



Etude toxicogénomique de nanovecteurs de silice mésoporeuse : relation entre décoration et toxicité

Cédric Pisani

► To cite this version:

Cédric Pisani. Etude toxicogénomique de nanovecteurs de silice mésoporeuse : relation entre décoration et toxicité. Chimie thérapeutique. Université Montpellier, 2017. Français. NNT : 2017MONT009 . tel-01842430

HAL Id: tel-01842430

<https://theses.hal.science/tel-01842430>

Submitted on 18 Jul 2018

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par **l'Université de Montpellier**

Préparée au sein de l'école doctorale
Sciences Chimiques Balard (ED459)

Et de l'unité de recherche
Institut Charles Gerhardt de Montpellier
**UMR5253 Matériaux Avancés pour la Catalyse
et la Santé**

Et de
Institut de Biotechnologies d'Aix-Marseille
Direction de la Recherche Fondamentale
Commissariat à l'Energie Atomique
et aux Energies Alternatives

Spécialité : **Ingénierie Biomoléculaire**

Présentée par **Cédric PISANI**

**Etude toxicogénomique de nanovecteurs de
silice mésoporeuse : relation entre
décoration et toxicité**

Soutenue le 20 septembre 2017 devant le jury composé de

Pr Armelle BAEZA, CNRS UMR 8251 Univ. Paris Diderot	Rapporteur
Pr Olivier FARDEL, INSERM UMR 1085 Univ. Rennes I	Rapporteur
Pr Elias FATTAL, CNRS UMR 8612 Univ. Paris-Sud	Président du Jury
Pr Christine ENJALBAL, IBMM Univ. Montpellier	Examineur
Pr Jean-Marie DEVOISSELLE, ICGM Univ. Montpellier	Directeur de Thèse
Dr Odette PRAT, CEA/DRF/BIAM	Encadrante de Thèse



Ce n'est pas le plus fort de l'espèce qui survit, ni le plus intelligent. C'est celui qui sait le mieux s'adapter au changement.

Charles Darwin

Remerciements

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury qui ont accepté de juger mon travail. Je remercie les professeurs Armelle Baeza et Olivier Fardel pour avoir accepté d'être rapporteurs, ainsi que les professeurs Elias Fattal et Christine Enjalbal d'avoir accepté d'être examinateurs. A tous, merci d'avoir pris de votre temps pour évaluer mon travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur de thèse, Jean-Marie Devoisselle, et mon encadrante, Odette Prat, pour tout ce qu'ils m'ont apporté au cours de ces trois années passées à travailler ensemble. Odette, je te remercie pour tout ce que tu m'as apporté, ta confiance, tes conseils, et tous ces échanges qui ont toujours été agréables et constructifs. Tu m'as transmis de précieuses connaissances. Tu as toujours cru en moi, même lorsque je doutais; ton engagement et ta bienveillance m'ont permis de mener à bien cette thèse.

Merci à Pierre Chagvardieff, Laurent Bellanger et Jean Armengaud de m'avoir donné la chance de profiter des ressources et des connaissances du laboratoire du LI2D au CEA de Marcoule.

Je voudrais aussi remercier les personnes travaillant aux laboratoires MACS et IMNO de l'institut Charles Gerhard de Montpellier ainsi que toutes celles travaillant au sein de la société NanoMedSyn pour l'ensemble des échanges que nous avons pu avoir au cours du projet BioSiPharm.

Je remercie toutes les personnes que j'ai côtoyées au sein du LI2D et plus particulièrement Jean Armengaud et Jean-Charles Gaillard pour m'avoir prêté main forte et conseillé en spectrométrie de masse, et sans qui ce travail n'aurait pas pu être réalisé. Merci également à Charles Marchetti, Laëtitia Pinto, Céline Guigue, Yves Brignon, Christine Almunia, Béatrice Alpha-Bazin, Claude Vidaud, Fabrice Gallais, Nicole Desmoulière, Pascale Richard, Yasmina Tayeb, Sylvie Ruat, Guylaine Miotello, et les anciens, Isabelle George, Sandra Laloï, Emeline Landas, Julie Fredonnet, Carole Béraud, Mickael Mege, Wei Liu, que je n'ai pas côtoyés seulement pendant trois ans, mais en réalité pendant presque six ans tout au long de mon parcours professionnel au CEA. Grâce à vous tous, j'ai toujours pris beaucoup de plaisir à venir travailler dans un laboratoire aussi vivant que le nôtre. Mention spéciale à Gérard Steinmetz pour sa bonne humeur légendaire et les discussions agréables que nous avons partagées.

Un grand merci à Marie Anne Roncato pour son oreille attentive, sa bienveillance, sa bonne humeur, sa profonde gentillesse, mais aussi pour ces 1400 cafés partagés pendant ces trois années (environ 140 litres de café qui nous ont maintenu éveillés parfois jusqu'à tard !). Bien plus qu'une collègue, tu es devenue une véritable amie. Je n'oublie évidemment pas Océane Ducos Anglade, Sabrina

Masmejean et Thi-ngoc Suong Huynh aussi devenues des amies et qui ont laissé une trace indélébile au laboratoire, comme les inoubliables mardis à thème ou vendredis gâteaux. Mille mercis aux anciens Emie Duriguello, François Allain, Charline LeGoff, Marion Gris-Deville, auparavant collègues et aujourd'hui amis.

Merci à Karen Culotta, Charlotte Mappa et Virginie Jouffret, avec qui j'ai pu partager de bons moments de rigolade. Bon courage aux futurs docteurs du LI2D, Charlotte Mappa et Esther Le Toquin, pour le bout de chemin qui leur reste à faire.

Et enfin, je n'aurai jamais assez de mots pour remercier mes parents et toute ma famille pour leur soutien de chaque instant. Un dernier mot tout particulier pour ma tendre Laëtitia, qui ne cesse d'apporter à ma vie tout le bonheur et l'amour que l'on puisse donner.

Table des matières

Préambule	15
<i>Etat de l'art</i>	17
1. Un peu d'histoire	18
2. La nanomédecine	21
3. Evolution des nanoparticules à visée médicale	24
3.1. Première génération : Un rôle de cheval de Troie	26
3.2. Deuxième génération : Furtivité et ciblage passif	27
3.2.a. La PEGylation	29
3.2.b. L'effet "EPR"	31
3.3. Troisième génération : vers le ciblage moléculaire actif	33
3.4. Quatrième génération : nanoparticules multifonctionnelles stimuli-responsives.....	35
3.4.a. La photothermie	35
3.4.b. Le magnétisme.....	37
3.5. Cas des nanoparticules magnétiques de silice mésoporeuse (M-MSNs)	39
3.5.a. Un cœur unique au centre d'une coquille mésoporeuse.....	39
3.5.b. Les applications théranostiques	41
4. Evaluation de la biocompatibilité et de la toxicité des nanovecteurs	46
4.1. Caractérisation physico-chimique	47
4.2. Evaluation de la toxicité - La nanotoxicologie	48
4.2.a. Les particularités de la nanotoxicologie	50
4.2.b. La pharmacocinétique : Absorption - Distribution - Métabolisation - Elimination	58
4.2.c. Les alternatives à l'expérimentation animale.....	68
5. Les domaines émergents en toxicologie cellulaire	72
5.1. Les modèles	72
Modèle cellulaire hépatique innovant	73
5.2. Technologies émergentes.....	76
5.2.a. L'impédance cellulaire en temps réel.....	76
5.2.b. La toxicogénomique.....	78
5.2.c. La toxicologie prédictive et le concept des Adverse Outcome Pathways (AOP)	90

Objectif de la thèse	95
Partie expérimentale	99
CHAPITRE I	100
Mise en place des technologies et de méthodes pour l'évaluation toxicologique de nanoparticules de silice	100
Article n°1 : Evaluation quantitative des effets de nanoparticules de silice à faible dose sur cellules pulmonaires : appréhender une toxicité complexe avec une grande profondeur de champ 102	
CHAPITRE II	121
Synthèse des M-MSNs, décorations PEG et DMPC, et évaluation toxicologique sur modèles hépatiques	121
Article n°2 : Synthèse, décoration, et effets cellulaires de nanoparticules de silice mésoporeuse	123
Article n°3 : Evaluation de la biocompatibilité de nanoparticules magnétiques de silice mésoporeuse fonctionnalisées sur des cellules humaines HepaRG	136
CHAPITRE III	161
Relation entre les nanoparticules et les protéines sériques– Influence et formation de la corona	161
Article n°4 : L'origine des protéines sériques contenues dans le milieu de culture cellulaire influence la toxicité in vitro de nanoparticules de silice mésoporeuse sur les cellules humaines hépatiques HepG2	163
Article n°5 : La chronologie de la formation de la corona autour de nanovecteurs de silice met en évidence le rôle de l'interactome de protéines	186
Article n°6 : Les étapes expérimentales de séparation influence la composition en protéines de la corona autour de nanoparticules de silice	205
Conclusions et perspectives	212
Annexes	218
Références	222

Table des illustrations

Figure 1. La coupe de Lycurgue.....	18
Figure 2. "Traicte de la vraye, vnique, grande, et vniverselle medecine des Anciens, dite des recens Or Potable."	19
Figure 3. Les caractéristiques pharmacologiques idéales d'un nanovecteur pour la délivrance de principes actifs en thérapie.	23
Figure 4. Web Of Science. 17 ans de publications et citations avec le mot clé "Nanomedicine"	24
Figure 5. Exemples de différents types de nanoparticules étudiés en thérapeutique et imagerie.....	25
Figure 6. Espace sinusoïde d'un lobule hépatique.....	28
Figure 7. A) poly(éthylène glycol) B) en conformation "Mushroom" ou "Brush" à la surface d'une nanoparticule.	30
Figure 8. Microscopie électronique à balayage (SEM) de vaisseaux sanguins dans A) des tissus sinusoïdes normaux du foie et B) des tumeurs métastatiques du foie..	32
Figure 9. (A) Thérapie photothermique (PTT) qui consiste à augmenter la température de manière sélective dans des tissus tumoraux à l'aide d'un laser proche infrarouge. (B) Quatre des NPs d'or les plus couramment employées sont représentées.....	36
Figure 10. Comportement des nanoparticules superparamagnétiques et ferromagnétiques.....	38
Figure 11. Schéma de la procédure de Kim <i>et al.</i> (2006) d'intégration de nanoparticules de magnétite dans des sphères de silice mésoporeuse.	40
Figure 12. Schéma de la procédure améliorée de la synthèse de nanoparticules magnétiques de silice mésoporeuse selon Kim <i>et al.</i> , 2008.	41
Figure 13. Représentation schématique de la libération d'un principe actif par augmentation de la température	44
Figure 14. Représentation de l'origine de la nanotoxicologie.	49
Figure 15. Phénomènes d'agglomération et d'agrégation des particules en poudres sèches ou dispersées dans un liquide..	51
Figure 16. Ensemble de paramètres pouvant modifier la dose effective de NPs sur cellules <i>in vitro</i> ..	54
Figure 17. Schéma simplifié de la corona recouvrant les ligands de ciblage en surface de NPs..	55
Figure 18. Evolution de la corona autour d'une nanoparticule à travers l'organisme.	56
Figure 19. L'abondance normalisée des protéines identifiées dans la corona en LC-MS/MS en fonction de leur classification protéique.	57
Figure 20. Propriétés cinétiques des NPs dans l'organisme.	58
Figure 21. Le système hépatique.	63

Figure 22. Principales enzymes de métabolisation responsables A) de modifications de groupements chimiques fonctionnels (Phase I) et B) de conjugaisons avec des groupements de substitution (Phase II).....	65
Figure 23. Nouvelle vision des évaluations toxicologiques.....	71
Figure 24. Photos de microscopie à contraste de phase (x200) (A) d'une culture différenciée d'HepaRG et (B) d'une culture d'HepG2.....	74
Figure 25. Analyse en composante principale (ACP) des données d'expression génique d'HepaRG, HepG2 et de trois cultures d'hépatocytes primaires (HH)	75
Figure 26. Principe de déplacement du courant électrique entre deux électrodes en fond de puits d'une plaque de culture E-plate d'xCELLigence..	76
Figure 27. Principe de l'impédance cellulaire en temps réel.	77
Figure 28. Couvertures des numéros spéciaux des journaux Science et Nature sur le séquençage du génome humain publiés tous deux en février 2001.....	79
Figure 29. Mise en œuvre d'une analyse par puce d'expression.....	81
Figure 30. Principe d'une analyse sur Bioanalyzer (Agilent Technologies).....	82
Figure 31. Image d'une puce d'expression génique 8x60k d'Agilent Technologies en fluorescence. ...	83
Figure 32. Ingenuity knowledge database.	84
Figure 33. Représentation schématique du spectromètre de masse ESI Q Exactive HF.	86
Figure 34. Mise en œuvre d'une analyse par nano-LC MS/MS en stratégie Shotgun	88
Figure 35. Représentation schématique du développement d'un AOP défini à partir de trois blocs d'informations indispensables.	91
Figure 36. Représentation de l'AOP n°27 « Cholestatic Liver Injury induced by inhibition of the bile salt export pump ».	93
Figure 37. Paradigme de la réponse hiérarchique au stress oxydant selon Meng <i>et al.</i> , 2009.	105
Figure 38. Représentation de la profondeur de champ analytique des données transcriptomiques et protéomiques.	106
Figure 39. Microscopie électronique à transmission (TEM) de M-MSNs.....	123
Figure 40. Viabilité des cellules HepG2 après exposition à des lots de M-MSNs natives pendant 24h, avant et après optimisation du protocole de synthèse.	124
Figure 41. Comparaison des effets de la corona autour de M-MSNs sur HepG2 et HepaRG mesurés par impédance cellulaire en temps réel.....	166
Figure 42. Comparaison des protéines humaines adsorbées aux M-MSNs avec deux listes aléatoires de protéines..	188

Liste des tableaux

Table 1. Exemples de barrières limitant la délivrance d'agents anticancéreux par voie intraveineuse	26
Table 2. Quelques exemples de cibages actifs avec un système de délivrance de principe actif.	34
Table 3. Différentes propriétés physico-chimiques importantes à caractériser.....	48
Table 4. Différences observées selon la taille des particules lors d'une exposition par voie respiratoire. Adapté de (Oberdörster, 2010)	52
Table 5. Quelques exemples de méthodes alternatives à l'expérimentation animale validées (source : FDA)	72

Liste des abréviations

A200: AEROSIL® 200
AA: Acide aminé
ACP: Analyse en composante principale
ADME: Absorption, distribution, métabolisation, élimination
ADN: Acide désoxyribonucléique
ADNc: ADN complémentaire
AFM: Microscopie à force atomique
ANR: Agence nationale de la recherche
AO: Adverse outcome
AOP: Adverse outcome pathway
ARN: Acide ribonucléique
ARNm: ARN messagers
ATP: Adénosine triphosphate
BAFF: B-cell activating factor
BCA: Acide Bicinchoninique
BNF: beta-naphthoflavone
BPL: Bonnes pratiques de laboratoire
BSA: Bovine serum albumin
BSEP: Bile salt export pump
CB: Canalicules biliaires
CI: Cell Index
COMT: Catechol O-methyltransferase
CPZ: Chlorpromazine
CTAB: Cetyltrimethylammonium bromide
Cy3: Cyanine 3
Cy5: Cyanine 5
CYP: Cytochrome P450
DH: Diamètre hydrodynamique
DLS: Dynamic Light Scattering
DMPC: 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
EPH: Epoxyde hydrolase
EPR: Enhanced permeability and retention
Fc: Fragment cristallisable d'une immunoglobuline
FC: Fold change
FDA: Food and drug administration
FDR: False discovery rate
FR: Folate Receptor
Gd: Gadolinium
GI: Gastro-intestinal

GOLD: Genomes online database

GSH: Glutathion

GST: Glutathione S-transferase

HC: Hépatocytes

HMT: Histamine methyl-transferase

HR: Acide hyaluronique

HSA: Albumine sérique humaine

HSR: Hypersensitivity Reaction

ICP-MS: Spectrométrie de masse à couplage inductif

IgG: Immunoglobuline G

IgM: Immunoglobuline M

IPA: Ingenuity pathway analysis™

IRM: Imagerie par résonance magnétique

ISO: Organisation internationale de normalisation

kHz: Kilo hertz

LDS: Lithium dodecyl sulfate

ESI: Electrospray ionization

LOTEL: Low observed transcriptional effect level

MALDI: Matrix assisted laser desorption/ionization

mBAFF: Mutant du B-cell activating factor

MIE: Molecular initial event

MION: Magnetic iron oxide nanoparticle

M-MSN: Magnetic mesoporous silica nanoparticle

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

Nano-HPLC: Nano-chromatographie en phase liquide à haute performance

Nano-LC MS/MS: Spectrométrie de masse en tandem couplée à une nano-chromatographie en phase liquide à haute performance

NAT: N-acetyltransferase

NOTEL: No observed transcriptional effect level

NP: Nanoparticule

NSAF: Normalized spectral abundance factor

OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques

Oe : Oersted

PA : Polyacrylique

PACA: Poly(cyanoacrylate d'alkyle)

PB: Phenobarbital

PBC: Cellules biliaires primitives

PBPK: Physiologically based pharmacokinetic

PEG: Poly(éthylène glycol)

Peptide RGD: Arginine-glycine-acide aspartique

PGA: Poly(γ -glutamic acid)
PIHCA: Poly-isohexyl-cyanoacrylate
PLA: Polylactide
PLGA: Poly[lactide-co-glycolide]
PMMA: Poly-méthacrylate de méthyle
PoT: Pathway of toxicity
PSM: Peptide spectrum match
PTT: Photothermie
PZ: Potentiel zeta
QSAR: Quantitative structure-activity relationship
REACH: Registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals
RIF: Rifampicin
SEM: Scanning electron microscopy
SH: Sérum humain
SPION: Superparamagnetic iron oxide nanoparticles
SRE: Système réticulo-endothélial
STEM: Microscopie électronique à balayage par transmission
SUT: Sulfotransferase
SUV: Small unilamellar vesicles
SVF: Sérum de veau fœtal
TEM: microscopie électronique à transmission
TEOS: Tetraethyl-orthosilicate
TGA: Analyse thermogravimétrique
TMB: 1,3,5-trimethylbenzene
TPMT: Thiopurine methyltransferase
TSCA: United States Toxic Substances Control Act
UE: Union Européenne
UGT: UDP-glucuronosyltransferase
USA: United States of America
VeGF: Vascular endothelial growth factor

Préambule

Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse font partie du projet BioSiPharm financé par l'Agence Nationale de la Recherche dans le cadre du programme Nanotechnologies et Nanosystèmes (P2N). Ce projet multidisciplinaire avait pour objectif principal d'évaluer la sécurité biologique de nanoparticules (NPs) de silice mésoporeuse avec différents recouvrements de surface, incluant comme axe majeur la mise en place de techniques standard d'évaluation.

Cette thèse se situe à l'interface entre la chimie et la biologie en traitant particulièrement de deux aspects fondamentaux de l'évaluation du risque biologique de ces nanoparticules, à savoir l'aspect toxicologique à travers l'impact sur un modèle cellulaire humain et l'aspect chimie analytique par l'étude des interactions nanoparticules et protéines sériques.

Les études présentées ont été menées sous la direction du Pr Jean-Marie DEVOISSELLE du laboratoire MACS (UMR5253 Matériaux Avancés pour la Catalyse et la Santé) de l'institut Charles Gerhardt de Montpellier, et encadrées par le Dr Odette PRAT de l'institut de Biotechnologies d'Aix-Marseille (BIAM) à Marcoule / Direction de la recherche fondamentale du Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA).

Ce manuscrit se divise en plusieurs parties :

1^{ère} PARTIE : Etat de l'art.

Concepts de nanomédecine, de nanovecteurs, de sécurité biologique et des domaines émergents en toxicologie cellulaire.

2^{ème} PARTIE : Objectifs de la thèse.

3^{ème} PARTIE : Partie expérimentale.

Chapitres 1 à 3 avec discussions des résultats à partir des articles publiés et soumis.

4^{ème} PARTIE : Conclusions et perspectives.

Etat de l'art

1. Un peu d'histoire

Le domaine de la Nanotechnologie, et en particulier des nanoparticules (NPs), est une des avancées clés du XXI^{ème} siècle (Krukemeyer *et al.*, 2015). Pourtant, si le concept paraît profondément moderne, l'histoire nous révèle que la production et l'utilisation de ces minuscules particules invisibles à l'œil nu ne sont pas des inventions qui datent d'hier.

En effet, les artisans savaient dès l'antiquité travailler la matière au point d'en contrôler les dimensions de manière très fine. Des technologies à base de nanomatériaux étaient déjà développées alors que les processus moléculaires se produisant au sein de la matière étaient inconnus. Ainsi, des exemples concrets marquent l'utilisation des nanomatériaux il y a plusieurs siècles. C'est le cas par exemple de la coupe de Lycurgue (Figure 1), un artefact romain datant du IV^{ème} siècle après J.C. et exposé au London British Museum. Cette coupe, faite de verre incorporant des NPs d'alliage or-argent (Figure 1C), est connue pour avoir un effet visuel bichromatique. Sa couleur passe ainsi du vert au rouge en fonction de l'angle de la lumière, selon que si celle-ci est réfléchi (Figure 1A) ou transmise (Figure 1B) (Freestone *et al.*, 2007).

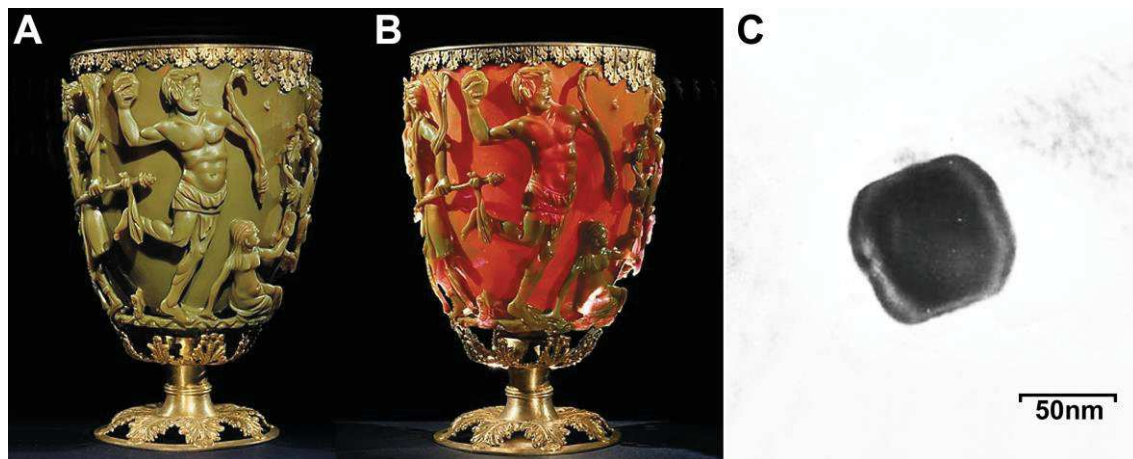


Figure 1. La coupe de Lycurgue. La coupe en (A) lumière réfléchi ou (B) transmise. (C) Microscopie Electronique à Transmission (TEM) d'une nanoparticule d'alliage or-argent contenue dans le verre (Freestone *et al.*, 2007). Department of Prehistory and Europe, © The British Museum.

En 2009, Reibold *et al.* font référence à la présence de particules de carbone nanométriques en structure orientée découvertes dans des épées de Damas produites à partir du III^{ème} siècle au Moyen-Orient. Ces particules étaient entre autre responsables d'une amélioration

impressionnante des caractéristiques d'élasticité et de résistance de ces lames (Reibold *et al.*, 2009). Ainsi, des propriétés physico-chimiques dues aux objets nanométriques étaient déjà utilisées depuis des siècles sans que les artistes et artisans n'aient pu interpréter la cause de ces effets surprenants sur les matériaux. Aujourd'hui les NPs, dont au moins une des dimensions est inférieure à 100 nm (Ehmann *et al.*, 2013), sont connues pour être responsables de ces propriétés nouvelles.

La nanomédecine, quant à elle, est considérée comme une science jeune car elle découle directement du potentiel que procurerait l'utilisation de ces nouveaux matériaux bien identifiés depuis peu. Les caractéristiques particulières de ces systèmes nanométriques suscitent d'immenses espoirs pour le traitement de maladies graves, dont en particulier les pathologies cancéreuses. Toutefois, des solutions de colloïdes ont été utilisées dans le passé comme traitements. Les premières données retrouvées concernent l'or et l'argent colloïdal. Si l'expression "colloïde" date de la fin du XIX^{ème} siècle (Graham, 1861), en Europe au Moyen Age, l'or et l'argent colloïdal étaient étudiés dans les laboratoires d'alchimistes. Paracelse, un des plus grands alchimistes suisses du XVI^{ème} siècle, précurseur de la toxicologie, a décrit les propriétés thérapeutiques de ce qu'il appelait la quintessence de l'or (*'quinta essentia auri'*), substance créée par réduction du chlorure d'or dans des mixtures d'extraits végétaux, d'alcools ou d'huiles (Dykman & Khlebtsov, 2011).

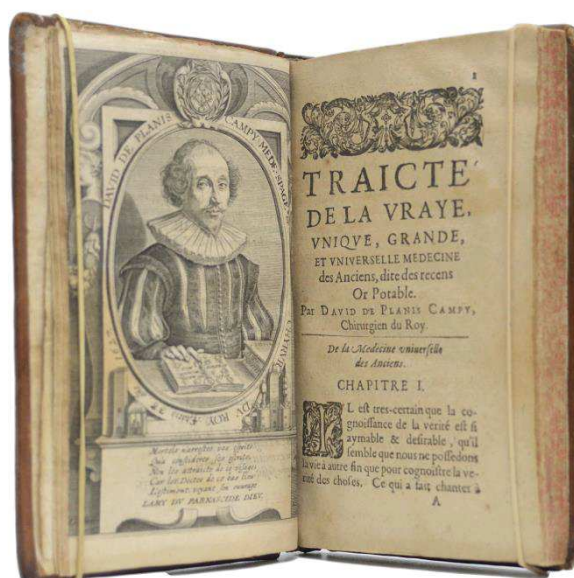


Figure 2. "Traicte de la vraye, vnique, grande, et vniverselle medecine des Anciens, dite des recens Or Potable." David de Planis Campy, médecin du roi Louis XIII. Numérisation Google.

