à partir de cellules A549, une lignée alvéolaire d'adénocarcinome pulmonaire extrêmement bien décrite et largement utilisées pour les études de toxicité *in vitro*.

Après la mise au point technique afin d'optimiser l'entretien du modèle, la caractérisation nous a permis de montrer le grand intérêt qui pouvait être porté à ce modèle pour des études de toxicité par son organisation pseudo alvéolaire particulière et sa grande différenciation. Mais également que ce modèle pouvait avoir d'autres applications. Notamment l'analyse moléculaire a montré l'intérêt de cette structure pour l'étude de la progression tumorale par la présence de cellules ayant des caractères de type souche potentiellement responsables de la différenciation.

La cartographie moléculaire a également montré un statut mutationnel de *K-ras* particulier qui, associé à la présence de cellules mucosécrétantes permet de rapprocher notre modèle d'un type de cancer du poumon particulier : l'adénocarcinome pulmonaire mucosécrétant muté *ras*. Son utilisation pour l'étude d'activité de nouvelles molécules anti-tumorales est particulièrement intéressante.

L'intérêt particulier réside également dans le fait que les structures peuvent être conservées ou étudiées pendant plusieurs semaines voir plusieurs mois, sans qu'il n'apparaisse de nécrose.

Enfin, les conditions expérimentales d'utilisation et d'entretien du modèle ouvrent les portes d'une utilisation à grande échelle, parfaitement compatible avec des analyses en routine.

An organotypic tridimensional cell culture of human alveolar epithelium to study
cancer progression and efficacy of innovative therapies

R. Grall¹, V. Paget^{1,*}, J. Delic^{1,*}, K. Bastide¹, M. Goislard¹, S. Altmeyer-Morel¹, S.
Chevillard^{1, §}

¹ CEA, Institute of Cellular and Molecular Radiobiology, Laboratory of Experimental
Cancerology, CEA, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France

² CEA, LIST, Diamond Sensors Laboratory, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

[§] Corresponding author

Correspondence: Sylvie Chevillard, Ph.D and lab manager
CEA, Institute of Cellular and Molecular Radiobiology,
Laboratory of Experimental Cancerology
18 route du Panorama
F-92265 Fontenay-aux-Roses.
Phone: (+33) 1 46 54 88 89
Fax: (+33) 1 46 54 88 86
E-mail: sylvie.chevillard@cea.fr

E-mail addresses:

RG: romain.grall@cea.fr
VP: vincent.paget@cea.fr
JD: jozo.delic@cea.fr
SC: sylvie.chevillard@cea.fr

KB: kristell.bastide@cea.fr
MG: maud.goislard@cea.fr
SAM: Sandrine.morel-altmeyer@cea.fr

KEYWORDS

ARTICLE EN COURS DE REDACTION

Abstract

1. Introduction

Human cancer is a dynamics and progressive event that remains difficult to catch for the understanding of its behavior or the efficacy of therapeutic agents. Tissues and organs are three-dimensional (3D) in a specific and accurate organization that confers to the cells a well-defined function. But, until today, the main approaches to understand cancer progression and therapeutic agents' efficacy are two-dimensional (2D) cell systems and animal models. Microenvironment, extracellular matrix (ECM) and cell-cell interactions are very influential on these two parameters and are the main limitations of the available 2D cell systems. And many signals and expressions are lost when cells are cultivated in 2D. On the other hand, conventional 2D cell systems provide accurate information dealing with mechanistic and pathways that can't be given by *in vivo* approach. Animal studies are powerful to bring global response through definitive tests, but they lack of efficiency regarding some features of human tumors, stem cell differentiation or immunity. Moreover, there is global willingness to make the animal testing more ethics by reducing, refining and replacing it. *In vitro* 3D models, based on human cells and reaching a more physiological state of cell interactions and microenvironment could bring a third approach, making a connection between conventional 2D cell culture approach and *in vivo* models.

Lung cancer is one of the most common cancers with the highest rate of related mortality in the world. Like every tissues, there is multiple types of lung cancer, but most of the time it comes from epithelial cells with at least 80% of non-small cell lung cancer (NSCLC). NSCLC can be subdivided in three families: adenocarcinoma (which are the most common form), squamous cell carcinoma and large cell carcinoma. Oncogenesis and early tumor formation have been extensively studied in 2D cellular systems but its limitations could explain the lack of answer and therapeutic failure in most of the cases. Undoubtedly, the absence of cell polarization, interactions, adhesion and glandular activity in conventional models, far from physiological reality, is the main obstruction. Also, these new innovative 3D cellular model, could provide molecular mechanism that occur *in vivo*, following exposure to therapeutic agents. Together with cellular and molecular biology tools, that could be easily used, 3D model can provide predictable, reproducible and high-throughput compatible solution for the screening of anticancer drugs.

Thus we developed a 3D cell culture of cancer alveolar epithelial cells (A549) at the air liquid interface. We compared phenotypic and molecular differences between the cells cultured with 2D conventional approach and those in 3D. The described organotypic model, cultured without artificial matrix should be very suitable to study the development and the progression of lung adenocarcinoma as well as the efficacy of new therapeutic approaches for the treatment of this murderous pathology.

2. Results – Discussion

2.1 3D cell culture conditions

The specific cell culture conditions, described in the Methods section, forces the pelleted cells to grow at the air-liquid interface. Figure 1-c illustrates these conditions where the structures are attached to a porous membrane floating on complete medium. Structural reorganization has been observed after six weeks, showing a huge phenotypic difference between conventional 2D cell culture of A549 (Figure 1-a) and our 3D structure (Figure 1-b) with alveolar like organization. We monitored the growth of the model by measuring their area (Figure 1-d). The growth follow-up shows a sustained and steady increase up to 45 days when the picture has been taken (Figure 1-b). The curve confirmed particular features observed like constant development of the structure and absence of necrotic cells. Thus the entire model remains healthy for couples of weeks allowing long term study without any bias linked to spontaneous massive cell death.

An interesting point noticed through binocular observations of the structures is their glossy aspect; they remain humid even if any medium is ever added on the porous membrane. In this way, when each system is divided in several pieces during maintenance, slimy strands are observed pointing out the presence of secretion like substance.

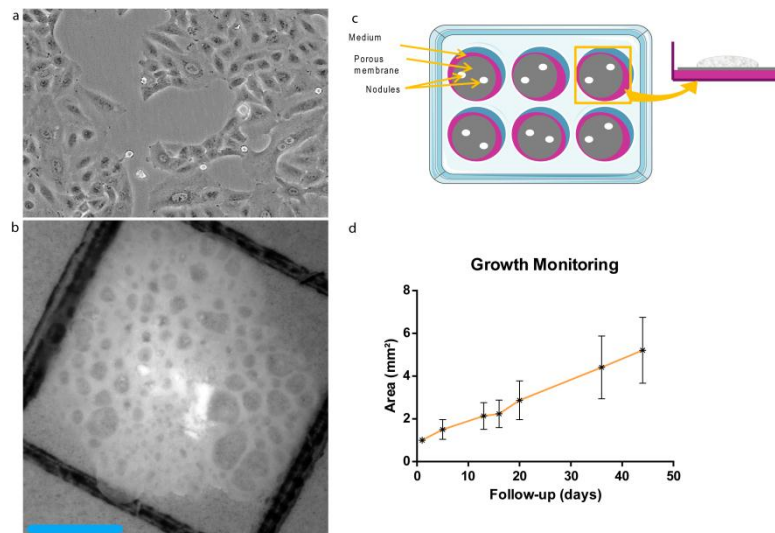


Figure 1: a) phase contrast of A549 in 2D culture conditions, and b) organotypic culture (3D) of A549, the gridded membrane can be seen under the structure (binocular view, the scale bar is 1 mm length). c) schematic representation of the 3D culture conditions in six well plates. d) growth monitoring of 3D structures' area.

2.2 Histologic characterization

Several classical histological staining and immunolabelling have been performed to characterize the model in term of architecture, secretion capacity, cell interactions and proliferation.

2.2.1 General structure

Hematoxylin and Eosin (H&E) staining allowed us to more accurately understand the general organization of the model. As shown in Figure 2-a, there is a specific architecture, from the membrane at the bottom to the air at the top.

At the basal pole, attached to the porous membrane, cells are organized in a stratified epithelium, firmly anchored to this base. A more precise observation intrigued us since a kind of cilia entrenched in the membrane (Figure 2-b), that would be very surprising since Type II alveolar pneumocytes do not express, in physiological conditions, cilia synthesis capacity. Moreover, the presence of such cells at the basal pole of the structure instead of the apical one where ciliated cells used to be found, prompted us to perform specific labelling. Immunolabelling of the β IV-tubulin showed a uniform tagging in the whole structure (Figure 2-c). This suggests that what could be taken for cilia were more likely cytoplasmic invaginations confirming the tight anchorage of the structure to the porous membrane. It has been confirmed through electronic microscopy analysis. It also confirms the orientation of the architecture with a basal role played by the stratified epithelium.

At an apical pole, alveolar like structures are observed. It is in accordance with global observation where many alveoli were heterogeneously distributed. They seem to be filled a substance that will be identified earlier.

2.2.2 Secretion activity

To better understand what kind of substance was observed, first during the maintenance of the model and then on the H&E labelled slides. Thus we performed alcian blue labelling, a specific stain of the slightly acid mucopolysaccharides, a component of mucus secretions (Figure 2-d, e, f).

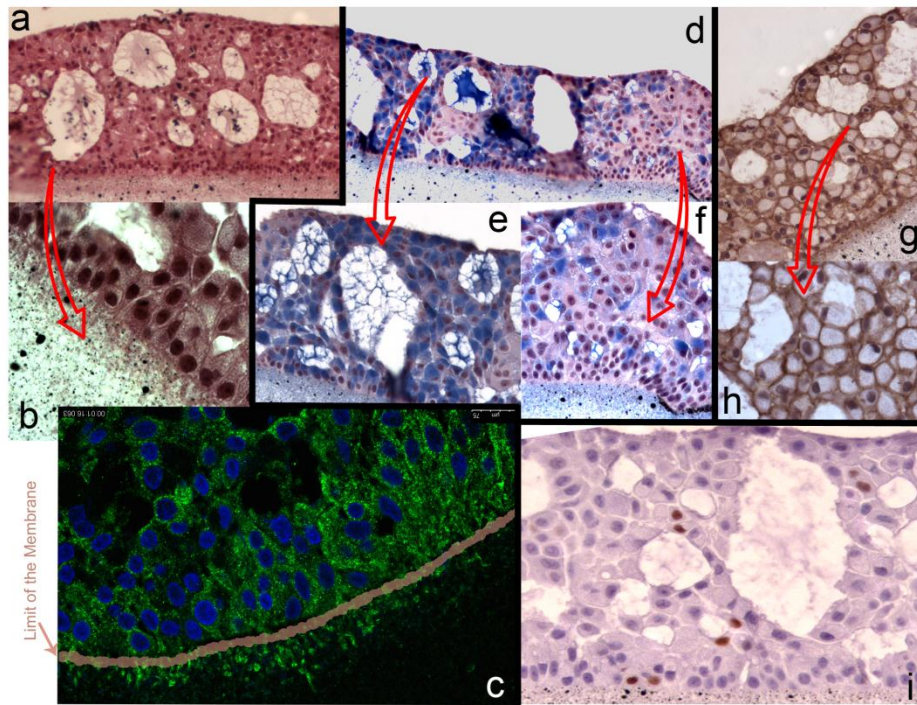


Figure 2: Histologic staining of the 3D structure: a) hematoxylin and eosin (H&E) (x10) where pseudo-alveoli can be seen, b) H&E (x100) showing cytoplasmic invaginations of basal cell into the nitrocellulose membrane, c) 8IV-Tubulin labelling (green) confirm the cytoplasmic invagination (nuclei in blue, x40). d, e, f) alcian blue staining mucus secretion from several cells and accumulates in pseudo-alveoli (d: x10 and e,f: x20). g, h) E-cadherin (x10 and x20 respectively) and i) Ki67 (x20) immunolabelling.

The result showed high heterogeneity between secreting cells mainly found around alveolar like structures and non-secreting cells. It also confirmed the presence of secretion in the alveoli. No intense staining was observed at the surface of the structure, the secretion might have been removed due to preparation process of the samples (fixation and dehydration and embedding steps).

An interesting point is the quasi-absence of A549 secreting cells when cultivated in 2D conditions (see supplementary). Thus, culture conditions seem to induce secretion activity capacities of some cells obviously linked with the alveolar like structures formation.

The miscellaneous repartition of the secreting cells in the structure has been confirmed by diastase-PAS and Coleman staining, other specific dye of secretion compounds (see supplementary).

2.2.3 Cellular interactions

To further understand the high structure cohesion that allows the development of the model without any scatter, we investigated the cell-cell interactions. The immunolabelling E-cadherin, of a protein involved in cellular adhesion, were performed. In 2D culture conditions, A549 cells are known to be unable to develop strong cellular interactions (REF).

The tag of this protein in the 3D model shows intense labelling indicating strong cell-cell adhesion (Figure 2-g, h). But this is not tight junctions that are responsible of the structure cohesion since neither zonula occludens nor occluding and claudin labelling was positive (not shown). These proteins are involved in the formation of tight junctions which are very specific form of cellular adhesion. The presence of adherent junctions instead of tight junctions have been confirmed by electronic microscopy study (Figure 3-a).

The E-cadherin labelling in A549 cells in 2D show very low level of expression confirming literature data. On the contrary, as a positive control, Calu-3, cells derived from bronchial tissue, and known to be able to form strong cell-cell interactions and tight junctions, showed a high level of expression (see supplementary).

2.2.4 Cellular proliferation

Cellular proliferation is one of the major limitations of 2D cells models, as compared to physiological tissues conditions. Indeed, most of the cell lines come from cancerous cells that exhibit unlimited and sustained proliferation and is opposite to that observed in human tissues [1, 2].

Thus we analyzed expression of Ki 67 a protein that control cell cycle progression, especially entrance into the G1 phase whose activity reflects cell proliferation [3].

The result showed that about 10 % of the cells express positive activity of the protein that is in accordance with proliferation rate observed in normal physiological conditions [4-6]. On the contrary, as expected, labelling of Ki 67 in A549 cells cultivated in 2D showed a strong signal since almost 99 % of cells were considered as positive.

These results are consistent with a sustained proliferation observed in 3D but less important than in 2D. The structure seems to reach a kind of organotypic like homeostasis.

2.2.5 Electronic microscopy

Electronic microscopy study has been performed to give extra information about cellular adhesion and secretion mainly. Thusly, the presence adherent junctions instead of tight junctions have been confirmed as well as desmosomes (Figure 3-a). In the same way intracellular characteristic structures of secretion synthesis have been observed in some cells, confirming the secretion activity of these cells previously stained specific dyes (Figure 3-b). These pictures point out an interesting fact: cells are full of mitochondria and many autophagosomes (Figure 3-c). It indicates a modification of cell metabolism probably linked to specific 3D culture conditions and to their new metabolic activities. This fact has been noticed during transcriptomic study of the models through a major modification of the metabolism pathways.

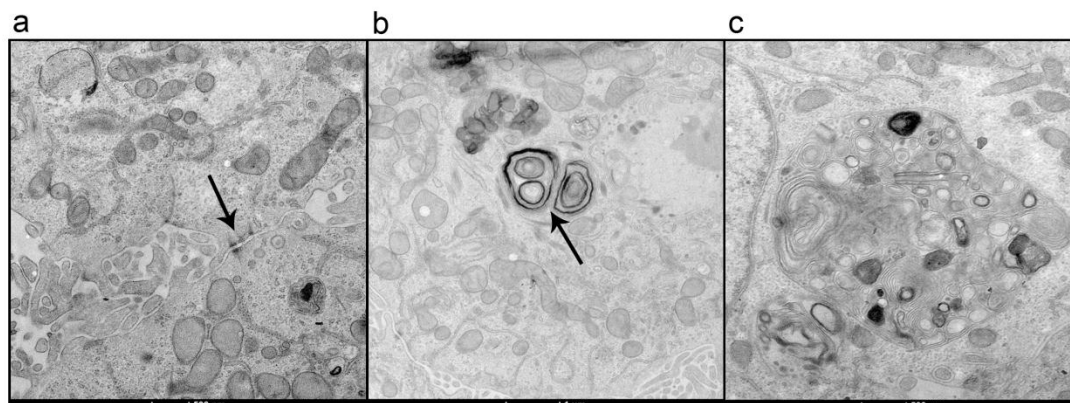


Figure 3: transmission electronic microscopy: a) cell-cell adhesion in 3D structure (arrow), b) specific structure of surfactant synthesis (arrow), and c) autophagosome.

Together these results show a specific organization in 3D of cells initially unable to create strong cellular interactions. The differentiation observed leads to an organized and oriented structure. Thus, a basal pole is first observed, strongly attached to the porous membrane, forming a stratified epithelium. Then an apical pole, with alveolar like structure full of mucus like secretion and bordered by secreting cells, heterogeneously distributed in the architecture.

2.3 Molecular characterization

In addition to the histological study of the 3D models, we screened molecular modifications that could explain cell differentiation and spatial organization.

Regarding lung adenocarcinoma, several markers are described to be linked to tumor aggressivity and resistance to treatments. These markers used to be associated with cancer stem cells concept. First CD133, reported in several cancers, acts as predictive marker of lung adenocarcinoma aggressivity [7-9]. Then CD44 an other putative surface marker of lung cancer stem cells [10, 11]. Also the activity of an enzyme responsible of resistance to treatment: aldehyde deshydrogenase 1 (ALDH1) [12]. Finally the thyroid transcription factor (TTF1) whose level of expression is of particular interest for the classification and the treatment response prediction [13, 14].

Thus level of expression of these features, studied either by flow cytometry, western blot or qPCR are given in Figure 3. Interestingly A549 cells in 2D express widely CD44 but not CD133 (CD44⁺/CD133⁻), on the contrary, cells in the 3D structure show a part of the population that expresses the CD133 marker. CD133⁺ cells, mainly associated with strong aggressivity and resistance to treatment, are observed in the 3D structure and have been localized at the basal pole (by immunolabelling, not shown). The difference of expression of these two markers have also been highlighted by qPCR and western blot (Figure 4 a and b respectively).

Expression of TTF1 has previously been reported as a good classification tool and lung cancers [15]. Moreover, the expression level used to be related with survival prognostic, the more the expression is high, better is the prognostic [16]. The results of the quantification of mRNA expression of TTF1 show an important decrease of its expression from 2D to 3D structure. The decrease is of about three folds, letting the 3D culture to reach characteristics of aggressive lung adenocarcinoma.

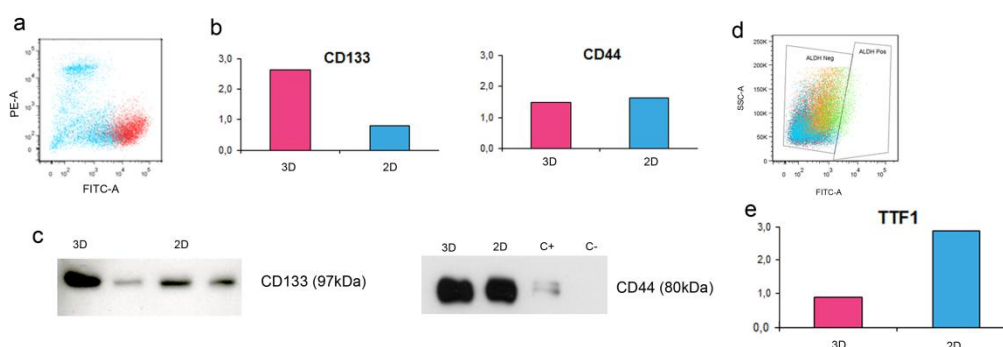


Figure 4: a) flow cytometry of CD44 (FITC-A) and CD133 (PE-A) on 2D (red) and 3D (blue) cell culture conditions, b) mRNA quantification of CD133 and CD44 in both cellular conditions, qPCR and c) protein quantification of CD133 and CD44 in 2D and 3D, Western Blot (positive control and negative controls were chosen as well known expression of CD44). d) measurement of ALDH activity in 2D (negative in red, basal level in blue) and 3D (negative in orange and basal level in green). e) mRNA quantification of TTF1 in 2D and 3D, qPCR.

2.4 Transcriptomic cartography

To be completed

2.5 A model for toxicology

Despite the capacity for lung cancer progression, the 3D model could also be suitable for the study of inhaled compounds. Indeed, the lung is one of the main routes of entrance for compounds presents in our environment. Toxicology of these compounds is multi-parametric study; it depends of the size of the particles, and their capacity to deeply enter in the respiratory tract but also of the presence of protection cells like macrophages and several secretions like mucus and surfactant.

Thus we exposed the A549 cells in 2D and in 3D to nanoporous particles, actively studied for their multiples skills for biomedical applications [17]. These compounds with a diameter of about 200 nm have already been described to be able to enter very into the cells. We confirmed this ability since 1 h after exposure of A549 cells in 2D to the MIL100-Fe, the particles are detectable in the cells (Figure 5-a). The same compounds, at the same concentration ($64\mu\text{g}/\text{cm}^2$) were deposited on the 3D structure. After 48 h of exposure, the particles are still embedded in the surface layer of the 3D model being not able to enter into the structure. The presence of human secretion synthesized by several cells could explain the retention of the particles out of the structure. It points out the importance of the secretions covering the entire surface of the lung (from mucus at the bronchial level surfactant at the alveolar one) and its impact on the toxicity studies of lung exposure. The presented model is thus particularly suitable for toxicology thanks to the presence of human secretion making the exposure conditions more realistic. The ad of other cell type like macrophages could bring more accuracy and predictivity to evaluate dangers following lung exposure.

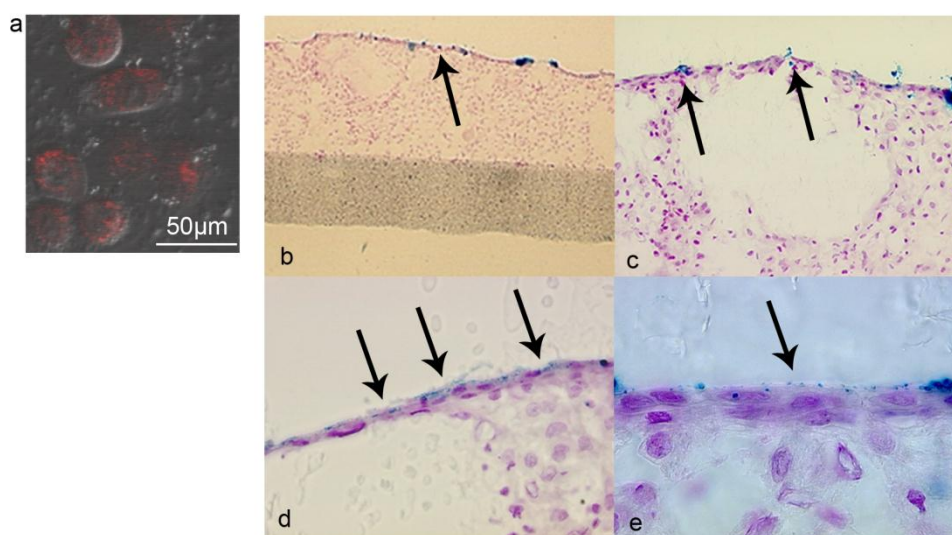
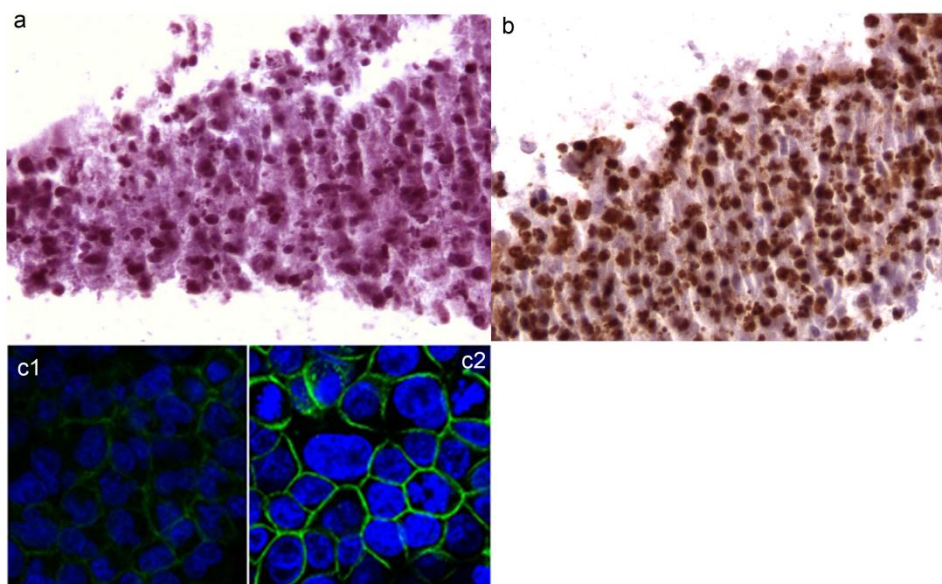


Figure 5: a) A549 in 2D culture condition exposed to MIL100(Fe)-Furazan for 1 h, b, c, d, e) 3D structure exposed to MIL-100(Fe) for 48 h (x4, x20, x4 and x100 respectively).

3. Discussion/Conclusion



Supplementary Figure 1: a) Alcian Blue and b) Ki67 labelling of A549 in 2D culture conditions, pelleted before fixation and paraffin embedding (x20). c) E-cadherin (green) and nuclei (blue, Hoescht 33342) labelling of A549 (c1) and Calu-3 (c2) (positive control) in 2D culture conditions (x40).

Material and Methods

Cell line

Human A549 cells (ATCC number: CCL-185™) were routinely grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air, in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) glutamax supplemented with 10% (v/v) inactivated fetal bovine serum and 1 mM antibiotic-antimycotic (Invitrogen, Carlsbad, CA). This medium is considered to be complete DMEM.

Cell Culture

Monolayer

Cells were classically cultivated in complete DMEM, trypsinized and diluted when getting confluent. For experiments, they were plated at an appropriate density, depending on the plate format.

Three-dimensional

For one nodule: 50×10^4 A549 cells were collected from regularly cultivated A549, washed two times, re-suspended in complete DMEM and centrifuged on the previously prepared semi-solid medium (800g, 10min, 12°C) in a fixed-rotor angle spinner (XXXX). Supernatant has been removed and tube incubated overnight (37°C, humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air). The densified cell pellet is carefully collected and deposited on microporous membrane (Millipore, XXXX), floating on 500μL of complete DMEM, in 6 wells plate. Three times a week, medium is removed and replaced by fresh complete DMEM.

When the nodule is big enough (about 5mm in diameter), they are cut in three to four pieces and deposited on new porous membranes. This size is reached after about one month and a half of growth. To perform the maintenance of the nodules, they are placed under binocular and cut in equal pieces. Each piece is placed on a new membrane; up to four pieces can be deposited on a same membrane. The binocular allowed us to identify altered part that can sometimes appear in the structure and have to be removed.

Histology

Paraffin

Nodules are washed with fresh complete DMEM before fixation with 4% PFA for 45min and washed twice with 1X PBS. They are then dehydrated with successive steps: 3x30min in 70° EtOH, 1x30min in 95° EtOH, 3x30min in 100° EtOH, 1x30min in ButOH and another ButOH bath for at least one night. Once dehydrated, nodules are placed into liquid paraffin for 5h, in a heating chamber (60°C). To prepare the paraffin blocks, liquid paraffin is put in mold, and the embedded nodules are properly placed in the mold (horizontally or vertically depending on the desired orientation of the sections. A cassette is finally added on the top of the mold, as a backing. Liquid paraffin is added to fill the mold and ensure solid attachment of the cassette on the block. Paraffin solidifies in 1h, section can be performed after at least 6h of cooling. 5µm sections have been performed on a microtome (Leica, XXX) and bond on polylysine coated slides. After one night in a 37°C dry chamber, slides are stored at room temperature.