Cet "or potable" était alors utilisé pour traiter diverses maladies comme la syphilis, la lèpre, ou la dysenterie. En France, c'est le médecin chirurgien du roi Louis XIII alias David de Planis Campy qui y fait référence (Figure 2), traitant des vertus de "l'or potable" en tant qu'élixir qu'il qualifiait de médecine universelle, démontrant à sa manière "quel pouvoir à cet Or Potable [...], à restituer la santé au corps humain"*¹.

Si l'utilisation de l'or était plutôt due à la considération que l'on y portait à cette époque en tant que métal noble, les propriétés bactéricides de l'argent, elles, étaient au contraire connues depuis l'antiquité. Grecs et Romains par exemple utilisaient des récipients en argent pour servir les boissons, aseptisant ainsi les liquides contenus. Les ustensiles de cuisine étaient également en argent, une tradition qui a perduré jusqu'au XIX^{ème} siècle. Au V^{ème} siècle av. J.C., Hippocrate quant à lui utilisait des préparations à base de poudre d'argent très fine pour traiter les ulcères et favoriser la cicatrisation des plaies. Par ailleurs, l'utilisation du nitrate d'argent en médecine a été mentionnée dans une pharmacopée romaine datant de 69 av. J.C. (Alexander, 2009). Enfin, les pionniers traversant l'ouest américain avaient constaté qu'en mettant des pièces d'argent dans leurs récipients d'eau potable, celle-ci se conservait plus longtemps.

Ainsi, l'élaboration intellectuelle et expérimentale de la discipline émergente qu'est la Nanomédecine s'est nourrie des expériences du passé. Paul Ehrlich, prix Nobel de Physiologie ou Médecine en 1908, avait avancé la théorie du « Magic Bullet », des « bulles magiques » capable de transporter des molécules chimiques dans l'organisme. Il posait ainsi une première définition de la vectorisation, inspirant des générations de scientifiques dans la conception de thérapies moléculaires contre le cancer (Strebhardt & Ullrich, 2008). Enfin, les évolutions théoriques de la biologie, la physique et la chimie au cours du XX^{ème} siècle, ainsi que l'invention de la microscopie à haute résolution, ont permis l'émergence de nouvelles disciplines telles que la biologie moléculaire ou la biochimie, qui contribuent à l'heure actuelle au décryptage des mécanismes moléculaires pathologiques et participent à l'élaboration de la médecine de demain, dont la nanomédecine fait partie.

*¹Extrait des Œuvres de Planis Campy, numérisation Google accessible gratuitement.

2. La nanomédecine

La nanomédecine peut se définir comme une science multidisciplinaire qui se place à l'interface entre les domaines de la physique, de la chimie, de la biologie, de la médecine et de l'électronique. Elle comprend l'utilisation de NPs à usage diagnostique ou thérapeutique, mais aussi les futures possibilités offertes par les nanotechnologies moléculaires pour les dispositifs à usage médical (nanomachines, nanocapteurs, nanoimplants, *etc.*) (Foundation, 2005).

Les connaissances cellulaires ont permis d'envisager l'association entre les nanomatériaux d'un côté, et les besoins en médecine humaine de l'autre, pour imaginer une délivrance spécifique de molécules thérapeutiques vers une cible tissulaire ou cellulaire, dite « adressage ». La taille des NPs, inférieure à 100 nm, les placent sur un ordre de grandeur allant des protéines aux virus et à certains organites cellulaires (Ehmann *et al.*, 2013). En raison de leur taille nanométrique, les NPs peuvent alors franchir des barrières biologiques et déployer leurs potentiels de façon unique, augmentant considérablement les possibilités en termes de diagnostic et de thérapie. En effet, même si un principe actif est intrinsèquement efficace, une préparation thérapeutique est confrontée à de multiples obstacles lors de l'administration, essentiellement en raison de ses propriétés physico-chimiques. Instabilité chimique, toxicité, immunogénicité, métabolisation, demi-vie courte, incapacité à franchir des barrières biologiques, résistance cellulaire, sont entre autres quelques exemples qui peuvent rendre tout candidat médicament inefficace *in vivo*. Ainsi, c'est tout l'art de la pharmacie galénique de franchir ces obstacles. Cependant, dès lors que le site d'administration est éloigné du tissu ciblé, les doses administrées pour obtenir des concentrations thérapeutiques efficaces engendrent également une déperdition importante vers les tissus sains (Peer *et al.*, 2007). De plus, la métabolisation rapide et l'excrétion de certains principes actifs sont des facteurs importants (Ex : Gemcitabine (Stella *et al.*, 2007)), auxquels on pallie par la multiplication des prises de doses dans le temps. Cela peut générer des effets secondaires importants pouvant altérer le bon fonctionnement d'un traitement (Lammers *et al.*, 2012).

Les NPs utilisées en tant que nanovecteurs de principes actifs sont ainsi une alternative prometteuse aux formulations conventionnelles, en réduisant les quantités administrées tout en répondant à un objectif fondamental de diminution des effets collatéraux. Ce n'est

pas une simple miniaturisation, mais bien de nouvelles possibilités accessibles uniquement à cette échelle de taille.

Les nanovecteurs constituent une solution possible d'optimisation de la délivrance d'un principe actif, allant de l'administration à l'action sur cible. En effet, la recherche en chimie galénique a permis de concevoir des nanomatériaux capables d'encapsuler ou de s'associer avec une molécule d'intérêt, jouant le rôle de protection et de transport, afin de franchir les barrières biologiques et d'atteindre une cible. Les avantages théoriques sont nombreux: ciblage cellulaire pathologique précis, diminution de la dose administrée pour une même dose effective, et de ce fait réduction des effets secondaires. Il est également envisagé de pouvoir transporter des principes actifs classiquement écartés jusqu'alors car difficilement compatibles avec les voies d'administration classiques (exemple : molécule peu soluble). De même pour les macromolécules dites fragiles comme l'ADN ou l'ARN, des peptides ou protéines, offrant des perspectives thérapeutiques importantes. Ainsi jusqu'au début des années 1970, on considérait qu'il était impossible d'administrer par voie intraveineuse des suspensions pharmaceutiques composées de particules solides, en raison des risques d'embolie. Aujourd'hui, la conception de suspensions nanoparticulaires chargées en principe actif permet, notamment dans le traitement de cancers, d'augmenter l'index thérapeutique de ces composés*² ($\text{Index thérapeutique} = \frac{\text{Dose maximum non toxique}}{\text{Dose minimum effective}}$) (Malam *et al.*, 2009).

Une illustration concrète de cet avantage a été démontrée par l'équipe du Pr Couvreur par l'utilisation de nanovecteurs polymériques (PACA: Poly(cyanoacrylate d'alkyle)) pour transporter la doxorubicine, un anticancéreux intercalant de l'ADN (Chiannilkulchai *et al.*, 1989). A dose équivalente, la formulation à base de NPs augmente l'efficacité de la doxorubicine par accumulation dans le foie, tout en évitant les tissus touchés de manière collatérale, car la forme galénique classique engendre une toxicité cardiaque.

Cependant, malgré leur potentiel évident, les NPs ont rencontré beaucoup d'obstacles auxquels il faut faire face: biodégradabilité, chargement et délivrance de la molécule active, biocompatibilité, *etc.* (Figure 3) (Abed & Couvreur, 2014). Pour répondre à ces

*²Le Collège de France - Nanomédicaments pour le traitement du cancer. Professeur Patrick Couvreur. 2010

problématiques, les avancées en science de la matière et en biologie ont permis d'élaborer des nano-objets de plus en plus sophistiqués.

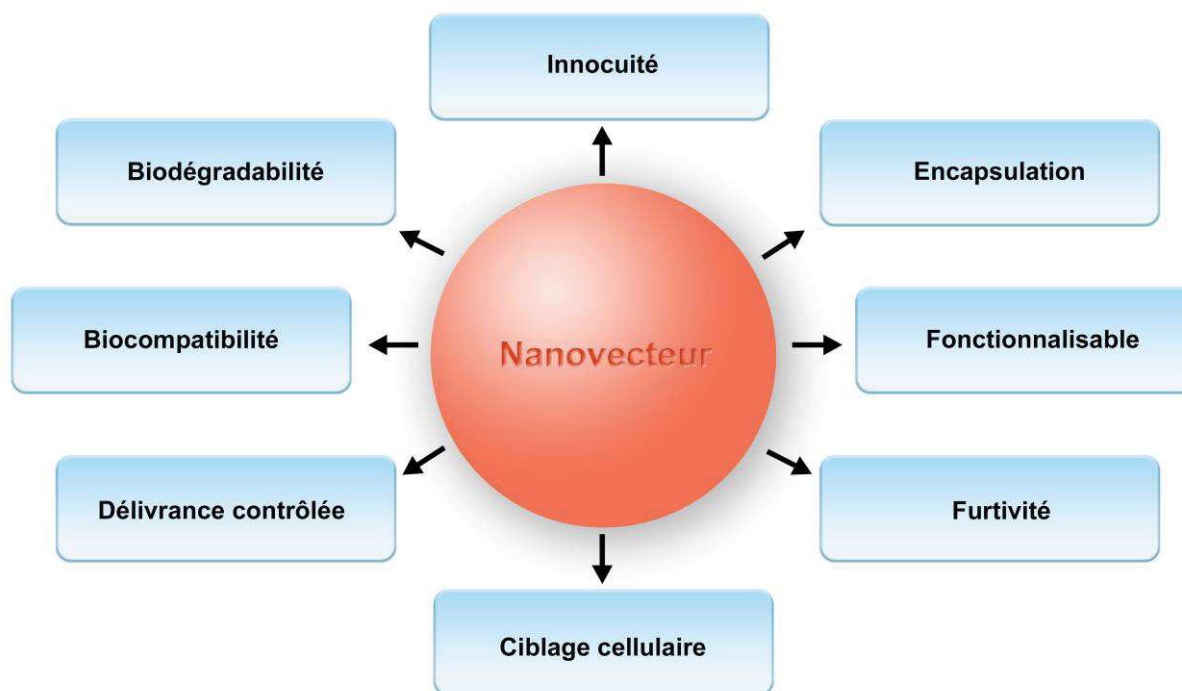


Figure 3. Les caractéristiques pharmacologiques idéales d'un nanovecteur pour la délivrance de principes actifs en thérapie.

3. Evolution des nanoparticules à visée médicale

Les travaux sur des NPs destinées à transporter un principe actif ont émergé à la fin des années 1960 avec l'étude du Pr Speiser et son équipe sur des billes en résine époxy pour une utilisation pharmaceutique (Khanna *et al.*, 1970, Khanna & Speiser, 1969, Kreuter, 2007). Depuis, des recherches intensives ont été effectuées sur la synthèse, la fonctionnalisation de surface et l'utilisation possible de systèmes nanovectorisés (Krukemeyer *et al.*, 2015). Plus de 7150 publications et 173 410 citations de travaux ont été recensées ces 17 dernières années sur le thème "Nanomedicine" (Figure 4).

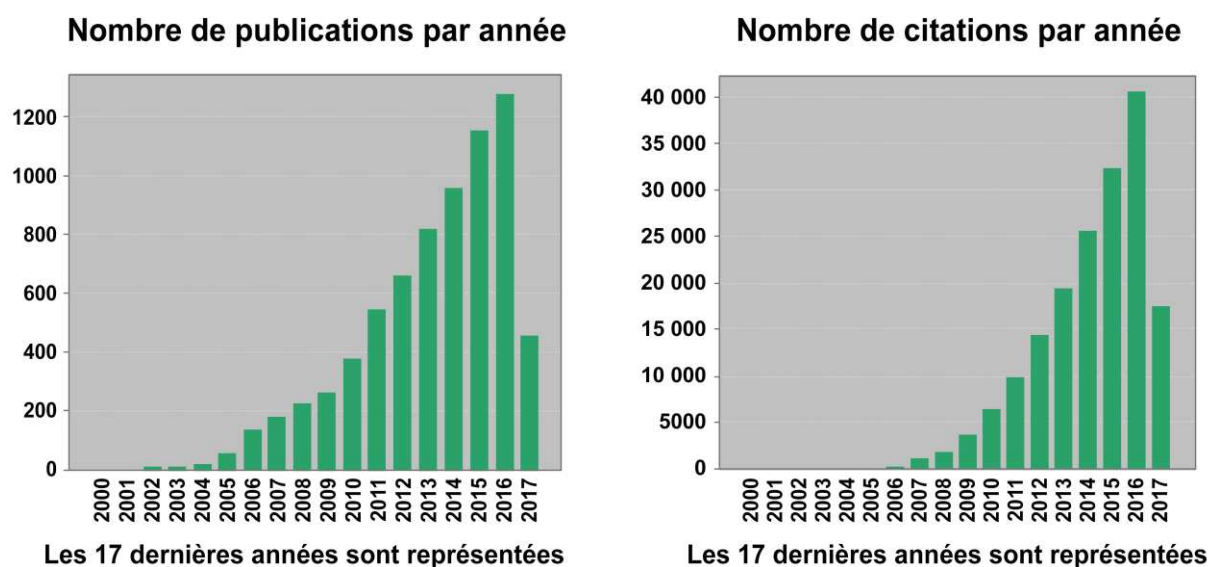


Figure 4. Web Of Science. 17 ans de publications et citations avec le mot clé "Nanomedicine".

Différents types de nanovecteurs ont ainsi été développés en parallèle des découvertes liées aux propriétés physiques, chimiques et biologiques des NPs. Des compositions et des morphologies très variées ont été étudiées et développées afin de répondre à des applications en thérapie ou en diagnostic par imagerie, à savoir : des liposomes (vésicules constituées d'une ou plusieurs bicouches de phospholipides, (Figure 5A), des NPs à base de polymères (formant une matrice de type nanosphère ou réservoir de type nanocapsule, (Figure 5B) (Danhier *et al.*, 2012), des micelles (formées de polymères amphiphiles, (Figure 5C), des dendrimères (Figure 5D), des NPs inorganiques de silice mésoporeuse (Figure 5E)

(Caltagirone *et al.*, 2015, Fu *et al.*, 2013, Mamaeva *et al.*, 2013, Wang *et al.*, 2015), des NPs superparamagnétiques ou photothermiques d'oxydes métalliques (Fer, Or) (Figure 5F), des quantum dots (nanocristaux semi-conducteurs sphériques) (Figure 5G), et des particules à base de carbone (nanotubes, nanosphères) (Figure 5H).

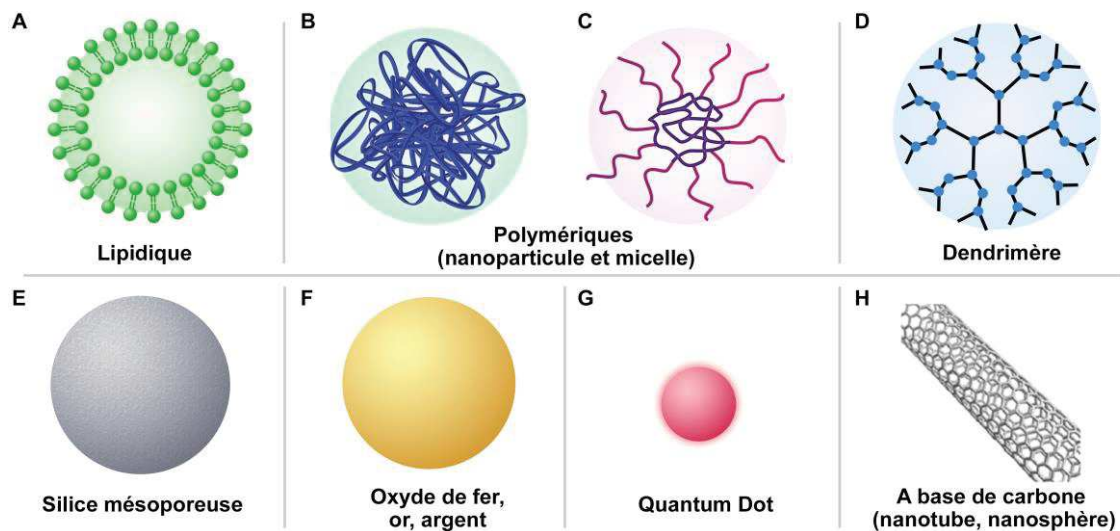


Figure 5. Exemples de différents types de nanoparticules étudiés en thérapeutique et imagerie.

Les nanovecteurs peuvent se décomposer en deux parties distinctes personnalisables, à savoir le cœur et la couronne. Chacune d'elles peut être dotée d'un ensemble de fonctionnalités répondant à des besoins déterminés (encapsulation, furtivité, adressage, *etc.*). L'évolution de ces NPs peut être ainsi classée en différentes générations, reflétant les nécessités et obstacles rencontrés au fil du temps.

3.1. Première génération : Un rôle de cheval de Troie

L'encapsulation de molécules thérapeutiques avait pour but premier d'améliorer les profils pharmacocinétiques, afin de protéger les principes actifs jusqu'à leur cible (tissu ou organe) en contournant les barrières anatomiques, physiologiques et chimiques (Table 1).

Table 1. Exemples de barrières limitant la délivrance d'agents anticancéreux par voie intraveineuse

Barrières anatomiques	Barrières physiologiques	Barrières chimiques
Endothélium vasculaire	Filtration rénale	Instabilité
Espace périvasculaire	Métabolisation hépatique	Solubilité
Vascularisation tumorale hétérogène	Haute densité tumorale	Poids moléculaire
Membrane cellulaire	Haute pression interstitielle	Biodistribution large
Membrane du noyau	Pompe d'efflux cellulaire	Interaction de charge
Barrière hémato-encéphalique	Haute toxicité collatérale	Demi-vie
-	Immunogénicité	Dégradation pH dépendante

Adapté de Lammers et al. (Lammers et al., 2012)

Pour contourner ces barrières, l'usage de NPs est une méthode galénique intéressante pour augmenter l'efficacité d'une molécule en la délivrant, à la manière d'un cheval de Troie, à l'endroit même de la zone ciblée. Les études de biodistribution ont montré qu'une grande partie de ces NPs dites de première génération se localisaient préférentiellement dans le foie et la rate. Cette distribution majoritairement hépatosplénique est le premier verrou biologique observé pour les nanovecteurs, et cela pour plusieurs types de matériaux. C'est le cas notamment de NPs de type polymérique (Owens *et al.* & Peppas, 2006). Des nanosphères composées de PLGA (poly[lactide-co-glycolide]), un copolymère biodégradable, se localisent préférentiellement au niveau hépatique à plus de 65% seulement cinq minutes après injection (Gref *et al.*, 1994, Le Ray *et al.*, 1994). Seules 5% des NPs étaient retrouvées dans le sang (Gref *et al.*, 1994). Ce polymère a depuis été autorisé par la FDA pour une utilisation médicale (Jain, 2000). La clairance des NPs circulantes est donc très clairement un phénomène de l'ordre de la minute (Gref *et al.*, 1995, Owens *et al.* & Peppas, 2006). Ce résultat primordial a été confirmé récemment par d'autres auteurs (Semete *et al.*, 2010). Ces observations ont également été faites pour d'autres polymères à savoir pour des particules de PMMA (poly méthacrylate de méthyle) (Kreuter *et al.*, 1979), de PA (polyacrylique) (Laakso *et al.*, 1986), de PLA (polylactide) (Allémann *et al.*, 1994, Bazile *et al.*, 1992), ou de

PACA (poly(cyanoacrylate d'alkyle)) (Peracchia *et al.*, 1999). Plus récemment, une accumulation hépatosplénique de 60% a été observée pour des NPs à base d'albumine sérique humaine (ASH) une heure après injection (Elzoghby *et al.*, 2012, Yang *et al.*, 2007), et de 85% pour des NPs de silice mésoporeuse 24h après injection (Liu *et al.*, 2011a).

C'est donc logiquement que cette particularité a été mise à profit en prenant pour première cible thérapeutique les pathologies hépatiques, comme les hépatocarcinomes. Des NPs ont donc été chargées de différents principes actifs anticancéreux afin d'effectuer des tests d'efficacité pour un ciblage direct du foie. Barraud *et al.* (2005) ont étudié l'application de l'encapsulation de la doxorubicine dans des NPs de PIHCA (poly-isohexyl-cyanoacrylate) à la fois *in vitro* et *in vivo* (Barraud *et al.*, 2005). Cette plateforme a été testée sur différentes lignées cellulaires humaines hépatiques telles que Huh7, HepG2 ou HepaRG, et sur des souris modèles hépatocarcinogéniques double transgéniques X/*myc*. L'efficacité cytotoxique anti-tumorale de ces NPs chargées s'est avérée supérieure à celle de la doxorubicine seule. Cette étude a donné naissance à une formulation en administration intraveineuse nommée Livatag® d'Onxeo, pour le traitement du cancer primitif du foie, actuellement en phase clinique III. Par ailleurs, l'équipe du Pr Couvreur en 1989 avait initialement élaboré des nanovecteurs polymériques à base de PACA (Poly(cyanoacrylate d'alkyle)) pour transporter la doxorubicine (Chiannikulchai *et al.*, 1989). Une localisation préférentielle a ainsi été démontrée au niveau du foie. D'autres études avec diverses NPs associées à des principes actifs ont été effectuées, comme avec le Paclitaxel dans des NPs de PGA (poly(γ -glutamic acid) par exemple (Liang *et al.*, 2006), ou plus récemment par association de plusieurs molécules dans des liposomes (Doxorubicine et Curcumine) (Zhao *et al.*, 2015).

3.2. Deuxième génération : Furtivité et ciblage passif

A l'échelle nanométrique, le rapport surface/volume développe une surface spécifique considérable. De ce fait, lors de l'injection intraveineuse d'une suspension nanoparticulaire, les NPs de première génération interagissent avec de nombreuses biomolécules et se recouvrent alors de protéines sériques dont des opsonines. Ces opsonines sont principalement identifiées comme étant des anticorps (fragments Fc d'IgG) et des facteurs du complément (C3, C4, C5), mais aussi d'autres protéines circulantes telle que la

fibronectine ou le fibrinogène (Owens *et al.* & Peppas, 2006, Walkey & Chan, 2012). Elles font ainsi partie d'une couronne de protéines qui signe très clairement de façon moléculaire la particule comme étant exogène (non soi). Par exemple, il a été montré que l'adsorption d'IgG à la surface de liposomes augmentait d'environ 6 fois leur phagocytose par des macrophages (Derksen *et al.*, 1987). Même remarque pour des NPs d'oxyde de fer phagocytées 10 fois plus à la fois *in vitro* et *in vivo* (Beduneau *et al.*, 2009).

Lors du passage des NPs dans le foie, celles-ci sont reconnues par des macrophages résidents appelés cellules de Kupffer. Cette reconnaissance, qui engendre alors la phagocytose des NPs et leur accumulation, vient d'une part de la particularité de ces macrophages à détenir des récepteurs spécifiques aux opsonines (Ex: Récepteurs Fc CD64 (Lunov *et al.*, 2011, Serda *et al.*, 2009)), et d'autre part de la disposition de l'endothélium vasculaire hépatique à ne pas être totalement jointif (Figure 6).

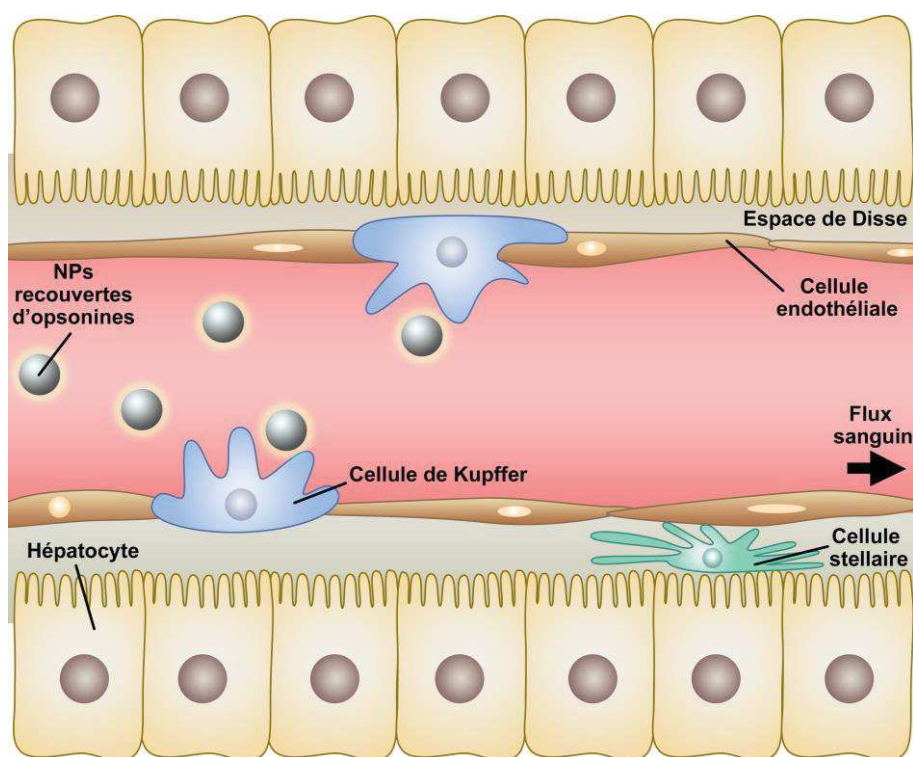


Figure 6. Espace sinusoïde d'un lobule hépatique. Les cellules de Kupffer sont des macrophages qui phagocytent les nanoparticules opsonisées.

En effet, entre les cellules endothéliales se trouvent les cellules de Kupffer qui sont alors en contact direct avec la circulation sanguine. De plus, au niveau de la rate, le sang est libéré dans la pulpe rouge qui est occupée par des macrophages qui officient alors comme filtre

pour le sang. Il y a ainsi une forte corrélation entre la capacité des nanomatériaux à capter des protéines circulantes et leurs interactions fortes avec les macrophages résidents appartenant au système réticulo-endothélial (SRE) (Walkey & Chan, 2012).