Frozen

Nodules are washed with complete DMEM and disposed in a mold filled with Frozen Section Media (Leica Biosystems) and placed at -20°C for at least 1h before sectioning. Tissues are sectioned using a Cryostat (Leica XXX) in 20µm sections with Adhesive Tape and Adhesive Slides (1X, Leica Biosystems). Sections sampled were labelled within one week.

Histology staining

Paraffin sections are deparaffinized, dehydrated and re-hydrated prior to stain. Frozen sections are placed in PBS (with Calcium, with Magnesium) for 5min before staining.

Hematoxylin & Eosin

Slides are placed in a solution of 1% eosin for 7min, rinsed with distilled water, and placed for 5min in Harris hematoxylin solution and washed with distilled water before mounting.

Alcian Blue

Slides are placed in 3% acetic acid for 3min, 30min in 3% alcian blue solution (alcian blue powder in acetic acid, pH 2.5), strongly washed with distilled water and counter-stained with 5min hematoxylin. They are finally washed and mounted.

Coleman

Same protocol as alcian blue staining but before counter-staining by hematoxylin, 0.5% basic fuchsin for 15min followed by distilled water washing.

Periodic Acid Schiff (PAS)

Endogen glycogen is inhibited by amylase solution for few minutes. Slides are then placed in 1% periodic acid solution for 10min, washed, placed in Schiff reactive solution for 30min and washed again. Slides are finally counter-stained by hematoxylin for 5min, washed and mounted.

Mounting step begins with dehydration through increasing percentage EtOH solutions (from 70% to 100% vol/vol), and mount in Eukitt® (Sigma Aldrich) after toluene bath.

Immunohistochemistry

Paraffin sections are deparaffinized, dehydrated and rehydrated prior to labelling. Antigen retrieval is performed in citrate buffer pH6 in a pressure cooker heater (XXXX) 20min, 120°C. After cooling, endogenous peroxidase activity is blocked by H₂O₂ 3%, 15min. Cells are blocked for 30min with ready-to-use (2.5%) normal horse blocking serum (ImmPRESS™ REAGENT, Vector Laboratories). Slides are incubated with primary antibody: Ki67 1:50 (XXXX), E-cadherin 1:100 (BD Biosciences, clone: 36/E-Cadherin), Surfactant Protein A (Abcam®, clone: 6F10), CD44 (Abcam®, clone: EPR1013Y), CD133 (Millipore™, clone: 17A6.1), ZO-1 (Invitrogen™, clone: ZMD.437) for 1h, 37°C in humid chamber. Samples are then washed 3 times (1xPBS) and then incubated with secondary antibody. In the case of immunohisto-fluorescence: 30min with 1:500 dilution of Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen), washed thrice (1xPBS) and then incubated at 37°C for 20 min with 200 mL of [1xPBS and 0.1 mg/mL Hoechst 33342 (Molecular Probes, Invitrogen)]. For immunohistochemistry in visible light, samples are incubated for 30min with ImmPRESS® reagent, and washed thrice (1xPBS). Slides are finally incubated in reconstituted peroxidase substrate solution (ImmPRESS™ REAGENT, Vector Laboratories) for 30sec, rinsed in tap water, counterstained and mounted.

Flow Cytometry

Cells were labelled with the following antibodies: CD44-FITC from BD Bioscience (San Jose, CA, USA) and CD133-PE eBioscience, and counterstained with propidium iodide. Isotypic controls were used to calibrate each experiment. For Side Population (SP) analysis, cells were stained as described by Rossi et al. 39. Briefly, cells were stained with Hoechst33342 5 mg/ml for 90 min at 37 °C. As cancer stem like cells are potentially capable of drug efflux, SP was defined as the cell population-containing no or low levels of Hoechst33342, and gated compared with KO143 inhibited sample.

RNA Extraction and Quantitative Real-Time PCR

RNA extraction and cDNA synthesis were performed as previously described [26]. The primers were from Applied Biosystems: Hs02379687_s1 (CD24), Hs99999905_m1 (GAPDH), and Hs99999902_m1 (RPLPO). Levels of gene expression were determined using GENORM software and normalized using GAPDH and RPLPO.

Western Blot

Electronic Microscopy

Captions

Figure 1: a) phase contrast of A549 in 2D culture conditions, and b) organotypic culture (3D) of A549, the gridded membrane can be seen under the structure (binocular view, the scale bar is 1 mm length). c) schematic representation of the 3D culture conditions in six well plates. d) growth monitoring of 3D structures' area.

Figure 2: Histologic staining of the 3D structure: a) hematoxylin and eosin (H&E) (x10) where pseudo-alveoli can be seen, b) H&E (x100) showing cytoplasmic invaginations of basal cell into the nitrocellulose membrane, c) β IV-Tubulin labelling (green) confirm the cytoplasmic invagination (nuclei in blue, x40). d, e, f) alcian blue staining mucus secretion from several cells and accumulates in pseudo-alveoli (d: x10 and e,f: x20). g, h) E-cadherin (x10 and x20 respectively) and i) Ki67 (x20) immunolabelling.

Figure 3: transmission electronic microscopy: a) cell-cell adhesion in 3D structure (arrow), b) specific structure of surfactant synthesis (arrow), and c) autophagosome.

Figure 4: a) flow cytometry of CD44 (FITC-A) and CD133 (PE-A) on 2D (red) and 3D (blue) cell culture conditions, b) mRNA quantification of CD133 and CD44 in both cellular conditions, qPCR and c) protein quantification of CD133 and CD44 in 2D and 3D, Western Blot (positive control and negative controls were chosen as well known expression of CD44). d) measurement of ALDH activity in 2D (negative in red, basal level in blue) and 3D (negative in orange and basal level in green). e) mRNA quantification of TTF1 in 2D and 3D, qPCR.

Figure 5: a) A549 in 2D culture condition exposed to MIL100(Fe)-Furazan for 1 h, b, c, d, e) 3D structure exposed to MIL-100(Fe) for 48 h (x4, x20, x4 and x100 respectively)

Supplementary Figure 1: a) Alcian Blue and b) Ki67 labelling of A549 in 2D culture conditions, pelleted before fixation and paraffin embedding (x20). c) E-cadherin (green) and nuclei (blue, Hoescht 33342) labelling of A549 (c1) and Calu-3 (c2) (positive control) in 2D culture conditions (x40).

Bibliography

1. Astashkina, A., B. Mann, and D.W. Grainger, *A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity*. Pharmacol Ther, 2012. **134**(1): p. 82-106.
2. Yamada, K.M. and E. Cukierman, *Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D*. Cell, 2007. **130**(4): p. 601-10.
3. Schluter, C., et al., *The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins*. J Cell Biol, 1993. **123**(3): p. 513-22.
4. Torres-Rendon, A., et al., *Expression of Mcm2, geminin and Ki67 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasias and their corresponding squamous-cell carcinomas*. Br J Cancer, 2009. **100**(7): p. 1128-34.
5. Liu, H.B., et al., *Expression and prognostic implications of FOXO3a and Ki67 in lung adenocarcinomas*. Asian Pac J Cancer Prev, 2015. **16**(4): p. 1443-8.

6. Pathmanathan, N. and R.L. Balleine, *Ki67 and proliferation in breast cancer*. J Clin Pathol, 2013. **66**(6): p. 512-6.
7. Qu, H., et al., *Prognostic value of cancer stem cell marker CD133 expression in non-small cell lung cancer: a systematic review*. Int J Clin Exp Pathol, 2013. **6**(11): p. 2644-50.
8. Lundin, A. and B. Driscoll, *Lung cancer stem cells: progress and prospects*. Cancer Lett, 2013. **338**(1): p. 89-93.
9. Alamgeer, M., et al., *Cancer stem cells in lung cancer: Evidence and controversies*. Respiriology, 2013. **18**(5): p. 757-64.
10. O'Flaherty, J.D., et al., *The cancer stem-cell hypothesis: its emerging role in lung cancer biology and its relevance for future therapy*. J Thorac Oncol, 2012. **7**(12): p. 1880-90.
11. Perona, R., et al., *A role for cancer stem cells in drug resistance and metastasis in non-small-cell lung cancer*. Clin Transl Oncol, 2011. **13**(5): p. 289-93.
12. Muzio, G., et al., *Aldehyde dehydrogenases and cell proliferation*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(4): p. 735-46.
13. Bernaudin, J.F., *[Molecular characteristics of lung cancer]*. Bull Cancer, 2010. **97**(11): p. 1323-35.
14. Kerr, K.M., *Personalized medicine for lung cancer: new challenges for pathology*. Histopathology, 2012. **60**(4): p. 531-46.
15. Johansson, L., *Histopathologic classification of lung cancer: Relevance of cytokeratin and TTF-1 immunophenotyping*. Ann Diagn Pathol, 2004. **8**(5): p. 259-67.
16. Perner, S., et al., *TTF1 expression in non-small cell lung carcinoma: association with TTF1 gene amplification and improved survival*. J Pathol, 2009. **217**(1): p. 65-72.
17. Horcajada, P., et al., *Porous metal-organic-framework nanoscale carriers as a potential platform for drug delivery and imaging*. Nat Mater, 2010. **9**(2): p. 172-8.

Conclusions et perspectives

L'utilisation des nanoparticules pour la fabrication de produits de notre quotidien permet d'en augmenter les qualités et d'assouvir notre soif perpétuelle de progrès. Dans le domaine médical et plus particulièrement en Oncologie, les perspectives que proposent ces composés aux propriétés physico-chimiques uniques sont très prometteuses. Qu'elles soient organiques, inorganiques ou même hybrides ; utilisées pour leurs propriétés intrinsèques ou pour leur capacité à véhiculer des médicaments ; pouvant cibler spécifiquement certaines cellules ou non, les possibilités de synthèse et les applications qui en découlent sont quasiment infinies.

Mon projet de thèse s'est articulé autour de trois grands axes. Le premier vise à démontrer l'intérêt de nanoparticules de diamants hydrogénées comme potentialisateurs des effets de l'irradiation. Le deuxième a pour but de prouver la biocompatibilité de matériaux de l'Institut Lavoisier, de composés hybrides poreux. Le troisième est étroitement lié aux premiers puisqu'il aborde la question de la toxicologie des nanoparticules de la nécessité de l'adapter et du besoin de développer des modèles cellulaires alternatifs à l'expérimentation animale.

Les nanodiamants hydrogénés comme potentialisateurs des effets de l'irradiation

Les nanodiamants ont dans ce domaine déjà prouvé une biocompatibilité exceptionnelle pour des composés organiques. De surcroît, des capacités de fluorescence intrinsèque ainsi qu'une possibilité de modification de leur surface pour en modifier les propriétés et permettre des greffages font de ces composés des candidats particulièrement intéressants pour des applications médicales. Particulièrement les H-NDs dont la réactivité de surface et la petite taille en font de formidables potentialisateurs de la radiothérapie.

Lors de ce travail j'ai validé biologiquement par une approche in vitro le postulat physico-chimique de potentialisation des effets des radiations ionisantes par les H-NDs. J'ai ainsi démontré leur capacité, en association à l'irradiation, à induire la senescence dans des cellules radorésistantes, stoppant ainsi leur prolifération. L'effet est obtenu grâce à la génération très importante de stress oxydant dans les cellules. Les espèces radicalaires sont produites grâce à la capacité des H-NDs à absorber les photons de l'irradiation et à resituer cette énergie sous forme d'électrons de basse énergie. Ce sont ces électrons qui vont jouer le rôle d'agent oxydant sur les molécules environnantes.

Les résultats permettent d'une part de souligner l'activation d'une voie de mort particulière d'intérêt thérapeutique. Comme cela a été abordé, la senescence correspond à un arrêt irréversible du métabolisme cellulaire qu'il est possible d'observer dans des cellules irradiées. Cependant, l'adaptabilité des cellules cancéreuses et plus particulièrement des cellules souches cancéreuses aux conditions de stress est à l'origine de l'échec de certains traitements. L'objectif était alors de surcharger les cellules résistantes aux effets de l'irradiation en espèces réactives de l'oxygène. Ce sont donc les propriétés intrinsèques des H-NDs qui sont utilisés pour obtenir cet effet.

Un des effets des ROS est l'induction de dommages à l'ADN. Ce stress génotoxique qui peut être contenu par certaines cellules radorésistantes, va être dépassé dans le cas d'une exposition concomitante de ces cellules aux H-NDs et à l'irradiation. Cependant, malgré un effet réel de ce double traitement, des possibilités sont à l'étude au laboratoire pour en augmenter la performance. On utiliserait alors la capacité de la surface des H-NDs à accueillir des petites molécules. On peut par exemple citer la possibilité d'ajouter des séquences antagonistes de certaines protéines impliquées dans la réparation de l'ADN. Cela affaiblirait encore un peu plus la cellule dans une étape cruciale à sa survie.

Cette nouvelle approche constituerait une parfaite illustration de ce qu'est ce que l'on appelle la nanomédecine, en faisant appel à tout le potentiel des nanoparticules étudiées.

La validation biologique et l'identification mécanistique ouvrent aujourd'hui les portes d'une étude *in vivo*, étape cruciale pour la confirmation du potentiel de ces composés.

Les Matériaux de l'Institut Lavoisier comme véhicule de médicaments

Les MILs, en tant que matériaux hybrides poreux biodégradables possèdent également de nombreux atouts. En effet, contrairement à d'autres systèmes synthétisés pour véhiculer des molécules actives, les MILs possèdent des capacités d'encapsulation très élevées grâce à une surface spécifique très importante. La dégradation spontanée de ces composés en milieu biologique associée à un relargage continu et prolongé des molécules encapsulées ajoutent de l'intérêt à leur utilisation en thérapeutiques.

Lors de ce projet, j'ai étudié la toxicité d'une famille de MIL : les MIL100, dont l'équilibre intéressant entre taille, capacité d'encapsulation et vitesse de dégradation est un atout majeur pour une utilisation en tant que vecteur de molécules actives. L'étude de toxicité *in vitro* menée l'a été sur trois MIL100 de base métallique différente (un à base de fer, un d'aluminium et un de chrome) afin d'étudier l'impact du métal sur les propriétés biologiques des composés. Le poumon et le foie ont été identifiés comme étant deux organes cibles d'exposition (pour une administration volontaire ou une absorption passive),

et quatre lignées cellulaires représentatives de ces organes ont été choisies. L'étude a permis de montrer l'absence de toxicité de ces composés, rejoignant des données déjà obtenues dans des conditions différentes.

L'étude de l'efficacité de ces composés en tant que véhicule de médicaments est la suite logique des résultats présentés, elle a été initiée.

La nanotoxicologie

Cependant, les propriétés particulières des nanoparticules et la nécessité de les considérer une à une pose une question majeure : quels effets peuvent-elles avoir à court et long terme sur notre santé. Cette question reste aujourd'hui encore sans véritable réponse, la faute sans doute à un manque d'harmonisation limitant la comparaison entre les nombreuses études menées à travers le monde. Les lignes bougent cependant ces dernières années avec une véritable volonté d'obtenir des réponses. La nanotoxicologie est donc une science nouvelle pour laquelle de nouvelles techniques doivent être développées afin d'appréhender de façon rapide, fiable et prédictive la toxicité de ces composés omniprésents dans notre quotidien.

Le laboratoire a développé et optimisé une plateforme d'étude de la toxicité de nanoparticules haut débit, quasi-standardisée et répondant aux exigences actuelles en matière d'harmonisation des pratiques. J'ai participé à plusieurs des études menées dont deux ont été présentées.

La première a notamment permis de démontrer la très grande biocompatibilité des nanodiamants HPHT de 20 et 100 nm que ce soit sur le plan de cytotoxicité que sur celui de la génotoxicité. Ces résultats positionnent les nanodiamants carboxylés comme particules de référence, et la possibilité d'en modifier aisément la surface autorise un grand nombre d'applications biomédicales.

La deuxième porte sur l'identification du danger lié à l'utilisation de nanoparticules de TiO_2 et du possible effet délétère de son association avec les photons des radiations ionisantes. En effet, la photo-activation qui résulte de l'interaction des nanoparticules avec les photons conduit à une toxicité significative dans les cellules pulmonaires étudiées. Ces résultats rappellent la nécessité d'évaluer les dangers inhérents à la présence quotidienne de nanoparticules dans notre environnement.

Au cours d'autres études non présentées ici, j'ai pu observer les interférences de certaines nanoparticules avec des tests colorimétriques ou fluorométriques utilisés en toxicologie conventionnelle. Cela m'a fait prendre conscience de la prudence nécessaire à la réalisation de ces études et à l'absolue nécessité de la mise en place systématique de contrôles internes afin de valider les résultats.

La nanotoxicologie est aujourd'hui un travail minutieux nécessitant la répétition des tests, nanoparticule par nanoparticule, système cellulaire par système cellulaire. Cependant, la volonté d'harmonisation associée à l'évolution des technologies notamment informatiques permet d'envisager une approche différente dans les prochaines années. En effet à l'heure de l'utilisation courante de calculateurs ultraperformants et du traitement de masse de données, il est possible d'envisager que, moyennant l'accumulation de données fiables et comparables préalablement, nous puissions prédire la toxicité d'un composé donné. Il pourrait par exemple être développé un outil de prédiction du déterminant physico-chimique d'un composé à l'origine de sa toxicité.

La toxicologie, conventionnelle ou nano, est une activité indispensable, préalable à toute utilisation d'un composé, que ce soit pour des applications agroalimentaires, textiles, de construction, médicales, etc. Le bon sens collectif, aidé par le législateur attend qu'avant toute utilisation, le composé démontre l'absence d'effet délétère sur notre santé et notre environnement. Des règles ont donc été établies quant aux conditions de réalisation de ce type d'étude. Ces règles sont cependant en train de changer, puisque l'utilisation d'animaux, étape cruciale permettant de faire le lien entre la mécanistique cellulaire et notre organisme est remise en question. La volonté actuelle est de réduire au strict minimum cette activité, et d'encourager au développement de modèles dits alternatifs (à l'expérimentation animale). Ces modèles, plus complexes que les modèles cellulaires classiques, sont censés être d'avantage prédictifs autorisant ainsi la réduction du recours à l'expérimentation animale. Ce type de modèle est très souvent tridimensionnel, l'ajout d'une dimension permettant de retrouver dans les cellules un comportement plus proche de celui qu'elles présentent dans des conditions physiologiques.

Modèle cellulaire tridimensionnel

Un des volets de mon projet a été de développer un modèle de culture tridimensionnel. Le poumon est un organe particulier car il constitue une porte d'entrée importante dans notre organisme de composés présents dans notre environnement. Le modèle a donc été développé à partir d'une lignée cellulaire d'épithélium alvéolaire humain : A549. La structure est maintenue à interface air-liquide dans un souci de mimétisme des conditions physiologiques. L'organisation tridimensionnelle est caractéristique et peut être détaillée ainsi : un pôle basal, formant un épithélium stratifié, dont certaines cellules sont douées d'une activité sécrétrice et un pôle apical, composé de structures pseudo alvéolaires dont la majorité des cellules sont douées d'activité sécrétrice également. La différenciation au sein de ce modèle a été expliquée en partie par la présence de cellules de type souche identifiées lors de l'étude moléculaire des cellules.

La structure ainsi développée se positionne comme un modèle d'étude de l'exposition pulmonaire à des composés environnementaux dont des nanoparticules.

Cependant cette même analyse moléculaire ainsi que celle du transcriptome montre un mimétisme certain avec une classe bien particulière de cancer pulmonaire : l'adénocarcinome pulmonaire mucosécrétant. L'étude de la progression tumorale et de la réponse aux traitements constitue une autre application possible de ce modèle.

Ce travail constitue donc la première étape du développement des H-NDs puisque si la validation *in vivo*, qui est sur point de débiter, confirme nos observations, la phase clinique de ce développement pourrait alors être envisagée à moyen terme.

La biocompatibilité des MILs ayant été maintenant démontrée au cours de plusieurs études, l'étude de l'efficacité de ces composés pour des applications médicales précises est la prochaine étape. L'utilisation de molécules utilisées en chimiothérapie anticancéreuse et antituberculeuses est notamment envisagée.

Enfin, le modèle tridimensionnel de culture d'épithélium alvéolaire est maintenant caractérisé et quelques études d'exposition ont été réalisées afin de définir son comportement. Il pourra maintenant être utilisé comme modèle d'étude de la réponse à de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement du cancer du poumon.

Références Bibliographiques

1. Reibold, M., et al., *Materials: carbon nanotubes in an ancient Damascus sabre*. Nature, 2006. **444**(7117): p. 286.
2. Horikoshi, S. and N. Serpone, *Introduction to Nanoparticles, in Microwaves in Nanoparticle Synthesis*. 2013, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 1-24.
3. Feng, S.-S. and S. Chien, *Chemotherapeutic engineering: Application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases*. Chemical Engineering Science, 2003. **58**(18): p. 4087-4114.
4. Maeda, H., *The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting*. Advances in Enzyme Regulation, 2001. **41**(1): p. 189-207.
5. Birrenbach, G. and P.P. Speiser, *Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology*. J Pharm Sci, 1976. **65**(12): p. 1763-6.
6. Couvreur, P., et al., *Nanocapsules: a new type of lysosomotropic carrier*. FEBS Lett, 1977. **84**(2): p. 323-6.
7. Marty, J.J., R.C. Oppenheim, and P. Speiser, *Nanoparticles--a new colloidal drug delivery system*. Pharm Acta Helv, 1978. **53**(1): p. 17-23.
8. Couvreur, P., et al., *Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties*. J Pharm Pharmacol, 1979. **31**(5): p. 331-2.
9. Gurny, R., et al., *Development of Biodegradable and Injectable Latices for Controlled Release of Potent Drugs*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 1981. **7**(1): p. 1-25.
10. Calvo, P., et al., *Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers*. Journal of Applied Polymer Science, 1997. **63**(1): p. 125-132.
11. Sun, Q., M. Radosz, and Y. Shen, *Challenges in design of translational nanocarriers*. J Control Release, 2012. **164**(2): p. 156-69.
12. Couvreur, P., *Nanoparticles in drug delivery: past, present and future*. Adv Drug Deliv Rev, 2013. **65**(1): p. 21-3.
13. Maggiorella, L., et al., *Nanoscale radiotherapy with hafnium oxide nanoparticles*. Future Oncol, 2012. **8**(9): p. 1167-81.
14. Sengupta, S., et al., *Temporal targeting of tumour cells and neovasculature with a nanoscale delivery system*. Nature, 2005. **436**(7050): p. 568-72.
15. Bennett, K.M., et al., *MR imaging techniques for nano-pathophysiology and theranostics*. Adv Drug Deliv Rev, 2014. **74**: p. 75-94.
16. Arora, P., et al., *Nano-regenerative medicine towards clinical outcome of stem cell and tissue engineering in humans*. J Cell Mol Med, 2012. **16**(9): p. 1991-2000.
17. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
18. Matsumura, Y. and H. Maeda, *A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs*. Cancer Res, 1986. **46**(12 Pt 1): p. 6387-92.
19. Byrne, J.D., T. Betancourt, and L. Brannon-Peppas, *Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics*. Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(15): p. 1615-26.
20. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of the Cell*. 6th ed. 2014, New York: Garland Science. 1464.
21. Conner, S.D. and S.L. Schmid, *Regulated portals of entry into the cell*. Nature, 2003. **422**(6927): p. 37-44.

22. Zhao, F., et al., *Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials*. Small, 2011. **7**(10): p. 1322-37.
23. Davis, M.E., Z.G. Chen, and D.M. Shin, *Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(9): p. 771-82.
24. Wu, Q., et al., *Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: mechanisms and lab approaches*. Cancer Lett, 2014. **347**(2): p. 159-66.
25. Holohan, C., et al., *Cancer drug resistance: an evolving paradigm*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(10): p. 714-26.
26. Markman, J.L., et al., *Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance*. Adv Drug Deliv Rev, 2013. **65**(13-14): p. 1866-79.
27. Kirtane, A.R., S.M. Kalscheuer, and J. Panyam, *Exploiting nanotechnology to overcome tumor drug resistance: Challenges and opportunities*. Adv Drug Deliv Rev, 2013. **65**(13-14): p. 1731-47.
28. Kunjachan, S., et al., *Multidrug resistance: Physiological principles and nanomedical solutions*. Adv Drug Deliv Rev, 2013. **65**(13-14): p. 1852-65.
29. Gu, Z., et al., *Injectable nano-network for glucose-mediated insulin delivery*. ACS Nano, 2013. **7**(5): p. 4194-201.
30. Kosaka, N., et al., *Clinical implications of near-infrared fluorescence imaging in cancer*. Future Oncol, 2009. **5**(9): p. 1501-11.
31. He, X., K. Wang, and Z. Cheng, *In vivo near-infrared fluorescence imaging of cancer with nanoparticle-based probes*. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2010. **2**(4): p. 349-66.
32. Rumenapp, C., B. Gleich, and A. Haase, *Magnetic nanoparticles in magnetic resonance imaging and diagnostics*. Pharm Res, 2012. **29**(5): p. 1165-79.
33. Merian, J., et al., *Fluorescent nanoprobe dedicated to in vivo imaging: from preclinical validations to clinical translation*. Molecules, 2012. **17**(5): p. 5564-91.
34. van Dam, G.M., et al., *Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- α targeting: first in-human results*. Nat Med, 2011. **17**(10): p. 1315-9.
35. Lasic, D.D., *Novel applications of liposomes*. Trends in Biotechnology, 1998. **16**(7): p. 307-321.
36. Steichen, S.D., M. Caldorera-Moore, and N.A. Peppas, *A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013. **48**(3): p. 416-427.
37. Barenholz, Y., *Doxil(R)--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned*. J Control Release, 2012. **160**(2): p. 117-34.
38. S. M. O'Brien, W.A., D. Ben Yehuda, J. Lister, G. J. Schiller, K. Seiter, S. E. Smith, W. Stock, J. A. Silverman and H. Kantarjian, *Phase II study of marqibo in adult patients with refractory or relapsed philadelphia chromosome negative (Ph-) acute lymphoblastic leukemia (ALL)*, in *2010 ASCO Annual Meeting*. 2010, Journal of Clinical Oncology. p. Abstract 6507.
39. Zhang, Q., X.E. Huang, and L.L. Gao, *A clinical study on the premedication of paclitaxel liposome in the treatment of solid tumors*. Biomed Pharmacother, 2009. **63**(8): p. 603-7.
40. Perche, F. and V.P. Torchilin, *Recent Trends in Multifunctional Liposomal Nanocarriers for Enhanced Tumor Targeting*. Journal of Drug Delivery, 2013. **2013**: p. 32.
41. Biswas, S., et al., *Development of the novel PEG-PE-based polymer for the reversible attachment of specific ligands to liposomes: synthesis and in vitro characterization*. Bioconj Chem, 2011. **22**(10): p. 2005-13.
42. Liechty, W.B. and N.A. Peppas, *Expert opinion: Responsive polymer nanoparticles in cancer therapy*. Eur J Pharm Biopharm, 2012. **80**(2): p. 241-6.
43. Zhang, Y., Y. Huang, and S. Li, *Polymeric micelles: nanocarriers for cancer-targeted drug delivery*. AAPS PharmSciTech, 2014. **15**(4): p. 862-71.
44. Steichen, S.D., M. Caldorera-Moore, and N.A. Peppas, *A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics*. Eur J Pharm Sci, 2013. **48**(3): p. 416-27.