3.2.a. La PEGylation

Dès lors que l'on veut élargir les possibilités de cibles pathologiques au sein du corps humain, il faut alors une technologie capable de contourner cette opsonisation très rapide. Dans cette perspective, des modifications de surface des NPs ont été envisagées et réalisées avec des polymères hautement hydrophiles (Moghimi *et al.*, 2001). Les polymères à haut poids moléculaires sont particulièrement intéressants car ils ont une liberté conformationnelle dans un environnement aqueux, octroyée par leurs longues chaînes polyethers, qui les rendent très flexibles. Cette flexibilité crée une barrière entropique (désorganisation thermodynamique) qui va contraindre l'adsorption de protéines. Celles-ci doivent alors comprimer les chaînes polymériques afin d'atteindre la surface des NPs (Szeleifer, 1997). Ce phénomène crée un encombrement stérique autour des NPs, c'est à dire un bouclier moléculaire.

Le polymère le plus utilisé dans les applications biologiques pour créer ce phénomène d'encombrement stérique est le poly(éthylène glycol) (PEG) (Figure 7A). Les avantages du PEG sont nombreux : il est hautement hydrophile, facile à synthétiser, relativement inerte, capable d'être éliminé par clairance rénale, et ne semble pas être toxique à faible dose (Walkey & Chan, 2012). Le PEG a été utilisé dans différentes spécialités pharmaceutiques et approuvé par la FDA (Knop *et al.*, 2010).

Ce type de polymère peut être introduit durant la synthèse des NPs, qu'elles soient organiques (polymériques, liposomes ...) ou inorganiques (silice, oxyde de fer ...). C'est le cas par exemple de l'incorporation du PEG dans des émulsions de NPs polymériques PLGA, créant ainsi un bloc co-polymérique nanoparticulaire amphiphile (PLGA-*b*-PEG) (Cheng *et al.*, 2007). Ainsi, cette formulation permet d'obtenir un cœur hydrophobe biodégradable de PLGA et une couronne de PEG hydrophile. Il est possible également de fusionner le PEG à des phospholipides pour l'inclure dans la membrane de liposomes (Klibanov *et al.*, 1991). Il existe d'autres méthodes de modification de surface avec du PEG mais cette fois-ci post-synthèse. En effet, l'ajout de PEG en surface des NPs peut se faire soit par adsorption physique, soit par réticulation chimique qui forme des liaisons covalentes avec des

groupements fonctionnels réactifs en surface (Owens *et al.* & Peppas, 2006). La méthode de réticulation étant préférée car elle ne conduit pas, contrairement à une adsorption physique, à une désorption du PEG dans l'environnement biologique au cours du temps.

De nombreuses propriétés du PEG influencent l'adsorption des protéines, comme la longueur des chaînes, leur densité, l'hydratation, leur conformation, *etc.* (Unsworth *et al.*, 2008). En particulier, la densité des chaînes de PEG en surface des NPs est un paramètre primordial déterminant l'efficacité de son utilisation dans le contournement de l'adsorption de protéines (Uz *et al.*, 2016). A faible densité, les chaînes de PEG adoptent une conformation de type "mushroom" grâce à leur grande flexibilité, ce qui ne crée pas une barrière suffisante pour contrer l'adsorption protéique (Figure 7B). A haute densité, les chaînes de PEG se gênent les unes les autres et prennent alors une conformation de type "Brush" (Figure 7B), ce qui crée ainsi un encombrement stérique suffisant (Owens *et al.* & Peppas, 2006). Selon Gref *et al.*, une réduction significative de l'adsorption des protéines autour de nanosphères de PEG-PLA est observée pour une densité entre 2 et 5% (w/w) (Gref *et al.*, 2000). Cette adsorption protéique est ainsi réduite de 10% pour 2% de PEG, et de 70% pour 5% de PEG. D'après Perry *et al.*, la présence de PEG sous conformation "Brush" diminue de 14 fois la prise en charge des NPs par des macrophages MH-S par rapport à des NPs non PEGylées (Perry *et al.*, 2012).

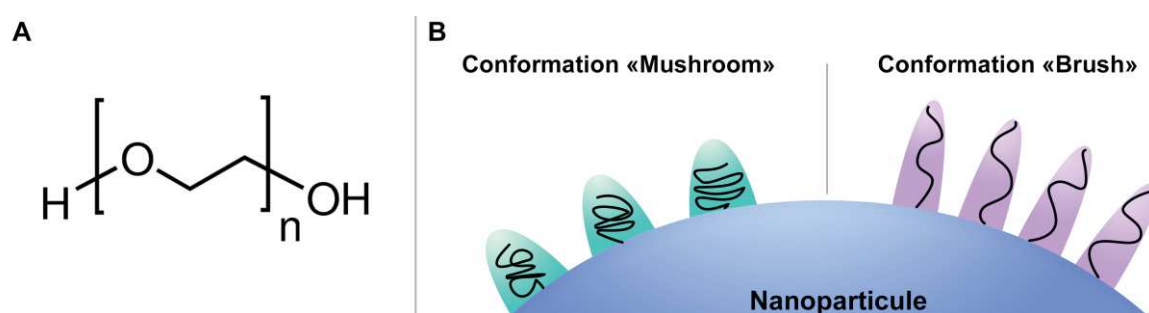


Figure 7. A) poly(éthylène glycol) B) en conformation "Mushroom" ou "Brush" à la surface d'une nanoparticule.

Le PEG permet donc de ralentir l'opsonisation en donnant cet effet de "furtivité" vis-à-vis des macrophages et augmente ainsi le temps de circulation des particules PEGylées dans le sang. Par exemple, la PEGylation de nanorods d'or en forte densité a prolongé leur circulation jusqu'à une demi-vie de 24 heures dans le sang chez la souris (Akiyama *et al.*, 2009). Cette

circulation prolongée permet de ce fait d'augmenter la possibilité d'atteindre une cible pathologique autre que le foie. Et en effet, l'accumulation de NPs dans une zone tumorale autre que le foie a ainsi été observée chez la souris et corrélée avec une circulation prolongée octroyée par la PEGylation (Perrault *et al.*, 2009).

3.2.b. L'effet "EPR"

Une longue circulation permet effectivement à une plus grande fraction de NPs de pouvoir diffuser dans le microenvironnement tumoral via un effet de perméabilité et de rétention améliorée, nommé EPR (« Enhanced Permeability and Retention »). L'effet EPR a été démontré pour la première fois en 1986 par Matsumura et Maeda (Matsumura & Maeda, 1986) et plus largement étudié par la suite, en particulier dans le cadre du ciblage thérapeutique des tumeurs (Fang *et al.*, 2003, Iyer *et al.*, 2006, Maeda, 2001, Maeda *et al.*, 2009, Seki *et al.*, 2009). Ces études ont montré que la plupart des tumeurs solides avaient des vaisseaux sanguins déstructurés et produisaient en grande quantité des facteurs de perméabilité (Figure 8). Ainsi, ces tumeurs présentent une perméabilité vasculaire accrue qui assure dans ce cas une quantité de nutriments et d'oxygène suffisante pour la croissance rapide des cellules tumorales. Un déséquilibre des régulateurs angiogéniques (facteurs de croissances, matrix metalloprotéinases) a également été observé, provoquant la formation de nombreux pores incluant des jonctions gap élargies situées entre les cellules endothéliales (Cho *et al.*, 2008).

L'effet EPR est ainsi considéré comme une spécificité anatomique et physiopathologique unique des vaisseaux sanguins en zone tumorale et inflammatoire. S'il est avéré que les macromolécules sont capables de passer dans les zones tumorales de manière passive via ces endothéliums désorganisés et perméables, les NPs sont supposées être capables également de s'accumuler dans ces zones par extravasation, qui est un ciblage tumoral passif. Le Doxil®, une formulation de la doxorubicine encapsulée dans des liposomes PEGylés et qui diffuse grâce à l'effet EPR, a été approuvé pour le traitement de plusieurs cancers en 1995 aux USA et en 1996 en UE (Barenholz, 2012, Schütz *et al.*, 2013). D'après Fang *et al.*, l'effet EPR est devenu l'étalon-or du design de NPs pour la délivrance de principes actifs anticancéreux (Fang *et al.*, 2011).

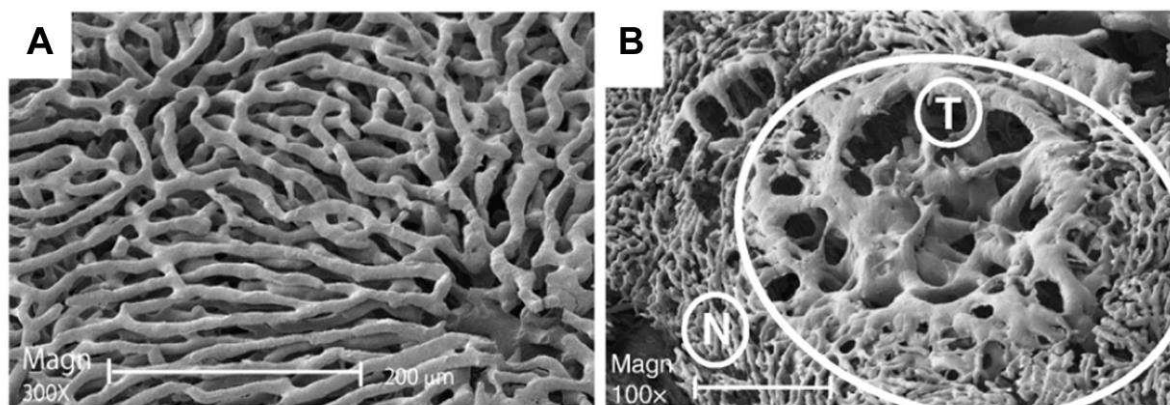


Figure 8. Microscopie électronique à balayage (SEM) de vaisseaux sanguins dans A) des tissus sinusoïdes normaux du foie et B) des tumeurs métastatiques du foie. T : Zone tumorale. N : Zone tissulaire saine. Adapté de Fang *et al.* (Fang *et al.*, 2011).

Cependant, l'effet EPR constitue également l'un des principaux pièges dans le domaine de la délivrance de principes actifs car cette spécificité tissulaire est souvent surévaluée. Ce phénomène est très hétérogène de par l'existence de variations importantes (inter et intra) d'un modèle de tumeur à un autre, sans oublier les variations interindividuelles. D'après Lammers *et al.*, il existe des disparités tissulaires importantes au sein d'une même tumeur, avec des parties endothéliales intactes et d'autres parties comprenant des doublures denses péri-vasculaires constituées de péricytes, de cellules musculaires lisses et/ou de fibroblastes, ne permettant pas au ciblage d'être totalement efficace (Lammers *et al.*, 2012).

Concernant le PEG, l'utilisation croissante de produits pharmaceutiques PEGylés a démontré ses effets bénéfiques, mais a également fait émerger ses effets secondaires (Ivens *et al.*, 2015, Knop *et al.*, 2010).

Ses inconvénients possibles sont :

- Une réponse immunologique déclenchant des réactions d'hypersensibilité (HSR)
- Un phénomène de clairance accélérée dès la seconde injection (production d'IgM anti-PEG (Ishida & Kiwada, 2008))
- Sa non-biodégradabilité

3.3. Troisième génération : vers le ciblage moléculaire actif

Un système de délivrance qui dépend exclusivement d'un mécanisme de ciblage passif fait inévitablement face aux limitations de l'effet EPR et de l'utilisation du PEG seul (Cho *et al.*, 2008).

En ayant connaissance de ces limites, mais également de la possibilité de fonctionnalisation de la surface des NPs, les concepteurs des nanovecteurs de 3^{ème} génération ont ajouté à ces NPs des fonctionnalités de ciblage. Ce sont les connaissances biologiques des associations ligands/récepteurs, notamment les récepteurs cellulaires surexprimés spécifiquement par les cellules cancéreuses, qui ont permis d'imaginer et d'élaborer des constructions de ciblage précis, dit actif, en utilisant des anticorps, des peptides, des vitamines, et autres molécules. Ainsi, un nanovecteur de 3^{ème} génération est composé d'un vecteur (organique ou inorganique), d'un principe actif et de fonctionnalisations de surface biologiquement actives qui peuvent interagir avec le milieu biologique environnant. Le ciblage doit cependant répondre à plusieurs critères (Allen, 2002). Premièrement, le récepteur ou ligand cellulaire ciblé doit être majoritairement exprimé dans les cellules tumorales, et pas dans les cellules saines. Deuxièmement, ces cibles doivent être exprimées de manière homogène sur l'ensemble des cellules tumorales ciblées. Enfin, elles ne doivent pas être sécrétées dans la circulation sanguine.

Cette approche a donné matière à de nombreuses études. Un exemple concret concerne le récepteur de l'acide folique (vitamine B9). D'après Leamon et Reddy en 2004, en utilisant du folate ou un analogue, une grande quantité de principe actif peut être administrée à des cellules cancéreuses positives au récepteur spécifique du folate (Folate receptor, FR) par déclenchement d'un mécanisme d'endocytose (Leamon & Reddy, 2004). Au niveau mécanistique, les auteurs ont ainsi décrit le schéma classique: la membrane plasmatique s'invagine pour former un endosome. Les endosomes nouveaux migrent vers des organites et s'acidifient, déclenchant l'activation de lysozymes. Le principe actif est alors libéré et pénètre dans le cytoplasme à condition qu'il ait les propriétés physico-chimiques pour traverser la membrane de l'endosome. Les récepteurs FR sont alors recyclés par la cellule et peuvent démarrer un nouveau cycle de reconnaissance (Cho *et al.*, 2008).

Il a été montré que l'acide folique avait une très forte affinité pour des récepteurs aux folates et particulièrement ceux qui sont liés au glycosylphosphatidylinositol, présentant une

expression limitée dans les cellules normales mais une surexpression de 100 à 300 fois chez des cellules cancéreuses (de type ovaires, seins, cerveau et poumons) (Goren *et al.*, 2000, Ross *et al.*, 1994). D'après Saba *et al.*, 53% des tumeurs squameuses primaires et métastatiques de la tête et du cou chez des patients présentent ce type de récepteurs FR, tandis qu'aucun de ces récepteurs n'a été retrouvé sur des cellules normales de la moelle osseuse (Saba *et al.*, 2007). Dans la continuité, cette même équipe a étudié une formulation à base de NPs d'héparine chargées d'une molécule active (Paclitaxel), et fonctionnalisées avec du folate pour le ciblage des cellules cancéreuses. Cette formulation a été testée chez des souris modèles et les résultats obtenus ont montré une réduction significative de la croissance de xénogreffes tumorales humaines, de même sur des tumeurs Paclitaxel résistantes, comparé aux NPs non fonctionnalisées et au Paclitaxel seul (Cho *et al.*, 2007). D'autres études ont été menées avec différents ligands en surface de NPs comme des aptamères (acides oligonucléiques de type ADN ou ARN qui présentent une conformation tridimensionnelle capable de se lier à des antigènes cellulaires spécifiques) (Alibolandi *et al.*, 2017, Farokhzad *et al.*, 2006, Farokhzad *et al.*, 2004, Hicke *et al.*, 2006, Liu *et al.*, 2016, Xie *et al.*, 2016), ou des protéines comme avec la transferrine (Chen *et al.*, 2017, Nag *et al.*, 2016, R. Nogueira-Librelotto *et al.*, 2017, Singh *et al.*, 2016).

Table 2. Quelques exemples de ciblage actifs avec un système de délivrance de principe actif.

Ligand	Cible	Résultats
Anticorps anti-CD74 (Lundberg <i>et al.</i> , 2004)	Récepteur CD74	Liaison covalente ligand/liposome; Reconnaissance par les cellules malignes du lymphome B
mBAFF (Zhang <i>et al.</i> , 2008)	Récepteur BAFF	BAFF est le ligand endogène habituel du récepteur BAFF. mBAFF est un mutant qui se lie au récepteur BAFF; Des liposomes PEGylés avec mBAFF permettent un ciblage des cellules du lymphome B <i>in vitro</i>
Acide Hyaluronique (Jain & Jain, 2008)	Récepteur HR	Les cellules cancéreuses HT-29 surexpriment le récepteur HR. Des NPs de chitosan incorporant de l'acide hyaluronique et chargées de 5-fluorouracile (anticancéreux) montrent une plus forte cytotoxicité <i>in vitro</i>
Anti-VEGF (Liu <i>et al.</i> , 2011b)	VEGF	NPs PLA-PEG fonctionnalisées avec un anti-VEGF et chargées de Gadolinium (agent de contraste en imagerie médicale). Délivrance facilitée du Gadolinium chez les cellules tumorales du foie VEGF-positives <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .
Ciblage par peptide (Jin <i>et al.</i> , 2016)	Intégrine $\alpha v \beta 3$	Des NPs type réservoirs (cœur lipidique et membrane polymère) contenant du Paclitaxel (anticancéreux) et un ligand peptidique inhibent significativement la croissance de tumeurs.

Adapté de Malam et al. (Malam et al., 2009).

Cependant si cette stratégie est très prometteuse, ce type de ciblage a tout de même quelques limites. Outre le ciblage des tissus pathologiques qui est délicat en raison de l'hétérogénéité tissulaire et de la nature stochastique des interactions ligands-récepteurs (Mura *et al.*, 2013), la construction physique du système doit inclure le ligand en surface des NPs. Celui-ci doit rester accessible, en quantité optimale, tout en conservant son intégrité chimique et sa stabilité ainsi que ses capacités de reconnaissance. Enfin, tout cela ne doit pas annihiler la furtivité du vecteur ni être compromis par l'environnement biologique.

3.4. Quatrième génération : nanoparticules multifonctionnelles stimuli-responsives

Une alternative basée sur de nouveaux types de nanovecteurs a émergé ces dernières années. Des constructions nanoparticulaires innovantes sont capables de fournir une réponse à divers stimuli grâce à des interventions exogènes (extracorporelles) ou endogènes.

3.4.a. La photothermie

L'une des voies les plus prometteuses est l'utilisation de nanovecteurs sensibles aux stimuli externes. C'est le cas de la photothermie (PTT) à travers l'utilisation de NPs de métaux nobles tel que l'or (Huang *et al.*, 2007). La PTT s'est développée rapidement comme une thérapie prometteuse pour le cancer car elle permet une augmentation sélective de la température des tissus tumoraux tout en évitant les dommages possibles sur les tissus sains (Figure 9A). Les NPs d'or (Figure 9B), ou partiellement composées d'or (cœur/coquille de type or/silice), se sont imposées comme la plateforme thérapeutique principale offrant des avantages majeurs tels qu'une résonance plasmonique modifiable, une haute conversion photothermique et une chimie de fonctionnalisation de surface ou d'encapsulation simple (Riley & Day, 2017).

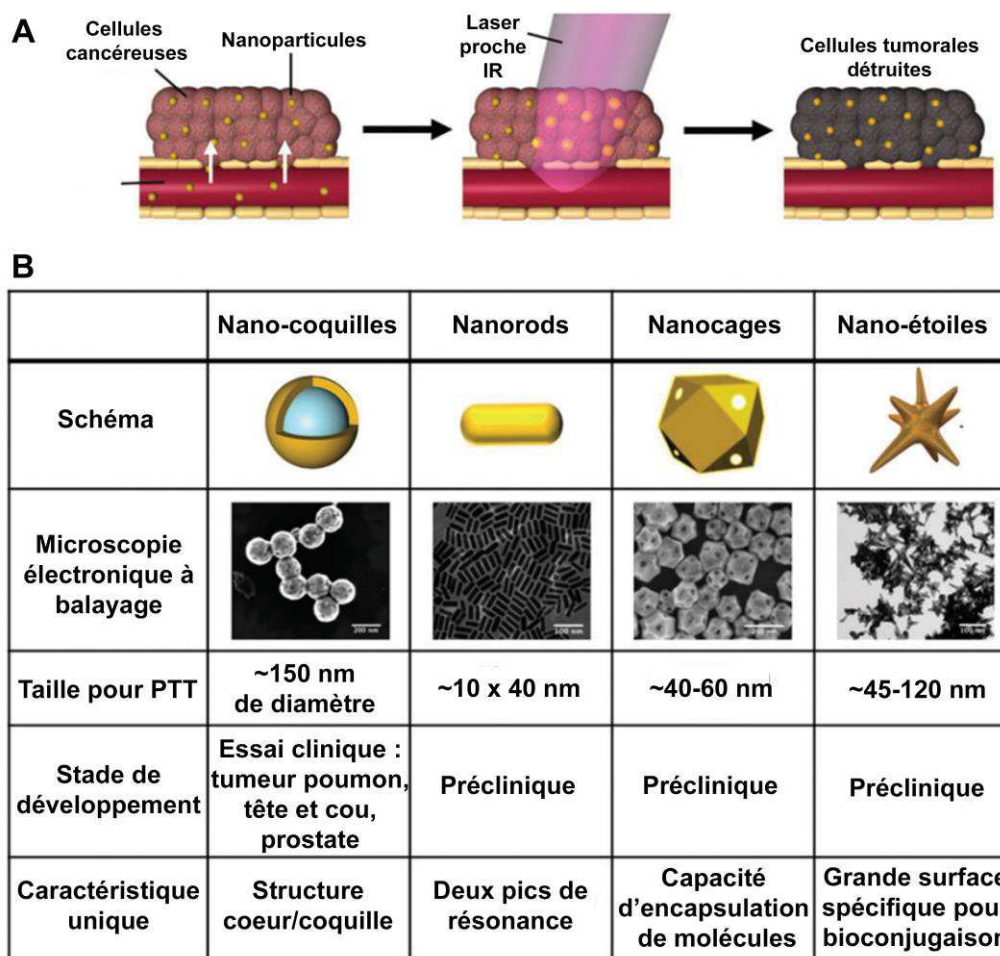


Figure 9. (A) Thérapie photothermique (PTT) qui consiste à augmenter la température de manière sélective dans des tissus tumoraux à l'aide d'un laser proche infrarouge. (B) Quatre des NPs d'or les plus couramment employées sont représentées. Adapté de Riley and Day. (Riley & Day, 2017)

En effet, les NPs d'or permettent une chimie de bioconjugaison simple de type or-thiol pour la fonctionnalisation de surface avec des molécules thérapeutiques, des ligands ou des agents de passivation qui améliore la biocompatibilité. Les propriétés optiques des NPs d'or peuvent être réglées en contrôlant leurs dimensions structurales afin qu'elles absorbent au maximum la lumière proche infrarouge ($\lambda \approx 650-1350$ nm), ce qui est idéal pour la PTT car la lumière peut pénétrer en toute sécurité profondément à travers les tissus sains pour atteindre les NPs d'or au sein d'une tumeur (Huang *et al.*, 2006). L'énergie lumineuse d'une onde électromagnétique est capable d'exciter les électrons de surface des NPs d'or, formant des plasmons localisés qui émettent une onde évanescence. Les NPs absorbent l'énergie du faisceau lumineux à une longueur d'onde donnée en fonction de leur taille et de leur forme (Jain *et al.*, 2008).

Deux spécialités pharmaceutiques sont en essais cliniques à savoir Auroshell® en phase I et Aurimmune® en phase II. D'autres produits sont à l'étude, comme Auritol® en pré-clinique. Verigene® est une plateforme approuvée en diagnostic *in vitro* (Schütz *et al.*, 2013).

3.4.b. Le magnétisme

Un autre exemple de stimulus externe est le champ magnétique, par ailleurs très étudié. L'avantage d'utiliser un champ magnétique est la possibilité de combiner plusieurs propriétés. En effet, il est possible d'utiliser un champ magnétique permanent pour guider les NPs, mais aussi d'utiliser un champ magnétique alternatif pour augmenter la température (l'hyperthermie). Ces possibilités diverses permettent d'envisager leur utilisation à la fois pour la thérapie avec la délivrance de principe actif (guidage et délivrance), mais aussi d'y associer le diagnostic par imagerie en résonance magnétique (IRM) en tant qu'agent de contraste (Barrow *et al.*, 2015). Cette combinaison récente est dite "théranostique" pour l'alliance entre la thérapie et le diagnostic.

Dans ce contexte, les NPs les plus étudiées sont les SPIONs pour « SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles ». Les SPIONs sont de petites NPs synthétiques de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), d'hématite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ou de magnétite (Fe_3O_4). D'autres NPs composées d'un alliage d'oxyde de fer et d'ions métalliques tel que le cuivre, le cobalt, le nickel ou le manganèse présentent également des propriétés superparamagnétiques et entre dans la catégorie des SPIONs. Mais dans les applications médicales, les SPIONs les plus utilisés restent pour l'instant les NPs de magnétite et de maghémite en raison d'une meilleure biocompatibilité (Wahajuddin & Arora, 2012).

L'origine du magnétisme de certains éléments est liée au courant formé par le déplacement de charges, dépendant de la structure atomique et de la température (Estelrich *et al.*, 2015). En diminuant la taille de particules magnétiques jusqu'à une valeur critique (exemple : 128nm pour les NPs sphériques de magnétite (Kandasamy & Maity, 2015)), celles-ci deviennent alors superparamagnétiques (Krishnan *et al.*, 2006). Le superparamagnétisme se caractérise par une aimantation forte dès l'application d'un champ magnétique, et un arrêt spontané dès l'arrêt de ce champ. Cette particularité est liée au nombre de domaines de Weiss (ou domaines magnétiques) formés dans la particule. Un domaine magnétique se réfère à un volume dans lequel tous les moments magnétiques sont alignés dans la même

direction. Les NPs superparamagnétiques ne contiennent ainsi qu'un seul domaine, alors qu'à l'inverse, les matériaux macrométriques se divisent spontanément en plusieurs domaines (Figure 10) (Dave & Gao, 2009, Estelrich *et al.*, 2015). Lors de l'application d'un champ magnétique externe, l'ensemble des domaines vont s'aligner avec ce champ magnétique jusqu'à ne former qu'un seul domaine. Les SPIONs n'étant formées que d'un domaine unique, celles-ci fournissent alors une réponse magnétique bien plus forte et plus rapide à l'application d'un champ magnétique que les matériaux multidomaines (Figure 10) (Dave & Gao, 2009, Kodama, 1999).

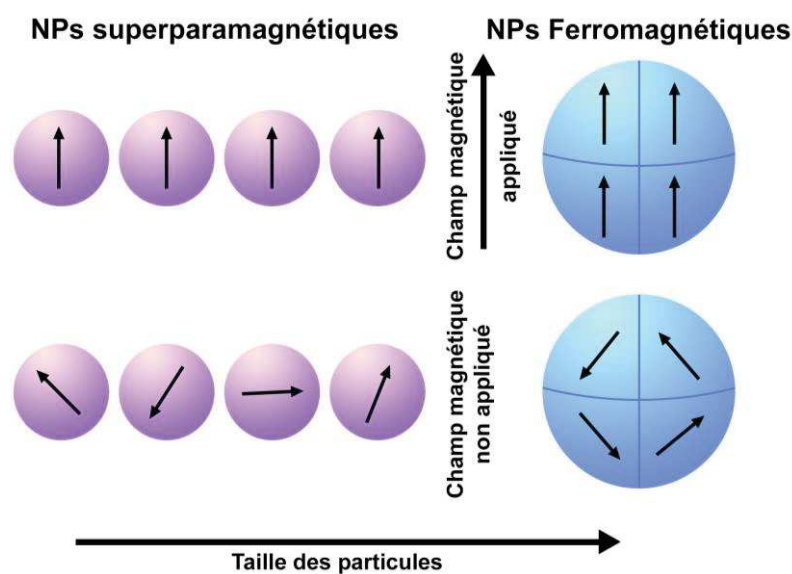


Figure 10. Comportement des nanoparticules superparamagnétiques et ferromagnétiques. Sous un champ magnétique externe, les domaines magnétiques s'alignent. En l'absence de champ magnétique, les ferromagnétiques maintiennent une aimantation résiduelle, contrairement aux superparamagnétiques.

En général, les SPIONs de Fe_3O_4 sont plus largement étudiées car plus simple à synthétiser. Même si la maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) est chimiquement plus stable, les deux types de nano oxydes n'ont pas été comparés en détail. En revanche, les SPIONs de Fe_3O_4 ont une aimantation de saturation plus élevée (Barrow *et al.*, 2015).

Les propriétés de surface des SPIONs sont essentielles pour leurs différentes applications. Un recouvrement organique ou inorganique est formé autour des SPIONs pour créer une coquille dans laquelle un principe actif est chargé. Plusieurs types de coquilles peuvent être utilisés pour recouvrir les SPIONs (Shubayev *et al.*, 2009):

- Organiques (dextran, chitosan, PEG, polysorbate, liposomes, peptides, *etc.*)
- Inorganiques (métaux, silice, *etc.*)

Ces NPs peuvent donc être suivies à distance en imagerie par résonance magnétique (IRM). Différents types de cœur/coquille utilisant le magnétisme pour l'imagerie (IRM) ou l'hyperthermie ont été étudiés, comme des liposomes magnétiques (Marie *et al.*, 2015, Martina *et al.*, 2007, Pradhan *et al.*, 2017, Shah *et al.*, 2016) ou des NPs de PLGA (Liu *et al.*, 2017a, Mosafer *et al.*, 2017, Sivakumar *et al.*, 2017) par exemple. Plusieurs systèmes à base de dextran ont par ailleurs été mis sur le marché comme Endorem® (1996) ou Resovist® (2001) pour l'imagerie médicale (Schütz *et al.*, 2013).

Outre le magnétisme ou la résonance plasmonique de surface, cette nouvelle génération de NPs a montré des résultats encourageants dans la réponse à divers stimuli physiques ou chimiques comme la température (Liu *et al.*, 2014), les ultrasons (Boissenot *et al.*, 2016) ou la variation de pH (Liu *et al.*, 2015) par exemple, mais aussi la pression osmotique, des concentrations enzymatiques, des gradients d'oxydo-réduction, *etc.* (Mura *et al.*, 2013).

3.5. Cas des nanoparticules magnétiques de silice mésoporeuse (M-MSNs)

Les NPs magnétiques de silice mésoporeuse (M-MSNs) combinent les propriétés de magnétisme offertes par les SPIONs et la capacité de charge de la silice mésoporeuse. Elles offrent une large gamme de fonctionnalités, tout en étant robustes et modulables. Ces NPs peuvent être modifiées chimiquement pour s'adapter à un grand nombre de scénarios de ciblage et de délivrance (Wang & Gu, 2015).

3.5.a. Un cœur unique au centre d'une coquille mésoporeuse

Ces dernières années, plusieurs stratégies de synthèse ont été testées pour encapsuler un cœur magnétique à l'intérieur d'une coquille de silice mésoporeuse, élargissant les applications de la nanomédecine (Wang & Gu, 2015). Cependant, le processus de nucléation hétérogène réalisé en surface d'un cœur de fer pour former une structure finale cœur/coquille était un verrou technique critique. En 2006, Kim *et al.* ont rapporté pour la première fois la réussite de l'encapsulation de plusieurs nanocristaux magnétiques

hydrophobes de 12 nm dans des sphères de silice mésoporeuse en utilisant une méthode de croissance en phase liquide, dénommée méthode sol-gel (Figure 11) (Kim *et al.*, 2006, Wang & Gu, 2015).

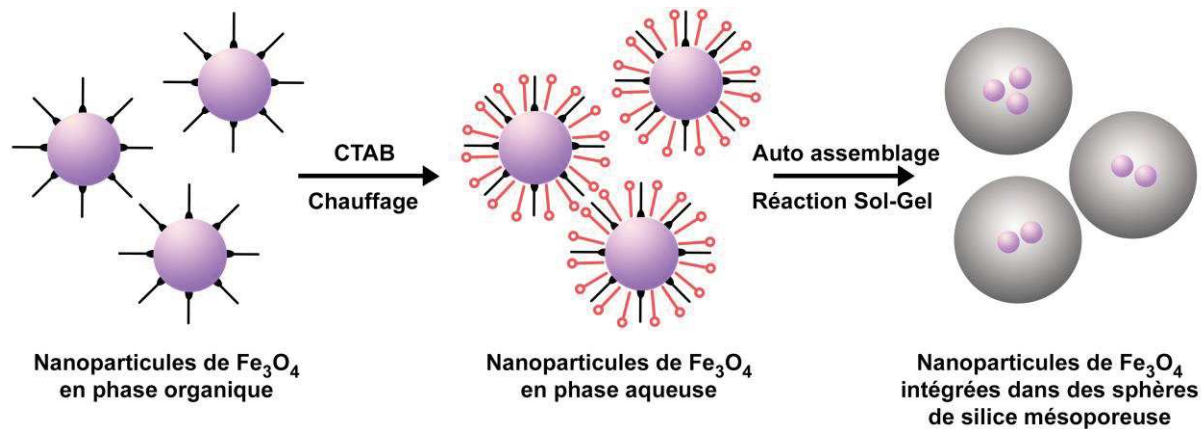


Figure 11. Schéma de la procédure de Kim *et al.* (2006) d'intégration de nanoparticules de magnétite dans des sphères de silice mésoporeuse (Kim *et al.*, 2006).

Dans cette méthode, les NPs de magnétite (Fe_3O_4) sont stabilisées dans une phase organique avec de l'acide oléique, puis transférées dans une phase aqueuse par mélange avec un tensioactif de type ammonium quaternaire, le cetyltriméthylammonium bromide (CTAB). Au cours de la réaction sol-gel, les NPs magnétiques chargées positivement jouent le rôle de "graines", c'est à dire que par hydrolyse et condensation, la formation d'une coquille de silice mésoporeuse va s'effectuer autour par interactions électrostatiques à partir d'un précurseur organosilane (le TEOS par exemple, tetraethyl-orthosilicate) dans la solution aqueuse contenant du CTAB (Li *et al.*, 2012). Le CTAB ne joue pas uniquement le rôle d'agent de transfert mais aussi de support à la formation de la mésostructure, le silicate se condensant autour du gabarit micellaire formant ainsi des structures ordonnées de silice. Cette même équipe a par la suite amélioré cette synthèse, créant des NPs monodisperses supposées contenir un cœur unique de Fe_3O_4 au centre d'une coquille de silice mésoporeuse (Figure 12) (Kim *et al.*, 2008).

Le contrôle de la taille des pores est une des caractéristiques élémentaires de ce système car il régit directement le type de molécule encapsulable au sein de la mésostructure. La taille des pores peut être finement choisie en utilisant des tensioactifs différents tel que la série des CTAB (C_{14}TAB , C_{16}TAB , C_{18}TAB) pour des pores de 2.4 à 3.4 nm, ou en employant des agents d'élargissement des pores comme le TMB/décane (1,3,5-triméthylbenzene) pouvant aller jusqu'à 6,1 nm de diamètre (Zhang *et al.*, 2011).

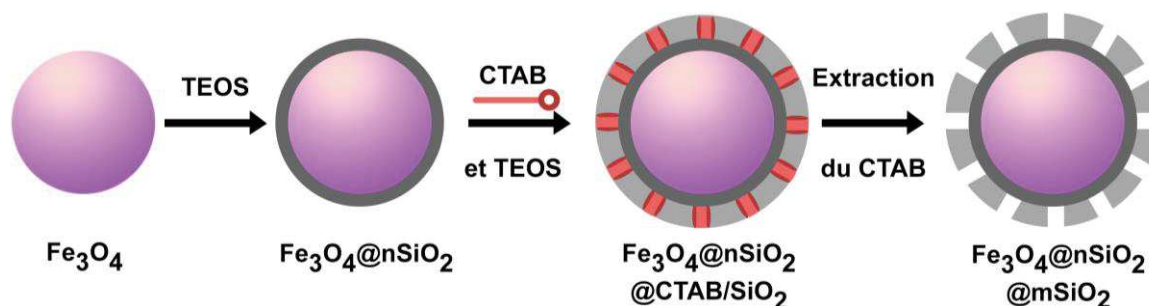


Figure 12. Schéma de la procédure améliorée de la synthèse de nanoparticules magnétiques de silice mésoporeuse selon Kim *et al.* (Kim *et al.*, 2008).

3.5.b. Les applications théranostiques

Les M-MSNs sont des NPs à très fort potentiel car elles combinent tous les avantages offerts par les différents systèmes nanovectorisés : un cœur de fer permettant d'interagir avec un stimulus externe et une coquille de silice entièrement fonctionnalisable qui, par sa structure, permet l'encapsulation de molécules diverses. Cette diversité permet d'imaginer l'association de la thérapie et du diagnostic avec une même plateforme nanoparticulaire. Un tel système maîtrisé permettrait d'effectuer un pas supplémentaire vers la médecine personnalisée, permettant d'adapter les modes de dosage et de distribution à la réponse biologique d'un patient.

De nombreuses études sont réalisées avec les M-MSNs, que ce soit dans l'imagerie médicale, la réponse à un stimulus ou la délivrance de principe actif. Les prochains paragraphes illustreront ces trois possibilités souvent combinées.

- Le diagnostic par imagerie par résonance magnétique (IRM)

L'IRM est une technique médicale puissante et non invasive permettant un diagnostic anatomique de grande précision. Cette technique est basée sur le phénomène de résonance magnétique nucléaire du proton de l'hydrogène, composant majeur de l'eau contenue dans l'organisme. Cette particularité offre une pénétration tissulaire illimitée et une excellente résolution spatiale (Wang & Gu, 2015). Ce sont les propriétés du spin du proton de l'hydrogène qui sont mises à profit dans cette technique. A l'activation d'un champ magnétique puissant, les protons passent d'un état fondamental à un état excité puis

reviennent à leur état fondamental. Une image est ainsi reconstituée en fonction de l'intensité du signal, dépendant des paramètres magnétiques de chaque tissu. Ces paramètres sont appelés temps de relaxation, et correspondent au temps de retour à l'équilibre des atomes d'hydrogène après excitation par l'onde électromagnétique. Il existe deux types de temps de relaxation, symbolisés par T1 et T2, correspondant respectivement à la relaxation longitudinale et transversale. Ainsi, la conjonction de séquences d'excitation différentes permet d'identifier les différents tissus solides, liquides, gras, tissus tumoraux ou inflammatoires. Les os cependant n'émettent pas de signaux car ils sont dépourvus d'eau (Wang & Gu, 2015).

Certains cas pathologiques requièrent l'utilisation d'agents de contraste afin d'en améliorer le diagnostic. Par exemple, le Gadolinium (Gd) est utilisé en complexe avec des ligands. Le Gd est un des métaux capables de jouer sur le temps de relaxation T1 des molécules d'eau, situées à proximité, par interaction avec ses électrons non appariés. En IRM, cela se matérialise par une gamme d'intensité de signal plus grande permettant de mieux détecter des tissus pathologiques inflammatoires ou tumoraux (McDonald *et al.*, 2015). Cependant, certains agents de contrastes à base de Gd présentent des complications de types fibrose systémique néphrogène chez des patients ayant des dysfonctionnements rénaux (Kim *et al.*, 2011, McDonald *et al.*, 2015).

Dans ce contexte, les M-MSNs ont la particularité d'allier la propriété de superparamagnétisme offerte par le cœur de fer avec les possibilités d'encapsulation et de fonctionnalisation de surface de la mésostructure de silice. En effet, les NPs superparamagnétiques Fe₃O₄ sont connues pour améliorer le contraste du temps de relaxation T2 (Ferridex®, Combidex®, autorisés par la FDA pour une utilisation clinique (Schütz *et al.*, 2013)). Combinée à l'incorporation d'un agent de contraste T1, le système pourrait avoir un intérêt majeur en imagerie médicale en augmentant considérablement la sensibilité, tout en préservant les tissus sains des effets adverses des agents de contrastes comme ceux à base de Gd.

Une étude a été réalisée en 2011 par Yang *et al.* traitant de l'amélioration des signaux T1 et T2 en IRM avec des NPs magnétiques de silice marquées au Gd (Yang *et al.*, 2011). Après réalisation de la coquille de silice, les auteurs ont créé des groupements amine en surface, ce

qui a permis la conjugaison covalente de complexes à base de Gd (Gd-DTPA, diethylenetriamine pentaacetic acid) et de peptides RGD (Arginine-Glycine-Acide Aspartique) en tant que molécules de ciblage. Ces constructions qui ne présentent qu'une très faible toxicité *in vitro* (200µg/mL, 20% de perte de viabilité maximale) sur des cellules U-87 MG (glioblastome cérébral), ont été testées *in vivo* en IRM sur des souris modèles à un dosage de 16mg/kg par injection. A partir de 24h après injection, les images issues d'IRM des xénogreffes tumorales sont significativement améliorées, avec une intensité deux fois plus importante pour le signal positif T1 et une baisse de 70% de l'intensité du signal T2. Les auteurs n'ont observé qu'une petite portion des particules localisées dans le foie.

Ces résultats démontrent que ce type de construction nanoparticulaire permet d'obtenir des diagnostics plus précis par exposition combinée de deux agents de contraste (cœur de fer, Gd), augmentant considérablement la sensibilité et la spécificité en imagerie médicale (Yang *et al.*, 2011).

- **L'hyperthermie par champ magnétique**

L'hyperthermie est un processus basé sur l'augmentation de la température d'une zone tissulaire, provoquant la destruction des cellules. Ses effets thérapeutiques sur les cellules cancéreuses ont été démontrés (Wust *et al.*, 2002). Une nouvelle méthode d'hyperthermie consiste à induire une augmentation de température par champ magnétique appliqué sur des NPs pour localiser la chaleur directement sur des cellules cibles.

La combinaison de NPs magnétiques avec une coquille de silice mésoporeuse est très prometteuse car elle permettrait la synergie possible entre la production localisée de chaleur et la libération contrôlée d'un principe actif. D'après Martín-Saavedra *et al.*, les M-MSNs s'internalisent dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses humaines et n'induisent pas de changements morphologiques ou métaboliques. A l'application d'un champ magnétique alternatif de 100 kHz à 200 Oe (œrsted), la réponse des M-MSNs a donné lieu à une élévation significative de la température, avec une perte de viabilité efficace des cellules tumorales (Martín-Saavedra *et al.*, 2010). Outre l'effet délétère que peut procurer la température directement sur les cellules, l'hyperthermie a été testée pour libérer des molécules ou des protéines transportées par les M-MSNs via des constructions thermosensibles (Baeza *et al.*, 2012). Baeza *et al.* ont créé une structure polymérique

thermosensible greffée en surface des M-MSNs qui agit comme un portail sur les pores, retenant le principe actif à l'intérieur de la silice mésoporeuse à température ambiante, la libération ne se produisant qu'à partir de 40°C (Figure 13).

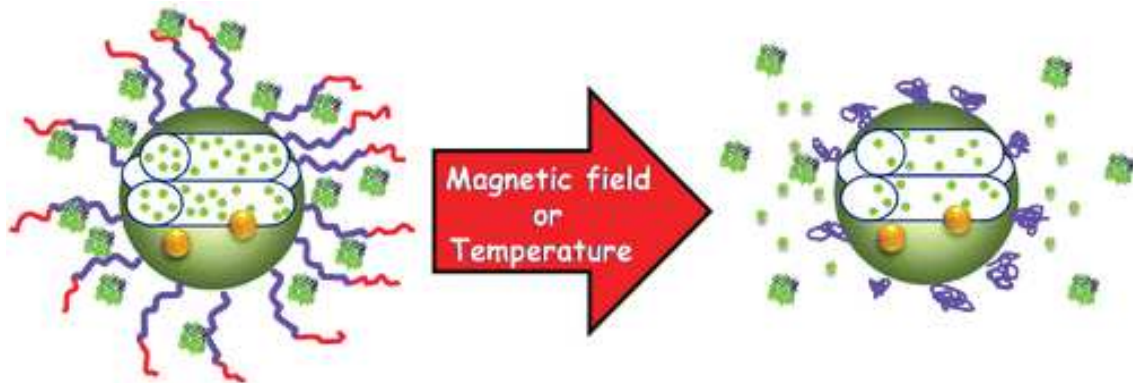


Figure 13. Représentation schématique de la libération d'un principe actif par augmentation de la température. Illustration de Baeza *et al.* (Baeza *et al.*, 2012).

D'autres constructions ont été testées, comme des designs à base d'ADN par exemple. Ruiz-Hernandez *et al.* ont immobilisé à la surface de M-MSNs de l'ADN monocaténaire et par hybridation avec le brin complémentaire, l'ADN a permis le blocage des pores de la silice (Ruiz-Hernández *et al.*, 2011). Cette construction est ainsi réactive à la température, libérant la molécule contenue dans la mésostructure de silice par dénaturation des brins d'ADN. Ainsi, l'ensemble de ces travaux démontre la possibilité de créer des systèmes contrôlables à des fins thérapeutiques.

- **La délivrance de principe actif**

En 2001, Huang et Brazel ont écrit que bien que le phénomène de "burst release" n'ait pas été totalement ignoré, aucune description précise n'a été faite jusqu'alors (Huang & Brazel, 2001). Le "burst release" est défini aujourd'hui comme une délivrance non contrôlée d'une large partie du principe actif encapsulé, immédiatement après contact avec le milieu biologique (comme le sang après injection par exemple). C'est parce que ce phénomène est extrêmement rapide comparé au processus total de délivrance qu'il n'a pas été étudié et même parfois ignoré de nombreux modèles mathématiques (Huang & Brazel, 2001).

Dans des situations précises, cette délivrance rapide peut être considérée comme un avantage. Par exemple lorsque la demi-vie *in vivo* d'une molécule encapsulée est très faible

ou que son activité chimique ou biologique est très courte. Néanmoins, le contournement de cette libération explosive du principe actif est nécessaire car ce phénomène est dangereux et inefficace d'un point de vue pharmacologique. Les M-MSNs permettent ainsi d'envisager un grand nombre de stratégies pour encapsuler et délivrer une molécule active. Mais surtout, il est possible de déclencher cette délivrance de manière contrôlée grâce aux nombreuses fonctionnalisations possibles (Knezevic *et al.*, 2013), comme vu précédemment avec l'hyperthermie par magnétisme. Les systèmes de délivrance répondant à des stimulations semblent être une voie d'avenir pour localiser les efforts thérapeutiques sur une zone précise. D'autres exemples concrets de libération contrôlée sont reportés dans la littérature. Par exemple, le pH extracellulaire des tumeurs solides étant considéré comme inférieur à celui des tissus sains (Stubbs *et al.*, 2000) (par acidification du microenvironnement dû à la sécrétion d'acides lactiques issus d'une glycolyse exacerbée dans de nombreuses tumeurs), il peut être exploité à des fins de délivrance programmée. Chang *et al.* en 2011 ont créé une structure M-MSNs fonctionnalisée avec un polymère pH-sensible (Chang *et al.*, 2011). La doxorubicine maintenue dans les pores de la mésostructure de silice est ainsi délivrée de manière optimale à pH 5.0 et non à pH 7.4.

De nombreux tests ont été ainsi effectués afin d'allier les bénéfices du cœur de fer et de la coquille de silice mésoporeuse, et l'ensemble des résultats est très prometteur (Biswas, 2017, Knezevic *et al.*, 2013, Singh *et al.*, 2011, Yang *et al.*, 2017, Zhang *et al.*, 2012). Néanmoins d'après Schütz *et al.*, aucune spécialité pharmaceutique à base de M-MSNs n'est actuellement en phase clinique ou autorisé par les instances réglementaires (Schütz *et al.*, 2013). En effet, les M-MSNs souffrent des mêmes problématiques que les autres types de NPs et de nombreux verrous demeurent. Les études d'interactions à l'interface nano-bio, si elles sont effectuées systématiquement, fourniront des directives rationnelles pour créer de futurs nanosystèmes utiles en médecine. Il est peu probable qu'une conception unique ou un matériau seul soit capable de guider une NP dans l'organisme entier, mais l'avancée des connaissances dans ce domaine est un axe majeur pour l'avenir de la nanomédecine (Chan, 2017).

4. Evaluation de la biocompatibilité et de la toxicité des nanovecteurs

Au cours des dernières décennies, les systèmes d'administration de médicaments à base de NPs sont devenus des sujets expérimentaux attractifs pour l'industrie pharmaceutique, avec de potentielles applications majeures dans de nombreux domaines thérapeutiques (Kohane & Langer, 2010). Cependant, depuis une dizaine d'années, l'utilisation des NPs, d'une manière générale, soulève de nombreuses préoccupations car celles-ci peuvent aussi exercer une toxicité non désirée, constituant une menace pour la santé humaine (Oberdörster, 2010).

En 2006, plusieurs scientifiques ont proposé cinq grands défis à relever afin de parvenir à un développement sûr et durable des nanotechnologies (Maynard *et al.*, 2006). Ces défis ont été définis de la manière suivante :

- Elaborer des instruments pour surveiller l'exposition aux NPs dans l'air et l'eau
- Développer et valider des méthodes pour évaluer la toxicité des NPs
- Elaborer des modèles pour prédire l'impact des NPs sur la santé humaine et l'environnement
- Développer des systèmes robustes pour évaluer l'impact des NPs, tout au long de leur cycle de vie, sur la santé humaine et l'environnement
- Elaborer des programmes stratégiques qui permettent des recherches pertinentes axées sur les risques

La plupart de ces défis répondent essentiellement à des préoccupations environnementales liées à l'utilisation de nanomatériaux. Toutefois les NPs à visée médicale suscitent les mêmes interrogations et les mêmes exigences doivent leur être appliquées.

Alors comment concevoir des nanomédicaments sécurisés ? Une option intéressante est d'inclure directement dans le processus de conception l'idée de sécurité biologique, dans une stratégie dite de « safety by design » (Nyström & Fadeel, 2012). Cette stratégie allie l'évaluation de la sécurité à la conception même des nanovecteurs, permettant ainsi d'anticiper certains effets indésirables. Cette approche consiste à définir à l'avance l'ensemble des critères à prendre en compte dans la conception d'un nanovecteur, à savoir : la biocompatibilité avec les tissus sains, la capacité de délivrance (incluant le ciblage,

l'encapsulation et la libération du principe actif), la biodégradabilité ou le potentiel d'excrétion, la traçabilité (ex : théranostic), et la possibilité d'être synthétisé de façon robuste et reproductible.

Néanmoins, bien que certaines propriétés puissent facilement être anticipées et intégrées dans la conception (ex: besoin d'un recouvrement pH-sensible), ce n'est pas le cas des interactions avec le vivant qui sont difficilement prévisibles. De ce fait, avant que les nanovecteurs puissent devenir une réalité clinique, il est nécessaire d'évaluer plus en détail les questions de toxicité et de biocompatibilité des NPs. La biocompatibilité peut se résumer globalement par l'innocuité des relations entre les NPs et leur environnement biologique (Kohane & Langer, 2010), alors que la toxicité concerne les réponses biologiques indésirables liées aux propriétés physico-chimiques des NPs, et l'évaluation du risque qu'elles représentent (Kunzmann *et al.*, 2011).

Généralement, les évaluations de la biocompatibilité et de la toxicité passent par différentes phases *in vitro* et *in vivo*. Elles nécessitent une caractérisation fine des nano-objets, suivie de différents tests sur modèles animaux ou cellulaires évaluant par exemple l'impact sur la morphologie et la viabilité, la modification de l'expression génique ainsi que leur biodistribution dans l'organisme. Ces tests peuvent également dépendre de la nature du problème anticipé en fonction de la composition des NPs. Par exemple, certains types de NPs sont capables de libérer des ions. C'est le cas des NPs d'argent qui libèrent par dissolution des ions Ag^+ qui peuvent se substituer à d'autres ions sur des sites de fixation de métalloprotéines, pouvant perturber l'homéostasie des métaux (Liu *et al.*, 2017b).

4.1. Caractérisation physico-chimique

Il existe un grand nombre de publications concernant la toxicité des NPs. Cependant, il est difficile de comparer ces études entre elles et d'en dégager des conclusions consensus. L'une des raisons expliquant ces différences provient d'un manque de caractérisation des NPs avant d'effectuer des tests de toxicité. En effet, après avoir été synthétisées, les NPs doivent être caractérisées afin d'en connaître les propriétés physico-chimiques (Orts-Gil *et al.*, 2011, Thomassen *et al.*, 2010). Il est important de distinguer les différences de propriétés intrinsèques des NPs car elles vont gouverner la majeure partie des interactions qui vont se

produire dans un milieu biologique. Ceci est d'autant plus vrai dans un contexte médical où les lots de réactifs et de médicaments doivent être les plus proches possible les uns des autres. Ainsi, certaines propriétés physico-chimiques des NPs apparaissent comme particulièrement importantes à caractériser (Stone *et al.*, 2010). Quelques-unes sont présentées dans le tableau ci-après (Table 3).

Table 3. Différentes propriétés physico-chimiques importantes à caractériser.