45. Bosman, A.W., H.M. Janssen, and E.W. Meijer, *About Dendrimers: Structure, Physical Properties, and Applications*. Chem Rev, 1999. **99**(7): p. 1665-1688.
46. Hughes, G.A., *Nanostructure-mediated drug delivery*. Nanomedicine, 2005. **1**(1): p. 22-30.
47. Le Meur, A.-C., *Développement de vecteurs pharmaceutiques pour le relargage contrôlé de principes actifs*. 2009, Université de Bordeaux 1.
48. Majoros, I.J., et al., *PAMAM dendrimer-based multifunctional conjugate for cancer therapy: synthesis, characterization, and functionality*. Biomacromolecules, 2006. **7**(2): p. 572-9.
49. Svenson, S. and D.A. Tomalia, *Dendrimers in biomedical applications--reflections on the field*. Adv Drug Deliv Rev, 2005. **57**(15): p. 2106-29.
50. Gupta, A.K. and M. Gupta, *Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications*. Biomaterials, 2005. **26**(18): p. 3995-4021.
51. Lewin, M., et al., *Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(4): p. 410-4.
52. Meng Lin, M., et al., *Iron oxide-based nanomagnets in nanomedicine: fabrication and applications*. Nano Rev, 2010. **1**.
53. Banobre-Lopez, M., A. Teijeiro, and J. Rivas, *Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment*. Rep Pract Oncol Radiother, 2013. **18**(6): p. 397-400.
54. Gupta, A.K. and A.S. Curtis, *Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: interaction studies with human fibroblasts in culture*. J Mater Sci Mater Med, 2004. **15**(4): p. 493-6.
55. Cai, W., et al., *Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology*. Nanotechnol Sci Appl, 2008. **2008**(1).
56. Akhter, S., et al., *Gold nanoparticles in theranostic oncology: current state-of-the-art*. Expert Opin Drug Deliv, 2012. **9**(10): p. 1225-43.
57. Lim, Z.Z., et al., *Gold nanoparticles in cancer therapy*. Acta Pharmacol Sin, 2011. **32**(8): p. 983-90.
58. Kim, C.K., P. Ghosh, and V.M. Rotello, *Multimodal drug delivery using gold nanoparticles*. Nanoscale, 2009. **1**(1): p. 61-7.
59. Phillips, M.A., M.L. Gran, and N.A. Peppas, *Targeted Nanodelivery of Drugs and Diagnostics*. Nano Today, 2010. **5**(2): p. 143-159.
60. Jeremic, B., A.R. Aguerri, and N. Filipovic, *Radiosensitization by gold nanoparticles*. Clin Transl Oncol, 2013. **15**(8): p. 593-601.
61. Arvizo, R.R., et al., *Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: past, present and future*. Chem Soc Rev, 2012. **41**(7): p. 2943-70.
62. Butterworth, K.T., et al., *Physical basis and biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization*. Nanoscale, 2012. **4**(16): p. 4830-8.
63. Hainfeld, J.F., D.N. Slatkin, and H.M. Smilowitz, *The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice*. Phys Med Biol, 2004. **49**(18): p. N309-15.
64. Arias, J.L., *Advanced methodologies to formulate nanotheragnostic agents for combined drug delivery and imaging*. Expert Opin Drug Deliv, 2011. **8**(12): p. 1589-608.
65. Wilczewska, A.Z., et al., *Nanoparticles as drug delivery systems*. Pharmacol Rep, 2012. **64**(5): p. 1020-37.
66. Chen, X., S.S. Gambhir, and J. Cheon, *Theranostic nanomedicine*. Acc Chem Res, 2011. **44**(10): p. 841.
67. Hobbs, S.K., et al., *Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(8): p. 4607-12.
68. Torchilin, V.P., *Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example*. Handb Exp Pharmacol, 2010(197): p. 3-53.
69. Rowsell, J.L. and O.M. Yaghi, *Strategies for hydrogen storage in metal--organic frameworks*. Angew Chem Int Ed Engl, 2005. **44**(30): p. 4670-9.
70. Li, J.R., R.J. Kuppler, and H.C. Zhou, *Selective gas adsorption and separation in metal-organic frameworks*. Chem Soc Rev, 2009. **38**(5): p. 1477-504.

71. Della Rocca, J., D. Liu, and W. Lin, *Nanoscale metal-organic frameworks for biomedical imaging and drug delivery*. *Acc Chem Res*, 2011. **44**(10): p. 957-68.
72. Paget, V., et al., *Carboxylated nanodiamonds are neither cytotoxic nor genotoxic on liver, kidney, intestine and lung human cell lines*. *Nanotoxicology*, 2014. **8 Suppl 1**: p. 46-56.
73. Mochalin, V.N., et al., *The properties and applications of nanodiamonds*. *Nat Nano*, 2012. **7**(1): p. 11-23.
74. Lin, W., W.J. Rieter, and K.M. Taylor, *Modular synthesis of functional nanoscale coordination polymers*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009. **48**(4): p. 650-8.
75. Horcajada, P., et al., *Synthesis and catalytic properties of MIL-100(Fe), an iron(III) carboxylate with large pores*. *Chem Commun (Camb)*, 2007(27): p. 2820-2.
76. Spokoyny, A.M., et al., *Infinite coordination polymer nano- and microparticle structures*. *Chem Soc Rev*, 2009. **38**(5): p. 1218-27.
77. Cho, M., et al., *The impact of size on tissue distribution and elimination by single intravenous injection of silica nanoparticles*. *Toxicol Lett*, 2009. **189**(3): p. 177-83.
78. Chen, Z., et al., *Bio-distribution and metabolic paths of silica coated CdSeS quantum dots*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008. **230**(3): p. 364-71.
79. García Márquez, A., et al., *Green Microwave Synthesis of MIL-100(Al, Cr, Fe) Nanoparticles for Thin-Film Elaboration*. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2012. **2012**(32): p. 5165-5174.
80. Horcajada, P., et al., *Porous metal-organic-framework nanoscale carriers as a potential platform for drug delivery and imaging*. *Nat Mater*, 2010. **9**(2): p. 172-8.
81. Ferey, G., et al., *A chromium terephthalate-based solid with unusually large pore volumes and surface area*. *Science*, 2005. **309**(5743): p. 2040-2.
82. Ferey, G., et al., *A hybrid solid with giant pores prepared by a combination of targeted chemistry, simulation, and powder diffraction*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2004. **43**(46): p. 6296-301.
83. Jhung, S.H., et al., *Microwave effect in the fast synthesis of microporous materials: which stage between nucleation and crystal growth is accelerated by microwave irradiation?* *Chemistry*, 2007. **13**(16): p. 4410-7.
84. J. Rouquerol, D.A., C. W. Fairbridge, D. H. Everett, J. M. Haynes, N. Pernicone, J. D. F. Ramsay, K. S. W. Sing, K. K. Unger, *Recommendations for the characterization of porous solids (Technical Report)*. *Pure and Applied Chemistry*, 2009. **66**(8): p. 1739-1758.
85. Lohe, M.R., M. Rose, and S. Kaskel, *Metal-organic framework (MOF) aerogels with high micro- and macroporosity*. *Chem Commun (Camb)*, 2009(40): p. 6056-8.
86. Shi, J., et al., *Synthesis of MIL-100(Fe) at Low Temperature and Atmospheric Pressure*. *Journal of Chemistry*, 2013. **2013**: p. 4.
87. Sing, K.S.W., *Adsorption methods for the characterization of porous materials*. *Advances in Colloid and Interface Science*, 1998. **76-77**(0): p. 3-11.
88. Agostoni, V., et al., *Towards an improved anti-HIV activity of NRTI via metal-organic frameworks nanoparticles*. *Adv Healthc Mater*, 2013. **2**(12): p. 1630-7.
89. Taylor-Pashow, K.M., et al., *Postsynthetic modifications of iron-carboxylate nanoscale metal-organic frameworks for imaging and drug delivery*. *J Am Chem Soc*, 2009. **131**(40): p. 14261-3.
90. Nguyen, J.G., K.K. Tanabe, and S.M. Cohen, *Postsynthetic diazeniumdiolate formation and NO release from MOFs*. *CrystEngComm*, 2010. **12**(8): p. 2335-2338.
91. Rieter, W.J., et al., *Nanoscale metal-organic frameworks as potential multimodal contrast enhancing agents*. *J Am Chem Soc*, 2006. **128**(28): p. 9024-5.
92. Taylor, K.M., W.J. Rieter, and W. Lin, *Manganese-based nanoscale metal-organic frameworks for magnetic resonance imaging*. *J Am Chem Soc*, 2008. **130**(44): p. 14358-9.
93. Rieter, W.J., et al., *Nanoscale coordination polymers for platinum-based anticancer drug delivery*. *J Am Chem Soc*, 2008. **130**(35): p. 11584-5.

94. deKrafft, K.E., et al., *Iodinated nanoscale coordination polymers as potential contrast agents for computed tomography*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009. **48**(52): p. 9901-4.
95. Miller, S.R., et al., *Biodegradable therapeutic MOFs for the delivery of bioactive molecules*. *Chem Commun (Camb)*, 2010. **46**(25): p. 4526-8.
96. Yoon, J.W., et al., *Controlled reducibility of a metal-organic framework with coordinatively unsaturated sites for preferential gas sorption*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2010. **49**(34): p. 5949-52.
97. Keskin, S. and S. Kizilel, *Biomedical Applications of Metal Organic Frameworks*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2011. **50**(4): p. 1799-1812.
98. Huxford, R.C., J. Della Rocca, and W. Lin, *Metal-organic frameworks as potential drug carriers*. *Curr Opin Chem Biol*, 2010. **14**(2): p. 262-8.
99. Slattery, J.T., et al., *Graft-rejection and toxicity following bone marrow transplantation in relation to busulfan pharmacokinetics*. *Bone Marrow Transplant*, 1995. **16**(1): p. 31-42.
100. Ghermani, N.E., et al., *Molecular reactivity of busulfan through its experimental electrostatic properties in the solid state*. *Pharm Res*, 2004. **21**(4): p. 598-607.
101. Baati, T., et al., *Quantification of trimesic acid in liver, spleen and urine by high-performance liquid chromatography coupled to a photodiode-array detection*. *Journal of Chromatography B*, 2011. **879**(23): p. 2311-2314.
102. Baati, T., et al., *In depth analysis of the in vivo toxicity of nanoparticles of porous iron(iii) metal-organic frameworks*. *Chemical Science*, 2013. **4**(4): p. 1597-1607.
103. Duerk, J.L., *MRI: The basics*. Ray H Hashemi and William G Bradley, Jr. *Williams & Wilkins, Baltimore*, 1997 \$45.00 (softcover only), 443 illustrations, pp. 336. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 1997. **7**(3): p. 614-615.
104. Taylor, K.M., A. Jin, and W. Lin, *Surfactant-assisted synthesis of nanoscale gadolinium metal-organic frameworks for potential multimodal imaging*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008. **47**(40): p. 7722-5.
105. Ferey, G., *Hybrid porous solids: past, present, future*. *Chem Soc Rev*, 2008. **37**(1): p. 191-214.
106. Hinks, N.J., et al., *Metal organic frameworks as NO delivery materials for biological applications*. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2010. **129**(3): p. 330-334.
107. Dai, Z.R., et al., *Possible in situ formation of meteoritic nanodiamonds in the early Solar System*. *Nature*, 2002. **418**(6894): p. 157-9.
108. Bundy, F.P., et al., *Man-Made Diamonds*. *Nature*, 1955. **176**: p. 51-55.
109. Angus, J.C. and C.C. Hayman, *Low-pressure, metastable growth of diamond and "diamondlike" phases*. *Science*, 1988. **241**(4868): p. 913-21.
110. Shenderova, O.A. and D.M. Gruen, *Ultrananocrystalline Diamond: Synthesis, Properties and Applications*. 2006: Taylor & Francis.
111. Valerii Yu, D., *Detonation-synthesis nanodiamonds: synthesis, structure, properties and applications*. *Russian Chemical Reviews*, 2007. **76**(4): p. 339.
112. Mochalin, V.N., et al., *The properties and applications of nanodiamonds*. *Nat Nanotechnol*, 2012. **7**(1): p. 11-23.
113. Osawa, E., *Monodisperse single nanodiamonds particulates*. *Pure and Applied Chemistry*, 2008. **80**(7): p. 1365-1379.
114. Ozawa, M., et al., *Preparation and Behavior of Brownish, Clear Nanodiamond Colloids*. *Advanced Materials*, 2007. **19**(9): p. 1201-1206.
115. Yu. Dolmatov, V., *Detonation synthesis ultradispersed diamonds: properties and applications*. *Russian Chemical Reviews*, 2001. **70**(7): p. 607-626.
116. Kratochvilová, I., et al., *Magnetical and Optical Properties of Nanodiamonds Can Be Tuned by Particles Surface Chemistry: Theoretical and Experimental Study*. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2014. **118**(43): p. 25245-25252.
117. Schrand, A.M., *Safety of Nanoparticles: from manufacturing to medical applications*. 1 ed. *Nanostructure Science and Technology*. 2009, New York: Springer. 239.

118. Schrand, A.M., et al., *Are diamond nanoparticles cytotoxic?* J Phys Chem B, 2007. **111**(1): p. 2-7.
119. Yuan, Y., et al., *Pulmonary toxicity and translocation of nanodiamonds in mice.* Diamond and Related Materials, 2010. **19**(4): p. 291-299.
120. Mohan, N., et al., *In vivo imaging and toxicity assessments of fluorescent nanodiamonds in Caenorhabditis elegans.* Nano Lett, 2010. **10**(9): p. 3692-9.
121. Chow, E.K., et al., *Nanodiamond therapeutic delivery agents mediate enhanced chemoresistant tumor treatment.* Sci Transl Med, 2011. **3**(73): p. 73ra21.
122. Yuan, Y., et al., *Biodistribution and fate of nanodiamonds in vivo.* Diamond and Related Materials, 2009. **18**(1): p. 95-100.
123. Rojas, S., et al., *Biodistribution of amino-functionalized diamond nanoparticles. In vivo studies based on ¹⁸F radionuclide emission.* ACS Nano, 2011. **5**(7): p. 5552-9.
124. Zhu, Y., et al., *The biocompatibility of nanodiamonds and their application in drug delivery systems.* Theranostics, 2012. **2**(3): p. 302-12.
125. Krueger, A. and D. Lang, *Functionality is Key: Recent Progress in the Surface Modification of Nanodiamond.* Advanced Functional Materials, 2012. **22**(5): p. 890-906.
126. Liu, Y., et al., *Functionalization of Nanoscale Diamond Powder: Fluoro-, Alkyl-, Amino-, and Amino Acid-Nanodiamond Derivatives.* Chemistry of Materials, 2004. **16**(20): p. 3924-3930.
127. Osswald, S., et al., *Control of sp²/sp³ carbon ratio and surface chemistry of nanodiamond powders by selective oxidation in air.* J Am Chem Soc, 2006. **128**(35): p. 11635-42.
128. Williams, O.A., et al., *Size-dependent reactivity of diamond nanoparticles.* ACS Nano, 2010. **4**(8): p. 4824-30.
129. Zhong, Y.L. and K.P. Loh, *The chemistry of C-H bond activation on diamond.* Chem Asian J, 2010. **5**(7): p. 1532-40.
130. Smith, A.H., et al., *Triggered release of therapeutic antibodies from nanodiamond complexes.* Nanoscale, 2011. **3**(7): p. 2844-8.
131. Huang, H., et al., *Active nanodiamond hydrogels for chemotherapeutic delivery.* Nano Lett, 2007. **7**(11): p. 3305-14.
132. Zhang, X.Q., et al., *Polymer-functionalized nanodiamond platforms as vehicles for gene delivery.* ACS Nano, 2009. **3**(9): p. 2609-16.
133. Guan, B., F. Zou, and J. Zhi, *Nanodiamond as the pH-responsive vehicle for an anticancer drug.* Small, 2010. **6**(14): p. 1514-9.
134. Liu, K.K., et al., *Covalent linkage of nanodiamond-paclitaxel for drug delivery and cancer therapy.* Nanotechnology, 2010. **21**(31): p. 315106.
135. Li, X., et al., *TAT-conjugated nanodiamond for the enhanced delivery of doxorubicin.* Journal of Materials Chemistry, 2011. **21**(22): p. 7966-7973.
136. Purtov, K.V., et al., *Nanodiamonds as Carriers for Address Delivery of Biologically Active Substances.* Nanoscale Res Lett, 2010. **5**(3): p. 631-636.
137. Kucsko, G., et al., *Nanometre-scale thermometry in a living cell.* Nature, 2013. **500**(7460): p. 54-8.
138. Zhang, X.Q., et al., *Multimodal nanodiamond drug delivery carriers for selective targeting, imaging, and enhanced chemotherapeutic efficacy.* Adv Mater, 2011. **23**(41): p. 4770-5.
139. Batsanov, S.S., et al., *Giant dielectric permittivity of detonation-produced nanodiamond is caused by water.* Journal of Materials Chemistry, 2012. **22**(22): p. 11166-11172.
140. Yeganeh, M., et al., *Atomic hydrogen treatment of nanodiamond powder studied with photoemission spectroscopy.* Physical Review B, 2007. **75**(15): p. 155404.
141. Cheng, C.L., et al., *The CH stretching features on diamonds of different origins.* Diamond and Related Materials, 2005. **14**(9): p. 1455-1462.
142. Arnault, J.C., et al., *Diamond nanoseeding on silicon: Stability under H₂ MPCVD exposures and early stages of growth.* Diamond and Related Materials, 2008. **17**(7-10): p. 1143-1149.
143. Girard, H.A., et al., *Hydrogenation of nanodiamonds using MPCVD: A new route toward organic functionalization.* Diamond and Related Materials, 2010. **19**(7-9): p. 1117-1123.

144. Yeap, W.S., Y.Y. Tan, and K.P. Loh, *Using Detonation Nanodiamond for the Specific Capture of Glycoproteins*. Analytical Chemistry, 2008. **80**(12): p. 4659-4665.
145. Arnault, J.C., et al., *Surface chemical modifications and surface reactivity of nanodiamonds hydrogenated by CVD plasma*. Phys Chem Chem Phys, 2011. **13**(24): p. 11481-7.
146. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 47-95.
147. Thannickal, V.J. and B.L. Fanburg, *Reactive oxygen species in cell signaling*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(6): p. L1005-28.
148. Vera-Ramirez, L., et al., *Free radicals in breast carcinogenesis, breast cancer progression and cancer stem cells. Biological bases to develop oxidative-based therapies*. Crit Rev Oncol Hematol, 2011. **80**(3): p. 347-68.
149. Sedelnikova, O.A., et al., *Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis*. Mutat Res, 2010. **704**(1-3): p. 152-9.
150. Vaupel, P., D.K. Kelleher, and M. Hockel, *Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy*. Semin Oncol, 2001. **28**(2 Suppl 8): p. 29-35.
151. Burkhart, D.L. and J. Sage, *Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(9): p. 671-82.
152. Muller, P.A. and K.H. Vousden, *Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities*. Cancer Cell, 2014. **25**(3): p. 304-17.
153. Iliakis, G., et al., *DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation*. Oncogene, 2003. **22**(37): p. 5834-47.
154. Langerak, P. and P. Russell, *Regulatory networks integrating cell cycle control with DNA damage checkpoints and double-strand break repair*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2011. **366**(1584): p. 3562-71.
155. Hezel, A.F. and N. Bardeesy, *LKB1; linking cell structure and tumor suppression*. Oncogene, 2008. **27**(55): p. 6908-19.
156. Blasco, M.A., *Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(8): p. 611-22.
157. Adams, J.M. and S. Cory, *The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy*. Oncogene, 2007. **26**(9): p. 1324-37.
158. Vanden Berghe, T., et al., *Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(2): p. 135-47.
159. Chaabane, W., et al., *Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2013. **61**(1): p. 43-58.
160. Ben-Porath, I. and R.A. Weinberg, *The signals and pathways activating cellular senescence*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(5): p. 961-76.
161. Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna, *Cellular senescence: when bad things happen to good cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(9): p. 729-40.
162. Kobayashi, C.I. and T. Suda, *Regulation of reactive oxygen species in stem cells and cancer stem cells*. J Cell Physiol, 2012. **227**(2): p. 421-30.
163. Lagadec, C. and F. Pajonk, *Catch-22: does breast cancer radiotherapy have negative impacts too?* Future Oncol, 2012. **8**(6): p. 643-5.
164. Maugeri-Sacca, M., M. Bartucci, and R. De Maria, *DNA damage repair pathways in cancer stem cells*. Mol Cancer Ther, 2012. **11**(8): p. 1627-36.
165. Mathews, L.A., S.M. Cabarcas, and W.L. Farrar, *DNA repair: the culprit for tumor-initiating cell survival?* Cancer Metastasis Rev, 2011. **30**(2): p. 185-97.
166. Mathews, L.A., et al., *Increased expression of DNA repair genes in invasive human pancreatic cancer cells*. Pancreas, 2011. **40**(5): p. 730-9.
167. Karimi-Busheri, F., et al., *Senescence evasion by MCF-7 human breast tumor-initiating cells*. Breast Cancer Res, 2010. **12**(3): p. R31.

168. Yin, H. and J. Glass, *The phenotypic radiation resistance of CD44+/CD24(-or low) breast cancer cells is mediated through the enhanced activation of ATM signaling*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e24080.
169. Johnston, M.D., et al., *On the proportion of cancer stem cells in a tumour*. J Theor Biol, 2010. **266**(4): p. 708-11.
170. Takebe, N., et al., *Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways*. Nat Rev Clin Oncol, 2011. **8**(2): p. 97-106.
171. Brown, J.M. and W.R. Wilson, *Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(6): p. 437-47.
172. Nowack, B. and T.D. Bucheli, *Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment*. Environmental Pollution, 2007. **150**(1): p. 5-22.
173. Treuel, L., et al., *Physicochemical characterization of nanoparticles and their behavior in the biological environment*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2014. **16**(29): p. 15053-15067.
174. Eustis, S. and M.A. El-Sayed, *Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes*. Chemical Society Reviews, 2006. **35**(3): p. 209-217.
175. Roduner, E., *Size matters: why nanomaterials are different*. Chemical Society Reviews, 2006. **35**(7): p. 583-592.
176. Mieszawska, A.J., et al., *Multifunctional gold nanoparticles for diagnosis and therapy of disease*. Mol Pharm, 2013. **10**(3): p. 831-47.
177. Friedlander, S.K., *Smoke, Dust, and Haze*. 2nd ed. 2000. 432.
178. Nützenadel, C., et al., *Critical size and surface effect of the hydrogen interaction of palladium clusters*. The European Physical Journal D, 2000. **8**(2): p. 245-250.
179. Izak-Nau, E., et al., *Altered characteristics of silica nanoparticles in bovine and human serum: the importance of nanomaterial characterization prior to its toxicological evaluation*. Part Fibre Toxicol, 2013. **10**(1): p. 56.
180. Warheit, D.B., *How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization?* Toxicol Sci, 2008. **101**(2): p. 183-5.
181. Murdock, R.C., et al., *Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique*. Toxicol Sci, 2008. **101**(2): p. 239-53.
182. Kroll, A., et al., *Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges*. Eur J Pharm Biopharm, 2009. **72**(2): p. 370-7.
183. Guzman, M., J. Dille, and S. Godet, *Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2012. **8**(1): p. 37-45.
184. Sharma, V.K., R.A. Yngard, and Y. Lin, *Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities*. Advances in Colloid and Interface Science, 2009. **145**(1-2): p. 83-96.
185. Sondi, I. and B. Salopek-Sondi, *Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria*. Journal of Colloid and Interface Science, 2004. **275**(1): p. 177-182.
186. Pal, S., Y.K. Tak, and J.M. Song, *Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(6): p. 1712-20.
187. Worle-Knirsch, J.M., K. Pulskamp, and H.F. Krug, *Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays*. Nano Lett, 2006. **6**(6): p. 1261-8.
188. Casey, A., et al., *Spectroscopic analysis confirms the interactions between single walled carbon nanotubes and various dyes commonly used to assess cytotoxicity*. Carbon, 2007. **45**(7): p. 1425-1432.
189. Aam, B.B. and F. Fonnum, *Carbon black particles increase reactive oxygen species formation in rat alveolar macrophages in vitro*. Arch Toxicol, 2007. **81**(6): p. 441-6.

190. Stone, V., H. Johnston, and R.P. Schins, *Development of in vitro systems for nanotoxicology: methodological considerations*. Crit Rev Toxicol, 2009. **39**(7): p. 613-26.
191. Zaqout, M.S., et al., *Binding of titanium dioxide nanoparticles to lactate dehydrogenase*. Environ Health Prev Med, 2012. **17**(4): p. 341-5.
192. Oberdorster, G., E. Oberdorster, and J. Oberdorster, *Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles*. Environ Health Perspect, 2005. **113**(7): p. 823-39.
193. Warheit, D.B., C.M. Sayes, and K.L. Reed, *Nanoscale and fine zinc oxide particles: can in vitro assays accurately forecast lung hazards following inhalation exposures?* Environ Sci Technol, 2009. **43**(20): p. 7939-45.
194. Teeguarden, J.G., et al., *Particokinetics in vitro: dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments*. Toxicol Sci, 2007. **95**(2): p. 300-12.
195. Gangwal, S., et al., *Informing selection of nanomaterial concentrations for ToxCast in vitro testing based on occupational exposure potential*. Environ Health Perspect, 2011. **119**(11): p. 1539-46.
196. Wang, J., et al., *Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles*. Toxicology, 2008. **254**(1-2): p. 82-90.
197. Kendall, M., et al., *Nanoparticle growth and surface chemistry changes in cell-conditioned culture medium*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2015. **370**(1661): p. 20140100.
198. Marano, F., et al., *Nanoparticles: molecular targets and cell signalling*. Arch Toxicol, 2011. **85**(7): p. 733-41.
199. Simon, H.U., A. Haj-Yehia, and F. Levi-Schaffer, *Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction*. Apoptosis, 2000. **5**(5): p. 415-8.
200. Zucker, R.M., et al., *Detection of TiO₂ nanoparticles in cells by flow cytometry*. Cytometry A, 2010. **77**(7): p. 677-85.
201. Zucker, R.M. and K.M. Daniel, *Detection of TiO₂ nanoparticles in cells by flow cytometry*. Methods Mol Biol, 2012. **906**: p. 497-509.
202. Paget, V., et al., *Human cell line-dependent WC-Co nanoparticle cytotoxicity and genotoxicity: a key role of ROS production*. Toxicol Sci, 2015. **143**(2): p. 385-97.
203. Paget, V., et al., *Specific uptake and genotoxicity induced by polystyrene nanobeads with distinct surface chemistry on human lung epithelial cells and macrophages*. PlosOne, 2015.
204. Redon, C.E., et al., *Recent developments in the use of gamma-H2AX as a quantitative DNA double-strand break biomarker*. Aging (Albany NY), 2011. **3**(2): p. 168-74.
205. Smart, D.J., et al., *Genotoxicity screening via the gammaH2AX by flow assay*. Mutat Res, 2011. **715**(1-2): p. 25-31.
206. Hartung, T., *Food for thought... on cell culture*. ALTEX, 2007. **24**(3): p. 143-52.
207. Coecke, S., et al., *Guidance on good cell culture practice. a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice*. Altern Lab Anim, 2005. **33**(3): p. 261-87.
208. Wion, D., et al., *[Oxygen tension and cancer-cell culture: half a century of artifacts?]*. Med Sci (Paris), 2008. **24**(12): p. 1093-5.
209. Coecke, S., et al., *Metabolism: a bottleneck in in vitro toxicological test development. The report and recommendations of ECVAM workshop 54*. Altern Lab Anim, 2006. **34**(1): p. 49-84.
210. Brandon, E.F., et al., *An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons*. Toxicol Appl Pharmacol, 2003. **189**(3): p. 233-46.
211. Hakura, A., S. Suzuki, and T. Satoh, *Advantage of the use of human liver S9 in the Ames test*. Mutat Res, 1999. **438**(1): p. 29-36.
212. Hartung, T. and G. Daston, *Are in vitro tests suitable for regulatory use?* Toxicol Sci, 2009. **111**(2): p. 233-7.
213. Frank, S.A. and M.A. Nowak, *Problems of somatic mutation and cancer*. Bioessays, 2004. **26**(3): p. 291-9.
214. Buehring, G.C., E.A. Eby, and M.J. Eby, *Cell line cross-contamination: how aware are Mammalian cell culturists of the problem and how to monitor it?* In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2004. **40**(7): p. 211-5.