Paramètre physico-chimique	Technique
Diamètre hydrodynamique	Diffusion dynamique de la lumière (DLS)
Polydispersité	Diffusion dynamique de la lumière (DLS)
Charge de surface	Potentiel Zeta
Taille et structure	Microscopie électronique à transmission (TEM)
Taille et forme	Microscopie à force atomique (AFM)
Surface spécifique et porosité	Sorption/désorption isotherme de l'azote - Méthode Brunauer-Emmett-Teller (BET)

La diversité des paramètres physico-chimiques des NPs soulève toutefois quelques questions particulières, notamment celle de la transposition des effets toxiques d'un type de NPs à un autre. Bien que les méthodes de caractérisation présentées dans la table 3 soient "classiques", il subsiste tout de même des variations de résultats entre les laboratoires qui les mettent en œuvre ; ce constat conduit de fait à la nécessité de mettre en place des méthodes standardisées. Pour certains matériaux (les nanotubes de carbone par exemple), il est possible de trouver quelques standards édités par l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques) ou l'ISO (Organisation Internationale de Normalisation), mais cela reste encore aujourd'hui très limité et insuffisant au regard de la grande diversité des NPs utilisées.

4.2. Evaluation de la toxicité - La nanotoxicologie

D'après Oberdörster *et al.*, le champ récent de la nanotoxicologie provient d'une part de l'accumulation de données relatives à la toxicologie des particules regroupant celles des poussières, des métaux, des radionucléides, de la silice, de l'amiante, des fibres synthétiques

et des particules fines issues de la pollution de l'air (PM₁₀ = particules de dimension inférieure à 10 µm). D'autre part la virologie, à la fois pour des raisons de taille de particules et d'interaction avec les cellules humaines, a contribué à alimenter ce champ disciplinaire (Oberdörster *et al.*, 2007) (Figure 14). Aujourd'hui, la nanotoxicologie est un des domaines les plus préoccupants de la toxicologie, en raison du développement fulgurant des nanomatériaux (Hobson, 2016).

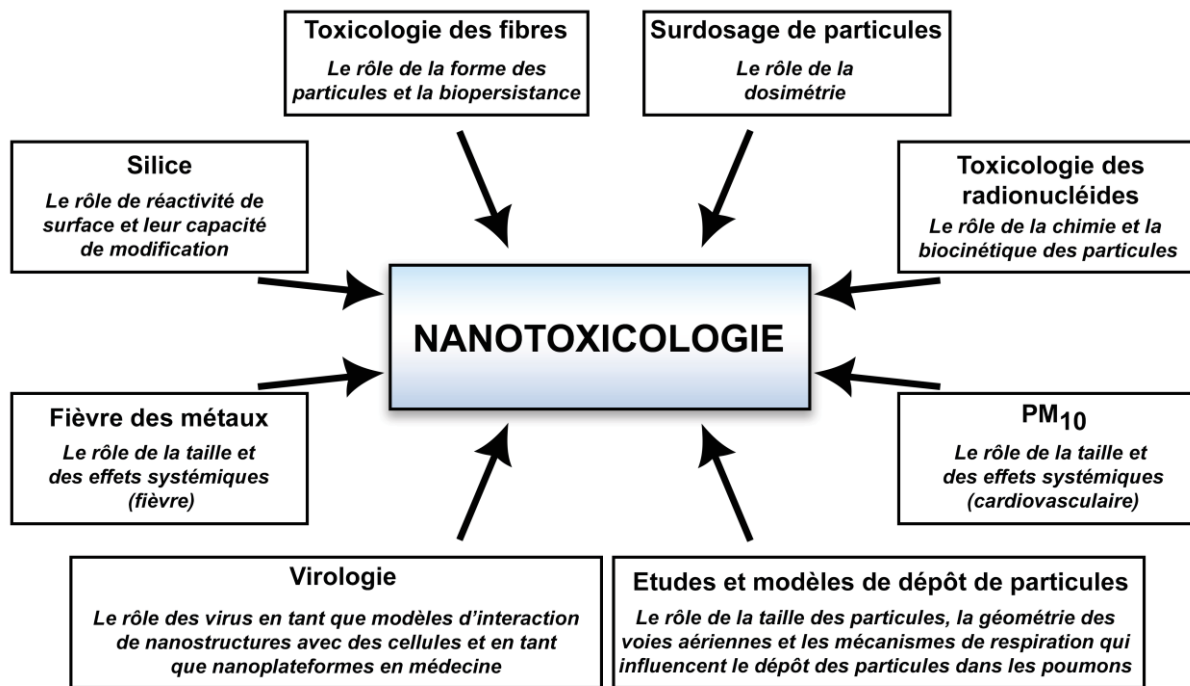


Figure 14. Représentation de l'origine de la nanotoxicologie. Adapté de Oberdörster *et al.* (Oberdörster *et al.*, 2007).

Les NPs ont longtemps été considérées équivalentes aux produits chimiques par les instances de toxicologie réglementaire (Hartung, 2010). Cet amalgame vient du fait que la toxicologie interprète l'impact d'un produit sur le vivant et doit en évaluer le risque ; ce qui est valable pour n'importe quel produit potentiellement toxique. Cependant, les méthodes utilisées et les interprétations qui en découlent doivent être adaptées afin de prendre en compte les différences qui subsistent entre les substances chimiques et les NPs. Pour ce faire, c'est vers les propriétés très particulières des NPs qu'il faut se tourner. Le terme même de "nanotoxicologie" est d'ailleurs né de la prise de conscience que les particules ultrafines inhalées pouvaient avoir des effets toxiques différents en comparaison de ceux induits par de faibles quantités de la même substance chimique à l'état non nanoparticulaire (Hobson,

2016). Schématiquement, la différence entre une substance chimique et une NP peut être représentée, d'une part, par une molécule aux caractéristiques connues, et d'autre part, par un objet polymorphe souvent mal caractérisé. Ainsi aujourd'hui, on admet que la taille, la forme, les propriétés de surface, la charge et autres caractéristiques des NPs peuvent profondément modifier leurs effets toxiques et leurs modes d'actions (Hobson, 2016). Par exemple, là où des produits chimiques toxiques inhalés provoquent une inflammation aigüe sur l'ensemble des tissus atteints (nasaux, broncho-alvéolaires), les NPs se déposent et agissent au niveau pulmonaire uniquement selon une distribution spatiale étroitement liée à leurs formes et leurs tailles. Par conséquent, les problématiques posées par ces deux types de substances ne sont pas les mêmes et des mécanismes différents sont à prendre en compte lorsqu'il s'agit de NPs. Dans le cas de la toxicité pulmonaire des NPs, la clairance pulmonaire, la prise en charge par des macrophages ou encore, l'influence des fluides (mucus, surfactant alvéolaire) sont des mécanismes à prendre en compte (Kagan *et al.*, 2005). La nanotoxicologie fait appel à de multiples champs disciplinaires tels que la chimie, la physique, la biologie et la toxicologie (Kunzmann *et al.*, 2011).

Lors des tests d'évaluation de la toxicité, les doses des NPs doivent être choisies de manière appropriée. D'après Oberdörster *et al.*, de nombreuses études utilisent des doses extrêmement élevées, et les résultats toxicologiques qui en découlent doivent être interprétés avec précaution (Oberdörster, 2010). Une évaluation approfondie des effets adverses et des effets désirables en relation avec des doses appropriées est donc nécessaire pour les applications nanomédicales des NPs. L'évaluation du risque posé par les NPs doit également prendre en considération la pharmacocinétique et la biopersistence, en tenant compte des spécificités de ces nanomatériaux.

4.2.a. Les particularités de la nanotoxicologie

Dans tout environnement biologique, les dynamiques d'interactions influencent considérablement les nano-objets. Ces interactions peuvent être de deux ordres : 1) entre les NPs elles-mêmes et 2) entre les NPs et leur environnement biologique. Quelques exemples d'interactions sont présentés ci-dessous.

- L'agrégation -l'agglomération

Les NPs ont une propension à s'unir pour donner naissance à des agrégats ou à des agglomérats. Ces phénomènes sont très communs mais difficilement prédictibles. Ils se différencient par l'intensité des forces qui maintiennent les NPs entre elles : on parle d'agrégats en présence de liaisons chimiques fortes et d'agglomérats en présence de liaisons physiques faibles. Les NPs peuvent plus ou moins s'agréger ou s'agglomérer dans des liquides ou dans l'air (Figure 15) et former des complexes pouvant atteindre des dimensions de plusieurs microns, provoquant ainsi des réponses différentes vis-à-vis du vivant (Oberdörster *et al.*, 2007).

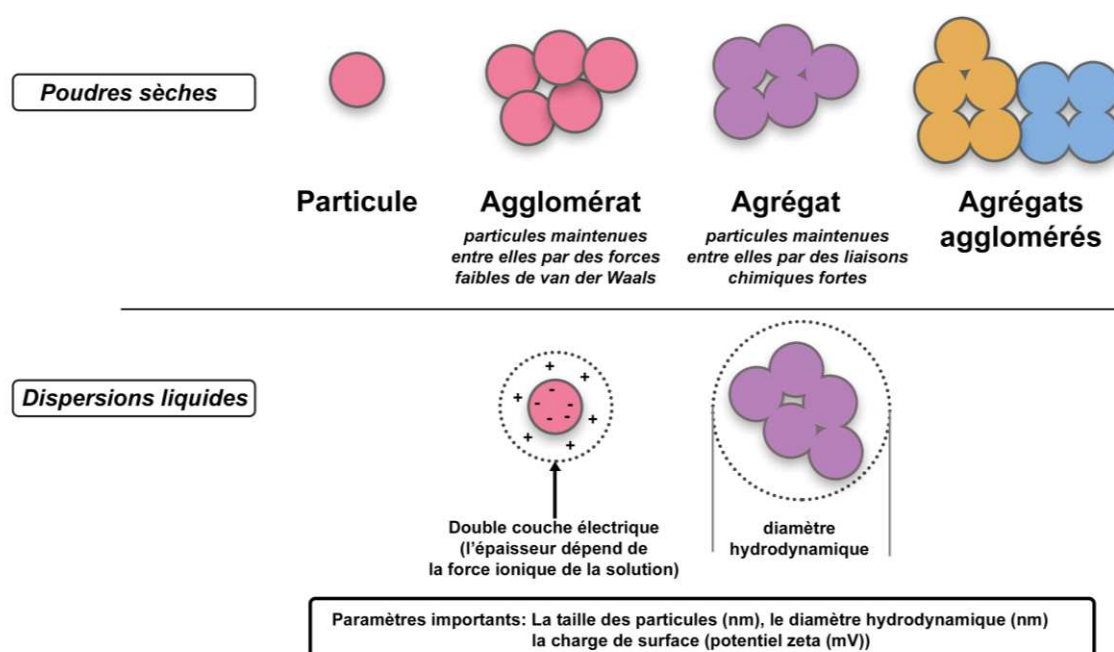


Figure 15. Phénomènes d'agglomération et d'agrégation des particules en poudres sèches ou dispersées dans un liquide. Adapté de Oberdörster *et al.* (Oberdörster *et al.*, 2007).

La caractérisation dimensionnelle des matériaux est essentielle à l'interprétation des résultats toxicologiques car la taille est un élément clé pour le passage à travers les différentes barrières cellulaires. La taille des NPs peut avoir des incidences directes sur de nombreux mécanismes cellulaires (Table 4). Par exemple, la translocation de particules larges vers des organes secondaires depuis le tractus respiratoire puis leur passage dans la circulation sanguine ont été démontrés uniquement en cas de surdosages associés à des

états inflammatoires ; alors qu'il en est tout autre lors de l'administration de NPs (Oberdörster, 2010).

Table 4. Différences observées selon la taille des particules lors d'une exposition par voie respiratoire. Adapté de (Oberdörster, 2010)

	Nanoparticules (<100 nm)	Particules (>500nm)
Adsorption de protéines et lipides <i>in vitro</i>	Oui, influence la bio-cinétique	Moins importante
Clairance Mucociliaire	Oui	Efficace
Prise en charge par macrophages alvéolaires	Faible	Efficace
Translocation dans les cellules épithéliales	Oui	En surdose
Translocation dans la circulation sanguine	Oui	En surdose
Internalisation cellulaire	Oui (Clathrine et Cavéoline)	Surtout par les cellules phagocytaires
Atteinte des mitochondries	Oui	Non
Atteinte des noyaux	Oui (<40 nm)	Non
Inflammation	Oui	Oui
Stress oxydant	Oui	Oui
Activation de voies de signalisations canoniques	Oui	Oui
Génotoxicité	Parfois	Non

L'homme ou l'environnement peuvent être exposés aux NPs sous forme libre mais aussi sous forme agglomérée ou agrégée. La voie d'exposition est extrêmement importante. Il est important de noter qu'en nanomédecine, en particulier pour l'injection dans le flux sanguin, l'agrégation est proscrite car le risque d'embolie est trop important. Des approches visant à disperser les NPs existent (par exemple les ultrasons), mais leur utilisation peut modifier l'état des charges de surface des NPs. Ainsi, les différences de comportement qui peuvent exister entre des NPs d'une substance et leurs homologues de plus grandes tailles exigent une caractérisation physico-chimique poussée des matériaux utilisés pour l'évaluation du risque toxicologique.

- La dosimétrie

Un principe fondamental en pharmacologie est de pouvoir développer une échelle d'activité chimique qui agit sur des systèmes biologiques de manière proportionnelle à la concentration (Hardman & Limbird, 2001). Ce paradigme de dose-réponse est sensiblement le même en toxicologie mais plus délicat à établir en nanotoxicologie. Les facteurs et les processus qui contrôlent la dose effective de NPs sur les cellules sont différents de ceux applicables aux produits chimiques (Teeguarden *et al.*, 2007). Les NPs sont affectées par les fluides et leurs dynamiques. De nombreux paramètres entrent en jeu, tant au niveau des NPs (taille, charge, chimie de surface, solubilité, *etc.*) que des fluides (température, viscosité, densité, présence de biomolécules, *etc.*). La notion de dose pour les NPs dans un système *in vitro* ou *in vivo* est donc bien plus complexe à définir, car plus dynamique que celle des substances chimiques.

In vitro, la distinction entre la dose d'exposition et la dose effective est particulièrement difficile à établir pour les NPs. Néanmoins, si les tests *in vitro* sont destinés à être utilisés dans l'évaluation du danger des NPs, cette problématique doit être résolue. La dosimétrie de produits chimiques *in vitro* s'appuie sur deux paramètres : la concentration et le temps (Teeguarden *et al.*, 2007). Les solutions chimiques ont des propriétés connues qui ne varient pas en solution (solubilité, hydrophilie, *etc.*). Contrairement aux produits chimiques, les NPs ont des caractéristiques physiques propres aux objets telles qu'une forme ou une chimie de surface, qui peuvent influencer la dose effective. C'est ce qui différencie une solution d'une suspension. La dosimétrie des NPs *in vitro* est un problème multidimensionnel. Elle inclut la concentration et le temps, mais également toute une série de paramètres qui vont influencer la dose délivrée aux cellules (Figure 16), comme l'aggrégation, la sédimentation ou le mouvement brownien des fluides. Ainsi, les NPs qui sont plus larges et plus denses atteindront les cellules plus rapidement et en plus grande quantité que les NPs plus petites et moins denses.

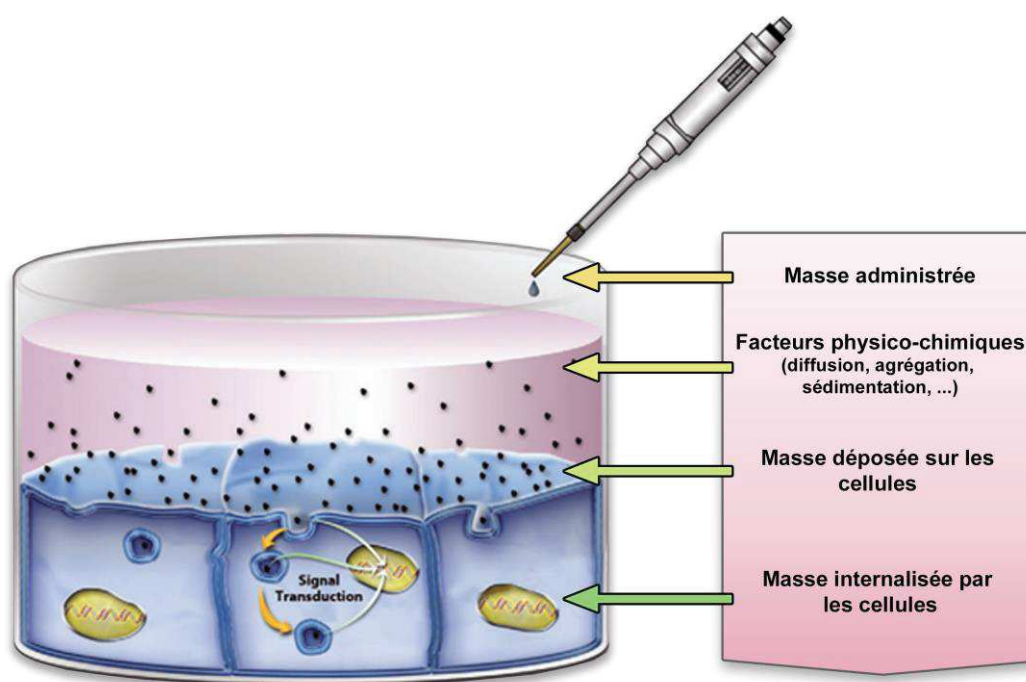


Figure 16. Ensemble de paramètres pouvant modifier la dose effective de NPs sur cellules *in vitro*.
Adapté de Teeguarden *et al.* (Teeguarden *et al.*, 2007).

- Les interactions avec les biomolécules : la corona

Une autre problématique des nanovecteurs est la formation d'une couronne de biomolécules autour des nano-objets, nommée « corona ». Si les substances chimiques peuvent subir une solvation, la corona est une caractéristique propre aux NPs qui entrent en contact avec un fluide biologique. Il est communément accepté aujourd'hui que la surface des NPs est modifiée par l'adsorption de nombreuses protéines et de lipides (Monopoli *et al.*, 2011). Ainsi lorsque la corona se forme, elle octroie aux NPs une nouvelle identité biologique, car ce n'est plus la surface des NPs qui régit les futures interactions avec l'environnement biologique, mais bien la corona (Monopoli *et al.*, 2012). De plus, lorsqu'un ensemble de protéines s'adsorbent en surface, certaines vont modifier leur conformation, exposer de nouveaux épitopes en surface, ou même perturber des fonctions biologiques en accumulant des protéines dans une zone très restreinte (Cedervall *et al.*, 2007). Malgré les efforts de la communauté scientifique sur ce sujet, la formation de la corona reste aujourd'hui difficilement comprise et très loin d'être prédictible ou modélisable. Elle est aujourd'hui une des raisons des difficultés du ciblage actif en nanomédecine, car le recouvrement de la surface des NPs entraîne la dissimulation des fonctions de ciblage

greffées en surface, telles que des anticorps ou encore des peptides. Un travail récent de Mirshafiee *et al.* a démontré que des NPs fonctionnalisées avec des Immunoglobulines (IgG) perdent leur capacité de ciblage parce qu'elles sont spontanément recouvertes par d'autres protéines sériques (Figure 17) (Mirshafiee *et al.*, 2013).

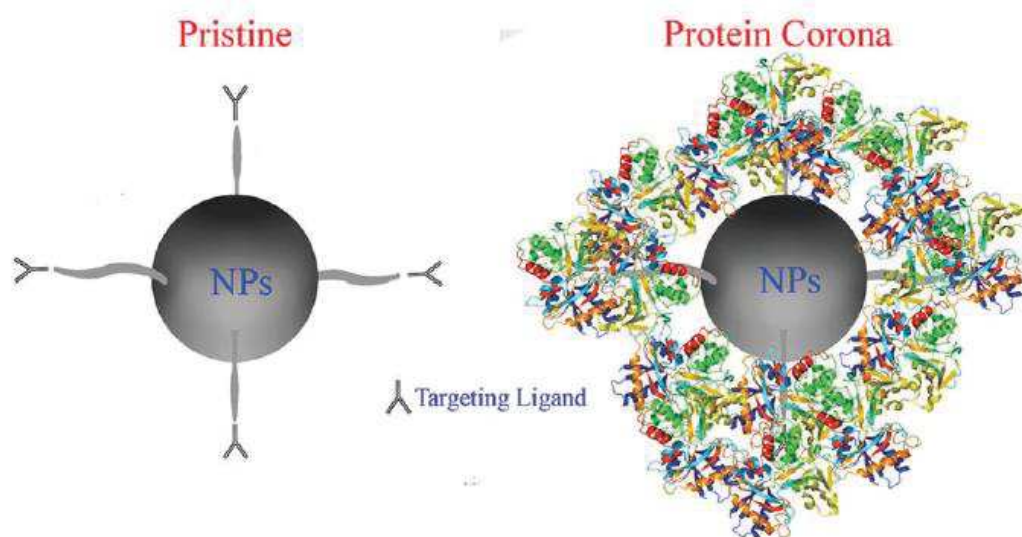


Figure 17. Schéma simplifié de la corona recouvrant les ligands de ciblage en surface de NPs. Illustration de Mirshafiee *et al.* (Mirshafiee *et al.*, 2013).

De plus, il faut garder à l'esprit le fait que la formation de la corona est intrinsèquement liée à l'opsonisation puisque les opsonines font partie intégrante des protéines sériques jouant un rôle important dans la reconnaissance de corps étrangers (non soi) présents dans la circulation sanguine (Tenzer *et al.*, 2011). Certains auteurs ont décrit la corona comme étant divisée en deux compartiments : la « hard » et la « soft » corona (Monopoli *et al.*, 2012). Ces deux compartiments sont différenciés par les temps d'échanges qui peuvent se produire entre les NPs et les protéines, intimement liés à leurs affinités mutuelles. D'après Monopoli *et al.*, seule une fraction des protéines du sang se lie aux NPs, soit quelques dizaines de protéines sur les quelques 3700 identifiées (Monopoli *et al.*, 2012). Toujours d'après cette équipe, ces protéines correspondent rarement aux plus abondantes dans le plasma, et ne sont pas forcément celles qui ont les affinités individuelles les plus fortes avec la surface des NPs.

Bien que la présence d'une soft corona n'ait jamais vraiment été démontrée car ces protéines ont de trop faibles interactions et se dissocient pendant les processus expérimentaux (Tenzer *et al.*, 2011), la hard corona conserve une certaine stabilité qui

permet de l'identifier (Casals *et al.*, 2010, Lundqvist *et al.*, 2008, Tenzer *et al.*, 2011, Walczyk *et al.*, 2010). Le contact entre des NPs et les différents environnements biologiques qu'elles rencontrent va donner lieu à divers échanges protéiques au fil du temps (Lundqvist *et al.*, 2011). La corona, dont la composition peut ainsi être influencée par l'ensemble des environnements rencontrés et non uniquement par leur premier contact, pourrait ainsi être la "mémoire" du trajet des NPs dans l'organisme, comme illustré dans la figure 18 selon Monopoli *et al.* (Monopoli *et al.*, 2012).

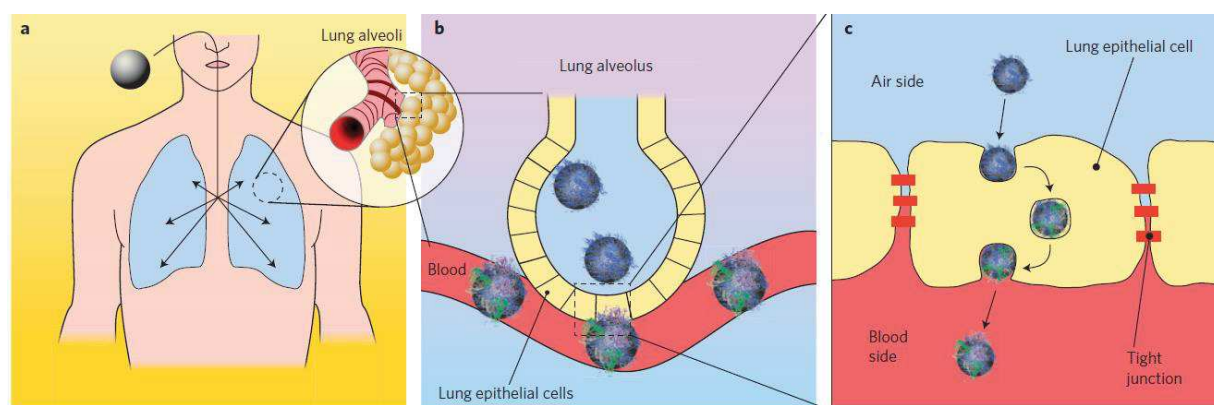


Figure 18. Evolution de la corona autour d'une nanoparticule à travers l'organisme. a) Un exemple de NPs inhalées jusqu'aux alvéoles pulmonaires. b) Une corona se forme par contact avec les fluides pulmonaires. c) Les NPs traversent les cellules alvéolaires pour atteindre la circulation sanguine. Dans ces cellules et le sang, les NPs adsorbent de nouvelles protéines spécifiques à ces environnements. Illustration de Monopoli *et al.* (Monopoli *et al.*, 2012).

Au vu de cette propriété particulière des NPs, une question se pose alors: faut-il limiter ou contrôler la formation de la corona ?

De nombreuses études montrent les effets du PEG en surface des NPs sur la formation de la corona (voir partie « PEGylation »). Néanmoins, bien que ces modifications réduisent les interactions avec des biomolécules, cette adsorption se produit tôt ou tard (Hamad *et al.*, 2010, Kim *et al.*, 2007, Pozzi *et al.*, 2014). Par exemple, la production d'IgM anti-PEG par l'organisme conduit à une opsonisation possible des NPs dès la seconde administration (Ishida & Kiwada, 2008). Ce type de modification pourrait conduire à des conséquences biologiques imprévues (Monopoli *et al.*, 2012). Prévenir la formation d'une corona autour

des NPs ne semble donc pas être la solution la plus appropriée à l'utilisation des NPs dans le domaine médical.

Une alternative serait d'en contrôler la formation. De nombreux auteurs ont montré que la corona protéique affecte les interactions des NPs avec les cellules (Fleischer & Payne, 2014, Lesniak *et al.*, 2012, Lesniak *et al.*, 2013, Zhu *et al.*, 2009, Zhu *et al.*, 2012), leur localisation intracellulaire (Qiu *et al.*, 2010), leur biodistribution ou leur physiopathologie (Monopoli *et al.*, 2012, Tenzer *et al.*, 2013, Tenzer *et al.*, 2011). En 2016, Mirshafiee *et al.* ont réalisé une étude sur l'orientation de la formation de la corona et ont utilisé sa composition en tant qu'outil de ciblage de macrophages. En pré-recouvrant les NPs d'immunoglobulines ou d'albumine sérique humaine, les auteurs ont observé que la composition de la corona résultante après introduction dans du plasma humain avait été modulée par les protéines initialement présentes (Figure 19) (Mirshafiee *et al.*, 2016).