215. MacLeod, R.A., et al., *Widespread intraspecies cross-contamination of human tumor cell lines arising at source*. Int J Cancer, 1999. **83**(4): p. 555-63.
216. Mak, I.W., N. Evaniew, and M. Ghert, *Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment*. Am J Transl Res, 2014. **6**(2): p. 114-8.
217. Reagan-Shaw, S., M. Nihal, and N. Ahmad, *Dose translation from animal to human studies revisited*. The FASEB Journal, 2008. **22**(3): p. 659-661.
218. Ioannidis, J.P., *Extrapolating from animals to humans*. Sci Transl Med, 2012. **4**(151): p. 151ps15.
219. Vocci, F. and T. Farber, *Extrapolation of animal toxicity data to man*. Regul Toxicol Pharmacol, 1988. **8**(4): p. 389-98.
220. Lin, J.H., *Pharmacokinetic and pharmacodynamic variability: a daunting challenge in drug therapy*. Curr Drug Metab, 2007. **8**(2): p. 109-36.
221. Lovell, D.P., *Impact of pharmacogenetics on toxicological studies. Statistical implications*. J Exp Anim Sci, 1993. **35**(5-6): p. 259-81.
222. Festing, M.F.W., *Reducing the Use of Laboratory Animals in Biomedical Research: Problems and Possible Solutions*. ATLA, 1998. **26**: p. 283-301.
223. *in Definition of Pain and Distress and Reporting Requirements for Laboratory Animals: Proceedings of the Workshop Held June 22, 2000*. 2000: Washington (DC).
224. Griffith, L.G. and M.A. Swartz, *Capturing complex 3D tissue physiology in vitro*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(3): p. 211-24.
225. Nelson, C.M. and M.J. Bissell, *Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006. **22**: p. 287-309.
226. Ohmori, T., et al., *Blockade of tumor cell transforming growth factor-betas enhances cell cycle progression and sensitizes human breast carcinoma cells to cytotoxic chemotherapy*. Exp Cell Res, 1998. **245**(2): p. 350-9.
227. Rak, J., et al., *Massive programmed cell death in intestinal epithelial cells induced by three-dimensional growth conditions: suppression by mutant c-H-ras oncogene expression*. J Cell Biol, 1995. **131**(6 Pt 1): p. 1587-98.
228. Bissell, M.J., H.G. Hall, and G. Parry, *How does the extracellular matrix direct gene expression?* J Theor Biol, 1982. **99**(1): p. 31-68.
229. Ronnov-Jessen, L., O.W. Petersen, and M.J. Bissell, *Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction*. Physiol Rev, 1996. **76**(1): p. 69-125.
230. Friedl, P., *Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(1): p. 14-23.
231. Keith, B. and M.C. Simon, *Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer*. Cell, 2007. **129**(3): p. 465-72.
232. Jenkins, J., et al., *Oxygen-sensing scaffolds for 3-dimensional cell and tissue culture*. Acta Biomater, 2015. **16**: p. 126-35.
233. Kim, J.B., *Three-dimensional tissue culture models in cancer biology*. Semin Cancer Biol, 2005. **15**(5): p. 365-77.
234. Fessart, D., H. Begueret, and F. Delom, *Three-dimensional culture model to distinguish normal from malignant human bronchial epithelial cells*. Eur Respir J, 2013. **42**(5): p. 1345-56.
235. Ingram, M., et al., *Three-dimensional growth patterns of various human tumor cell lines in simulated microgravity of a NASA bioreactor*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1997. **33**(6): p. 459-66.
236. Breslin, S. and L. O'Driscoll, *Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery*. Drug Discov Today, 2013. **18**(5-6): p. 240-9.
237. Mehta, G., et al., *Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy*. J Control Release, 2012. **164**(2): p. 192-204.

238. Bell, E., *Strategy for the selection of scaffolds for tissue engineering*. Tissue Eng, 1995. **1**(2): p. 163-79.
239. Lee, J., M.J. Cuddihy, and N.A. Kotov, *Three-dimensional cell culture matrices: state of the art*. Tissue Eng Part B Rev, 2008. **14**(1): p. 61-86.
240. Lu, H.H., et al., *Three-dimensional, bioactive, biodegradable, polymer-bioactive glass composite scaffolds with improved mechanical properties support collagen synthesis and mineralization of human osteoblast-like cells in vitro*. J Biomed Mater Res A, 2003. **64**(3): p. 465-74.
241. Holy, C.E., M.S. Shoichet, and J.E. Davies, *Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period*. J Biomed Mater Res, 2000. **51**(3): p. 376-82.
242. Sakai, T., M. Larsen, and K.M. Yamada, *Fibronectin requirement in branching morphogenesis*. Nature, 2003. **423**(6942): p. 876-81.
243. Holliday, D.L., et al., *The practicalities of using tissue slices as preclinical organotypic breast cancer models*. J Clin Pathol, 2013. **66**(3): p. 253-5.
244. Yamada, K.M. and E. Cukierman, *Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D*. Cell, 2007. **130**(4): p. 601-10.
245. van der Kuip, H., et al., *Short term culture of breast cancer tissues to study the activity of the anticancer drug taxol in an intact tumor environment*. BMC Cancer, 2006. **6**: p. 86.
246. Hickman, J.A., et al., *Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: capturing tumor complexity in vitro/ex vivo*. Biotechnol J, 2014. **9**(9): p. 1115-28.
247. Zhao, H., et al., *Patient-derived tissue slice grafts accurately depict response of high-risk primary prostate cancer to androgen deprivation therapy*. J Transl Med, 2013. **11**: p. 199.
248. Collado, M., M.A. Blasco, and M. Serrano, *Cellular Senescence in Cancer and Aging*. Cell. **130**(2): p. 223-233.
249. Dorr, J.R., et al., *Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy*. Nature, 2013. **501**(7467): p. 421-425.
250. Schmitt, C.A., *Cellular senescence and cancer treatment*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1775**(1): p. 5-20.
251. Acosta, J.C. and J. Gil, *Senescence: a new weapon for cancer therapy*. Trends Cell Biol, 2012. **22**(4): p. 211-9.



(51) Classification internationale des brevets :

A61K 47/48 (2006.01) A61K 41/00 (2006.01)
A61K 33/00 (2006.01) A61K 49/00 (2006.01)
B82Y5/00 (2011.01) A61K 9/51 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/IB2013/055766

(22) Date de dépôt international :

12 juillet 2013 (12.07.2013)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

12 56786	13 juillet 2012 (13.07.2012)	FR
12 56781	13 juillet 2012 (13.07.2012)	FR
12 60924	16 novembre 2012 (16.11.2012)	FR

(71) Déposant : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES [FR/FR]; 25, rue Leblanc, Bâtiment « Le Ponant D », F-75015 Paris (FR).

(72) Inventeurs : PETIT, Tristan; 65 rue de la Roquette, F-75011 Paris (FR). ARNAULT, Jean-Charles; 34 rue Rouget de Lisle, F-78120 Rambouillet (FR). GIRARD,

Hugues; 7 avenue Gaugé, F-78220 Viroflay (FR). GRALL, Romain; 48 rue Boucicaut, F-92260 Fontenay Aux Roses (FR). CHEVILLARD, Sylvie; 2 bis, rue des écoles, F-75005 Paris (FR). DELIC, Jozo; 13, rue Franklin Roosevelt, F-92340 Bourg La Reine (FR).

(74) Mandataires : MARCADE, Véronique et al; Cabinet Ores, 36, rue de St Pétersbourg, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : USE OF NANODIAMONDS FOR GENERATING FREE RADICALS FOR THERAPEUTIC PURPOSES UNDER RADIATION

(54) Titre : UTILISATION DE NANODIAMANTS POUR GENERER DES RADICAUX LIBRES A VISEE THERAPEUTIQUE SOUS IRRADIATION

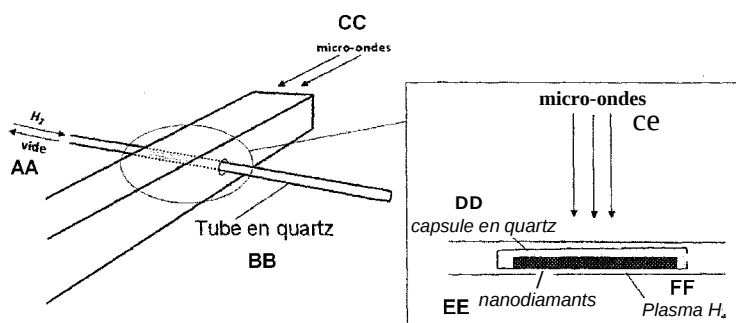


Figure 1

AA ... Vacuum
BB ... Quartz tube
CE ... Microwaves
DD ... Quartz capsule
EE ... Nanodiamonds
FF ... H₂ plasma

(57) Abstract : The present invention relates to the use of nanodiamonds as drugs generating free radicals, in particular for treating tumours. The invention is based on generating free radicals on the surface of the nanodiamonds when they are exposed to radiation, for example ionising radiation. In order to increase the effectiveness of the nanodiamonds, same can be complexed with a radiosensitising agent, such as a chemical molecule or an interfering RNA targeting a repairing gene.

(57) Abrégé : La présente invention porte sur l'utilisation de nanodiamants comme médicaments générateurs de radicaux libres, en particulier pour traiter des tumeurs. Cette invention repose sur la génération de radicaux libres à la surface des nanodiamants lorsqu'ils sont soumis à un rayonnement, par exemple un rayonnement ionisant. Afin d'accroître l'efficacité des nanodiamants, ces derniers peuvent être complexés à un radiosensibilisant, tel qu'une molécule chimique ou un ARN interférant visant un gène réparateur.

MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont
reçues (règle 48.2.K)

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

UTILISATION DE NANODIAMANTS POUR GENERER DES RADICAUX LIBRES A VISEE THERAPEUTIQUE SOUS IRRADIATION

La présente invention concerne le domaine de la radiothérapie. Elle a notamment pour objet l'utilisation de **nanoparticules** de diamant particulières (ou nanodiamants), pour générer localement des radicaux libres.

La radiothérapie est une technique courante pour traiter des tumeurs cancéreuses, utilisée dans environ 50% des cas, Elle consiste à créer des radicaux libres dans les cellules par irradiation localisée ; ces radicaux libres provoquent des ruptures de l'ADN des cellules irradiées, conduisant à leur mort. L'efficacité des traitements par radiothérapie est actuellement limitée par la résistance de certaines tumeurs aux rayonnements ionisants, par rapport aux cellules saines. Une radiosensibilisation sélective et efficace des cellules tumorales permettrait d'améliorer significativement l'efficacité de ces traitements et de réduire les effets secondaires sur les tissus sains.

Dans ce but, différentes approches ont été décrites, telles que l'utilisation de nanoparticules capables de générer localement des radicaux libres, ou l'utilisation de radiosensibilisants.

La première approche consiste à générer localement, au sein de la tumeur, des radicaux libres en utilisant des nanoparticules. Les méthodes de ce type décrites à ce jour sont basées sur des propriétés physiques, liées aux nanoparticules, permettant de générer efficacement des espèces radicalaires à leur surface sous irradiation. Les nanoparticules utilisées sont généralement constituées d'atomes ayant un numéro atomique (Z) élevé, afin d'absorber plus efficacement les rayons X, mais qui sont généralement des matériaux coûteux (or, platine, terres rares), et/ou pouvant induire une toxicité, et/ou peu stables dans un milieu biologique. A titre d'exemple, on peut citer la demande de brevet IJS2008/0003 183 (Ting Guo), qui propose d'utiliser des nanoparticules constituées d'éléments lourds comme l'or, capables d'émettre des électrons Auger localement sous irradiation. Cette génération d'électrons peut être induite en utilisant des rayons X ayant une énergie que les molécules d'eau n'absorbent que faiblement, afin de générer les radicaux libres essentiellement à proximité des nanoparticules. Cependant, pour améliorer la stabilité colloïdale et la biocompatibilité de ces nanoparticules, le greffage de molécules est souvent nécessaire, ce qui peut atténuer la dose d'électrons secondaires ou Auger transmis à l'environnement de la nanoparticule, et réduit donc la dose de radicaux libres générés.

Selon la deuxième approche citée plus haut, de nouvelles molécules radiosensibilisantes sont actuellement en cours d'étude, dont le but est de cibler les défenses biologiques propres aux cellules tumorales (C. Begg *et al*, 2011). Malheureusement, ces molécules ne peuvent pas toujours être délivrées dans les cellules tumorales *in vivo*, ce qui limite leur utilisation thérapeutique. C'est notamment le cas des ARNs interférants de POLQ, qui ont montré récemment une grande sélectivité dans la radiosensibilisation de cellules

tumorales *in vitro* (Higgins *et al*, 2010). Ces ARNs interférents pourront difficilement être utilisés *in vivo* sans moyen de vectorisation, car leur biodisponibilité est limitée.

Différentes applications biotechnologiques sont actuellement connues pour les nanodiamants., telles que la vectorisation et la délivrance de médicaments et d'ARN interférents dans les cellules tumorales. Dans ces applications, les nanodiamants sont utilisés uniquement comme vecteurs passifs. A titre d'exemple, on peut citer la demande de brevet US 2010/0305309 (Ho *et al*), portant sur différents procédés pour délivrer des médicaments avec des nanodiamants. Dans ce cas particulier, les nanodiamants utilisés comme vecteurs sont oxydés en surface, ce qui leur donne une charge de surface négative et rend nécessaire l'ajout de polymères pour permettre de vectoriser des brins d'ADN ou d'ARN ayant aussi une charge négative. Ces polymères peuvent induire une toxicité supplémentaire et augmentent significativement la taille des nanodiamants, ce qui peut induire une plus grande rétention dans les organes comme le foie ou les reins pour des applications *in vivo*.

La présente invention repose sur la mise en évidence, par les inventeurs, d'une propriété jusqu'ici ignorée des nanodiamants. Le terme "nanodiamant" désigne ici toute nanoparticule principalement constituée d'atomes de carbone hybridé sp^3 , ayant une taille inférieure à 250 nm. Ces nanoparticules peuvent être, entre autres, synthétisées par broyage de diamant de synthèse ou par détonation. Dans ce dernier cas, les nanodiamants ont généralement une taille inférieure à 10 nm. Le terme "nanodiamant" désigne également des agrégats de taille nanoparticulaire constitués de nanoparticules de diamant primaires. Les inventeurs ont observé que les nanodiamants ont des propriétés physiques particulières qui leur permettent de générer efficacement des radicaux libres sous rayonnement, notamment sous rayonnement ionisant. Les nanodiamants sont en effet constitués d'une très grande concentration d'atomes de carbone (1.8×10^{23} atomes/cm³), ce qui permet d'absorber plus efficacement les rayonnements que les tissus biologiques environnants, malgré un numéro atomique équivalent. De plus, les nanodiamants ont une très bonne stabilité colloïdale, même sans fonctionnalisation qui atténuerait le transfert des électrons générés à leur environnement. Enfin, l'excellente conductivité thermique du diamant assure une libération très efficace de la chaleur résultant de l'irradiation (par exemple par un rayonnement ionisant) à la surface des nanodiamants. Les nanodiamants permettent donc de générer efficacement des radicaux libres dans les cellules tumorales, et/ou de la chaleur, tout en utilisant un matériau à base de carbone peu coûteux, biocompatible et stable en milieu biologique sans fonctionnalisation nécessaire.

La présente invention porte donc, en premier lieu, sur l'utilisation d'un nanodiamant pour générer des radicaux libres à visée thérapeutique et/ou diagnostique. Selon une mise en œuvre particulière de l'invention, une production de chaleur est couplée à la production de radicaux libres. L'utilisation de nanodiamant comme médicament et/ou comme outil de diagnostic générant des radicaux libres découle des propriétés mises en évidence par les inventeurs et décrites ci-dessus.

Dans le cadre de la présente invention, l'action thérapeutique des nanodiamants est le fait des dommages causés, directement ou indirectement, par les radicaux libres générés à la surface des nanodiamants, aux molécules situées aux alentours immédiats des nanoparticules, et en particulier à moins de 10 nm de la surface des nanoparticules. Dans les applications visant la destruction de cellules, il est donc préférable que les nanoparticules pénètrent dans les cellules, pour que les radicaux libres causent des dommages aux acides nucléiques cellulaires (ADN et ARN nucléaires et/ou ARNs cytoplasmique et/ou ADN mitochondrial, *etc.*). Pour cela, des nanodiamants dont le diamètre moyen est inférieur à 100 nm, voire inférieur à 50 nm ou même inférieur à 10 nm, sont préférés pour mettre en œuvre l'invention.

Les inventeurs ont observé que des nanodiamants ayant subi un traitement de surface particulier pour créer des fonctions CH_x ($x = 1, 2$ ou 3) et/ou du carbone sous forme graphitique en surface (par plasma hydrogène, recuits à haute température sous vide ou sous hydrogène par exemple) sont particulièrement efficaces. L'expression "nanodiamant graphitisé" désigne ici tout nanodiamant contenant, en surface, des atomes de carbone hybridés sp^2 . Bien entendu, la présence d'atomes de carbone hybridés sp^2 en surface du nanodiamant n'exclut pas la présence d'autres groupements chimiques à la surface de ces nanodiamants. De même, l'expression "nanodiamant hydrogéné" désigne tout nanodiamant contenant des fonctions de type C-H , C_2H_4 ou CH_3 en surface. Les nanodiamants dont la surface a été (partiellement ou totalement) graphitisée et/ou hydrogénée, quand ils sont exposés à l'air ou dispersés en milieu aqueux, présentent des propriétés de conduction de surface qui leur donnent une affinité électronique négative. En parallèle, leur surface devient favorable à l'adsorption préférentielle des molécules étant à l'origine des radicaux libres en milieu biologique (H_2O , O_2 et NO_2 principalement), permettant ainsi un transfert d'électrons du nanodiamant vers ces molécules, qui s'effectue spontanément. Sous rayonnement ionisant, ce transfert d'électrons est amplifié et crée des radicaux libres de manière particulièrement efficace. En outre, l'adsorption préférentielle de molécules comme H_2O , O_2 et NO_2 à la surface de ces nanodiamants modifiés permet, en apportant ces molécules dans les cellules, de surmonter une des causes principales de la résistance des cellules tumorales, qui est le manque d'oxygène dans ces cellules (hypoxie), limitant la génération de radicaux libres oxygénés.

Les nanodiamants ayant des fonctions CH_x et/ou du carbone sous forme graphitique en surface ont de plus une permittivité diélectrique très importante, qui permet de les utiliser comme source de chaleur sous un champ électromagnétique oscillant à des fréquences entre 100 et 10^6 Hz (Batsanov *et al.*, 2012). Ces nanodiamants possèdent aussi des propriétés d'absorption des rayonnements infrarouges, comme les autres nanomatériaux carbonés, induisant aussi une libération de chaleur (Yang *et al.*, 2010). Pour obtenir une production de chaleur par les nanodiamants, des infrarouges de longueur d'onde comprise

entre 600 et 1400 nm seront préférentiellement utilisés, cette gamme correspondant aux infrarouges absorbés par les tissus biologiques. Les propriétés de génération de radicaux libres peuvent alors être couplées à de l'hyperthermie.

Selon une mise en œuvre préférée, la présente invention porte donc sur un nanodiamant dont la surface a été au moins partiellement graphitisée et/ou hydrogénée, pour utilisation pour générer des radicaux libres à visée thérapeutique et/ou diagnostique, éventuellement couplés à de la chaleur. En particulier, la présente invention porte sur un nanodiamant pour utilisation en combinaison avec un rayonnement, comme médicament et/ou comme outil de diagnostic générant des radicaux libres.

Parmi les rayonnements susceptibles de provoquer la génération de radicaux libres à la surface des particules de nanodiamant, on peut citer les rayonnements ionisants, parmi lesquels des ondes électromagnétiques telles que les rayons X, les rayons gamma et les ultra-violets, ainsi que des rayonnements particuliers, notamment un rayonnement constitué de protons, de hadrons ou de particules bêta (β^+ ou β^-). Selon un mode de réalisation préféré, la présente invention porte donc sur un nanodiamant tel que ceux décrits plus haut, pour utilisation en combinaison avec un rayonnement ionisant, comme médicament et/ou comme outil de diagnostic.

L'homme du métier adaptera les paramètres du rayonnement utilisé (nature, énergie, puissance et durée d'irradiation) en fonction de la profondeur du tissu à atteindre et d'autres paramètres cliniques et techniques. A titre purement indicatif, certaines valeurs sont présentées dans le tableau 1 ci-dessous.

Toutefois, d'autres rayonnements peuvent être utilisés, à la place ou en combinaison avec les rayonnements cités ci-dessus. Parmi ces rayonnements de natures diverses, on peut citer les rayonnements visible, infrarouge, micro-ondes, neutrons, notamment pour obtenir une production de chaleur. Les irradiations peuvent être multiples, tant par la nature des rayonnements utilisés que par l'application des rayonnements en plusieurs fois.

Nature du rayonnement	Energie	durée	Pénétration	Organes
UV	3-120 eV	Quelques minutes	Superficielle	Peau et cavités (exemple : vessie)
Rayons X	20 à 150 keV	Quelques minutes	Quelques millimètres	Peau et cavités (exemple : vessie)
Rayons X (ortho voltage)	200 à 500 keV	Quelques minutes	Jusqu'à 6 cm	Organes superficiels, muscles
Rayons X (méga voltage)	1000keV à 25000keV	Quelques minutes	Tout le corps	Organes profonds (exemple : prostate)

Tableau 1

Selon une mise en œuvre particulière de l'invention, au moins une partie des radicaux libres générés sont des radicaux libres oxygénés. Les inventeurs ont également montré que l'azote pouvait s'adsorber à la surface des nanodiamants. Aussi, selon une mise en œuvre de l'invention, au moins une partie des radicaux libres générés sont des radicaux libres azotés.

Les radicaux libres provoquant des ruptures de l'ADN, les nanodiamants décrits plus haut trouvent une application avantageuse dans la destruction de cellules cibles telles que des cellules cancéreuses. Selon un mode de réalisation préféré, la présente invention concerne donc l'utilisation d'un nanodiamant tel que décrit ci-dessus pour traiter une tumeur solide, ladite utilisation étant basée sur la propriété intrinsèque du nanodiamant de générer des radicaux libres sous irradiation.

Selon une mise en œuvre particulière de l'invention, les particules de nanodiamant sont fonctionnalisées. En particulier, un nanodiamant selon l'invention peut être lié à une molécule de ciblage, par liaison covalente ou non. Plusieurs techniques de greffage de molécules à la surface de nanodiamants ont été décrites dans l'art antérieur, et l'homme du métier est en mesure de choisir, en fonction notamment du type de molécule de ciblage, celle qui lui convient le mieux. A titre d'exemples non limitatifs de méthodes de greffage de molécules de ciblage à la surface de nanodiamants, on peut citer :

- un couplage type peptidique via la formation d'une fonction amide ou ester entre le nanodiamant et la molécule de ciblage (Huang et Chang, 2004)
- un couplage direct de la molécule de ciblage sur le nanodiamant par la création d'une liaison C-C entre les deux entités (Girard *et al.*, 2011)
- un couplage de type cycloaddition via la présence de carbones à l'état d'hybridation sp^2 ou sp sur le nanodiamant et/ou sur la molécule de ciblage (Jarre *et al.*, 2011)
- un couplage de type silanisation via la présence de fonction silanes sur la surface du nanodiamant et/ou sur la molécule de ciblage (Krüger *et al.*, 2006)
- un couplage non covalent, basé sur des interactions électrostatiques et/ou la formation de liaisons hydrogène entre le nanodiamant et la molécule cible (Chen *et al.*, 2010).

Ces couplages peuvent s'effectuer soit directement à la surface des nanodiamants, soit par l'intermédiaire de molécules préalablement greffées ou adsorbées à la surface des nanodiamants. Pour les nanodiamants hydrogénés, le couplage direct par la création d'une liaison C-C est le plus efficace. Pour les nanodiamants graphitisés, le couplage par cycloaddition est le plus approprié.

Selon un mode de réalisation préféré des nanodiamants ciblés selon l'invention, le ciblage est assuré par au moins un ligand biologique reconnu par un récepteur

surexprimé à la surface de certaines cellules. Les ligands biologiques permettant de cibler spécifiquement certaines cellules peuvent être :

- des peptides, par exemple le peptide RGD, ou leurs dérivés ou leurs analogues (ex : le peptide octéotride, analogue de la somatostatine, un analogue de la bombésine, de la neurotensine, l'EGF, le VIP...),
- des protéines, des anticorps, ou leurs dérivés ou leurs analogues,
- des sucres, notamment des monosaccharides (ex : glucose, galactose, glucosamine ou galactosamine), des oligosaccharides, des polysaccharides ou leurs dérivés ou leurs analogues,
- des oligonucléotides, ADN, ARN, leurs dérivés ou leurs analogues,
- des molécules organiques (telles que le folate ou le pamidronate biphosphonaté).
- des complexes organométalliques.

Leur activité de ciblage est due à la reconnaissance moléculaire de ces ligands par des récepteurs surexprimés à la surface des cellules de la zone d'intérêt.

Des ligands particulièrement préférés pour mettre en œuvre l'invention sont des ligands de molécules fréquemment surexprimées à la surface des cellules tumorales. Par exemple des peptides comportant le motif RGD, tels que le cyclo(RGDfK), le cyclo(RGDyK) ou le cyclo(RGDfV), peuvent avantageusement être utilisées. Ces peptides reconnaissent l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, qui est surexprimée à la surface des cellules tumorales et des cellules endothéliales lors de la néoangiogenèse tumorale. L'utilisation de ces ligands dans les nanodiamants selon l'invention permet donc de cibler les tumeurs et leur vascularisation, pour les détruire par la production de radicaux libres, éventuellement couplée à la production de chaleur. Un autre ligand préféré est, par exemple un peptide comportant le motif NGR décrit par Curnis *et al.* (2002), lequel cible également les néo-vaisseaux.

Bien entendu, d'autres molécules peuvent être greffées à la surface des nanodiamants utilisés dans le cadre de la présente invention, par exemple pour augmenter leur stabilité en milieu biologique, ou pour en effectuer un marquage (fluorophore, marqueur radioactif, *etc.*) (Figure 17).

De manière avantageuse, les nanodiamants selon la présente invention peuvent être suivis par des méthodes d'imagerie utilisant la luminescence intrinsèques des centres colorés dans les nanodiamants (centres N-V ou autre) (Chang *et al.*, 2008). Des méthodes de spectroscopies peuvent aussi être utilisées, notamment la spectroscopie Raman (Chao *et al.*, 2007). Le praticien peut donc vérifier la présence des nanodiamants au niveau de la zone ciblée, par exemple au niveau d'une tumeur solide, avant de soumettre cette zone à l'irradiation qui entraînera la génération de radicaux libres. Ceci permet de diminuer encore les effets secondaires du traitement.

Comme mentionné plus haut, les nanodiamants sont connus pour leur capacité à vectoriser des molécules. Selon un mode de réalisation particulier, la présente invention propose d'utiliser des nanodiamants à la fois pour leurs propriétés de vectorisation (fonction passive) et pour leurs propriétés de génération de radicaux libres sous irradiation (fonction active). Le principe de fonctionnement de cet aspect de l'invention est illustré à la Figure 18. Le couplage des propriétés de vectorisation des nanodiamants à ses propriétés de génération de radicaux libres est particulièrement avantageux dans le cadre de complexes multimodaux nanodiamants/radiosensibilisants. En effet, les radiosensibilisants permettent une réponse sélective en attaquant des voies biologiques spécifiques aux cellules tumorales tandis que les nanodiamants augmentent la quantité de radicaux libres générés. L'association de ces deux composantes permet d'augmenter significativement l'efficacité et la sélectivité par rapport à l'utilisation de manière isolée de nanoparticules ou de molécules radiosensibilisantes : d'une part, l'utilisation de nanodiamants permet de transporter les radiosensibilisants dans les cellules tumorales de manière ciblée et de les libérer progressivement dans ces cellules, si bien que la biodisponibilité des radiosensibilisants est améliorée et, d'autre part, les radiosensibilisants vont inactiver les défenses des cellules tumorales, donc les radicaux générés par les nanodiamants vont provoquer davantage de ruptures d'ADN dans les cellules tumorales. Ce couplage permet *a priori* d'augmenter les concentrations de radiosensibilisants délivrés dans les cellules tumorales et de réduire la dose de radiation nécessaire pour éliminer ces cellules.

Selon cette approche, la présente invention concerne une composition comprenant un nanodiamant tel que décrit ci-dessus, fonctionnalisé ou non par une molécule de ciblage, ainsi qu'une molécule radiosensibilisante. Cette molécule radiosensibilisante peut être liée audit nanodiamant par Liaison covalente, ou simplement adsorbée à sa surface.

Différents types de molécules radiosensibilisantes, aussi appelés "radiosensibilisants", ont été décrits et peuvent être utilisés pour mettre en œuvre la présente invention. A ce titre, on peut notamment citer des radiosensibilisants de type chimique, dont une liste non exhaustive comprend le misonidazole, le metronidazole, l'etanidazole, le pimonidazole, les phénylpropanoïdes et l'acide monoiodoacétique. Ces molécules peuvent être fixées sur les nanodiamants de façon covalente, éventuellement via des bras clivables en milieu cellulaire, permettant la libération de ces molécules après internalisation du nanodiamant. À titre d'exemple de bras clivables, on peut citer un polymère PEG/poly-lysine, un bras peptidique clivé par une enzyme surexprimée dans le type de tumeur ciblé (par exemple la MMP2 ou la cathepsine D), ou encore un bras comprenant un pont disulfure, lequel sera clivé par les thiorédoxines dans les lysosomes et endosomes des cellules. Alternativement, le radiosensibilisant chimique peut être lié au nanodiamant par des liaisons faibles (adsorption électrostatique soit directe, soit par l'intermédiaire d'un polymère chargé).

Comme évoqué plus haut, un nouvel axe de recherche dans le domaine de la radiosensibilisation concerne l'utilisation d'acides nucléiques capables de moduler l'expression de certaines protéines impliquées dans la réparation de l'ADN. La présente invention porte donc également sur une composition comprenant un nanodiamant tel que décrit plus haut et une molécule radiosensibilisante constituée d'une molécule d'acide nucléique adsorbée à la surface du nanodiamant. Les acides nucléiques préférés pour mettre en œuvre cet aspect de l'invention sont des ARN interférents capables d'inhiber l'expression d'un gène responsable de la réparation de l'ADN, comme par exemple un ARN interférent inhibant l'expression du gène POLQ.

Bien entendu, les compositions de l'invention seront avantageusement utilisées en combinaison avec un rayonnement, notamment comme médicament anticancéreux, et de préférence dans des conditions telles que le rayonnement induit la production, à la surface des nanodiamants, de radicaux libres et/ou de chaleur. Le terme "en combinaison" indique que l'effet recherché est obtenu lorsque les cellules, tissus ou organes d'intérêt, ayant incorporé en partie des nanoparticules de l'invention, sont excités par le rayonnement. Toutefois, il n'est pas nécessaire que les particules et les rayons soient administrés simultanément ni selon le même protocole.

Un autre objet particulier de l'invention réside dans une méthode pour induire ou causer la lyse ou la destruction de cellules cancéreuses, *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*, comprenant la mise en contact de cellules cancéreuses avec un ou des nanodiamants ou compositions tels que décrits précédemment, pendant une période de temps suffisante pour leur permettre de pénétrer dans les cellules cancéreuses et, le cas échéant, pour permettre la libération des radiosensibilisants, suivie de l'exposition des cellules à des rayons tels que définis ci-dessus, ladite exposition induisant la génération de radicaux libres et/ou de chaleur à la surface des nanodiamants et provoquant la lyse ou la mort desdites cellules. Le cas échéant, une étape intermédiaire de détection des nanodiamants, par exemple par spectroscopie Raman, est effectuée avant l'étape d'exposition aux rayons, afin de contrôler la localisation des nanodiamants.

L'invention concerne également une méthode de traitement du cancer, comprenant l'administration à un patient atteint d'un cancer d'une composition comprenant des nanodiamants tels que définis précédemment, de préférence fonctionnalisés par une molécule de ciblage, dans des conditions permettant aux nanodiamants ou agrégats nanoparticulaires de pénétrer dans les cellules cancéreuses, et le traitement ultérieur du patient en présence d'une source d'excitation, par exemple choisie parmi les rayons X, les rayons gamma, les UV, les protons et les hadrons, conduisant à une altération, une perturbation ou une destruction fonctionnelle de cellules cancéreuses du patient, traitant ainsi le cancer.

Le terme "traitement" désigne ici toute amélioration des signes cliniques, comme notamment une diminution de la taille ou du développement d'une tumeur ou d'une

zone **tissulaire pathologique**, la **suppression** ou la destruction de cellules ou tissus pathologiques, un ralentissement de la progression de la pathologie, une réduction de la formation de métastases, une régression ou une rémission complète, **etc.** Les nanodiamants et **compositions** de l'invention **peuvent également être** utilisées ***in vitro* ou *ex vivo***.

L'invention est utilisable pour traiter tout **type** de cancer, notamment les tumeurs solides, métastasées ou non, par exemple choisies parmi les cancers du poumon, foie, rein, **vessie**, sein, **tête-et-cou**, cerveau, ovaires, prostate, peau, intestin, **colon**, **etc.** Les rayons peuvent être appliqués à tout **moment** après l'**administration** des particules, **en** une ou plusieurs fois, en utilisant tout système **de** radiothérapie ou de radiographie déjà disponible. Les **nanodiamants** et compositions de l'invention peuvent être administrés par différentes voies, de préférence par injection, systémique **ou** locale, ou de manière orale. Des injections **ou** administrations répétées peuvent être envisagées, si nécessaire.

Les exemples suivants et les figures annexées **illustrent** l'invention sans toutefois limiter son étendue.

Légendes des figures

Figure 1 : Schéma du montage d'hydrogénation des nanodiamants (NDs) par plasma d'hydrogène ($\frac{3}{4}$) assisté par micro-ondes.

Figure 2 : Clichés par **Microscopie Electronique** en Transmission Haute Résolution (**METHR**) de NDs initiaux (a), NDs après 1h (b) et 8h (c) **de** recuit sous vide à 750°C. Les plans diamants (111) et graphitiques (001) sont indiqués par les lignes blanches et grises, respectivement. Les **reconstructions** de surface graphitiques sont indiquées par des flèches blanches. La barre d'échelle est de 5 nm.

Figure 3 : Spectres de **Spectroscopie de Photoélectrons X (XPS)** du niveau de cœur du carbone (C1s) des NDs initiaux (ND-initial), NDs après 1h (ND-1h), 5h (ND-5h) et 8h (ND-8h) de recuit sous vide à 750°C.

Figure 4 : Evolution du potentiel Zeta des NDs-1h, ND-5h, ND-8h et NDs hydrogénés (ND-H) dans l'eau uitrapure en fonction du pH.

Figure 5 : Distribution en taille des protéines **du** milieu **DMEM + 10%** de sérum de veau **fœtal (SVF)** (noir), des **NDs-5h** dans l'eau déionisée (bleu), dans le **MEM juste** après ajout (vert) et après 5h (rouge). Les mesures sont effectuées à 37°C.

Figure 6 : Cliché METHR de nanodiamants hydrogénés (a) et **graphitisés** en surface (b). Les plans (111) du diamant sont **surlignés** en plan et les reconstructions graphitiques de surface sont indiquées par les **flèches** blanches. La barre d'échelle est de 5 nm.

Figure 7 ; Spectres XPS du niveau de cœur **du** carbone (C1s) de nanodiamants hydrogénés après dispersion dans l'eau (a) et après une heure de recuit sous vide à 400°C (b).

Figure 8 : Spectres de Spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier (FTiR) de NDs initiales (ND initial), NDs-G après 1h (ND-1h) et 8h (ND-8h) de recuit sous vide.

Figure 9 : Réponse cellulaire de la lignée Oaki-İ après exposition aux NDs-COOH sans irradiation.

Figure 10 : Réponse cellulaire de la lignée Caki-1 après exposition aux NDs-COOH après une irradiation de 4 Gy.

Figure 11 : Réponse cellulaire de la lignée Caki-1 après exposition aux NDs-H sans irradiation.

Figure 12 : Réponse cellulaire de la lignée Caki-1 après exposition aux NDs-H après une irradiation de 4 Gy.

Figure 13 : Evolution des cellules Caki-1 après exposition aux NDs-COOH et NDs-H , sans irradiation.

Figure 14 : Evolution des cellules Caki-1 après exposition aux NDs-COOH et NDs-H, après une irradiation de 4 Gy.

Figure 15 : Stress oxydant induit par les NDs-H avec ou sans irradiation. Le témoin sans sonde illustre le fond de luminescence n'étant pas lié aux radicaux libres. L'autre témoin est exposé à la sonde fluorescente mais pas aux NDs-H. Les barres grises représentent l'intensité du stress oxydant dans les cellules non irradiées, et les barres blanches l'intensité du stress oxydant dans les cellules ayant subi un rayonnement de 4 Gy, une heure après cette irradiation.

Figure 16 : Internalisation d'une sonde d'acide nucléique peptidique marquée avec le fluorophore Cy3 (ANP-Cy3) adsorbée à la surface de ND-H. Les observations ont été réalisées après 24h (A) ou 72h (B) d'incubation de cellules Caki en présence d'un mélange ND-H/ANP-Cy3. Les noyaux cellulaires ont été marqués au bisbenzimidazole Hoechst 33342.

Figure 17 : Complexe nanoparticule de diamant / radiosensibilisant.

Figure 18 : Principe de fonctionnement. a) incorporation du complexe nanodiamants (NP)/radiosensibilisants dans une cellule, b) libération des radiosensibilisants et inhibition des défenses de la cellule, c) génération d'électrons et formation de radicaux libres sous irradiation.

EXEMPLES

Exemple 1 : Production de nanodiamants (NDs) avant des reconstructions de surface graphitiques ou des fonctions hydrogénées en surface

Les NDs ayant des propriétés utiles pour la radiosensibilisation de cellules tumorales ont été modifiés par des traitements particuliers permettant la formation de reconstructions graphitiques (graphitisation) ou de fonctions hydrogénées de type CH avec

x~1, 2 ou 3 (hydrogénation). Des NDs comportant une combinaison de ces deux types de terminaisons de surface peuvent également être utilisés dans le cadre de la présente invention. Les méthodes décrites ci-dessous sont celles utilisées par les inventeurs pour l'hydrogénation (par plasma d'hydrogène assisté par micro-ondes) et la graphitisation (par recuit sous vide à haute température ou par exposition aux micro-ondes sous vide de NDs hydrogénés), mais ces terminaisons de surface particulières peuvent *a priori* être obtenues également par d'autres méthodes. Il est à noter que les conditions exposées sont à adapter en fonction de la chimie de surface initiale des NDs, qui peut varier d'un fournisseur de nanodiamants à l'autre. Les traitements décrits ici ont été optimisés pour des NDs de détonation produits par le Nanoearbon Institute au Japon (Prof. Eiji Osawa).

1.1. Hydrogénation par plasma d'hydrogène assisté par micro-ondes

1.1.1. Mode opératoire

La méthode utilisée pour conférer des terminaisons hydrogénées aux NDs est décrite dans la référence de Girard *et al.*, 2010. Les NDs (environ 50-100 mg) sont introduits en voie sèche dans une cartouche en quartz, ou bien directement dans un tube en quartz, qui est inséré de façon perpendiculaire dans un guide d'onde connecté à un générateur de micro-ondes à 2.45 GHz (Sairem), comme présenté sur la figure 1. Le guide d'onde est refroidi à l'eau et le tube est refroidi à l'air comprimé. Ce tube est relié à un dispositif de pompage primaire et d'approvisionnement en hydrogène haute pureté N9.0 et argon gazeux.

Dans un premier temps, une série de purges sont réalisées via un pompage primaire dans le tube (pression < 0.1 mbar) et remise sous pression par de l'hydrogène haute pureté, puis l'hydrogène haute pureté est injecté jusqu'à atteindre une pression stabilisée à 12 mbar. Cette pression est soit maintenue tout au long du processus d'hydrogénation par isolation du tube (mode statique), soit maintenue par l'association d'un flux continu d'hydrogène et d'une vanne de régulation de pression sous consigne (mode dynamique). Une puissance micro-ondes de 300 W est utilisée pour induire la création d'un plasma dans le tube. La géométrie des micro-ondes dans le guide d'ondes est adaptée pour obtenir une puissance absorbée par le plasma maximale et une puissance réfléchie nulle au niveau du générateur. Le tube est régulièrement tourné et translaté manuellement afin de s'assurer que la majorité des NDs sont exposés au plasma. La durée normale d'exposition est de 20-30 min. Afin d'obtenir une hydrogénation complète, il est important d'effectuer une purge après 5 min de traitement afin d'évacuer des espèces oxydées désorbées de la surface des NDs : après arrêt des micro-ondes, le tube est pompé en vide primaire, puis de l'hydrogène pur est réintroduit dans le tube pour initier de nouveau la formation d'un plasma. Cette purge intermédiaire n'est pas utile dans le cas d'une hydrogénation sous flux dynamique d'hydrogène. A la fin du traitement, le tube est refroidi sous hydrogène jusqu'à ce qu'il soit à la température ambiante, puis le gaz résiduel est pompé. Le tube est remis à pression ambiante par introduction d'argon, puis les NDs peuvent être récupérés.

i.1.2. Caractérisation

Des caractérisations détaillées des propriétés de surface des NDs hydrogénés préparés de cette manière ont été publiées (Girard *et al.*, 2010 ; Girard *et al.*, 2011 ; Arnault *et al.*, 2011). La chimie de surface y est étudiée par spectroscopies d'électrons (XPS), infrarouge (FTIR) et Raman. De plus, trois greffages dont la sélectivité sur films de diamant hydrogénés est connue ont été appliqués à ces nanodiamants hydrogénés ; une sélectivité équivalente vis-à-vis de la présence des terminaisons hydrogénées des nanodiamants a été démontrée. Ceci montre en particulier que ces NDs présentent des propriétés d'affinité électronique négative (Girard *et al.*, 2011). Ces propriétés sont à l'origine de leur utilisation pour générer des radicaux libres dans l'eau (voir exemple 2).

1.2. Graphitisation de NDs hydrogénés par exposition micro-ondes

Les NDs hydrogénés selon le procédé décrit ci-dessus peuvent être graphitisés à la suite de leur hydrogénation, *in situ*, par une simple ré-exposition à des micro-ondes sous vide primaire. En effet, les inventeurs ont observé que les NDs hydrogénés ont la capacité d'absorber les micro-ondes sous vide. Ainsi, en adaptant la géométrie de la cavité micro-onde, la plupart de la puissance micro-onde (les inventeurs ont utilisé 300 W pour 100 mg de NDs) est absorbée par les NDs et est convertie en chaleur. Une exposition de quelques secondes est suffisante pour permettre une élévation très rapide de la température des NDs, induisant la formation de reconstructions graphitiques en surface, comme cela se produit dans un procédé de graphitisation classique par recuit à haute température (voir ci-dessous). Une exposition supérieure à 1 minute, en revanche, conduit à la formation de nanoparticules entièrement graphitiques où le cœur diamant a totalement disparu. Cette méthode peut être une alternative aux recuits sous vide à haute température dont le protocole expérimental est détaillé dans le paragraphe qui suit.

1.3. Graphitisation de surface des nanodiamants par recuit sous vide

7.5. /. Mode opératoire

La surface des nanodiamants peut être graphitisée par recuit sous vide à haute température (entre 700°C et 900°C) (Petit *et al.*, 2011). Ces recuits sous vide sont effectués dans une chambre à parois métalliques dédiée, équipée d'un élément chauffant en carbure de silicium permettant d'atteindre des températures supérieures à 1000°C et un système combiné de pompage primaire et turbomoléculaire permettant l'obtention d'un vide secondaire dans la chambre (de l'ordre de 10^{-7} mbar).

Entre 50 et 100 mg de NDs en voie sèche sont déposés dans un creuset en alumine muni d'un couvercle du même matériau, qui est alors placé sur l'élément chauffant à l'intérieur de la chambre. Durant le recuit, la température du creuset est mesurée par une caméra infrarouge (FUR SC300) au préalable calibrée d'après l'émissivité du creuset tandis que la température de l'élément chauffant est estimée avec un thermocouple. La chambre est ensuite pompée à température ambiante jusqu'à l'obtention d'une pression inférieure à $5 \times$

10^{-7} a bar), puis la température de l'élément chauffant est progressivement augmentée jusqu'à 1000°C (correspondant à 750°C pour le creuset), en maintenant la pression dans la chambre inférieure à 5×10^6 mbar. Une fois la température stabilisée, le creuset est laissé à température constante pour une durée déterminée, puis la température de l'élément chauffant est progressivement réduite jusqu'à la température ambiante. Le creuset est ainsi refroidi sous vide. Une fois ramené à température ambiante, l'enceinte du réacteur est remise à pression atmosphérique sous air, permettant la sortie du creuset. Les NDs peuvent alors être récupérés pour être remis en suspension.

1.3.2. Caractérisations

Typiquement, un recuit à 750°C pendant une heure est suffisant pour obtenir la formation de reconstructions graphitiques en surface, mais des recuits plus longs peuvent être utilisés pour augmenter le taux de couverture de la surface par ces reconstructions graphitiques. Des températures supérieures à 900°C induisent une graphitisation du cœur du diamant, la graphitisation limitée à la surface des NDs est donc difficilement contrôlable au-dessus de 900°C.

La graphitisation des NDs est validée par microscopie électronique en transmission haute résolution (METHR) après 1h et 8h de recuits sous vide à 750X, correspondant à la température du creuset (Figure 2). Les clichés permettent d'observer les modifications de la structure atomique induites par les recuits. Cette graphitisation est aussi validée par l'analyse de la chimie de surface par spectroscopie de photo-électrons X (XPS). En effet, une composante liée au carbone hybridé sp^2 apparaît après recuit sous vide à basse énergie de liaison par rapport au carbone hybridé sp^3 (Figure 3).

Exemple 2 : Mise en suspension des NDs modifiés dans l'eau

Les NDs hydrogénés et/ou graphitisés sont ensuite mis en suspension colloïdale dans de l'eau ultrapure (18.2 MΩ.cm à 25°C) en utilisant une sonde plongeante de sonification (Hielscher UP400S) de 300 W fonctionnant à une fréquence de 24 kHz. Les NDs sont initialement introduits dans une solution d'eau ultrapure à une concentration de l'ordre de 5 à 10 mg/ml pour être ensuite exposés aux ultrasons pendant au minimum 2h. A la suite du procédé de sonification, et afin de séparer de la suspension les plus gros agrégats non dispersables, les suspensions sont centrifugées à 4800 tours/minute pendant 1h. Seul le surnageant est récupéré. Le diamètre hydrodynamique des NDs en suspension est mesuré par diffusion dynamique de la lumière (DDL) par un équipement dédié. La mesure du potentiel Zeta caractéristique de la charge de surface des nanodiamants en solution est effectuée sur le même équipement (Nanosizer ZS, Maivern) complété d'un module de titration automatique (MPT-2, Maivern) afin d'effectuer des mesures en fonction du pH.

Les suspensions ainsi obtenues sont constituées d'agrégats de NDs dont le diamètre hydrodynamique est inférieur à 50 nm et présentent un potentiel Zeta positif dans

l'eau ultrapure sur une large gamme de pH, comme indiqué pour des NDs recuits sous vide 1h (ND-1h), 5h (ND-5h) et 8h (ND-8h) sur la figure 4. Une évolution similaire de la charge de surface est observée sur les NDs hydrogénés. En particulier, le potentiel Zeta élevé à pE physiologique permet d'assurer une bonne stabilité colloïdale des NDs modifiés dans cette

Ces NDs sont stables plusieurs mois dans l'eau mais aussi en milieu biologique comme l'illustre l'évolution du diamètre hydrodynamique des NDs-5h dans un milieu constitué de MEM (Minimal Essential Media) et de 10% de sérum de veau fœtal, mesuré par DDL (Figure 5). Après plus de 6 mois dans l'eau, un diamètre moyen de 35 nm est détecté pour les NDs-5h. Après ajout dans le milieu [MEM + sérum] à une concentration de 0.5 mg/ml environ, le diamètre augmente à 144 nm, ce qui est attribué à l'adsorption de protéines du sérum chargées négativement sur la surface positive des NDs. Après 5h d'incubation à 37°C, le diamètre est réduit à 121 nm, ce qui montre qu'il n'y a pas d'effet significatif d'aggrégation au cours du temps en milieu biologique.

Exemple 3 ; Génération de radicaux libres à partir des nanodiamants (NDs) hydrogénés (NDs-H)/graphitisés (NDs-G)

L'effet d'amplification de la génération de radicaux libres à proximité des NDs-H/G est basé sur deux propriétés physiques : la forte densité d'atomes de carbone (de l'ordre de 10000 atomes pour un nanodiamant de 5 nm de diamètre) dans les NDs, permettant d'absorber efficacement les rayonnements, et leur capacité à transférer efficacement les électrons du cœur diamant à des espèces oxygénées fixées en périphérie des NDs.

L'absorption des rayonnements ionisants est beaucoup plus importante dans les NDs que dans les tissus environnants à cause de la forte densité atomique du diamant ($=1.8 \times 10^{23} \text{ at.cm}^{-3}$). En effet, la distance entre deux plans atomiques d'orientation (111) de la maille diamant est de 0.206 nm, comme l'illustre le cliché de microscopie électronique en transmission haute résolution (METHR) présenté sur la figure 6. Sous rayonnement, une forte concentration de photoélectrons et d'électrons secondaires sont créés et sont libérés localement à la surface des NDs. En effet, la surface des NDs-H et NDs-G se comporte respectivement comme la surface de films de diamant hydrogénés ou celle d'un plan de graphène. Ces deux surfaces sont connues pour permettre un transfert d'électrons très efficace vers des molécules adsorbées en surface (Chakrapani *et al.*, 2007 ; Ryu *et al.*, 2010),

En parallèle, les NDs-H et NDs-G ont la possibilité d'adsorber efficacement des espèces oxygénées à leur surface. Ainsi, une forte concentration d'oxygène a été mesurée à la surface des NDs-H et NDs-G, représentant jusqu'à 6 % atomique d'après les spectres XPS, après dispersion dans l'eau ultra-pure. L'oxygène provient d'adsorption par des liaisons non covalentes de molécules d'eau ($\frac{3}{4}$) et de dioxygène ($<\frac{3}{4}$) ainsi que de liaisons covalentes C-O simple liaison pouvant être liées à des fonctions hydroxydes, éthers, époxydes

ou endoperoxides. Cet oxygène, lié de manière covalente à la surface des NDs, est caractérisé par la présence d'un épauement à haute énergie de liaison sur les spectres du niveau de cœur du carbone C1s par spectroscopie d'électrons X (XPS) présenté sur la figure 7a. En revanche, cet oxygène est faiblement lié puisque un recuit sous vide à 400°C permet de désorber la plupart de cet oxygène (Figure 7b). Par spectroscopie infrarouge (FTIR), après désorption des espèces adsorbées de manière non covalente par un recuit sous vide à 200°C, une importante bande à 1100 cm^{-1} a été observée, qui peut être liée à des fonctions de type éthers, époxydes ou endoperoxides (Figure 8), validant les résultats obtenus par XPS.

Ainsi, les électrons générés par irradiation sont transférés à ces molécules adsorbées sur la surface des NDs. Ces molécules étant des précurseurs de radicaux libres oxygénés (O_2 , $\text{HO}^\bullet$, $\frac{3}{4}\text{O}_2$, ...) le transfert d'électrons venant des NDs induit une forte production de radicaux libres à la surface des NDs. Il est à noter que de l'azote a aussi été mesuré par XPS : il est donc possible que des molécules azotées soient aussi adsorbées à la surface des NDs, impliquant la génération de radicaux libres azotés.

L'adsorption d'oxygène sur la surface induit un potentiel Zeta positif des NDs-H et NDs-G, assurant une bonne stabilité colloïdale par stabilisation électrostatique, même en milieu biologique. L'environnement biologique où se trouvent les NDs est donc directement exposé aux radicaux libres générés à la surface des NDs.

Exemple 4 : Index cellulaire et stress oxydatif mesuré dans la lignée tumorale Caki-1, sous Irradiation gamma en présence de NDs-COOH et NDs-H

L'effet radiosensibilisant des nanodiamants a été étudié sur une Lignée tumorale du rein Caki-L, connu pour être particulièrement radorésistante. Des cellules exposées à des NDs-COOH et NDs-H à 3 concentrations (10, 100 et 500 $\mu\text{g/ml}$), ainsi que des cellules sans NDs ont subi à un rayonnement de 4 Gray (Gy).

L'évolution de l'index cellulaire, caractéristique de réponse globale des cellules (morphologie, adhésion, viabilité, ...), a été suivi en temps réel sur 120h après irradiation par impédance-métrie en utilisant le système xCELLigence (Roche).

Le stress oxydatif a ensuite été évalué par observation des cellules par microscopie optique et quantifié par cytométrie en flux.

4.1. Résultats sur les NDs-COOH

Après exposition aux NDs-COOH, l'index cellulaire évolue de manière équivalente jusqu'à 48h pour les concentrations de 10 et 100 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 9). Une très faible décroissance est observée à 100 $\mu\text{g/ml}$ pour des temps plus longs. En revanche, l'index cellulaire est fortement diminué pour la concentration 500 $\mu\text{g/ml}$.

Ces résultats montrent que les NDs-COOH ne sont pas toxiques pour des concentrations inférieures à 100 $\mu\text{g/ml}$, mais qu'une certaine toxicité peut être observée à plus forte concentration. La toxicité dépend donc de la dose.

Après irradiation de 4 Gy, la croissance de l'index cellulaire du témoin montre que cette irradiation est trop faible pour créer une toxicité significative sans nanoparticules (Figure 10). En revanche, l'index cellulaire est divisé par 2 par rapport au témoin après une exposition aux NDs-COOH à une concentration de 10 µg/ml, voire plus pour les concentrations plus élevées.

Les NDs-COOH ont donc bien un effet radiosensibilisant, qui dépend de la dose de NDs-COOH injectée dans les cellules. De plus, ces NDs ne sont pas toxiques à des concentrations inférieures à 100 µg/ml.

4.2. Résultats sur les NDs-H

Le même protocole a été appliqué avec des NDs-H (Figures 11 et 12). Il est à noter que la toxicité des NDs-H est encore plus faible que les NDs-COOH puisqu'aucune toxicité n'est détectée même pour la concentration de 500 µg/ml, ce qui se serait traduit par une diminution de l'index cellulaire. La décroissance observée après 90h est probablement due à une saturation du signal détecté par impédance-métrie. due à la forte concentration de NDs-H utilisés. On observe en revanche une augmentation significative de l'index cellulaire, qui peut résulter, par exemple, d'une augmentation de taille des cellules après incorporation des NDs-H.

Après irradiation, le témoin suit la même croissance que dans le cas précédent. En revanche, avec la présence de NDs-H, la toxicité est très importante. L'index cellulaire est ainsi divisé par 3,4 pour une concentration de 10 µg/mL. La toxicité ne semble pas dépendre de la dose de NDs-H puisque une évolution similaire de l'index cellulaire est observée à des concentrations plus élevées. Ce résultat est cohérent avec une toxicité induite par un stress oxydatif à très faible concentration en NDs-H, uniquement sous irradiation.

4.3. Résultats liés au stress oxydatif

Dans un premier temps, le stress oxydatif a été évalué en observant la morphologie des cellules par microscopie optique.

Il n'y a pas d'évolution particulière au niveau des cellules témoins sans/avec irradiation. Après ajout de nanodiamants, on observe la formation de vacuoles (apparaissant avec un contraste blanc), caractéristiques d'une toxicité induite par stress oxydatif (Figure 13). Le nombre de vacuoles augmente avec le temps.

La concentration de vacuoles augmente significativement après irradiation dans les cellules exposées aux NDs (Figure 14), ce qui est en accord avec les résultats précédents.

Des mesures quantitatives du stress oxydatif ont été effectuées en mesurant la fluorescence d'une sonde sensible aux radicaux libres oxygénés (2',7'-dichlorofluorescein) par cytométrie en flux. Une fois exposées aux différentes conditions expérimentales (NDs-H, irradiation, NDs-H + irradiation), les cellules ont été détachées de leur support de culture, remises en suspension, puis incubées 10 minutes en présence de cette sonde. Une fois entrée

dans les cellules, la sonde peut rester sous forme réduite non fluorescente ou s'oxyder et donc émettre un signal fluorescent. L'intensité de fluorescence est directement liée à la quantité de radicaux libres oxygénés, ce qui permet une quantification relative sur stress oxydatif (Chen et al., 2010). Cette méthode permet la mesure de radicaux libres oxygénés total intracellulaire, contrairement à la mesure de protéines oxydées par exemple.