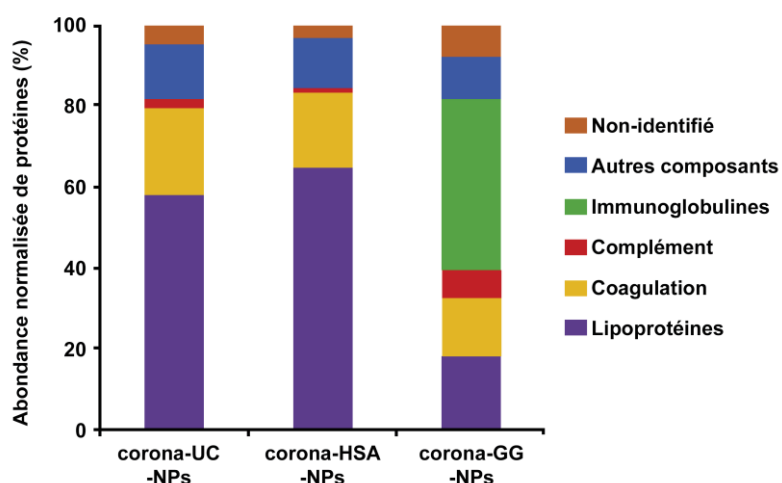


Figure 19. L'abondance normalisée des protéines identifiées dans la corona en LC-MS/MS en fonction de leur classification protéique. Corona-UC : NPs fonctionnalisées par de l'acide carboxylique ; Corona-HSA : NPs recouvertes d'albumine sérique humaine ; Corona-GG : NPs recouvertes de gammaglobulines. Figure issue de Mirshafiee *et al.* (Mirshafiee *et al.*, 2016).

Malgré ces résultats encourageants, la compréhension de la formation de la corona reste préliminaire. Celle-ci est liée à un grand nombre de paramètres tel que les propriétés physico-chimiques des NPs, les propriétés des protéines, la présence d'autres biomolécules (lipides, sucres, vitamines, hormones, *etc.*), sans oublier l'ensemble des paramètres propres à l'*in vivo* (ex: dynamique du flux sanguin) (Mathe *et al.*, 2013, Nel *et al.*, 2009, Puddu &

Perry, 2012, Sakulkhu *et al.*, 2014). Cette problématique demeure un enjeu majeur à la fois pour la nanomédecine, mais également dans les domaines de la toxicologie *in vitro* et *in vivo*.

4.2.b. La pharmacocinétique : Absorption - Distribution - Métabolisation - Elimination

La pharmacocinétique permet d'étudier finement le destin des nanovecteurs *in vivo*. Elle regroupe ainsi l'Absorption, la Distribution, la Métabolisation et l'Elimination (ADME) (Figure 20). Les caractéristiques physico-chimiques des NPs impliquent des comportements d'ADME différents par rapport aux molécules chimiques (Hagens *et al.*, 2007). Il est donc important de bien comprendre les mécanismes d'ADME, afin d'optimiser la conception des NPs et de mieux anticiper leur potentielle toxicité dans les applications médicales.

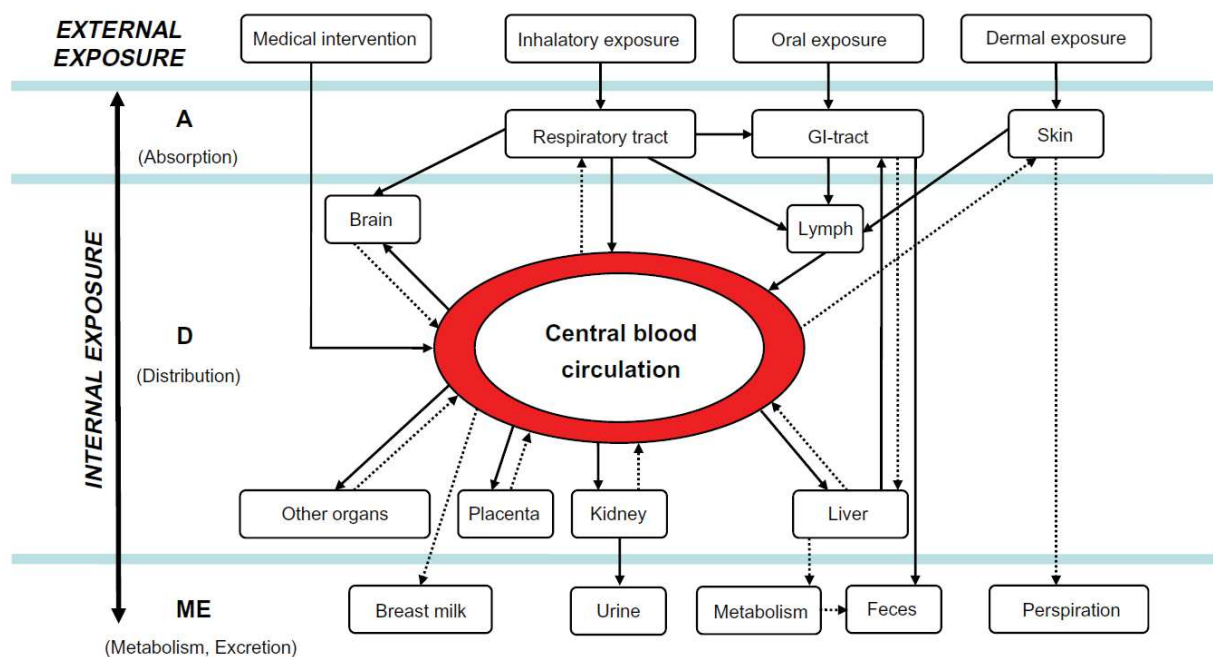


Figure 20. Propriétés cinétiques des NPs dans l'organisme. Dans ce schéma, les processus d'ADME sont indiqués. L'exposition interne est la part de la dose externe qui atteint la circulation systémique. Les flèches représentent les routes confirmées des NPs. Les lignes en pointillés représentent les routes hypothétiques. Illustration de Hagens *et al.* (Hagens *et al.*, 2007).

- **Absorption et résorption**

Au niveau pharmacologique, l'absorption/résorption caractérise un ensemble de phénomènes régissant le transfert du principe actif libéré de sa forme galénique jusqu'à son arrivée dans la circulation systémique. Le principe actif doit ainsi traverser tout un ensemble de barrières (épidermique, digestive ou hépatique par exemple) par diffusion passive ou active. A cette étape, la biodisponibilité est évaluée, c'est à dire la fraction de la dose administrée ayant atteint la circulation sanguine sans avoir été modifiée. Par exemple, une administration par voie intraveineuse représente une biodisponibilité de 100%. En nanomédecine, l'absorption représente le processus par lequel les NPs passent du site externe d'exposition au site biologique interne (Li *et al.*, 2010). Ainsi deux types d'absorption se distinguent, à savoir les voies ayant facilement accès à la circulation sanguine et au système lymphatique (intraveineuse, sous cutanée, intramusculaire, *etc.*) et celles impliquant des muqueuses (orale, nasale, pulmonaire, oculaire, *etc.*). Les principales voies d'absorption sont présentées dans ce chapitre.

Voie par injection. Il existe différentes manières d'injecter des NPs afin d'atteindre des organes ou des tissus cibles. Les NPs administrées par injection non-intraveineuse, c'est à dire les voies sous-cutanée, intradermique, intramusculaire ou intrapéritonéale, doivent être absorbées afin d'atteindre une cible tissulaire ou organique éloignée du site d'administration. Néanmoins, ces différentes routes d'administration ont été étudiées pour une délivrance de nanovecteurs à un niveau local ou destinée à pénétrer le système lymphatique (Lee *et al.*, 2009, Maincent *et al.*, 1992, Moghimi, 2003), plutôt que la circulation systémique. En effet, par injection intradermique, les NPs sont phagocytées par les macrophages et les cellules dendritiques du derme puis accumulées au niveau des nœuds lymphatiques (Nishioka & Yoshino, 2001, Oberdörster Günter, 2005), alors que les NPs injectées directement dans la circulation sanguine rencontrent, quant à elles, le système immunitaire via l'opsonisation et requièrent des stratégies complexes de furtivité (voir partie « Interactions avec les biomolécules »).

Voie topique. L'exposition de NPs sur la peau a bénéficié d'une attention particulière ces dernières années en raison des potentielles opportunités que cette application pourrait engendrer aux niveaux industriel, médical et cosmétique. Récemment, une formulation à

base de NPs polymériques a été utilisée en application cutanée pour le traitement de l'acné (Ramezanli *et al.*, 2017), apportant de nouvelles solutions thérapeutiques. L'industrie des textiles utilise aujourd'hui des NPs d'argent pour leurs propriétés antibactériennes (Lee *et al.*, 2003). Des NPs (TiO₂, ZnO) sont également présentes dans des produits cosmétiques et des crèmes solaires. Si la pénétration de la barrière cutanée par les NPs est encore un sujet controversé, certaines revues récentes relient cette pénétration à des tailles de NPs inférieures à 45nm pour une peau endommagée, et à 4 nm pour une peau saine et possiblement par la voie des follicules pileux (Labouta & Schneider, 2013, Larese Filon *et al.*, 2015).

Voie de l'ingestion. Cette voie se caractérise par la présence de deux barrières majeures : le mucus et l'épithélium gastro-intestinal (GI). Le mucus est un liquide viscoélastique et adhésif qui protège les cellules de plusieurs tissus. La plupart des particules ingérées sont piégées dans cette couche de mucus qui crée ainsi une barrière protectrice significative au-dessus de l'épithélium (Lai *et al.*, 2009). Son renouvellement continu par excrétion dirige les NPs ainsi piégées vers les fèces, ce mécanisme pouvant prendre plusieurs heures en fonction de leur localisation anatomique. D'après une revue de Des Rieux *et al.*, des études ont montré que des microparticules polymériques de 4µm ne sont pas endocytées par les cellules intestinales (des Rieux *et al.*, 2006, Lamprecht *et al.*, 2001). Néanmoins, ces NPs polymériques (les plus stables en condition GI) sont une alternative prometteuse car elles protègent efficacement le principe actif de l'environnement biologique avec une distribution uniforme dans le tractus GI (des Rieux *et al.*, 2006). Les barrières rencontrées lors d'une exposition par voie orale sont nombreuses et les NPs doivent ainsi être capables de résister dans la lumière intestinale, de traverser le mucus, de s'associer à la surface apicale des cellules intestinales et de traverser l'épithélium pour atteindre le système lymphatique ou la circulation systémique.

Voie de l'inhalation. De la même manière que dans le cas de l'ingestion, les NPs inhalées sont confrontées à un mucus présent dans la partie trachéobronchique. Les NPs qui se déposent dans cette zone sont éliminées par les mouvements mucociliaires, mais peuvent aussi diffuser à travers le mucus pour atteindre l'épithélium. La partie alvéolaire des poumons est dépourvue de mucus mais contient une fine couche de surfactant qui permet de conserver l'intégrité structurelle des alvéoles. Les alvéoles ont une surface très large, et

leur contact avec les vaisseaux sanguins font de cette région un site avantageux pour le passage des NPs dans la circulation sanguine (Yang *et al.*, 2008).

Voie nasale. D'après Elder *et al.*, les NPs déposées dans la région olfactive sont adsorbées vers le système nerveux central (Elder *et al.*, 2006). Ainsi, cela suggère que la voie nasale pourrait servir de porte d'entrée pour les NPs dans le cerveau, celui-ci étant protégé par la solide barrière hémato-encéphalique (Borm & Kreyling, 2004). Ces études sont d'un intérêt considérable à la fois pour la délivrance de molécules thérapeutiques au cerveau, mais aussi pour l'impact neurotoxique de l'exposition aux NPs environnementales par inhalation.

- **Distribution**

Quelle que soit la voie d'administration d'un médicament, il est, dans tous les cas, distribué dans l'ensemble de l'organisme à travers les différents liquides et tissus. La distribution est généralement composée de deux phases, une phase liquide (lymphatique, plasmatique) et une phase tissulaire. La notion de transport du principe actif est en général primordiale. Dans le cas des NPs à visée médicale, plusieurs études ont montré que tous les tissus et organes sont atteignables en utilisant les voies classiques d'administration (Hagens *et al.*, 2007). Néanmoins, la biodistribution diffère fortement en fonction de la nature et des propriétés physico-chimiques des NPs. On peut lister un certain nombre de facteurs qui influencent la biodistribution :

- L'interaction quasi instantanée avec les biomolécules du sang qui provoque des changements en surface, modifiant les propriétés physico-chimiques des NPs (voir partie « interactions avec les biomolécules »).
- L'interaction avec les cellules sanguines. Certains types de NPs (or et oxyde de titane), ont été localisés à l'intérieur de globules rouges (Rothen-Rutishauser *et al.*, 2006).
- La structure de l'endothélium vasculaire. L'endothélium peut être structuré de différentes manières à savoir continue, discontinue ou fenêtrée. L'endothélium fenêtré se distingue des autres structures par la présence de perforations d'environ 60nm, caractéristiques des zones ayant des besoins d'échanges moléculaires importants (intestin, reins, glandes endocrines, muqueuse digestive). L'endothélium discontinu,

quant à lui, est propre au foie et à la rate, et présente des pores allant de 50 à 100 nm (Gentile *et al.*, 2008).

- Le système lymphatique. Présent dans l'ensemble des tissus de l'organisme (excepté les cartilages, la cornée et le système nerveux central), le fluide lymphatique se déplace dans des capillaires à travers les ganglions en direction de la circulation sanguine. La nature perméable de l'endothélium lymphatique permet aux macromolécules, pathogènes, ou NPs d'y pénétrer. Néanmoins, la protection lymphatique est réalisée par les macrophages des ganglions qui agissent en tant que filtre. Certaines voies d'administration telles que l'injection sous cutanée ou intramusculaire (Yim *et al.*, 2009), mais aussi orale ou pulmonaire (Yang *et al.*, 2008), donnent accès aux voies lymphatiques. Des études *in vivo* de NPs lipidiques radiomarquées ont mis en évidence leur localisation de manière significative dans le système lymphatique chez le rat après inhalation (Videira *et al.*, 2002).

Cette liste de facteurs n'est pas exhaustive et il est important de noter qu'il existe bien d'autres facteurs influençant la biodistribution des NPs dans l'organisme, comme la vitesse du flux sanguin ou l'apport sanguin dans les différents tissus, provoquant alors des taux variables de transports de NPs en fonction des tissus considérés.

- **Métabolisation**

Après absorption et distribution, le principe actif peut subir des modifications enzymatiques consistant à transformer chimiquement la molécule. La biotransformation aboutit à la formation de différents types de métabolites : inactifs, actifs et/ou toxiques. Cette métabolisation a majoritairement lieu dans le foie, organe essentiel effectuant de nombreuses fonctions biologiques comme le stockage, la détoxification ou encore la production d'acides biliaires.

Le système hépatique. Le foie est un organe volumineux et très vascularisé, séparé en deux lobes. La vascularisation du foie est complexe et apporte une alimentation en sang conséquente. Ainsi, l'apport sanguin dans cet organe est réalisé à la fois par l'artère hépatique et par la veine porte (Figure 21) (Chan, 2017).

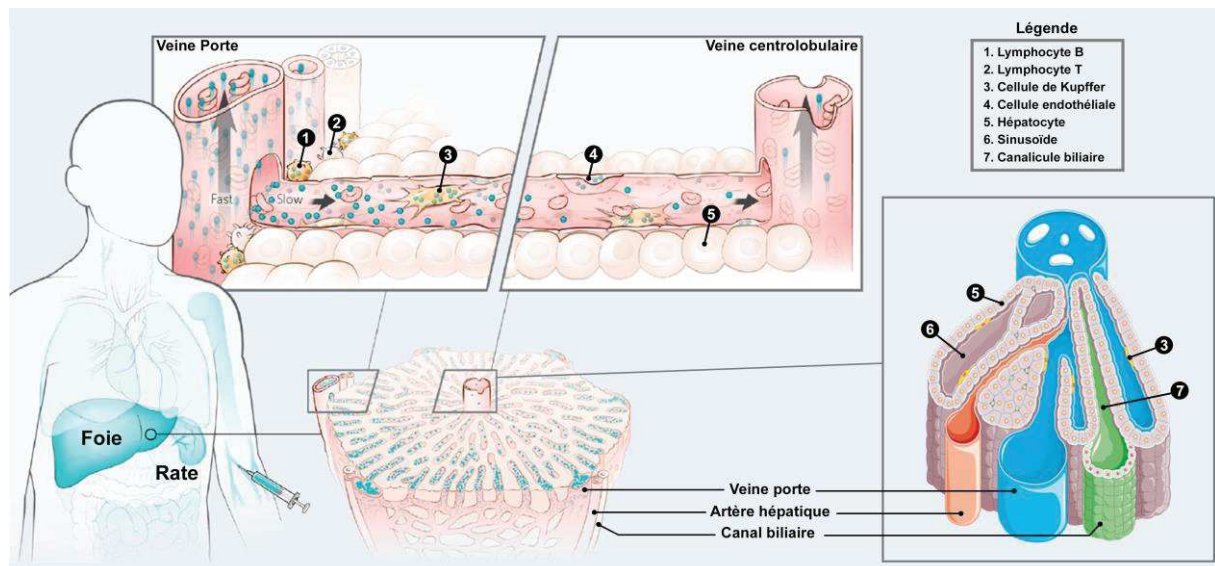


Figure 21. Le système hépatique. Des NPs (en bleu) injectées dans la circulation sanguine rencontrent divers organes du système phagocytaire mononucléaire (MPS) comme le foie. En entrant dans les lobules hépatiques, la vitesse de circulation des NPs se réduit d'un facteur 1000. Différentes cellules immunitaires ont la capacité d'endocyter/phagocyter ces NPs comme les cellules de Kupffer et sont responsables de la clairance hépatique des NPs. Adapté de Tsoi *et al.* (Tsoi *et al.*, 2016) et de Servier Medical Art.

Ces deux flux sanguins vont se distribuer de manières différentes dans les unités fonctionnelles du foie, nommées lobules hépatiques. Un lobule est composé d'une veine centrolobulaire autour de laquelle vont s'organiser des plaques d'hépatocytes alimentées par le sang (Figure 21). Le circuit de la veine porte provient du système gastro-intestinal, ce circuit apporte les nutriments essentiels issus de la digestion. L'artère hépatique, quant à elle, provient du cœur et des poumons et apporte l'oxygène. Le sang va ainsi circuler dans le lobule et être en contact avec les cellules hépatiques, avant de finir son circuit dans la veine centrolobulaire. Les cellules de Kupffer (voir partie « Deuxième génération - furtivité et ciblage passif ») se trouvent à l'intérieur des sinusoides, en contact direct avec le sang. Ces macrophages agissent en tant que sentinelles permettant de supprimer les antigènes provenant du tractus gastro-intestinal ou de la circulation systémique. Dans l'espace de Disse, zone entre les cellules endothéliales et les hépatocytes, se trouvent d'autres cellules immunitaires comme des cellules stellaires ou dendritiques. Enfin, les canalicules biliaires (CB) présents dans les lobules vont apporter la bile produite par les hépatocytes mais aussi celle recyclée provenant de la veine porte. En effet, la bile produite dans les canalicules est

orientée vers la vésicule biliaire avant d'être utilisée dans le duodénum. La majeure partie de cette bile est réabsorbée par l'iléon (partie de l'intestin grêle) et renvoyée dans les lobules hépatiques via la veine porte.

Les hépatocytes ont plusieurs fonctions notamment le stockage du glucose, le stockage des lipides, et la synthèse de protéines plasmatiques indispensables comme l'albumine, des protéines de transports ou des facteurs de coagulation. Le rôle majeur de ce type cellulaire reste néanmoins la métabolisation de substances exogènes et endogènes grâce à des enzymes spécifiques.

Les réactions enzymatiques de phases I et II. Les enzymes de phases I et II jouent un rôle central dans la métabolisation, la biotransformation et la détoxification des xénobiotiques ou composés étrangers qui sont introduits dans l'organisme. Généralement, ces enzymes métaboliques protègent l'organisme des substances exogènes potentiellement toxiques provenant de l'environnement. Pour minimiser l'impact néfaste de xénobiotiques, qui pourraient induire des réponses cellulaires spécifiques et altérer la différenciation, la prolifération ou l'homéostasie allant jusqu'à la mort cellulaire, divers types cellulaires produisent ces enzymes en abondance à un niveau basal, en particulier les hépatocytes (Rushmore & Tony Kong, 2002). Ainsi, les réactions enzymatiques ont pour but de modifier la structure chimique des composés xénobiotiques afin d'en faciliter l'excrétion. Néanmoins, dans certains cas, il est possible aussi qu'elles favorisent la toxicité des composés par des mécanismes de bioactivation. Ces réactions enzymatiques spécifiques ont été catégorisées en deux phases :

Les enzymes de phases I assurent les étapes d'oxydation, d'hydrolyse et d'hydroxylation des xénobiotiques qui conduisent à leur excrétion via l'urine ou la bile, ou à la prise en charge par les enzymes de phases II. Elles sont principalement constituées de la superfamille des cytochromes P450 (CYP), des enzymes microsomales retrouvées majoritairement dans le foie, mais aussi dans une moindre mesure dans d'autres tissus tels que tractus GI ou les reins (Zanger & Schwab, 2013). Chez l'Homme, codées par 57 gènes fonctionnels et 58 pseudogènes (Nelson *et al.*, 2004), quatre familles de CYP (CYP1, CYP2, CYP3, CYP4) sont connues pour jouer un rôle important dans la métabolisation et la biotransformation des xénobiotiques dans les zones hépatiques et extra-hépatiques (Rushmore & Tony Kong,

2002); les familles 1 à 3 étant jugées d'une importance majeure (Zanger & Schwab, 2013). Ainsi, une douzaine d'enzymes CYP de ces 3 familles sont responsables de la biotransformation de près de 80% des substances thérapeutiques utilisées en clinique (Figure 22A). Les formes les plus exprimées dans le foie sont les CYPs 3A4, 2C9, 2C8, 2E1 et 1A2, tandis que 2A6, 2D6, 2B6, 2C19 et 3A5 restent faiblement exprimés chez l'homme. L'expression génique de chaque CYP est différente et est influencée par une combinaison de facteurs impliquant entre autres le polymorphisme génétique, la régulation des cytokines, ou l'induction par des xénobiotiques.

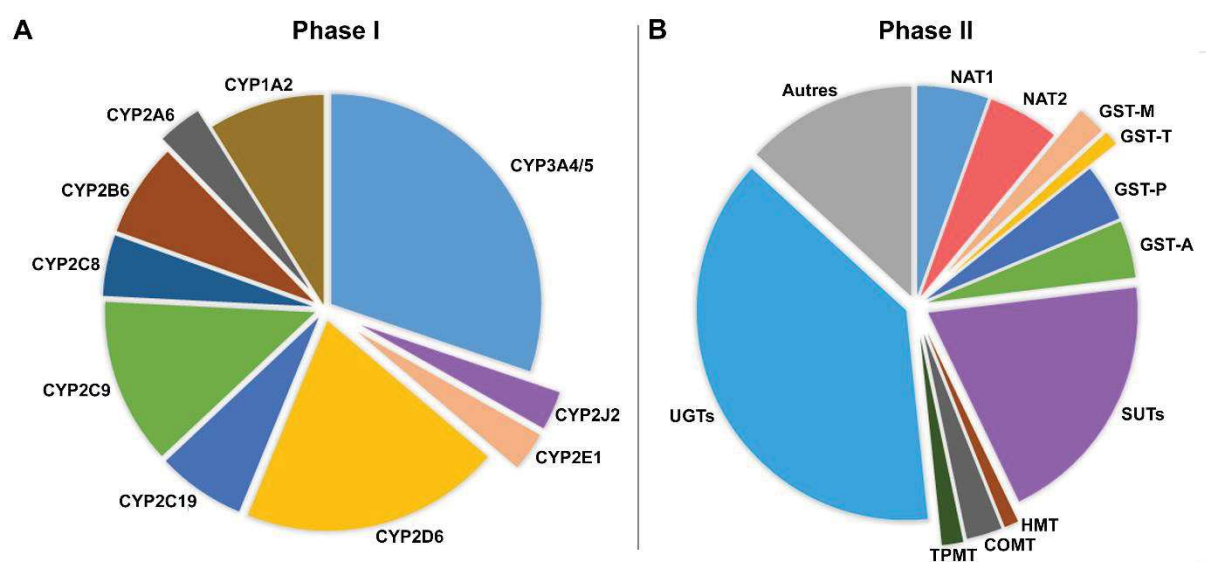


Figure 22. Principales enzymes de métabolisation responsables A) de modifications de groupements chimiques fonctionnels (Phase I) et B) de conjugaisons avec des groupements de substitution (Phase II). La répartition des enzymes de phases I et II correspondent aux contributions de ces enzymes dans la métabolisation de médicaments d'après Evans et Relling (Evans & Relling, 1999). CYP : cytochrome P450 ; NAT : N-acétyltransferase ; GST : glutathione S-transferase ; SUTs : sulfotransferase ; HMT : histamine méthyl-transferase ; COMT : catechol O-méthyltransferase ; TPMT : thiopurine méthyltransferase ; UGT : UDP-glucuronosyltransferase.