Les résultats obtenus sur la Figure 1.5 montrent que :

- Pour les cellules exposées aux NDs-H et non irradiées, le stress oxydant induit dépend de la concentration. Il est doublé pour une concentration en NDs-H de 100 µg/ml.
- Pour les cellules irradiées et non exposées aux NDs-H, le stress oxydant est, à 1h après irradiation, identique à celui des cellules non irradiées, non exposées aux NDs-H.
- Pour les cellules exposées aux nanoparticules et irradiées, le stress oxydant est triplé par rapport à la référence sans NDs-H mais cette augmentation n'est pas dépendante de la dose de NDs-H.

Il y a donc apport de radicaux libres dans les cellules après incorporation des NDs-H, mais ces radicaux libres induisent une toxicité significative par stress oxydant uniquement après irradiation d'après révélation de l'index cellulaire. La génération de radicaux libres est entretenue par les NDs-H puisque même une heure après irradiation, le stress oxydant est plus élevé que sans irradiation, ce qui n'est pas le cas du témoin.

4.4. Conclusions

Les nanodiamants ont donc un effet radiosensibilisant qui permet d'amplifier l'effet des radiations en générant une création plus importante de radicaux libres. Une simple exposition à une dose normalement insuffisante pour induire la mort des cellules tumorales permet une mort par stress oxydatif quand les cellules ont été préalablement exposées aux NDs. Les cellules exposées aux NDs peuvent donc être traitées sélectivement. Les NDs sont particulièrement intéressants car ils ne génèrent pas de toxicité en absence de rayonnement et les cellules non irradiées ne seront pas affectées par la présence de NDs. La toxicité initiale est réduite et l'effet radiosensibilisant amplifié pour des NDs-H, qui sont donc particulièrement intéressants.

Exemple 5 : Utilisation de nanodiamants hydrogénés pour vectoriser des molécules biologiques dans les cellules

Afin de vérifier la capacité des nanodiamants hydrogénés (ND-H) à lier et transporter des molécules d'intérêt biologique dans les cellules, des particules de ND-H ont été mélangées à un volume égal d'une sonde télomérique constituée d'acide nucléique peptidique (ANP, ou **Protein Nucleic acid Analogue, PNA**, en anglais), marquée avec le fluorophore Cy3. Les concentrations finales dans le mélange étaient de 64,52 µg/cm³ pour les ND-H et 0,5645 µM pour la sonde ANP-Cy3. La sonde ANP-Cy3 a été dénaturée par chauffage à 80°C pendant 5 minutes avant d'être mélangée aux ND-H.

Après une incubation de 10 minutes à température ambiante, le mélange de NDs-H et de sonde ANP-Cy3 a été exposé à des cellules Caki-1 en culture (dans des plaques 8 puits Labtek). Les cellules ont été maintenues en présence du mélange pendant 24h et 72h, dans des conditions standard de culture cellulaire. Les noyaux cellulaires ont ensuite été marqués avec un marqueur fluorescent (Hoechst 33342), et les plaques ont été observées directement à l'aide d'un microscope à fluorescence inversé. Pour le marquage nucléaire, le filtre d'excitation/émission était ~350nm/460nm, et pour le marquage du ANP-Cy3, de 550nm/570nm.

L'internalisation de la sonde de ANP-Cy3 a été observée uniquement dans le cas où les particules de ND-H avaient été mélangées avec cette sonde. En l'absence de ND-H, la sonde ANP-Cy3 n'a pas été internalisée (Figure! 6).

Ces résultats démontrent la capacité des ND-H à lier une sonde ANP-Cy3 et à la transporter dans les cellules. La molécule internalisée ici n'a pas d'activité cytotoxique majeure, mais elle est chimiquement similaire à des molécules cytotoxiques telles que celle utilisée à l'exemple 6 ci-dessous, qui permettra d'obtenir une synergie avec l'activité cytotoxique des ND-H soumis à des radiations. En outre, cette sonde est moins chargée (négativement) que les molécules cytotoxiques d'intérêt thérapeutique qui pourront être utilisées en clinique. Ces molécules plus chargées négativement s'adsorberont plus facilement à la surface des ND-H et seront plus efficacement vectorisées dans les cellules. Ces résultats démontrent donc la capacité des ND-H à vectoriser à l'intérieur des cellules des molécules cytotoxiques d'intérêt thérapeutique telles que des acides nucléiques ou des ANP.

Exemple 6 : Utilisation de complexes nanodiamants/ARN interférents radiosensibilisant pour le traitement de tumeurs

Des nanodiamants (taille primaire de 5 nm) sont préparés afin d'avoir un potentiel Zeta positif selon les procédés décrits ci-dessus. Pour les NDs hydrogénés et/ou graphitisés, une étape de sonification dans l'eau permet à la fois de disperser les nanodiamants et d'adsorber efficacement des molécules (H_2O , O_2 et NO; principalement) sur leur surface, leur conférant ainsi une charge de surface positive.

Des ARNs interférents POLQ, ayant la capacité d'inhiber les ARN messagers codant pour la polymérase θ , permettant la réparation de l'ADN dans certaines cellules tumorales (le gène POLQ est surexprimé dans les cancers du sein les plus agressifs par exemple) sont adsorbés sur la surface des nanodiamants. Les ARNs ayant une charge négative de surface, peuvent être adsorbés par interaction électrostatique sur la surface des nanodiamants chargés positivement par simple addition des ARNs dans la suspension de nanodiamants.

Ces complexes nanodiamants/ARNs sont ensuite injectés dans des cellules tumorales, où ils rentrent préférentiellement du fait de la perméabilité accrue des membranes

des cellules tumorales. Les ARNs interférants POLQ sont libérés progressivement dans les cellules tumorales et inhibent la synthèse des polymérases θ . Les cellules tumorales sont rendues plus sensibles aux radiations.

5 Les cellules tumorales sont irradiées par des rayons X, entraînant la libération de radicaux libres dans les cellules ayant internalisé les nanodiamants.

REFERENCES

- Arnault, X.-C.; Petit, T.; Girard, H.; Chavanne, A.; Gesset, C.; Sennour, M.; Chaigneau, M. Surface chemical modifications and surface reactivity of nanodiamonds hydrogenated by CVD plasma. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2011, 13, 11481-11487.
- Batsanov, S. S.; Gavrilkin, S. M.; Batsanov, A. S.; Poyarkov, K. B.; Kulakova, I. I.; Johnson D. W. and Mendis B. G., Giant dielectric permittivity of detonation-produced nanodiamond is caused by water, *Journal of Materials Chemistry*. 2012, 22, 11166-11172.
- Begg, A.C., Stewart, F.A. and Vens, C. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nature Review Cancer*, 2011, 11, 239-253.
- Girard, H. A.; Arnault, J. C. C.; Perruchas, S.; Saada, S.; Gacoin, T.; Boilot, J.-P. P.; Bergonzo, P. Hydrogenation of nanodiamonds using MPCVD: A new route toward organic functionalization. *Diamond and Related Materials*, 2010, 19, 1117-1123.
- Chakrapani, J. C. Angus, A. B. Andersen, S. D. Wolter, B. R. Stoner, G. U. Sumanasekera, Charge Transfer Equilibria Between Diamond and an Aqueous Oxygen Electrochemical Redox Couple, *Science*, 2007, 318, 1424-30.
- Chang, Y.-R.; Lee, H.-Y.; Chen, K.; Chang, C.-C.; Tsai, D.-S.; Fu, C.-C.; Fini, T.-S.; Tzeng, Y.-K.; Fang, C.-Y.; Han, C.-C.; Chang, H.-C. and Fann, W., Mass production and dynamic imaging of fluorescent nanodiamonds. *Nature Nanotechnology*, 2008, 3, 284-288.
- Chao, X.L, Perevedentseva, E., Chung, P.H., Liu, K.K., Cheng, C.Y., Chang, C.C. and Cheng, C.L., Nanometer-sized diamond particles as a probe for biolabeling. *Biophysical Journal*, 2007, 93, 2199-2208 (2)
- Chen M., Zhang X.-Q., Man H.B., Lam R., Chow E.K., Ho D., Nanodiamond Vectors Functionalized with Polyethylenimine for siRNA Delivery, *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2010, 1, 3167-3171.
- Chen, X.; Zhong, Z.; Xu, Z.; Chen, L.; Wang Y., 2% T-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy, *Free Radical Research*, 2010, 44 (6), 587-604.
- Girard, H. A.; Petit, T.; Perruchas, S.; Gacoin, T.; Gesset, C.; Arnault, X. C.; Bergonzo, P. Surface properties of hydrogenated nanodiamonds; a chemical investigation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2011, 13, 11517-11523.
- Cumis, F., G. Arrigoni, *et al.* Differential binding of drugs containing the NGR motif to CD13 isoforms in tumor vessels, epithelia, and myeloid cells *Cancer Research*, 2002, 62(3): 867-74.

Higgins, G.S., Prevo, R., Lee, Y.F., Heileday, T., Muschel, R.J., Taylor, S., Yoshimura, M., Hickson, I.D., Bernhard, E.J. and McKenna, W.G. A small interfering RNA screen of genes involved in DNA repair identifies tumor-specific radiosensitization by POLQ knockdown. *Cancer Research*, 2010, 70, 2984-2993.

5 Huang LC, Chang HC. Adsorption and immobilization of cytochrome c on nanodiamonds. *Langmuir*, 2004, 20 (14), 5879-84.

Jarre, G., Liang, Y., Betz, P., Lang, D. and Krueger, A., Playing the surface game-Diels-Alder reactions on diamond nanoparticles. *Chemical Communication (Cambridge)*, 2011, 47, 544-546.

10 Krüger A, Liang Y, Jarre G, Stegk J., Surface functionalisation of detonation nanodiamond suitable for biological applications. *Journal of Material Chemistry*, 2006, 11, 2322-2328.

Petit, T.; Arnault, J.-C.; Girard, H. A.; Sennour, M.; Bergonzo, P. Early stages of surface graphitization on nanodiamond probed by x-ray photoelectron spectroscopy. *Physical Review B*, 2011, 84, 233407.

15 Ryu, L. Liu, S. Berciaud, Y.-J. Yu, H. Lin, P. Kim, G. W. Flynn, L. E. Brus, Atmospheric Oxygen Binding and Field Doping in Deformed Graphene on a SiO₂ Substrate, *Nano Letters*, 2010, 10, 4944-4951.

20 Yang, K.; Zhang, S.; Zhang, G.; Sun, X.; Lee S.-T. and Liu, Z, Graphene in Mice: Ultrahigh In Vivo Tumor Uptake and Efficient Photothermal Therapy, *Nano Letters*, 2010, 10, 3318-3323.

REVENDICATIONS

1. Nanodiamant pour utilisation pour générer des radicaux libres à visée thérapeutique et/ou diagnostique.

5 2. Nanodiamant pour utilisation selon la revendication 1, dans laquelle la génération de radicaux libres est couplée à une génération de chaleur.

3. Nanodiamant pour utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que son diamètre moyen est inférieur à 10 nm.

10 4. Nanodiamant selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que sa surface a été au moins partiellement graphitisée et/ou hydrogénée.

5. Nanodiamant selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour utilisation en combinaison avec un rayonnement ionisant, pour générer des radicaux libres à visée thérapeutique et/ou diagnostique,

15 6. Nanodiamant selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que des radicaux libres oxygénés sont générés.

7. Nanodiamant selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que des radicaux libres azotés sont générés.

20 8. Nanodiamant selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour utilisation selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, caractérisé en ce que le rayonnement ionisant est un rayonnement électromagnétique.

25 9. Nanodiamant selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour utilisation selon la revendication 8, caractérisé en ce que le rayonnement électromagnétique est constitué de rayons X.

10. Nanodiamant selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour utilisation selon la revendication 8, caractérisé en ce que le rayonnement électromagnétique est constitué de rayons gamma.

30 11. Nanodiamant selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour utilisation selon la revendication 8, caractérisé en ce que le rayonnement électromagnétique est constitué d'ultra-violets.

12. Nanodiamant selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour utilisation selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, caractérisé en ce que le rayonnement ionisant est un rayonnement particulaire.

35 13. Nanodiamant pour utilisation selon la revendication 12, caractérisé en ce que le rayonnement particulaire est constitué de protons.

14. Nanodiamant pour utilisation selon la revendication 12, caractérisé en ce que le rayonnement particulaire est constitué de hadrons.

15. Nanodiamant selon Tune quelconque des revendications précédentes, pour utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour utilisation comme médicament destiné à la destruction de cellules cibles.

5 16. Nanodiamant selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour utilisation selon la revendication 15, caractérisé en ce que les cellules cibles sont des cellules cancéreuses.

17. Nanodiamant selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour utilisation selon Tune quelconque des revendications précédentes, pour utilisation pour traiter une tumeur solide.

10 18. Nanodiamant selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le nanodiamant est fonctionnalisé.

19. Nanodiamant selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il est lié à une molécule de ciblage,

15 20. Nanodiamant selon la revendication 19, caractérisé en ce que la molécule de ciblage est un ligand biologique reconnu par un récepteur surexprimé à la surface de certaines cellules.

21. Nanodiamant selon la revendication 20, caractérisé en ce que le ligand biologique est choisi dans le groupe constitué par un peptide, une protéine, un anticorps, un sucre, un ollgonucléotide, une molécule organique, et un complexe organometallique.

22. Nanodiamant selon la revendication 21, caractérisé en ce que le ligand biologique est choisi dans le groupe constitué par les peptides comportant le motif RGD ou le motif NGR.

23. Composition comprenant un nanodiamant selon l'une quelconque des revendications précédentes, ainsi qu'une molécule radiosensibilisante liée audit nanodiamant ou adsorbée à sa surface.

24. Composition selon la revendication 23, caractérisée en ce que la molécule radiosensibilisante est une molécule d'acide nucléique adsorbée à la surface du nanodiamant.

30 25. Composition selon la revendication 24, caractérisée en ce que la molécule d'acide nucléique est un ARN interfèrent capable d'inhiber l'expression d'un gène responsable de la réparation de l'ADN.

26. Composition selon la revendication 25, caractérisée en ce que l'ARN interfèrent inhibe l'expression du gène **POLQ**.

35 27. Composition selon la revendication 23, caractérisée en ce que la molécule radiosensibilisante est une molécule chimique radiosensibilisante.

28. Composition selon Tune quelconque des revendications 23 à 27, pour utilisation comme médicament, en combinaison avec un rayonnement.

29. Composition pour utilisation selon la revendication 28, caractérisée en ce que le rayonnement induit la production de radicaux libres à la surface du nanodiamant.