Les enzymes de phase II (Figure 22B) ont pour fonction de conjuguer sur les substances xénobiotiques, issues ou non des biotransformations de phase I, des groupements chimiques qui permettent d'augmenter leur hydrosolubilité. Ces modifications chimiques permettent ainsi d'éliminer plus facilement ces molécules par l'urine ou la bile. Elles sont constituées de plusieurs superfamilles, comme par exemple :

- Les sulfotransférases (SUT) (Gamage *et al.*, 2006)
- Les UDP-glucuronosyltransférases (UGT) (Tukey & Strassburg, 2000)
- Les époxyde hydrolases (EPH) (Fretland & Omiecinski, 2000)
- Les glutathione S-transférases (GST) (Singhal *et al.*, 2015)
- Les N-acetyltransferases (NAT) (Jancova *et al.*, 2010)
- Les thiopurine S-methyl transferase (TPMT) (Jancova *et al.*, 2010)

Comme dans le cas des CYP, chaque superfamille se décompose en familles et sous-familles de gènes codant différents isoformes aux spécificités précises de substrat et de localisation tissulaire. L'excrétion et l'élimination de nombreuses substances xénobiotiques sont ainsi réalisées par conjugaison. Par exemple, les UGT et les SUT favorisent l'élimination de molécules contenant un groupe fonctionnel hydroxyle (OH). Cependant dans certains cas, ces biotransformations entraînent la formation de métabolites actifs et toxiques. Par exemple, la catalyse par des GST de composés électrophiles avec du glutathion (GSH) engendre la bioactivation d'intermédiaires réactifs, entraînant possiblement des effets toxiques au niveau cellulaire (van Bladeren, 2000).

Par conséquent, la régulation de l'expression génique de diverses enzymes de phase I et de phase II impacte directement le métabolisme, la pharmacocinétique, l'efficacité et la potentielle toxicité des substances thérapeutiques d'une part, et des xénobiotiques environnementaux d'autre part. Ces processus sont connus dans le cas des substances chimiques. Néanmoins dans le cas des NPs, les spécificités physico-chimiques de ces dernières complexifient la compréhension des voies métaboliques impliquées dans leur dégradation. La métabolisation des NPs inclut potentiellement tous les types de mécanismes qui peuvent altérer leurs propriétés physico-chimiques (Li *et al.*, 2010). Même si les NPs inorganiques sont plutôt stables et difficiles à dégrader dans l'organisme, la plupart sont excrétées au bout de quelques jours, c'est notamment le cas des NPs de silice mésoporeuse (Lu *et al.*, 2010). D'autres NPs ont également montré leur capacité à résider durant de longues périodes dans différents organes. C'est le cas notamment des quantum dots, présents dans les reins, le foie et la rate de souris 28 jours après injection (Raymond *et al.*, 2007).

A l'inverse, certaines NPs sont dites biodégradables, c'est notamment le cas des NPs de polymères naturels (BSA, chitosan) ou synthétiques (PLGA, PLA). Ainsi, la plupart des NPs sont transportées dans le foie via la veine porte ou l'artère hépatique où leur dégradation est rendue possible. Une étude récente a montré que des NPs magnétiques pouvaient être dégradées partiellement *in vivo* et *in vitro* et que leurs produits de dégradation étaient pris en charge par les voies métaboliques classiques du fer (Rojas *et al.*, 2017). La dégradation partielle des NPs d'oxyde de fer est assurée par les cellules de Kupffer, et leurs produits de dégradation transportés vers les hépatocytes sous une forme associée à la ferritine (Briley-Saebo *et al.*, 2004).

- Excrétion

Il existe un grand nombre de voies d'excrétion possibles pour l'organisme, comme la clairance respiratoire, les fluides (transpiration, lactation, urine) ou les fèces. Les NPs peuvent être excrétées de différentes manières en fonction du type d'administration. Cependant l'excrétion par les voies hépatique et rénale vers les urines et les fèces semble être la plus importante (Longmire *et al.*, 2008).

Une NP présente dans le système circulatoire peut être excrétée par clairance rénale car elle pourra être extraite de l'organisme via l'urine par filtration glomérulaire ou sécrétion tubulaire. Cependant, ce mécanisme dépend de la taille des NPs. D'après Choi *et al.*, la clairance est fonctionnelle et complète lorsque la taille des NPs est inférieure à 5.5 nm (Soo Choi *et al.*, 2007). L'excrétion rénale est également possible pour des NPs plus grandes, mais le mécanisme est plus lent. D'après Lu *et al.*, après injection de NPs de silice mésoporeuse d'environ 100 nm, plus de 26% de la silice a été détectée dans l'urine après 24h, et près de 95% de la quantité initiale a été excrétée par l'urine et les fèces au 4ème jour (Lu *et al.*, 2010), dans un rapport de 3 pour 1 dans l'urine par rapport aux fèces. Cependant, du fait que ces analyses sont généralement réalisées par ICP-MS, il n'est pas possible de déterminer si pour cette taille de NPs, la silice détectée dans l'urine était sous forme nanoparticulaire ou solubilisée, et donc dégradée avant passage dans le système rénal. Néanmoins d'après He *et al.*, des NPs de silice mésoporeuse d'une taille proche de 45 nm ont été détectées dans la vessie quelques heures après injection intraveineuse (He *et al.*, 2008). De même pour Burns *et al.*, des NPs de silice de 3.3 et 6.0 nm ont été majoritairement excrétées par filtration

rénale (Burns *et al.*, 2009). La clairance rénale semble être la voie dominante d'excrétion des NPs.

Outre ses fonctions métaboliques, le foie est également capable d'excréter des NPs (Cho *et al.*, 2009), d'autant plus qu'il est le lieu d'accumulation de nombreuses NPs via l'opsonisation. Sans pour autant être aussi efficaces que les cellules de Kupffer, les hépatocytes peuvent également internaliser les NPs. D'après Furumoto *et al.*, des NPs de polystyrène ont été retrouvées à la fois dans les cellules de Kupffer et dans les hépatocytes après injection intraveineuse (Furumoto *et al.*, 2001). D'après ces auteurs, une partie des NPs a ainsi été éliminée à travers le système biliaire.

Il existe d'autres processus d'élimination des NPs sans que celles-ci soient forcément en contact avec des cellules. C'est le cas par exemple de la clairance pulmonaire à travers les mouvements mucociliaires, qui permettent de rejeter les NPs à travers le mucus pour qu'elles soient ensuite éliminées par expulsion pulmonaire ou par les fèces via le système gastro-intestinal.

4.2.c. Les alternatives à l'expérimentation animale

« Ce n'est pas le plus fort de l'espèce qui survit, ni le plus intelligent. C'est celui qui sait le mieux s'adapter au changement. » Charles Darwin.

L'évolution est faite de changements perpétuels qui nous dirigent toujours à un moment de rupture où l'adaptation devient une évidence. D'après Thomas Hartung dans son chapitre « Evolution of toxicological science : the need for change » (Hartung, 2017a), la toxicologie n'a pas toujours été en phase avec le changement. Néanmoins, la tendance actuelle d'une toxicologie du 21^{ème} siècle, en phase avec la règle bioéthique des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer) (Russell & Burch, 1959), est à la diminution, voire au remplacement des tests effectués sur des animaux, bien que donnant régulièrement lieu à des controverses. Les raisons de cette évolution sont multiples.

La première d'entre elles est la force de la réglementation. Des milliers de nouvelles substances chimiques sont synthétisées chaque année. Devant cet afflux, les instances réglementaires s'adaptent en établissant de nouveaux programmes tel que la législation européenne des produits chimiques de 2006 REACH (Registration, Evaluation, Authorisation

and Restriction of Chemicals), le TSCA (United States Toxic Substances Control Act) de 1976^{*3}, ou en développant de nouveaux programmes spécifiques à la nanotoxicologie (Busquet *et al.*, 2014). Selon une extrapolation de données européennes collectées dans « Regulatory Toxicology: Progress in Law » (Busquet *et al.*, 2014), 5 à 10 millions d'animaux sont « utilisés » tous les ans uniquement pour la protection de la santé publique et de l'environnement; et il est raisonnable de penser, au vu des obligations imposées par la réglementation en matière d'évaluation toxicologique, que ce nombre d'animaux continuera inévitablement de croître avec l'innovation industrielle.

La deuxième raison est d'ordre économique. Les études toxicologiques sont coûteuses car elles requièrent des infrastructures particulières régies par des normes (comme les bonnes pratiques de laboratoire, BPL), où les expériences sont conduites sur de longues durées et sur des populations animales importantes pour identifier tous les phénomènes toxiques éventuels et pour obtenir une force statistique suffisante. De plus, les applications, les coûts et les bénéfices sont très hétérogènes entre l'industrie et le domaine académique (Hartung, 2017b). L'industrie étant particulièrement soumise à la réglementation internationale, c'est donc en premier lieu le domaine industriel qui souhaite s'adapter. Pour des raisons économiques, les tests *in vivo* ne peuvent pas être appliqués à tous les stades de la production industrielle, que ce soit pour les produits chimiques ou thérapeutiques. En particulier, en recherche et développement, leur utilisation est remise en question et des criblages de type *in vitro* sont souvent mis en œuvre.

La troisième raison est d'ordre éthique. Les aspects éthiques sont délicats car ils sont dominés par l'opinion publique selon laquelle le recours à l'expérimentation animale ne devrait intervenir que lorsqu'il n'existe aucune autre alternative. Les règles de bioéthiques régissant le bien-être des animaux en laboratoire, et l'acceptation réglementaire de nouveaux modèles alternatifs s'inscrivent dans cette direction (directive 2010/63/UE).

La quatrième raison est d'ordre scientifique. La question de la reproductibilité est centrale. D'après Hartung, dans le domaine de la cancérologie, sur plus de 3500 études, pour un coût total de 3,5 milliards de dollars, 13% des investigations ont montrées des résultats incertains et la reproductibilité des données obtenues n'était que de 57% pour les 121 substances

^{*3} <https://www.epa.gov/laws-regulations/summary-toxic-substances-control-act>

testées de manière répétée (Gottmann *et al.*, 2001, Hartung, 2017b). Ce constat de résultats incertains se retrouve également dans les essais d'irritation oculaire chez le lapin (OCDE n°405, reproductibilité: 70%) (Luechtefeld *et al.*, 2016a), dans les essais de sensibilisation cutanée par stimulation locale des ganglions lymphatiques (ELGL) chez la souris (OCDE n°429, reproductibilité : 89%) (Luechtefeld *et al.*, 2016b), et 26% des tests utérotoxicologiques chez le rongeur (OCDE n°440) pour l'étude de la perturbation endocrinienne sont contradictoires (Browne *et al.*, 2015).

Pour corriger ces dérives, il existe aujourd'hui des alternatives *in vitro* et *in silico*. Une réflexion sur une nouvelle vision de la toxicologie est plus que nécessaire (Figure 23) (Leist *et al.*, 2014). Contrairement à ce qui est parfois avancé, le remplacement des animaux par des essais *in vitro* n'est pas obligatoirement réductionniste, car il faut également considérer que l'utilisation d'un animal pour prédire les effets sur l'Homme pose la question de la pertinence de la transposition des résultats entre espèces. En effet, les exemples de dé-corrélation entre les effets chez l'animal et l'homme sont nombreux. Par ailleurs, il est intéressant de noter que ce sujet représente une véritable contrainte car des facteurs d'incertitude sont aujourd'hui appliqués aux résultats *in vivo*, en particulier aux valeurs toxiques de référence, pour pallier à ces variations inter-espèces. L'*in vitro* et l'*in silico*, selon une conception de la toxicologie proposée par les auteurs du « Consensus report on the future of Animal-Free systemic toxicity testing » (Leist *et al.*, 2014), pourraient ainsi permettre de tester de nombreuses molécules/nano-objets et de bénéficier de tous les avantages de ces techniques (apport de nombreuses informations biologiques, vitesse d'analyse, reproductibilité et force statistique) à coût plus réduit. Cette approche permettrait d'effectuer une priorisation des produits potentiellement toxiques, ce qui représente actuellement un enjeu majeur, pour ensuite ne réaliser les tests sur animaux que lorsque cela s'avère être strictement nécessaire.

Dans la continuité de la Règle des 3R, l'Union Européenne a pris des mesures concernant les directives du domaine des cosmétiques. L'actuelle directive 1223/2009 a banni les tests sur les animaux pour les nouveaux produits cosmétiques et requiert l'utilisation d'alternatives à l'utilisation animale pour l'évaluation du risque sanitaire. Un pas de l'UE qui stimule la création de nouveaux modèles *in vitro* et *in silico* (Luechtefeld *et al.*, 2016a).

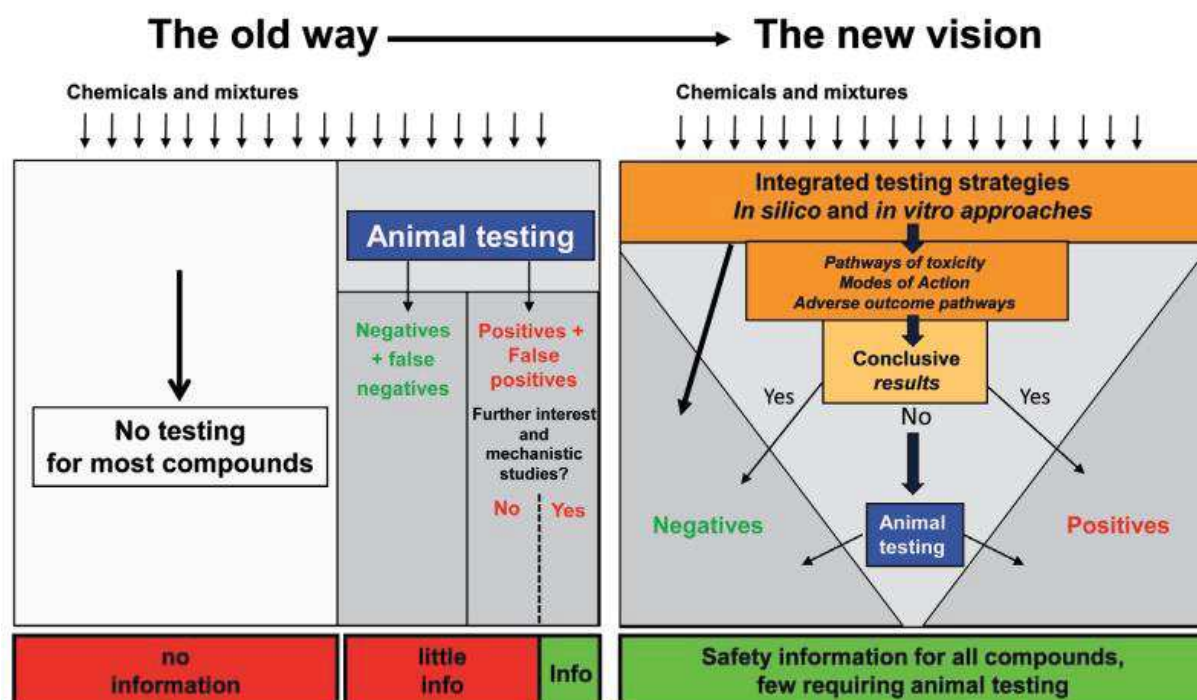


Figure 23. Nouvelle vision des évaluations toxicologiques. D'après le "Consensus report on the future of Animal-Free systemic toxicity testing" de Leist *et al.* (Leist *et al.*, 2014), une nouvelle approche de l'évaluation toxicologique est suggérée. Cette approche est basée sur les méthodes *in silico* et *in vitro* qui permettent l'identification de PoT (Pathway of Toxicity). Les données massives obtenues sont suffisantes pour déterminer l'aspect toxique d'une substance et permettre ainsi de prioriser celles nécessitant des études de confirmation *in vivo*.

5. Les domaines émergents en toxicologie cellulaire

5.1. Les modèles

Une stratégie qui fait ses preuves pour remplacer les tests sur animaux part de l'analyse de l'état des technologies disponibles pour trouver de nouvelles approches toxicologiques. De plus, l'étude sur animaux est également entachée du problème du dosage (Leist *et al.*, 2014). Les experts le disent : « La moitié de l'ensemble des produits chimiques testés, qu'ils soient naturels ou synthétiques, sont positifs à fortes doses chez les rongeurs dans les essais sur le cancer. Ces résultats ne sont pas en accord avec de faibles doses en exposition humaine » (Ames & Gold, 2000). En effet, comme le dit schématiquement Thomas Hartung, « *les humains ne sont pas des rats de 70kg, et les rats ne sont pas des humains de 300g* » (Hartung, 2009). Le prédictif est également mis à mal concernant les animaux modèles, en particulier dans le domaine du développement de principes actifs. Seulement 8% des molécules thérapeutiques testées en phase clinique I obtiennent des autorisations et la moitié d'entre elles échouent en phase III (Leist *et al.*, 2014). Il y a donc un besoin urgent d'obtenir des méthodes prédictives pour l'évaluation du risque pour l'homme.

De nombreuses solutions sont actuellement proposées par la communauté scientifique, certaines sont d'ailleurs déjà autorisées par les instances réglementaires (Table 5).

Table 5. Quelques exemples de méthodes alternatives à l'expérimentation animale validées (source : FDA)

Méthode	N°OCDE	Date d'adoption	Accord avec les 3R
<i>In vitro</i> dermal absorption methods	TG 428	2004	Remplace
Corrositex® <i>in vitro</i> membrane barrier skin corrosivity test	TG 435	2006-2015	Remplace
Episkin™ <i>in vitro</i> human skin model corrosivity test	TG 431	2004-2016	Remplace
3T3 NRU phototoxicity test for skin photo-irritation	TG 432	2004	Remplace
Reconstructed human cornea-like epithelium test for identification of substances not requiring ocular hazard labeling	TG 492	2015	Remplace
Cytosensor microphysiometer <i>in vitro</i> test method for eye safety testing	En étude par l'OCDE	-	Remplace

Des techniques de pointes rapides, sensibles et fiables permettent aujourd'hui d'approfondir les connaissances biologiques, notamment concernant les modes d'actions responsables des effets toxiques des substances pour l'homme. Différents modèles cellulaires humains 2D et 3D (MucilAir™, Bio-Alter®[®], EpiSkin, HepaRG™) sont aujourd'hui commercialisées. Par ailleurs, la recherche sur les cellules souches pluripotentes qui a valu le prix Nobel de médecine en 2012 au Pr Yamanaka, suscite également de grands espoirs pour faire émerger de nouveaux modèles cellulaires humains expérimentaux pour la pharmacotoxicologie (Takahashi *et al.*, 2007). Enfin des techniques à haut débit dites « omics » (transcriptomique, protéomique, métabolomique), et d'autres méthodes émergentes (modèles PBPK, QSAR, AOP) ont un intérêt considérable en toxicologie. Celles utilisées pendant cette thèse sont décrites ci-dessous.

Modèle cellulaire hépatique innovant

Durant les années écoulées entre 1975 et 2008, 30% des médicaments ont été retirés du marché pour leur toxicité hépatique avérée (Guillouzo *et al.*, 2007, MacDonald & Robertson, 2009). Ceci traduit un échec de l'analyse prédictive des effets, en partie lié à la faible corrélation entre l'animal et l'homme concernant l'hépatotoxicité. En particulier, les voies de métabolisation des xénobiotiques sont différentes entre espèces et de plus les variations génétiques chez l'homme sont des facteurs non négligeables de disparité entre les espèces (Guillouzo *et al.*, 2007). Les alternatives *in vitro* passent par l'utilisation d'hépatocytes primaires ou de lignées cellulaires immortalisées. Cependant, ces deux types de modèles ont leurs limites.

L'utilisation de cellules primaires est conditionnée par les rares disponibilités d'échantillons de foie humain, issus de résections, des procédures d'isolation délicate, la variabilité inter-donneurs, une durée de vie limitée, et le coût élevé qui constituent de sérieuses limitations à l'utilisation de ce type de cellules dans des systèmes *in vitro* à haut débit (Gerets *et al.*, 2012). En dépit de ces limitations, les hépatocytes primaires restent une référence pour les études de pharmacotoxicologie. Néanmoins, cette affirmation est aujourd'hui beaucoup plus contrastée.

L'autre alternative se trouve dans les lignées cellulaires immortalisées, notamment la lignée HepG2. Les cellules HepG2 présentent des caractéristiques génotypiques proches des

cellules normales du foie et sont hautement différenciées (Sassa *et al.*, 1987). HepG2 a été utilisée comme plateforme cellulaire pour tester le potentiel cytotoxique de nombreux produits chimiques (Gerets *et al.*, 2009). Toutefois, la principale limitation de ce modèle reste sa capacité métabolique faible comparée aux hépatocytes primaires (Xu *et al.*, 2004). D'après Gerets *et al.*, ces cellules peuvent servir de modèle pour tester la cytotoxicité de principes actifs mais restent peu efficaces dans le cas d'une étude métabolique, comprenant les effets des potentiels métabolites formés (Gerets *et al.*, 2012). En effet, ces cellules ont un niveau d'expression des CYPs faible mais un niveau normal des enzymes de phase II, à l'exception des UDP-glucuronosyl transférases (Westerink & Schoonen, 2007).

Un récent modèle cellulaire hépatique décrit pour la première fois en 2002 (Gripon *et al.*, 2002), nommé HepaRG (Figure 24), a été développé dans le but de pallier à un profil métabolique défaillant observé dans les lignées immortalisées.

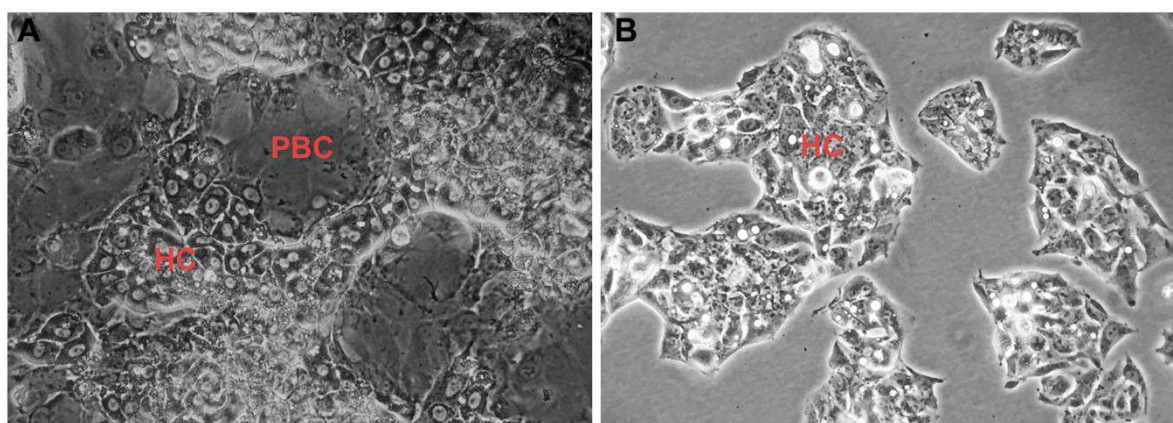


Figure 24. Photos de microscopie à contraste de phase (x200) (A) d'une culture différenciée d'HepaRG et (B) d'une culture d'HepG2. HC: Hépatocytes. PBC: Cellules biliaires primitives.

En effet, la lignée HepaRG, issue d'un carcinome hépatique, est composée d'un mélange d'hépatocytes et de cellules biliaires, permettant une capacité métabolique comparable aux cellules primaires de foie, sans présenter les inconvénients de variabilité inter-donneurs ni d'instabilité fonctionnelle pendant la durée de la culture (Lambert *et al.*, 2009). D'après Antherieu *et al.*, HepaRG présente des fonctions hépatiques et expressions de gènes spécifiques à des niveaux comparables aux hépatocytes primaires (Antherieu *et al.*, 2009).

Gerets et son équipe en 2012 ont entrepris la comparaison des profils d'expression géniques d'HepaRG avec HepG2 et des hépatocytes primaires issus de trois donneurs différents (Figure 25) (Gerets *et al.*, 2012). Leur analyse en composante principale (ACP) démontre la proximité des profils d'expressions géniques entre HepaRG et les cultures primaires, comparés à HepG2, en réponse à différents hépatotoxiques.

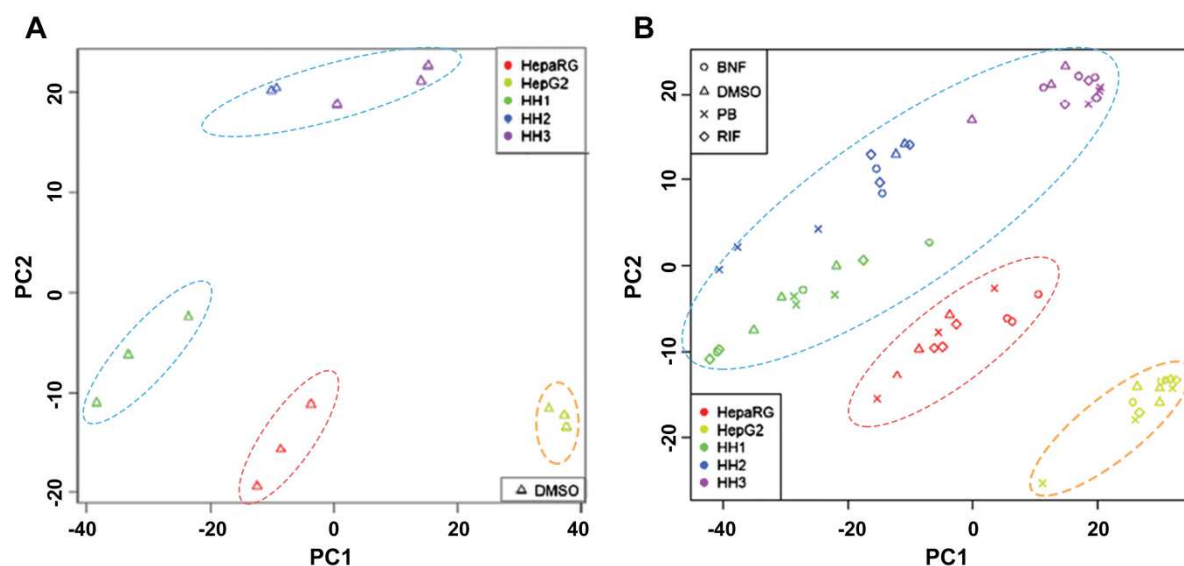


Figure 25. Analyse en composante principale (ACP) des données d'expression génique d'HepaRG, HepG2 et de trois cultures d'hépatocytes primaires (HH). Les ACP représentent (A) le niveau basal des profils des cultures contrôle et (B) après exposition à différents hépatotoxiques (BNF: beta-naphthoflavone; PB: phenobarbital; RIF: rifampicin). Résultats de Gerets *et al.* (Gerets *et al.*, 2012)

De ce fait, HepaRG est une culture cellulaire hépatique innovante. C'est une alternative possible aux cultures primaires humaines, contournant les nombreux inconvénients et se rapprochant des caractéristiques hépatiques *in vivo*, contrairement aux lignées de cellules hépatiques immortalisées. Ces avantages ont par ailleurs été confirmés très récemment par Nelson *et al.* Les cellules hépatiques HepaRG maintiennent un phénotype organotypique avec un métabolisme à haute activité intrinsèque des CYP et sont significativement plus performantes que les cellules HepG2 pour les applications pharmaceutiques et thérapeutiques (Nelson *et al.*, 2017).