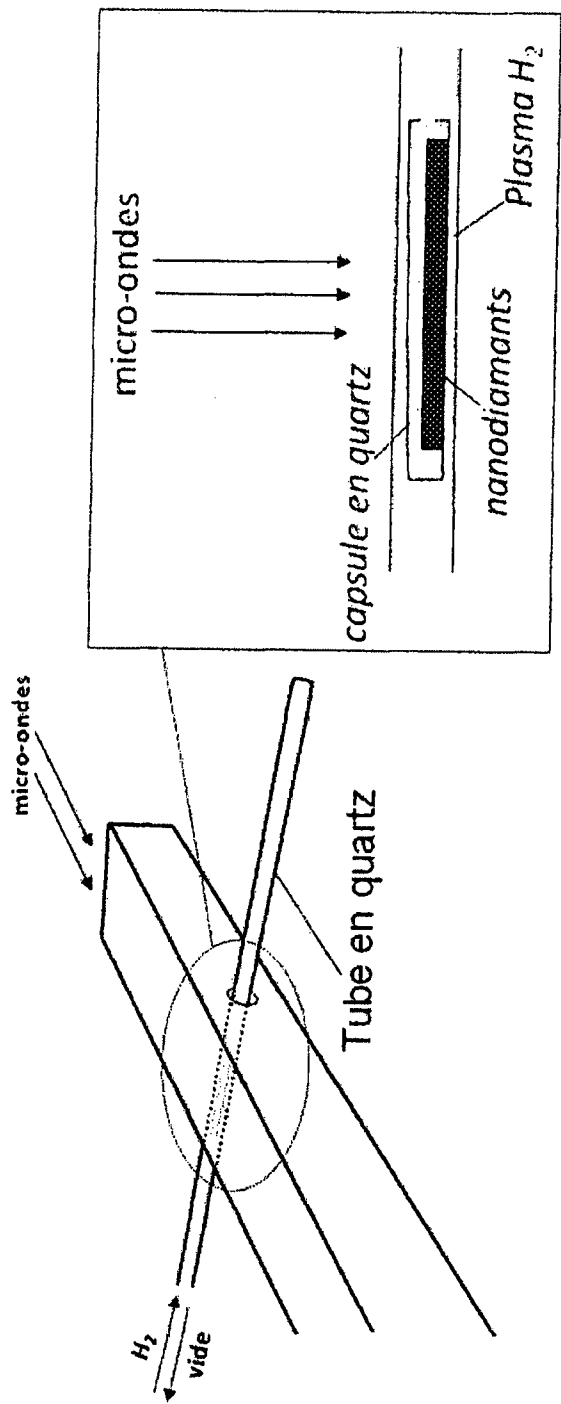


Figure 1

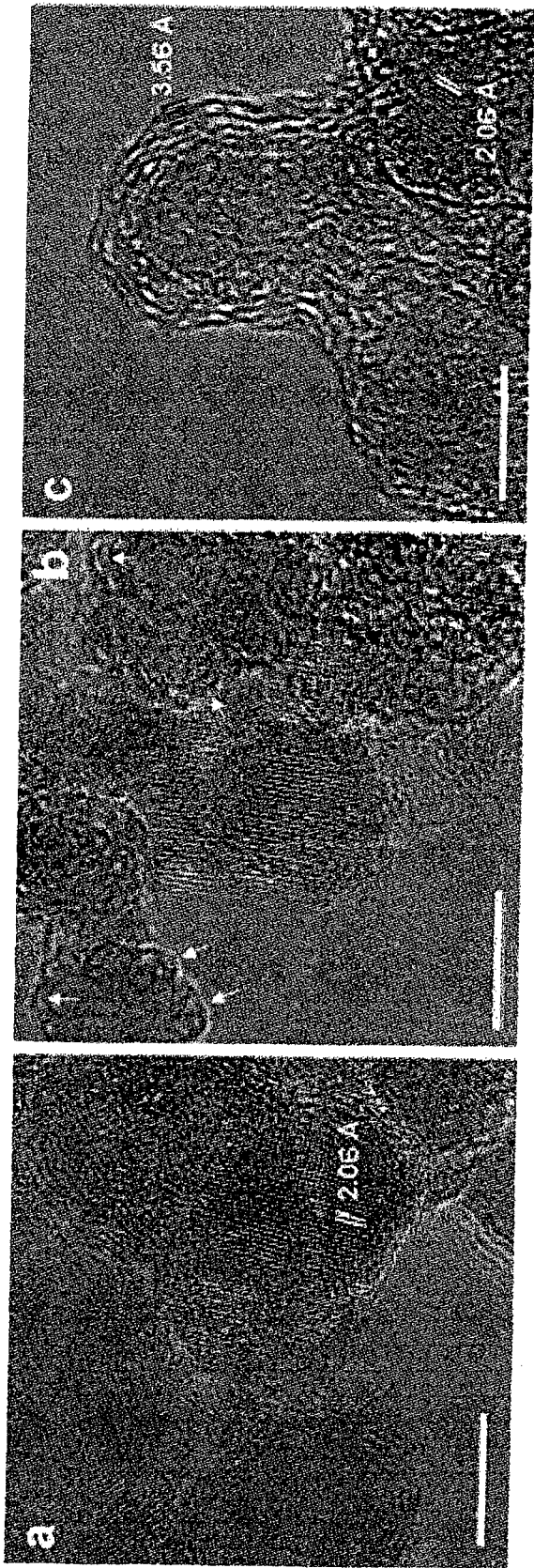


Figure 2

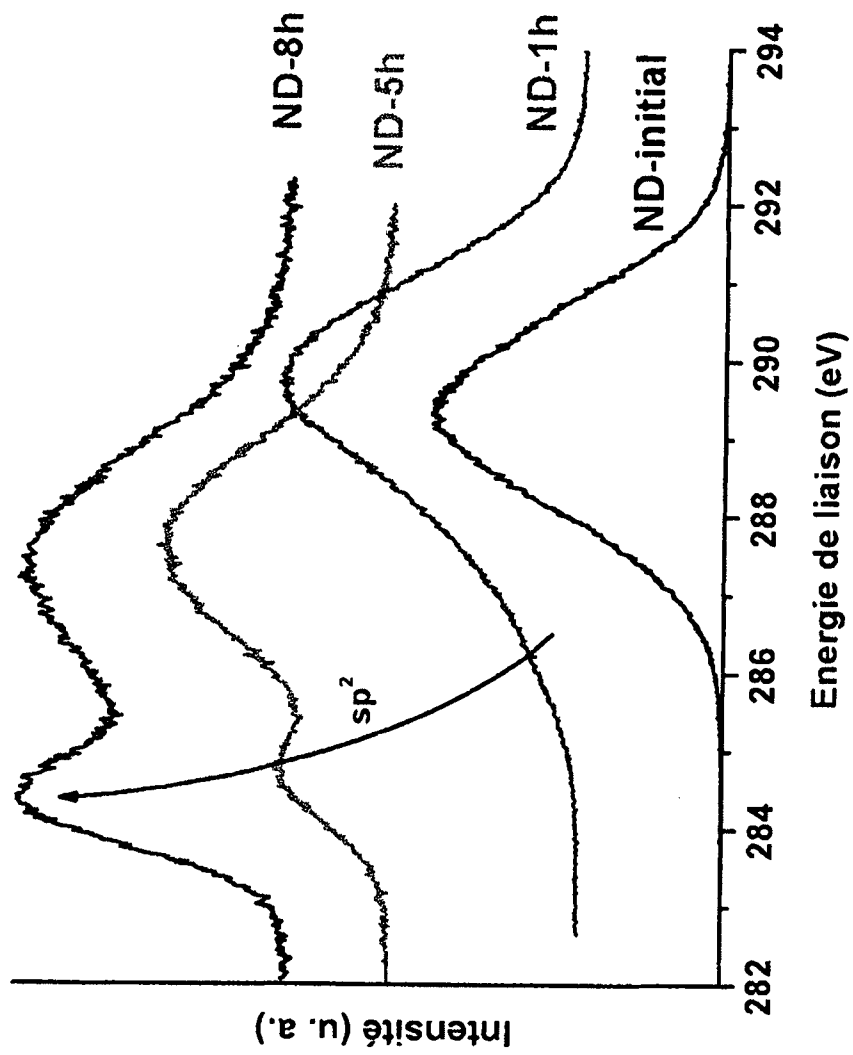


Figure 3

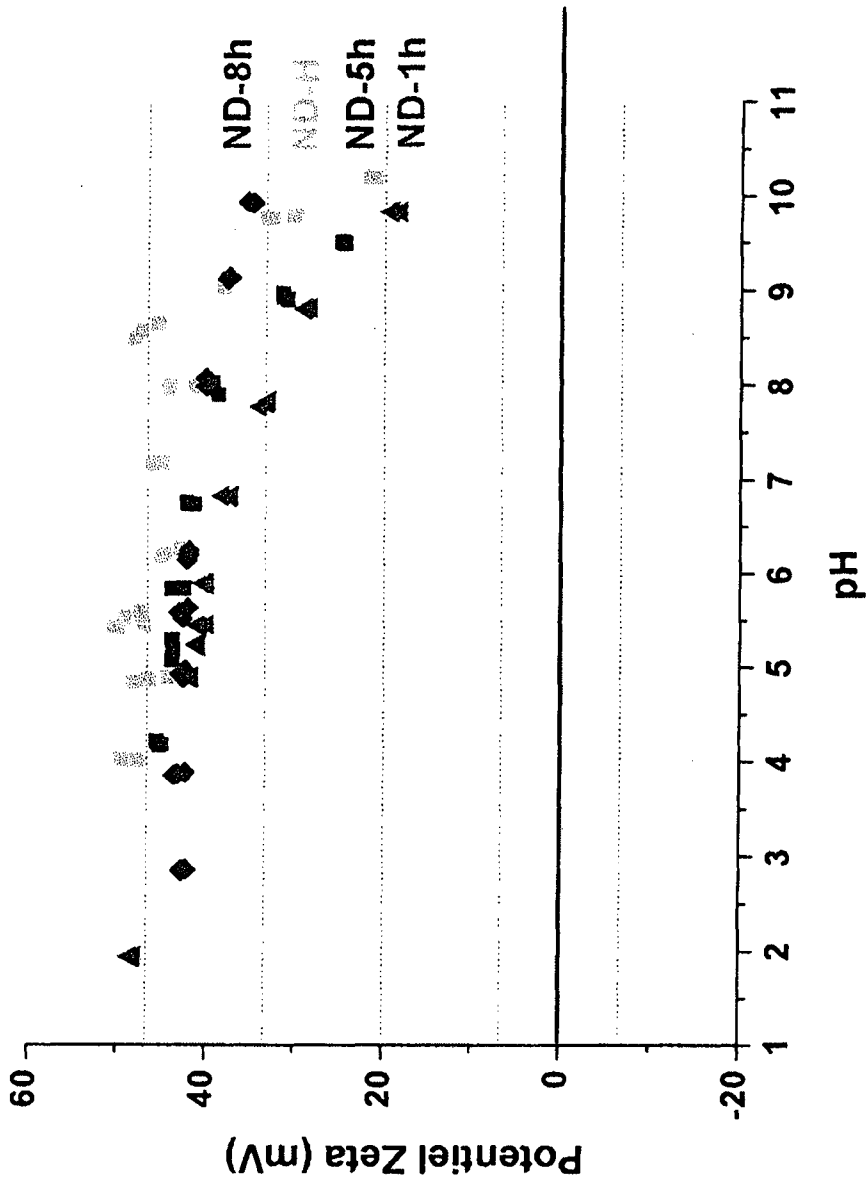


Figure 4

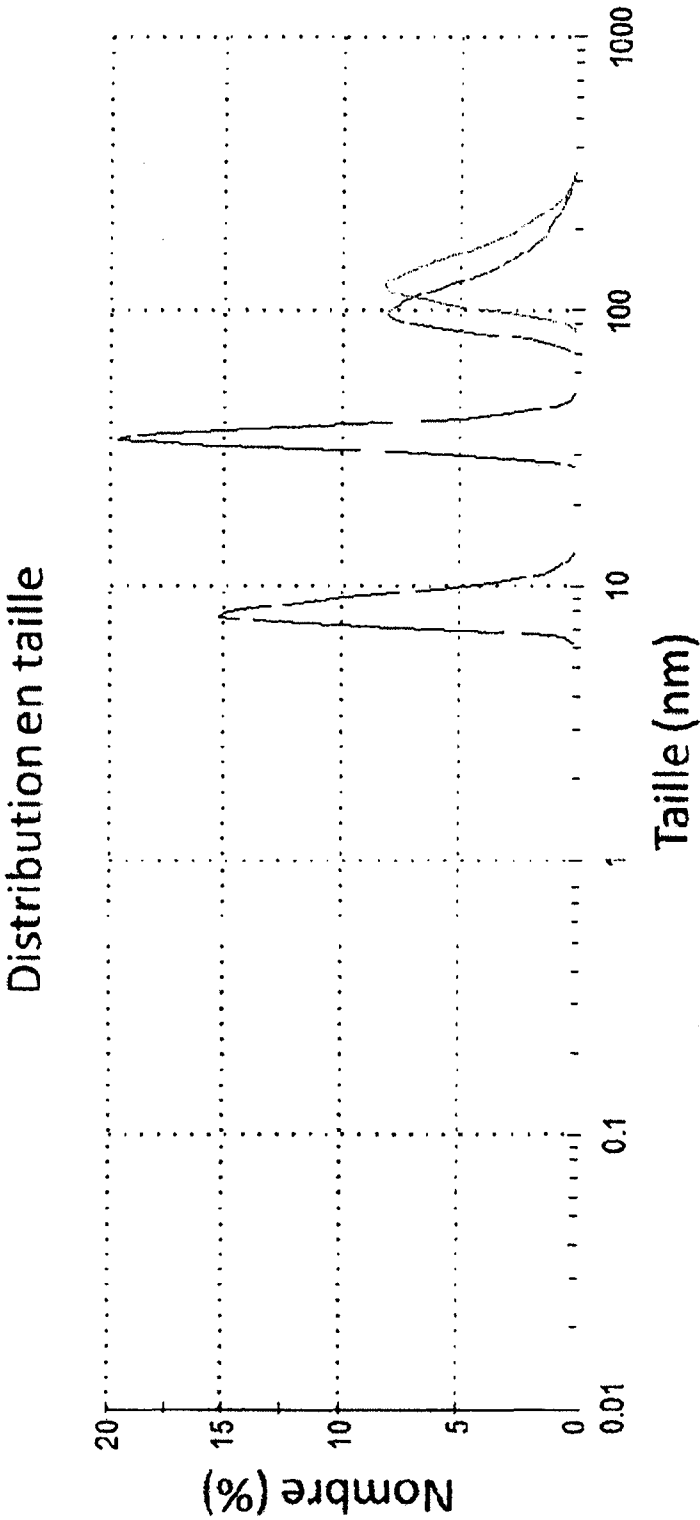


Figure 5

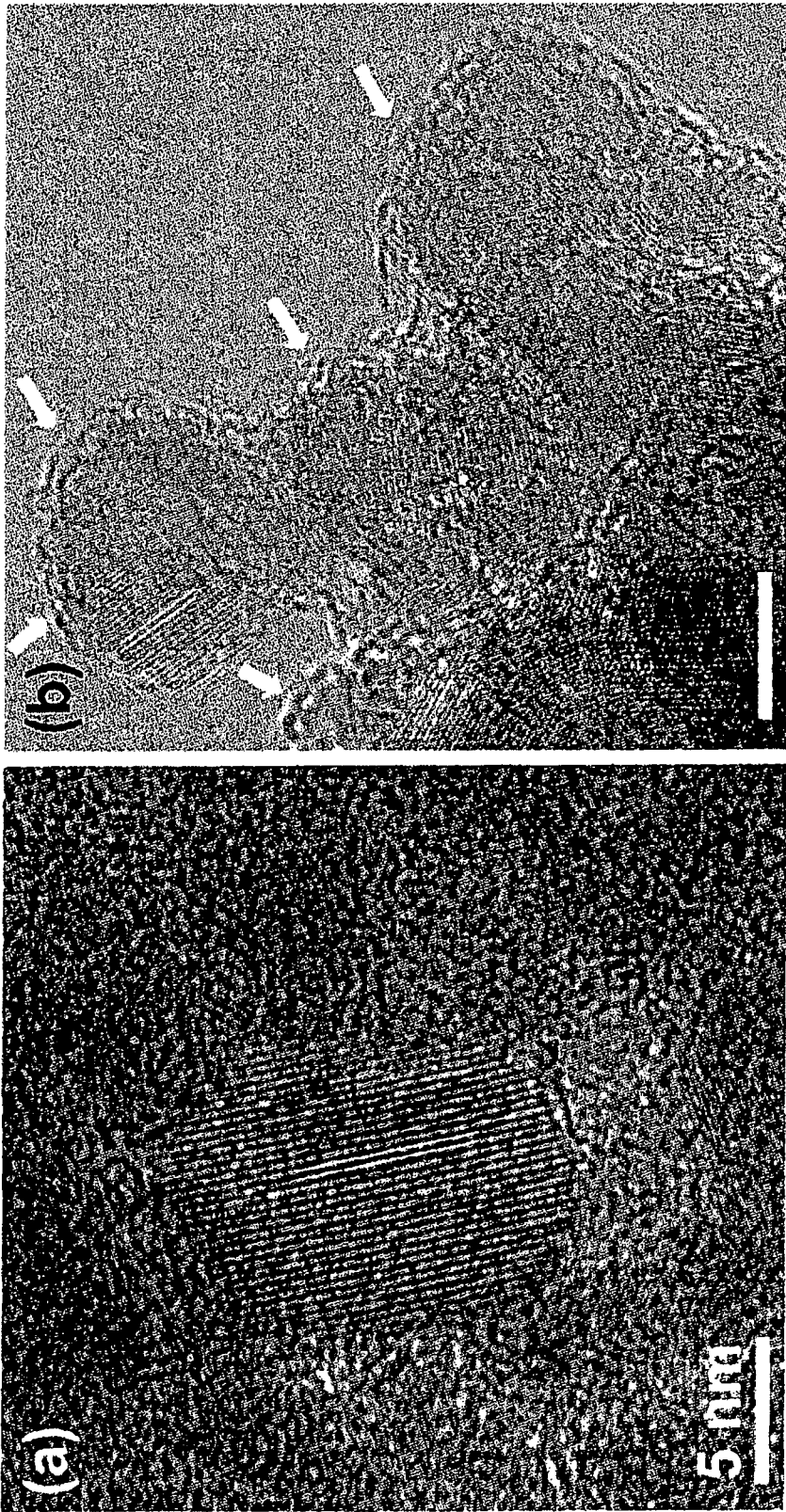


Figure 6

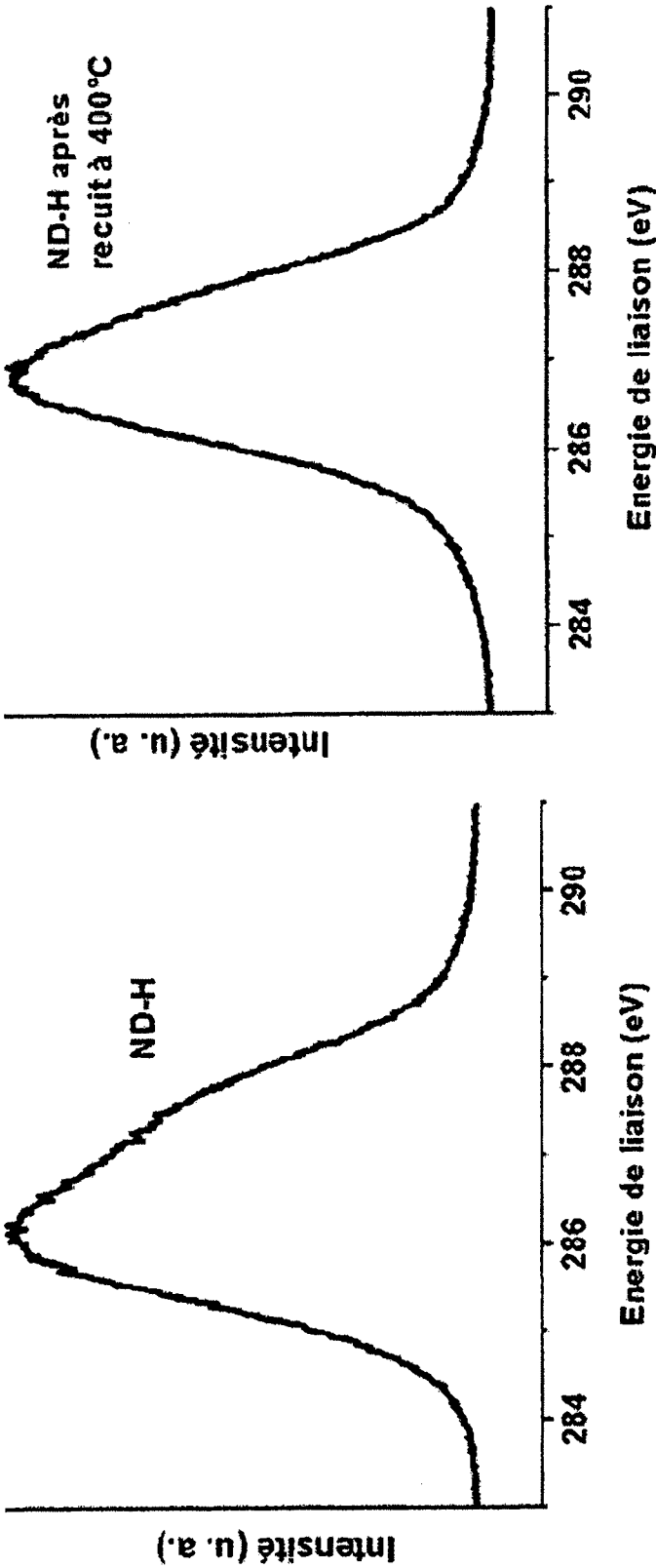


Figure 7

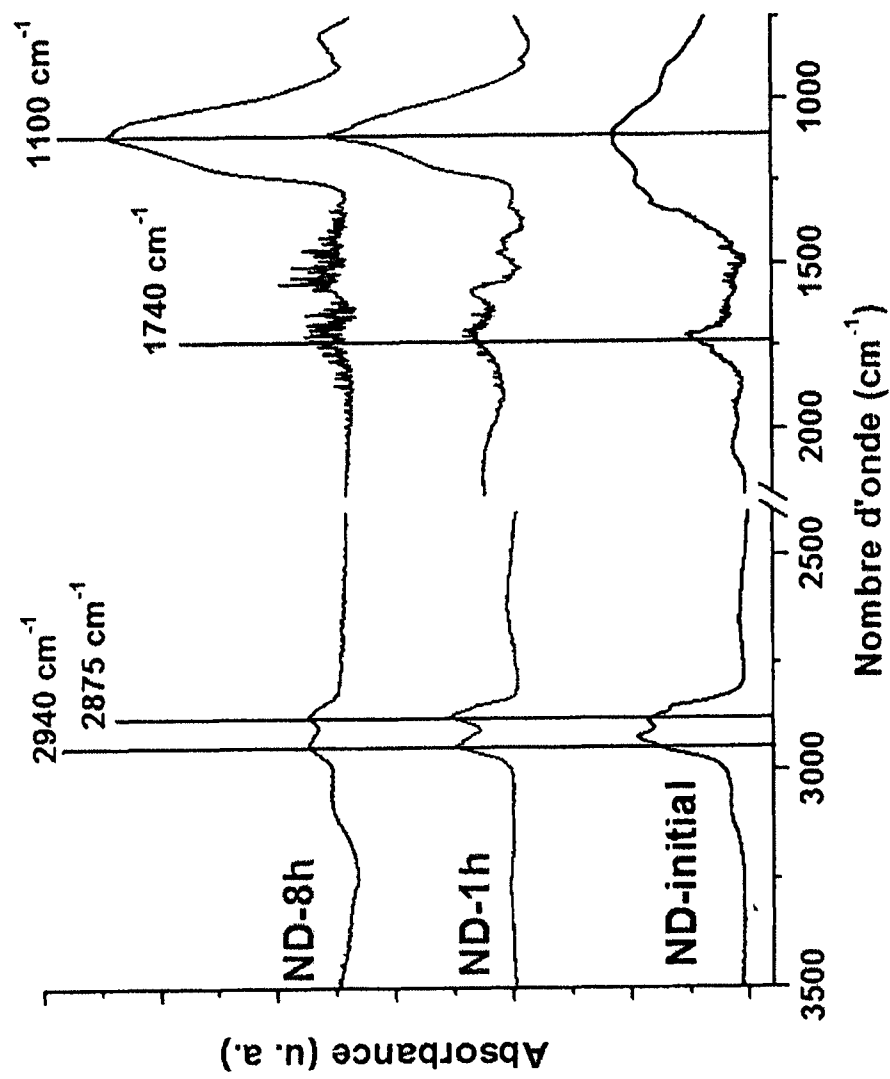


Figure 8

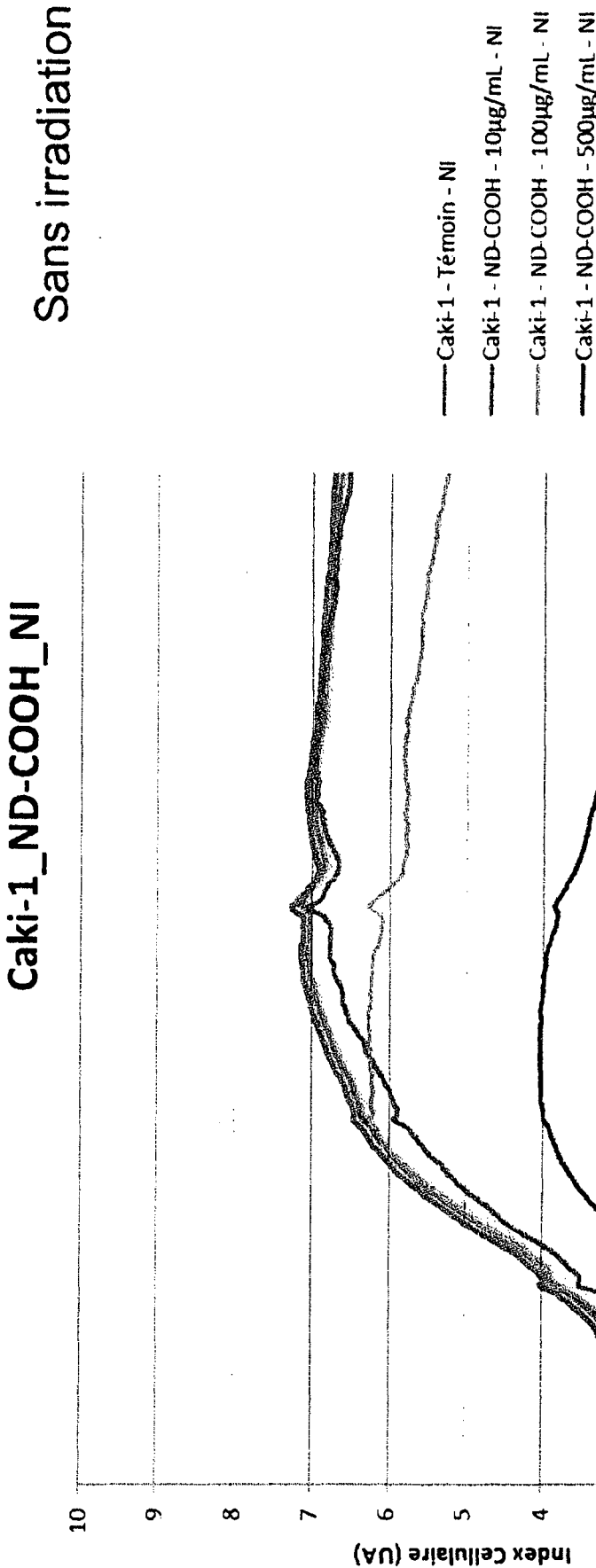


Figure 9

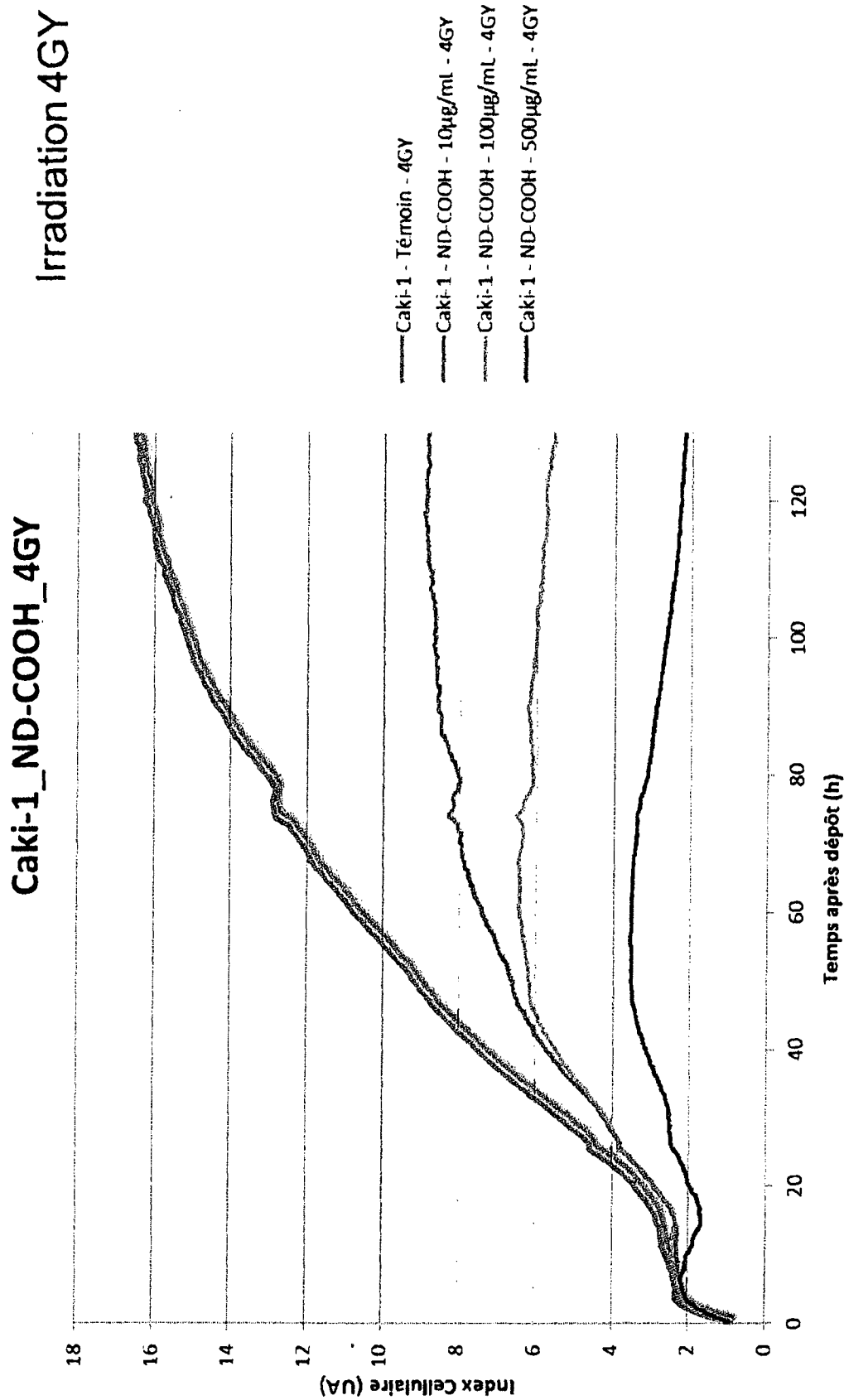


Figure 10

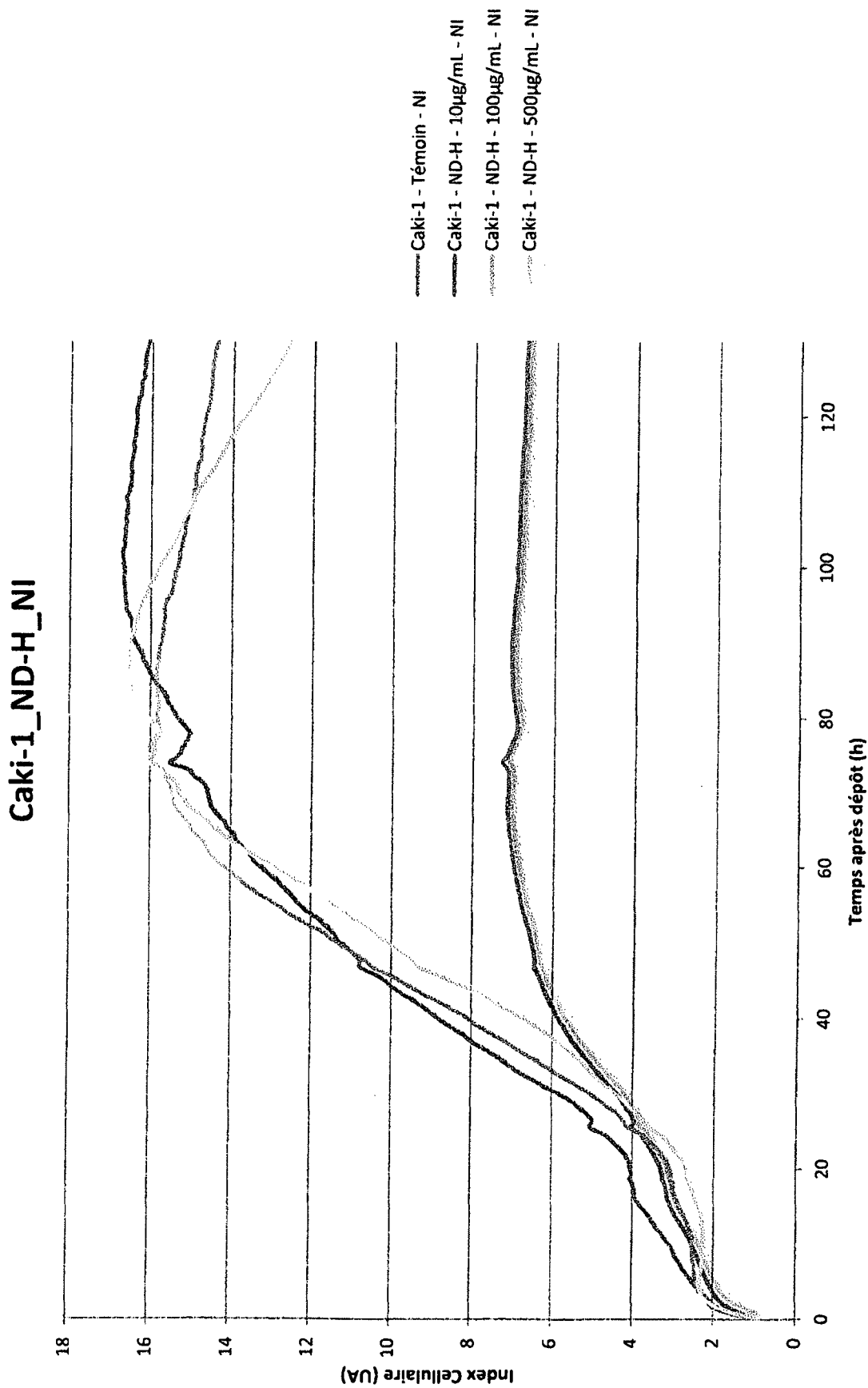


Figure 11

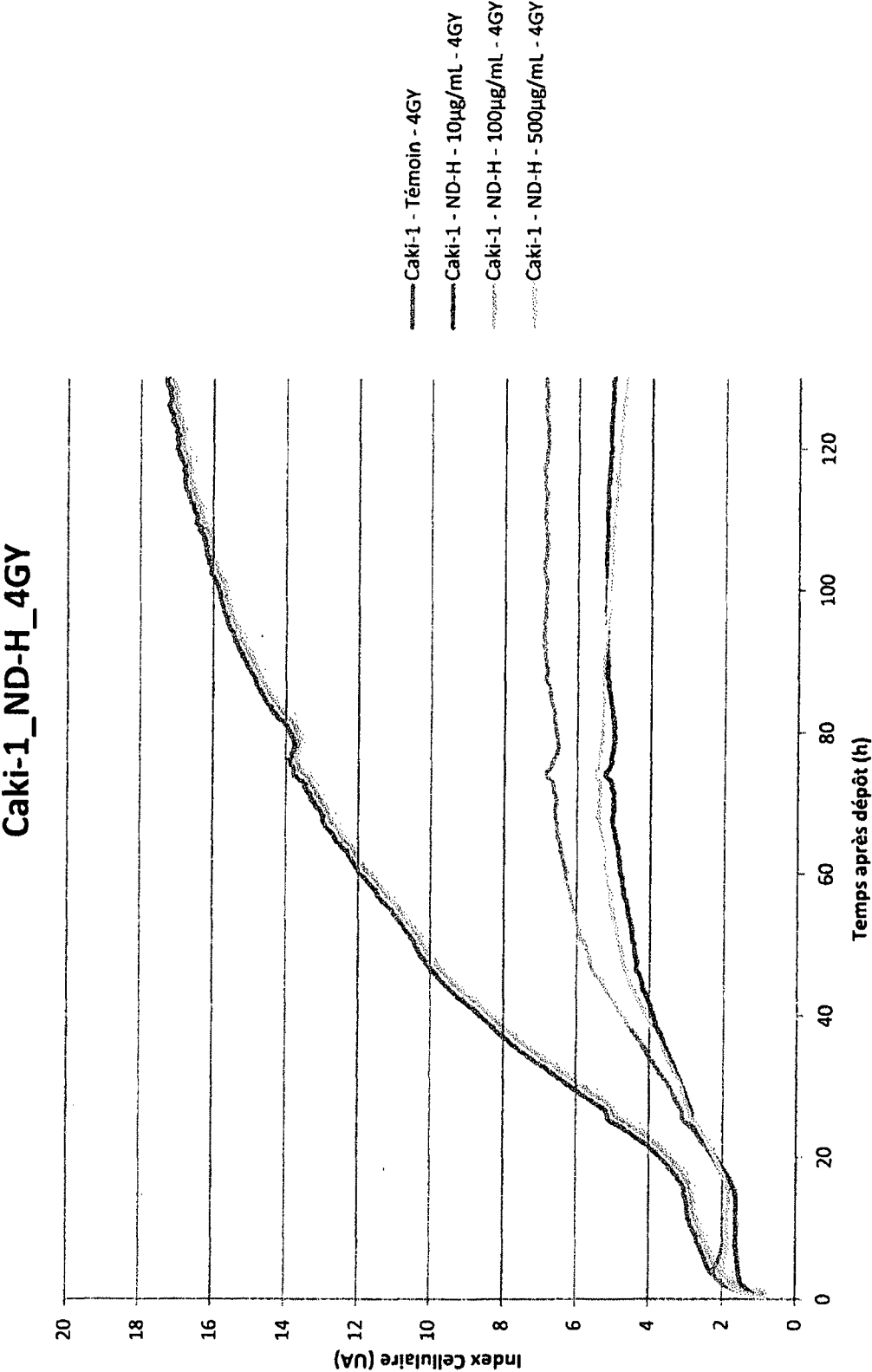


Figure 12

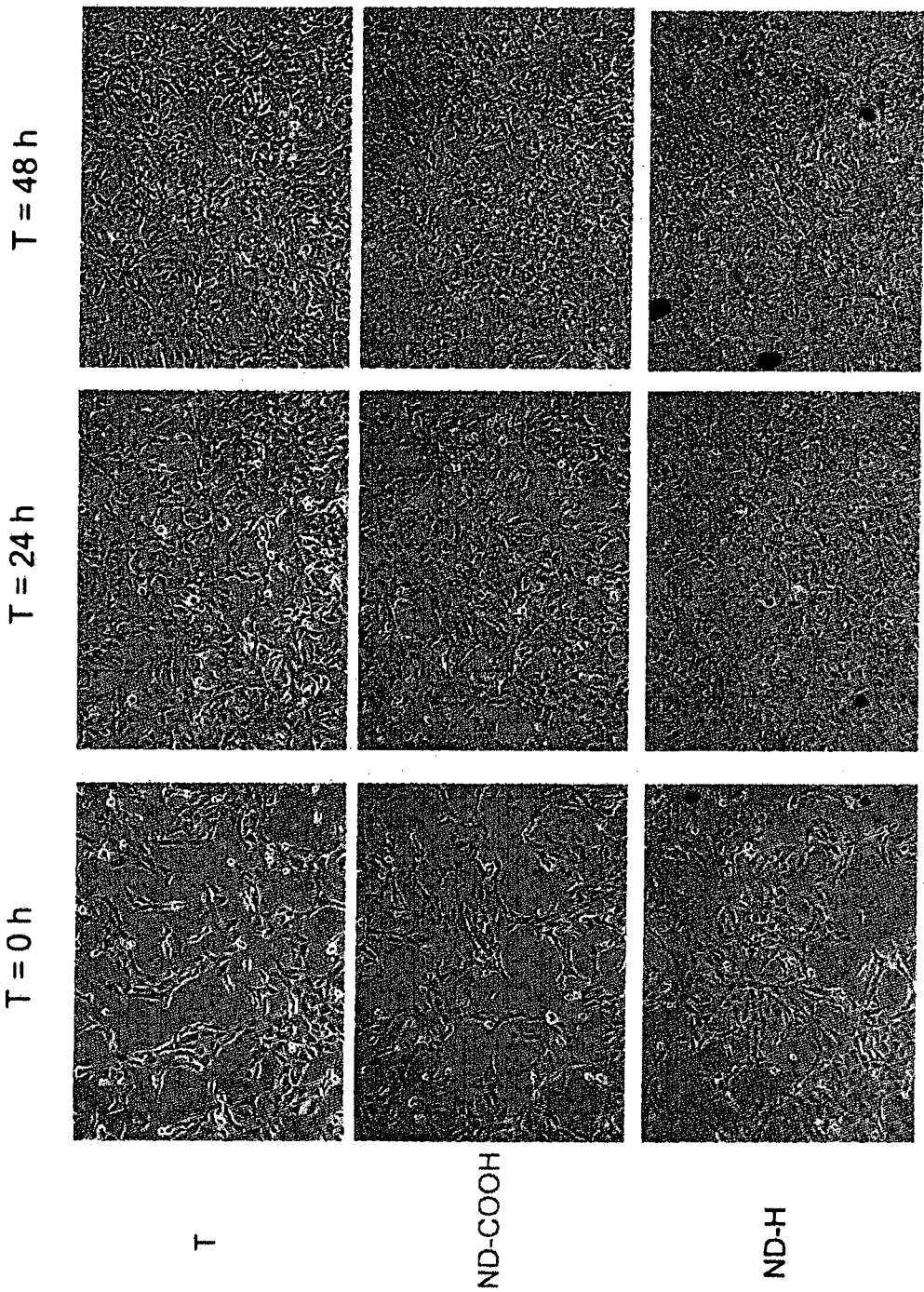


Figure 13

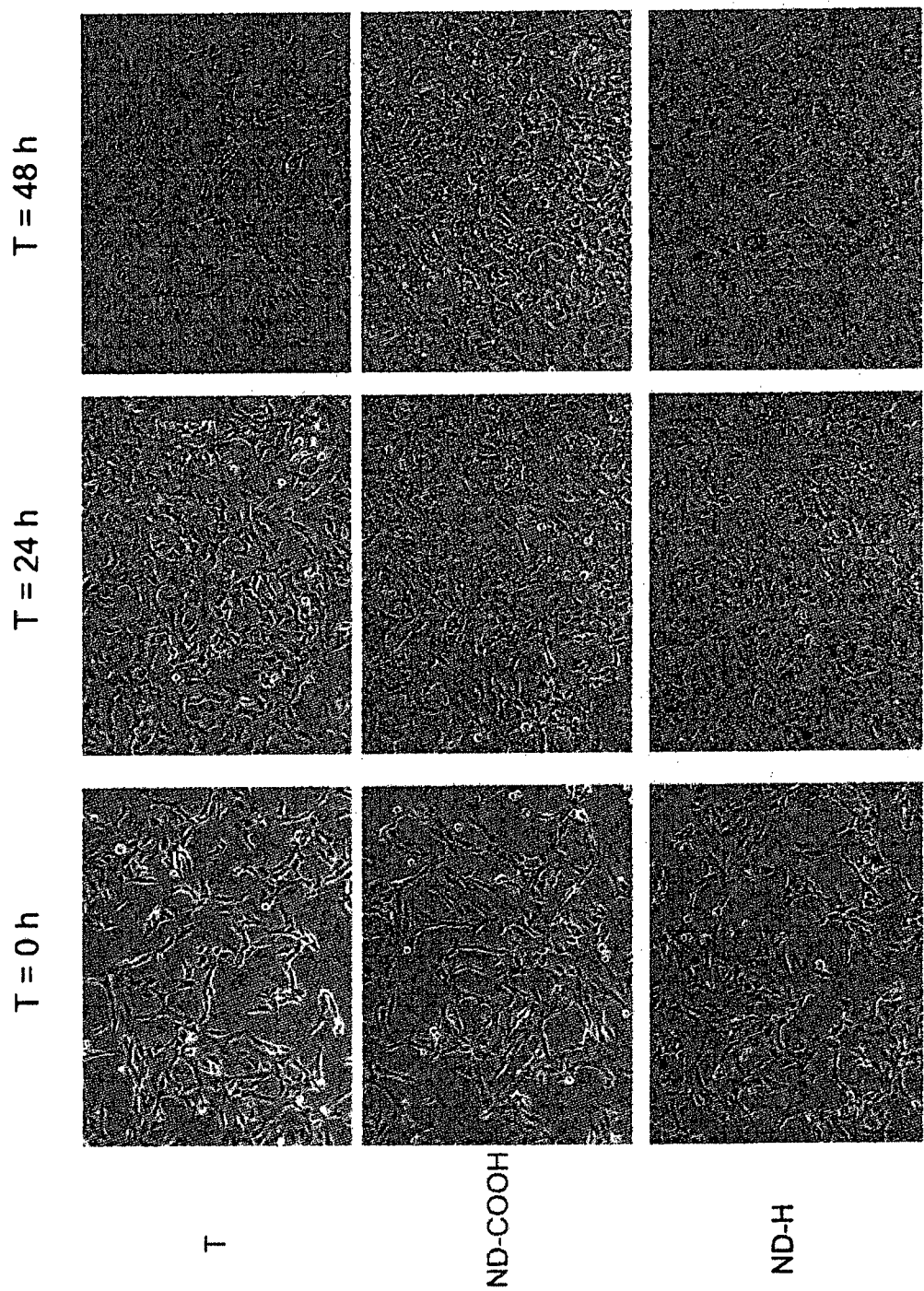


Figure 14

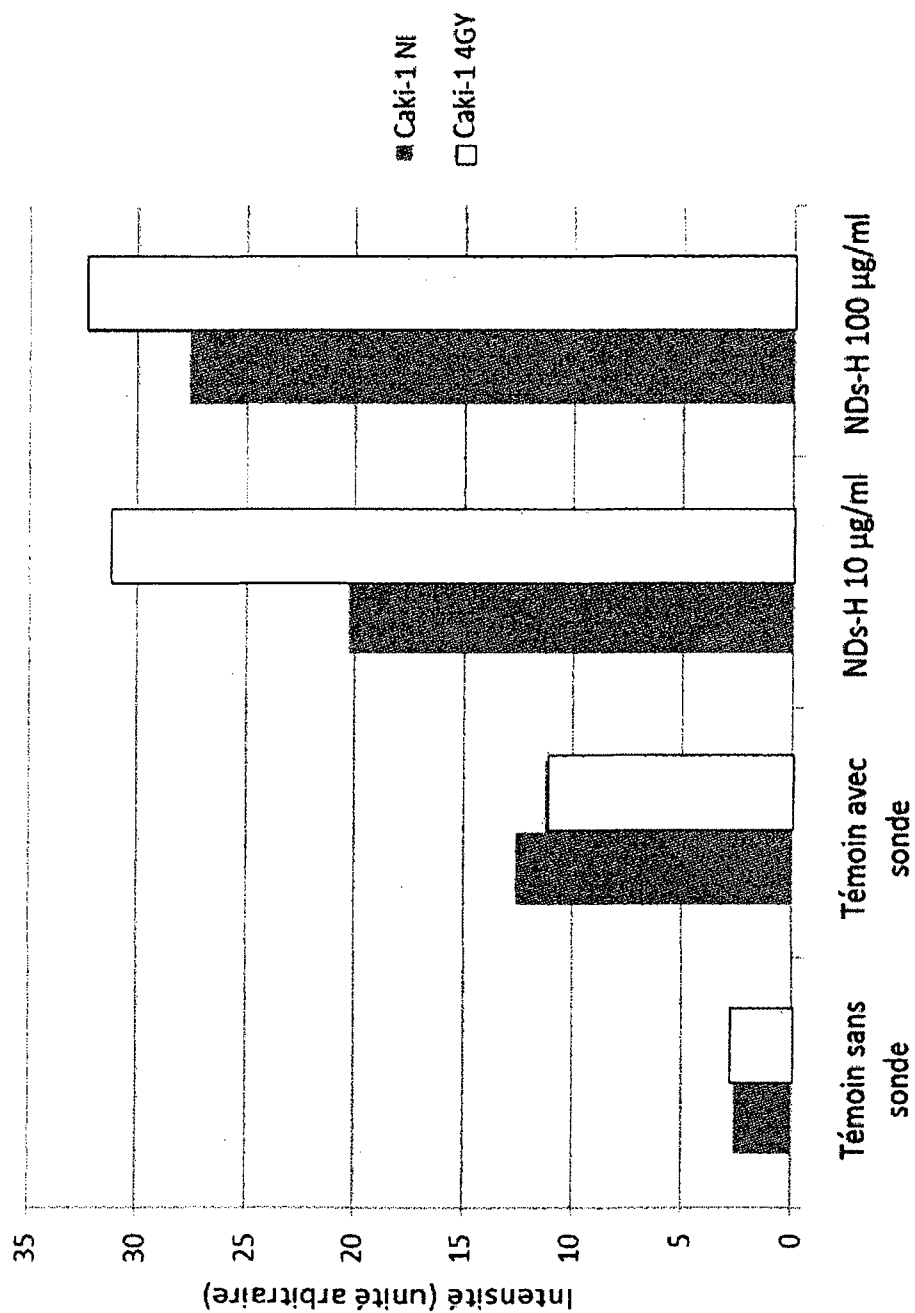


Figure 15

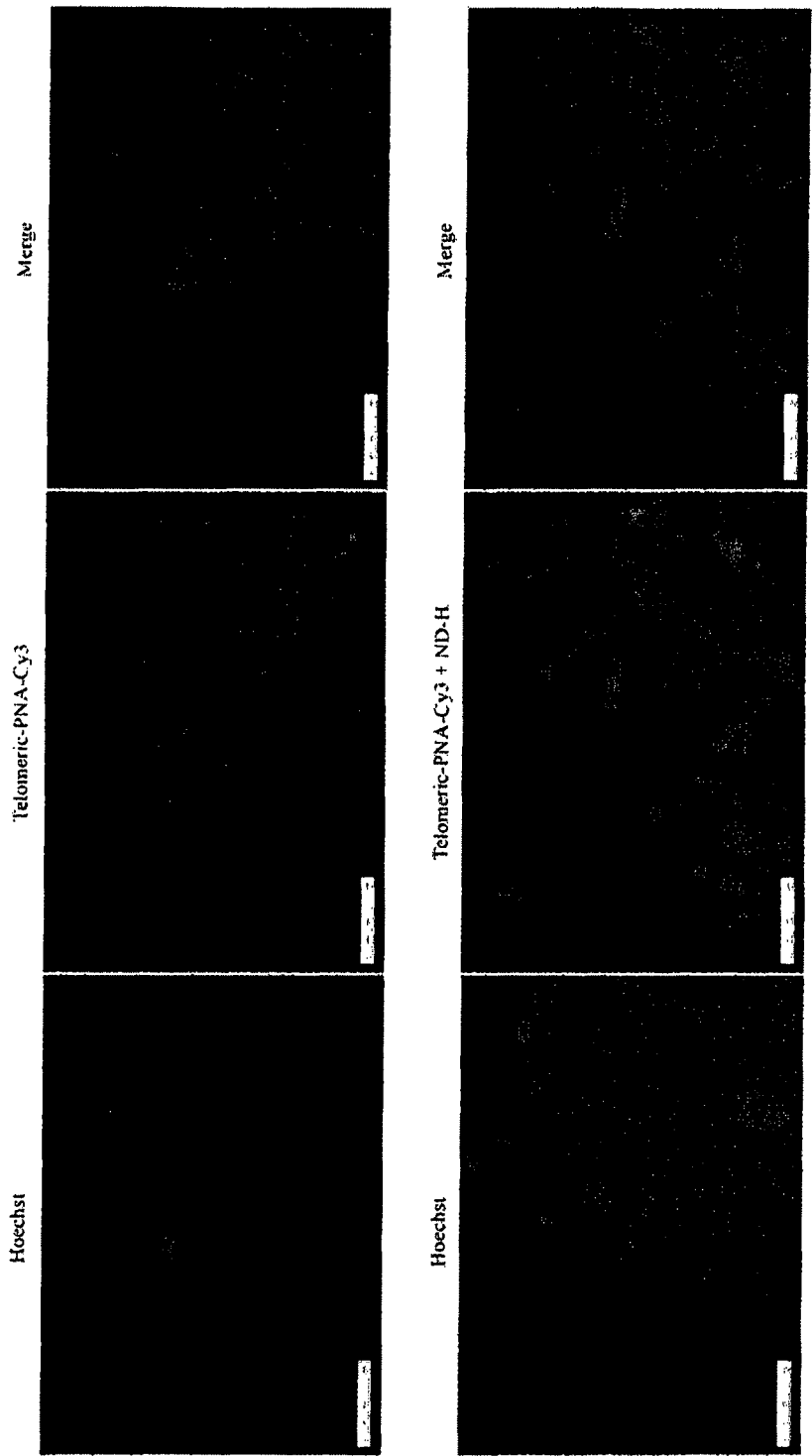


Figure 16A

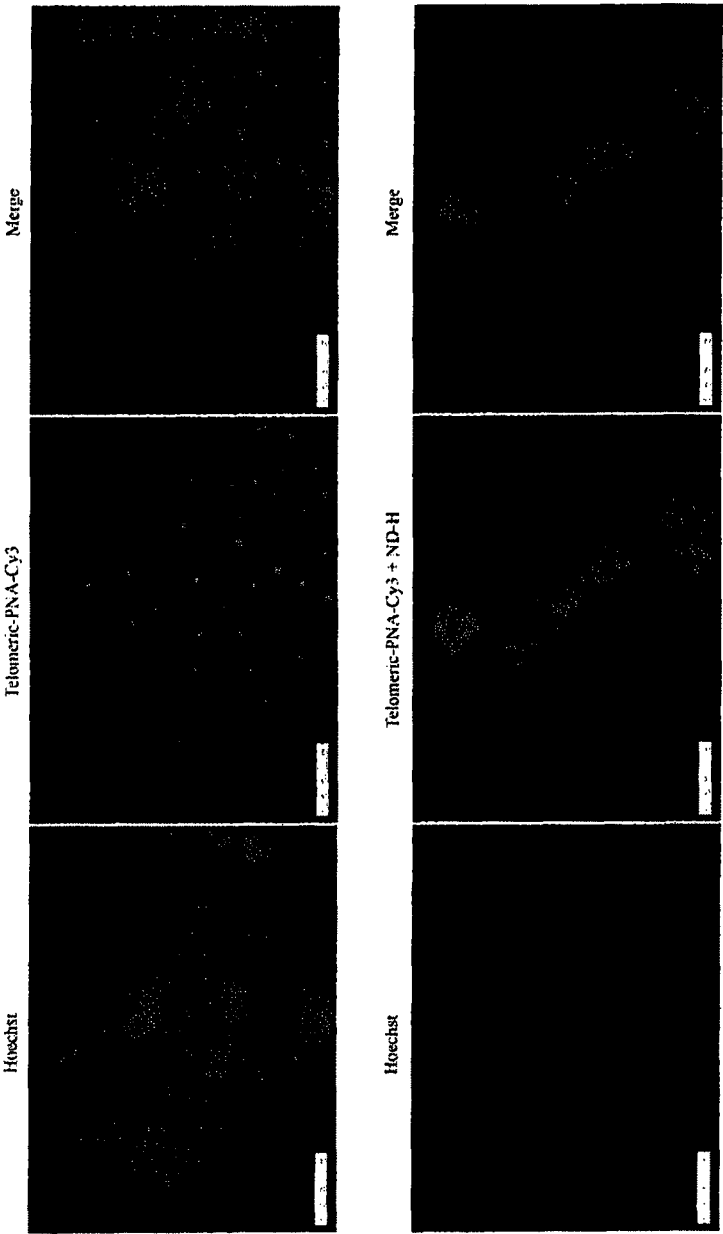


Figure 16 B

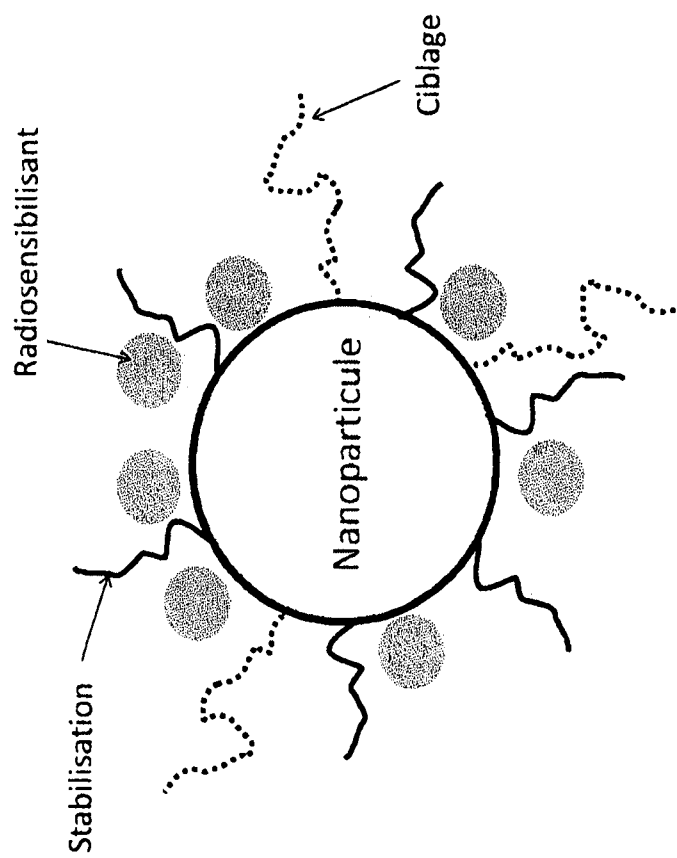


Figure 17

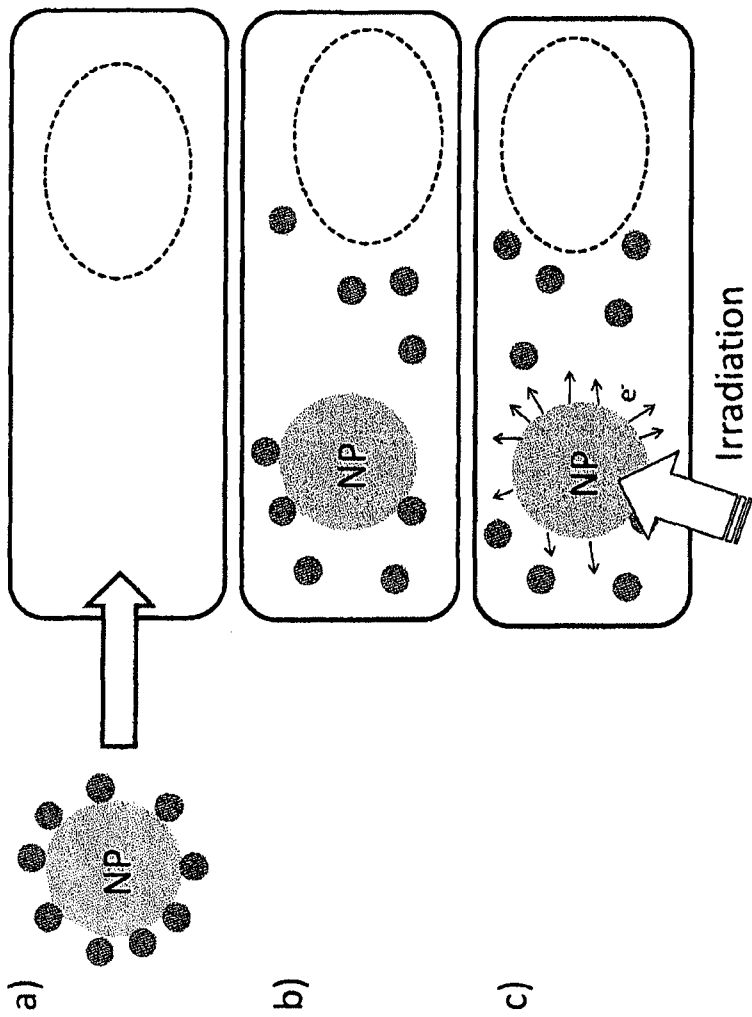


Figure 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2013/055766

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K47/48 A61K33/00 B82Y5/00 A61K9/00 A61K41/00 A61K49/00 A61K9/51 ADD.	
According to International Patent Classification (IPC) onto both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED	
Minimum documentation searched (classification System followed by classification symbols) A61K B82Y	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal , BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
X	KUZNETSOV OLEKSANDR ET AL: "Water-sol ubl e nanodi amond. ", LANGMUI R : THE ACS JOURNAL OF SURFACES AND COLLOIDS 20 MAR 2012 , vol . 28, no. 11, 20 March 2012 (2012-03-20) , pages 5243-5248, XP002697335 , ISSN: 1520-5827 the whol e document abstract page 5244, col umn 2, l i n e s 8-d e r n i è r e f i g u r e s 3,8 ----- -/- .
	Relevant to claim No. 1-29
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.	
* Spécial catégories of cited documents :	
"A" document defining the général state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other spécial reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 16 October 2013	Date of mailing of the international search report 06/11/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Luangkhot, Nathal i e

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2013/055766

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHI-CHENG FU ET AL: "Characteri zati on and appl icati on of singl e fluorescent nanodi amonds as cel lular biomarkers" , PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCI ENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCI ENCES, US, vol . 104, no. 3, 16 January 2007 (2007-01-16) , pages 727-732 , XP002456036, ISSN: 0027-8424, DOI : 10. 1073/PNAS. 0605409104 the whol e document abstract -----	1
X	US 2011/008447 AI (CHAO JUI -I [TW] ET AL) 13 January 2011 (2011-01-13) the whol e document paragraph [0082] ; figure 12b -----	1
X	GI RARD H A ET AL: "Surface properti es of hydrogenated nanodi amonds : a chemi cal investi gati on." , PHYSICAL CHEMISTRY CHEMICAL PHYSICS : PCCP 28 JUN 2011 , vol . 13, no. 24, 28 June 2011 (2011-06-28) , pages 11517-11523 , XP002697336, ISSN: 1463-9084 the whol e document abstract -----	1
X	ARNAULT JEAN-CHARLES ET AL: "Surface chemi cal modi ficati ons and surface reacti vity of nanodi amonds hydrogenated by CVD plasma. " , PHYSICAL CHEMISTRY CHEMICAL PHYSICS : PCCP 28 JUN 2011 , vol . 13, no. 24, 28 June 2011 (2011-06-28) , pages 11481-11487 , XP002697337 , ISSN: 1463-9084 the whol e document paragraph [concl usi on] -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2013/055766

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2011008447 A1	13-01-2011	TW 201102088 A	16-01-2011
		US 2011008447 A1	13-01-2011

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/IB2013/055766

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE			
INV.	A61K47/48	A61K33/00	B82Y5/00
	A61K49/00	A61K9/51	A61K9/00
ADD.			
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB			
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE			
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) A61K B82Y			
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche			
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal , BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data			
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents		no. des revendications visées
X	KUZNETSOV OLEKSANDR ET AL: "Water-soluble nanodiamond.", LANGMUIR : THE ACS JOURNAL OF SURFACES AND COLLOIDS 20 MAR 2012 , vol . 28, no. 11, 20 mars 2012 (2012-03-20) , pages 5243-5248, XP002697335 , ISSN: 1520-5827 Le document en entier abrégé page 5244, colonne 2, ligne 8-dernière figures 3,8 ----- -/-		1-29
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe			
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets			
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
16 octobre 2013		06/11/2013	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Luangkhot, Nathalie	

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CHI-CHENG FU ET AL: "Characteri zati on and appl icati on of singl e fluorescent nanodi amonds as cel lular biomarkers" , PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCI ENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCI ENCES, US, vol . 104, no. 3, 16 janvi er 2007 (2007-01-16) , pages 727-732 , XP002456036, ISSN: 0027-8424, DOI : 10.1073/PNAS. 0605409104 le document en enti er abrégé -----	1
X	US 2011/008447 AI (CHAO JUI -I [TW] ET AL) 13 janvi er 2011 (2011-01-13) le document en enti er alinéa [0082] ; figure 12b -----	1
X	GI RARD H A ET AL: "Surface properti es of hydrogenated nanodi amonds : a chemi cal investi gati on.", PHYSICAL CHEMISTRY CHEMICAL PHYSICS : PCCP 28 JUN 2011 , vol . 13, no. 24, 28 jui n 2011 (2011-06-28) , pages 11517-11523 , XP002697336, ISSN: 1463-9084 le document en enti er abrégé -----	1
X	ARNAULT JEAN-CHARLES ET AL: "Surface chemi cal modi ficati ons and surface reacti vity of nanodi amonds hydrogenated by CVD plasma. ", PHYSICAL CHEMISTRY CHEMICAL PHYSICS : PCCP 28 JUN 2011 , vol . 13, no. 24, 28 jui n 2011 (2011-06-28) , pages 11481-11487 , XP002697337 , ISSN: 1463-9084 le document en enti er alinéa [concl usi on] -----	1

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

PCT/IB2013/055766

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (avril 2005)

Nouvelles stratégies pour le traitement des tumeurs chimio et radio-résistantes : Nanodiamants et Solides hybrides poreux. Etude in vitro dans des systèmes 2D et 3D.

Ce travail de thèse s'inscrit dans un contexte d'explosion des nanoparticules et de leur très grand potentiel pour des applications en cancérologie. Ainsi, deux classes de nanoparticules ont été étudiées afin de valider et de caractériser biologiquement ce potentiel. Premièrement les Nanodiamants hydrogénés (H-NDs) dont l'interaction avec les photons de l'irradiation comme générateur de stress oxydatif était au cœur du postulat physico-chimique. Nous avons non seulement validé cette hypothèse dans plusieurs lignées cellulaires de cancer du rein et du sein notamment, insensibles aux doses d'irradiation étudiées ; mais également identifié la sénescence comme étant la voie activée par le double traitement H-NDs et irradiation. Les Solides hybrides poreux sont également des matériaux prometteurs grâce à leur haut pouvoir d'encapsulation de molécules actives. Nous avons ainsi démontré l'absence de toxicité de ces composés seuls dans quatre lignées de cancer du poumon et du foie, élément essentiel avant d'envisager leur utilisation, chargés avec des principes actifs. Enfin, à l'heure où la réglementation internationale encourage le développement et l'utilisation de modèles alternatifs à l'expérimentation animale, nous avons mis au point un modèle de culture tridimensionnelle d'adénocarcinome mucosécrétant de poumon. Il est utilisé pour l'étude de la progression tumorale ainsi que pour la découverte de nouvelles molécules de chimiothérapie.

Mots clés : nanodiamants hydrogénés, solide hybrides poreux, radio-résistance, modèle alternatif, cancer pulmonaire

Innovative therapeutic strategies against chemo and radio-resistant cancers: hydrogenated Nanodiamonds and Metal organic frameworks. An *in vitro* study in 2D and 3D systems.

The present study focuses on nanoparticles and their great skills for oncology therapies. Two kinds of nanoparticles have been studied in order to biologically validate and characterize their skills. The use of hydrogenated Nanodiamonds (H-NDs) as radio sensitizer is based on a physico-chemical postulate where they act as oxidative stress generator through interaction with irradiation. Thus we validated this hypothesis in radio resistant kidney and breast cancer cell lines and identify senescence as the main pathway after co-treatment with H-NDs and irradiation. Metal organic frameworks are also of particular interest for drug delivery thanks to their very important loading capacities. Here we demonstrate the biocompatibility of the empty compounds in four lung and hepatic cancer cell lines, a main point before their involvement in drug delivery strategies. Finally, following international guidelines encouraging to make animal testing more ethic, we developed a new 3D cell culture mimicking mucinous lung adenocarcinoma. This well characterized model will be used for the study of cancer development and drug screening.

Key words: hydrogenated nanodiamonds (H-NDs), metal organic frameworks (MOFs), radioresistance, alternative models, lung cancer