5.2. Technologies émergentes

5.2.a. L'impédance cellulaire en temps réel

Les techniques dites "label-free" permettent l'analyse non invasive de processus cellulaires tels que la migration, l'adhésion ou la prolifération. L'intérêt principal est de pouvoir suivre l'évolution d'une culture cellulaire *in vitro*, qu'elle soit issue d'une lignée ou qu'elle soit primaire, dans des conditions spécifiques et sans pour autant utiliser de marquage particulier (fluorescent, radioactif, *etc.*). L'impédance cellulaire (système xCELLigence d'ACEA) fait partie de ces technologies émergentes *in vitro* et permet de contrôler la culture en temps réel. Le principe repose sur la présence en fond de puits (d'une plaque de culture spécifique) d'un réseau d'électrodes d'or recouvrant 70 à 80% de la surface d'un puits. Le milieu de culture présent dans les puits faisant office d'électrolyte, substance conductrice contenant des ions mobiles, il est possible de faire circuler un faible courant alternatif entre les électrodes (figure 26A). Ainsi, le courant alternatif sinusoïdal fourni par l'appareil peut être perturbé par la présence de cellules qui se déposent en fond de puits et adhèrent progressivement (Figure 26B). Les électrodes permettent ainsi de mesurer la résistance au passage du courant alternatif, l'impédance électrique.

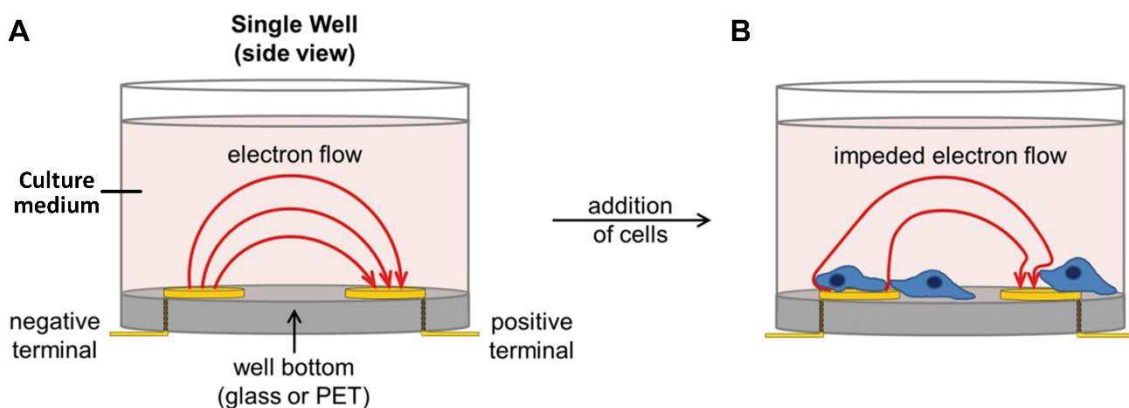


Figure 26. Principe de déplacement du courant électrique entre deux électrodes en fond de puits d'une plaque de culture E-plate d'xCELLigence. Circulation du courant alternatif A) sans cellule et B) en présence de cellules. Adapté d'ACEA biosciences.

L'impédance est issue de la loi d'Ohm et concerne les circuits électriques en courant alternatif. Elle est notée Z et est définie comme le rapport de la tension électrique (U) sur l'intensité (I). En absence de cellule, l'impédance est régie par deux composantes que sont l'impédance à l'interface électrodes/milieu et la résistance du milieu lors du passage d'une

électrode à une autre (Figure 26A). En présence de cellules (Figure 26B), l'impédance des cellules s'ajoute, influencée entre autre par la résistance membranaire (Mu *et al.*, 2010). La présence de cellules affecte localement l'environnement ionique à l'interface électrode/milieu, ce qui a pour conséquence d'augmenter l'impédance proportionnellement au nombre de cellules.

Ainsi, l'impédance est un paramètre qui fait intervenir à la fois les caractéristiques physiques du milieu, des cellules, mais aussi la fréquence du courant auquel est soumis le système. La fréquence est un paramètre important car il impacte directement la monocouche cellulaire (Stolwijk *et al.*, 2015). A des fréquences entre 100 et 100 000 Hz, l'impédance tient compte des particularités de résistance des membranes plasmiques. Ainsi, le courant se déplace majoritairement autour et entre les cellules, la membrane plasmique faisant office d'isolant. On y mesure alors majoritairement des informations de multiplication cellulaire, d'adhésion et de mortalité, mais aussi de modifications intercellulaires comme la stabilité des jonctions. A haute fréquences (10kHz et plus), le courant est suffisant pour traverser les cellules (Stolwijk *et al.*, 2015). La valeur d'impédance traduit alors la morphologie des cellules en plus d'autres paramètres. L'appareil xCELLigence RTCA DP délivre un courant alternatif d'une fréquence de 10kHz. Pour quantifier le statut cellulaire à un instant t , le système xCELLigence fournit une valeur nommée Cell Index (CI) qui représente les mesures d'impédance en présence de cellules (par rapport à celles du milieu de culture) (Figure 27A) (Atienza *et al.*, 2005, Mu *et al.*, 2010).

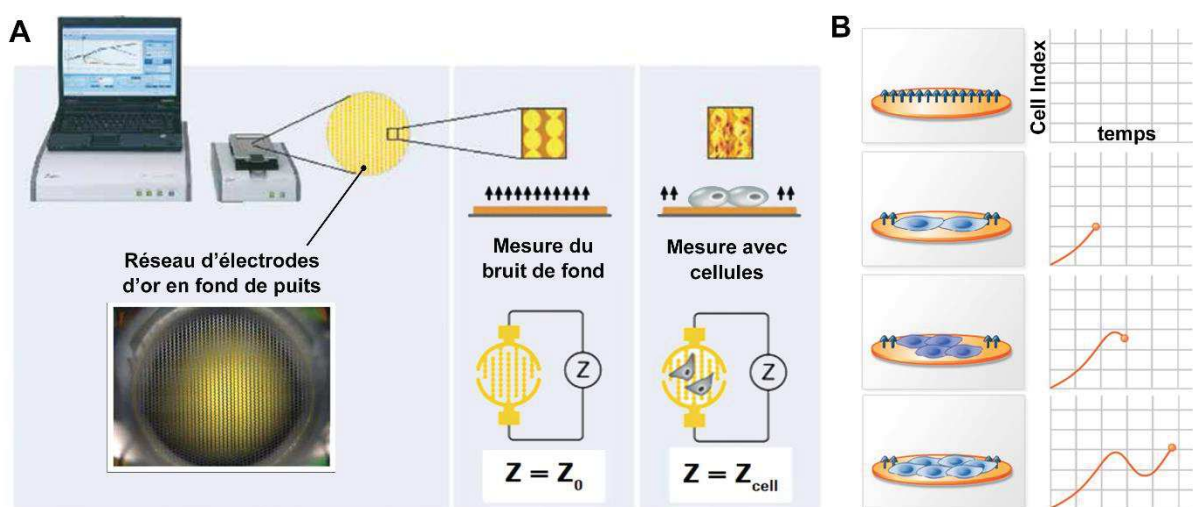


Figure 27. Principe de l'impédance cellulaire en temps réel. A) Le réseau d'électrodes d'or en fond de puits permet B) l'enregistrement des variations du Cell Index (CI) dépendant du développement de la culture cellulaire.

Puisque le signal CI est dépendant de l'adhésion, du nombre de cellules, de la morphologie cellulaire et de la mortalité, une culture cellulaire peut se traduire graphiquement en différentes phases selon le schéma de la figure 27B.

Ce système sensible permet de tester l'impact toxique de différents produits dans des conditions "label-free" sur des cultures cellulaires adhérentes. L'utilisation de ce système est en pleine expansion, aujourd'hui présent dans de nombreux domaines de recherche *in vitro*, tels qu'en cardiotoxicologie (Xi *et al.*, 2011), en immunologie et microbiologie (Slanina *et al.*, 2011, Van Pham *et al.*, 2014), ou dans l'étude des modes d'actions de substances chimiques (Xi *et al.*, 2014).

5.2.b. La toxicogénomique

La toxicogénomique recouvre les méthodes dites « omics », comprenant l'étude des profils d'expression des gènes (transcriptome), de protéines (protéome) ou de métabolites (métabolome) issus d'un organisme, d'un tissu ou de cellules (Waters & Fostel, 2004). L'accumulation rapide des bases de données génomiques et protéiques a permis l'analyse et la compréhension des modes d'actions de composés chimiques ou d'autres agents stressants sur des systèmes biologiques. Ainsi, la toxicogénomique a pour but premier de discerner les liens de cause à effet entre l'exposition d'un organisme à une substance exogène et l'altération de l'expression de ces différentes biomolécules. Elle vise à déchiffrer les mécanismes moléculaires déclenchés par l'exposition à un ou plusieurs stress et de déterminer l'origine des perturbations physiologiques observées par des méthodes classiques. Ces décryptages de mécanismes moléculaires peuvent permettre l'identification de biomarqueurs directement liés à l'exposition des substances exogènes.

- **La transcriptomique par puces d'expression génique**

Historique. La révolution génomique a offert à la science de nouveaux outils d'analyses permettant l'étude de processus biologiques complexes. Depuis les années 90 (Schena *et al.*, 1995, Shalon *et al.*, 1996), cette révolution s'est traduite par l'essor fulgurant de la biologie moléculaire, des technologies robotiques, bioinformatiques, optiques et microélectroniques d'une part, et par le développement spectaculaire du séquençage du génome humain d'autre part (Lander *et al.*, 2001, Venter *et al.*, 2001) (Figure 28).



Figure 28. Couvertures des numéros spéciaux des journaux Science et Nature sur le séquençage du génome humain publiés tous deux en février 2001.

Ces avancées ont permis d'élaborer des outils "omics" puissants à partir du décryptage de l'ADN. C'est le cas des puces d'expression génique, qui permettent d'analyser les niveaux d'expression de l'ensemble des ARN messagers (ARNm) exprimés simultanément dans un organisme ou un tissu donné, liés à un état de développement ou à un environnement particulier à un instant donné. Pour définir simplement les puces d'expression, c'est une collection de biomolécules (ADN) représentant l'ensemble des gènes d'un organisme (dont le génome a été auparavant séquencé) et fixée sur un support. C'est le cas aujourd'hui de milliers d'organismes étudiés par les chercheurs, à ce jour 276 412 organismes sur la base de données en ligne GOLD (Genomes Online Database^{*4}), couvrant procaryotes et eucaryotes.

Principe. Le principe général des puces d'expression génique est basé essentiellement sur le processus d'hybridation moléculaire de l'ADN. Les sondes nucléotidiques fixées sur la puce permettent la détection par fluorescence des séquences complémentaires (les cibles) présentes au sein d'un échantillon. Cette technologie est très avantageuse pour les organismes séquencés (Homme, souris, rat et autres) et permet d'améliorer fortement la compréhension des mécanismes d'actions moléculaires dans différentes conditions testées en analysant les variations d'expression des ARNm. Les puces ADN sont ainsi utilisées dans de nombreux domaines en toxicologie (Anthérieu *et al.*, 2017, Djouina *et al.*, 2016),

^{*4} The Genome Online Database GOLD : <https://gold.jgi.doe.gov>

écotoxicologie (Kim *et al.*, 2017, McQuillan & Shaw, 2014) et en nanotoxicologie (Bajak *et al.*, 2015, Grzincic *et al.*, 2015, Shim *et al.*, 2012).

Procédé de fabrication. Les premières puces qui ont fait leur apparition étaient basées sur le procédé de dépôt de sondes oligonucléotidiques sur lame de verre. Le verre était un choix évident : économique, stable à haute température, lavable, peu poreux et ayant un bruit de fond de fluorescence minimale (Cheung *et al.*, 1999). Actuellement, le procédé de fabrication des puces est majoritairement basé sur la synthèse *in situ* des brins ADN, soit par photolithographie, soit par impression. La synthèse *in situ* permet la fabrication de puces à très haute densité de sondes oligonucléotidiques. A la différence du procédé de dépôt d'oligonucléotides, les brins sont directement synthétisés à la surface des puces (lame de verre).

Dans notre projet, les puces utilisées pour étudier les profils d'expression génique après exposition à diverses NPs proviennent d'Agilent Technologies (Palo Alto, CA). Le procédé de fabrication actuel de ces puces est une synthèse *in situ* symbolisée par l'appellation commerciale "SurePrint". C'est une technologie dite d'impression "à jet d'encre" pour synthétiser des oligonucléotides. Ce procédé industriel dans lequel chaque brin est synthétisé par dépôt en jet des différentes bases sans contact avec la puce s'approche des imprimantes informatiques. Ce type de synthèse réalise ainsi des sondes oligonucléotidiques de 60-mer, base par base, suivant des séquences connues. Ces sondes de 60-mer fournissent ainsi une très grande spécificité de reconnaissance dans un échantillon donné.

Les avantages des puces fournies par les fabricants sont la reproductibilité du processus de synthèse, la standardisation des réactifs, la maintenance des infrastructures et la mise à jour des séquences en fonction de l'avancée des bases de données. L'introduction de l'hybridation en phase liquide a également permis à cette technologie de gagner en précision et en robustesse. Ce sont des éléments essentiels afin d'obtenir des résultats robustes, favorisant la transition de cette technologie vers les applications cliniques. D'autres avantages rendent cette approche très robuste. Les puces sont dotées aujourd'hui de nombreux points de contrôles, de points de normalisation de l'intensité de fluorescence et d'un réseau de spots en nid d'abeilles de très grande précision (Miller & Tang, 2009).

Mise en œuvre. Les ARNm sont tout d'abord extraits des cellules et purifiés en système par colonnes à l'aide de kits désormais commerciaux (RNeasy mini, Qiagen) (Figure 29A). Ces kits remplacent les méthodes d'extraction plus anciennes par séparation de phases en thiocyanate de guanidinium/phenol/chloroforme (connu sous divers noms commerciaux comme TRIzol de chez Invitrogen par exemple). Ces ARNm purifiés sont amplifiés en ADN complémentaires (ADNc) puis marqués de façon covalente avec divers fluorochromes incluant la Cyanine-3 (Cy3) (pic λ excitation= 550 nm, λ émission = 570 nm) et/ou la Cyanine-5 (Cy5) (pic λ excitation= 650 nm, λ émission = 670 nm) (QuickAmp Labeling, Agilent). Dans notre projet, nous avons utilisé uniquement la Cy3 comme marqueur fluorescent car celui-ci présente une meilleure stabilité dans le temps par rapport à la Cy5.

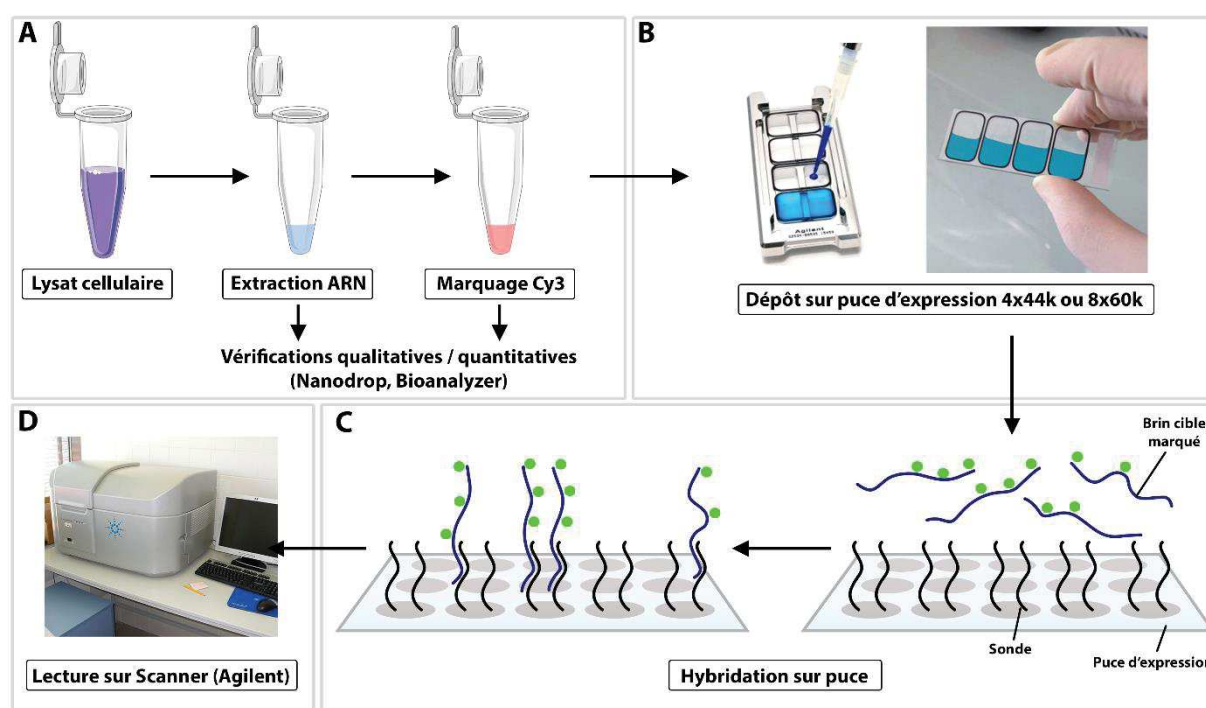


Figure 29. Mise en œuvre d'une analyse par puce d'expression. A) Les ARN des lysats tissulaires ou cellulaires sont extraits puis marqués à la Cyanine3 et purifiés. B) Les échantillons marqués sont déposés sur lame pour C) être hybridés sur la puce. D) Après 17heures à 60°C sous agitation, les puces sont rincées et leur fluorescence est analysée à l'aide d'un Scanner.

Les évaluations qualitatives et quantitatives des échantillons tout au long de ce processus ont été effectuées à l'aide d'un Nanodrop™ (ThermoFisher Scientific) et d'un Bioanalyzer (Agilent Technologies). Le Nanodrop est un spectrophotomètre UV-visible qui permet la mesure quantitative des acides nucléiques en micro-volumes (1 μ L) et détermine des

contrôles qualitatifs comme les ratios 260/280 (pour détecter les contaminations par des composés aromatiques comme des protéines ou des phénols) et 260/230 (contamination par des sels chaotropiques ou solvants organiques). Le Bioanalyzer est basé sur une technologie microfluidique (dépôt 1 μ L) qui remplace l'électrophorèse sur gel classique par une électrophorèse en micro-capillaire couplée à une détection par fluorescence (Figure 30). Elle permet de déterminer la qualité et la quantité des acides nucléiques avec précision.

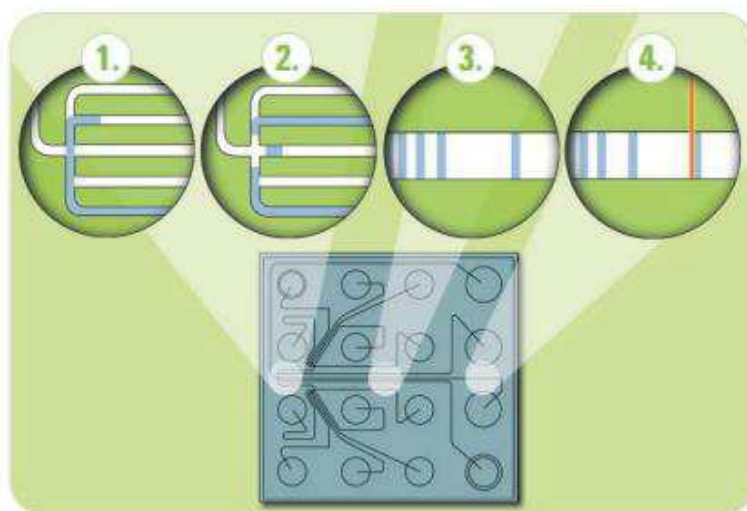


Figure 30. Principe d'une analyse sur Bioanalyzer (Agilent Technologies). 1) les échantillons sont déposés dans des micropuits et se déplacent dans les microcanaux par différence de potentiel. 2) Chaque échantillon est injecté dans le canal de séparation qui permet 3) la séparation en électrophorèse capillaire. Les acides nucléiques sont ainsi séparés par taille et 4) détectés avec précision grâce à la fluorescence d'un agent intercalant. Adapté d'Agilent Technologies.

Après détermination finale du taux de marquage (quantité de Cy3 par μ g d'ADNc), les échantillons sont déposés sur une lame de verre contenant des chambres d'hybridation (Figure 29B). La puce d'expression génique (contenant l'ensemble des sondes) est déposée sur cette lame, fermant ainsi les chambres et permettant au processus d'hybridation en phase liquide d'être réalisé à 60°C sous rotation pendant 17 heures (Figure 29C).

Après divers lavages, les puces d'expression sont lues par un scanner (Figure 29D). Ce scanner permet d'utiliser deux lasers, un SHG-TAG laser (532nm) et un laser hélium-néon (633nm), qui permettent de cibler directement les fluorochromes contenus dans les ADNc hybridés aux sondes. Dans le cas présent, seul le marquage avec Cy3 et le laser à 532 nm ont

été utilisés. Une image monochrome de la puce d'expression résultante est ainsi obtenue (Figure 31).

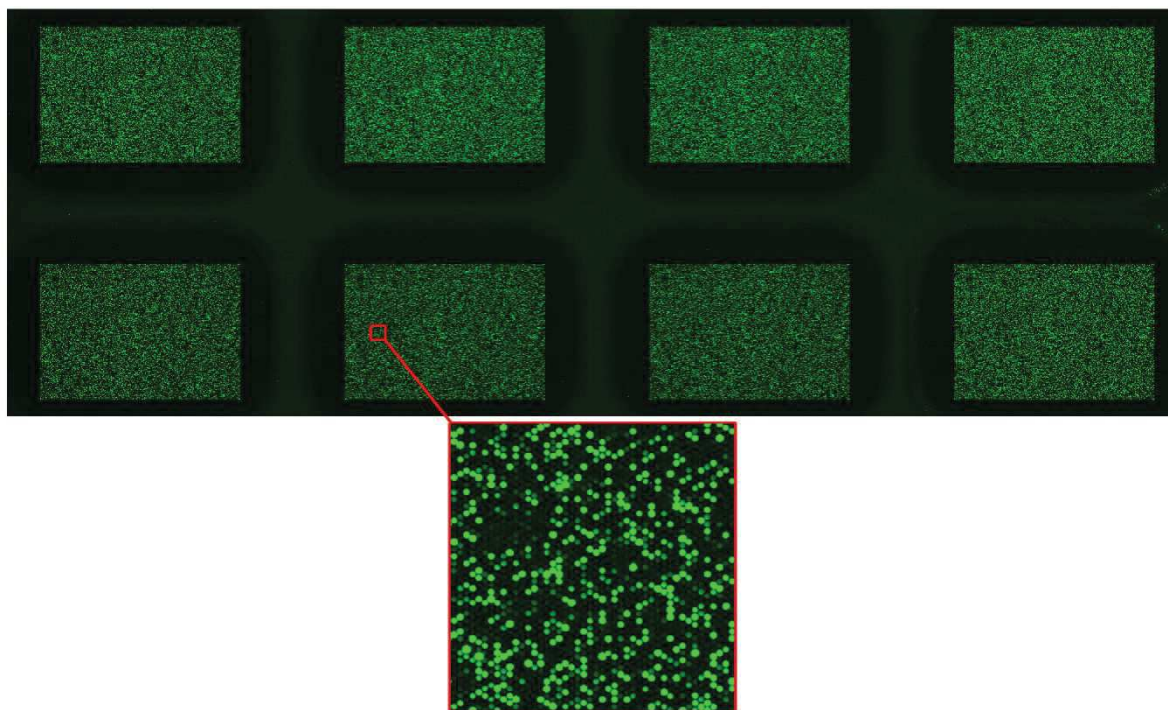


Figure 31. Image d'une puce d'expression génique 8x60k d'Agilent Technologies en fluorescence (Cy3). Les huit blocs contiennent 60 000 spots représentant l'ensemble des transcrits, incluant des réplicats et contrôles. Chaque spot est ainsi représentatif d'une séquence unique d'ARN messagers humains.

Analyse différentielle. Le traitement des données est effectué en plusieurs phases. La première phase, produite avec le logiciel Feature Extraction (Agilent), consiste à superposer une grille contenant l'ensemble des identifiants des spots (identifiants des sondes, points de contrôles qualité) sur l'image de fluorescence obtenue. Ce traitement associe ainsi les valeurs de fluorescence à chaque gène et effectue des mesures de contrôle qualité. La deuxième phase, impliquant le logiciel Genespring GX (Agilent), consiste à réaliser une analyse différentielle entre les échantillons traités (à différents temps et différentes doses de substances) par rapport à des échantillons de tissus/cellules contrôles. Cette étape permet de normaliser la fluorescence sur l'ensemble des données de la puce, et d'effectuer des tests et corrections statistiques (généralement un test de student avec une correction « false discovery rate » Benjamini-Hochberg) permettant de filtrer et de conserver uniquement les données significatives. Des taux d'expression génique entre échantillons

traités et échantillons de contrôle sont ainsi obtenus (« fold change ») et associés à des p-values. Seuls les fold change supérieurs à 2 et des p-values inférieures à 0.05 sont conservés.

Interprétation biologique des données. L'analyse de données massives (« big data ») ne peut se faire sans un logiciel d'analyse adapté. Les fichiers obtenus avec Genespring contenant l'ensemble des gènes réprimés ou induits peuvent être traités ensuite par divers outils libres d'accès ou non (David, KEGG Pathway, Panther Pathway, Ingenuity Pathway Analysis, etc.). Le but principal de cette étape est de pouvoir comparer l'ensemble des transcrits modulés d'une expérience avec la totalité des fonctions et voies canoniques connues dans la littérature. L'analyse approfondie dite de fouille biologique (« data mining ») permet alors de dégager les mécanismes cellulaires qui sont impliqués dans la réponse à l'exposition à des substances exogènes. Dans ce projet, nous avons utilisé l'application web Ingenuity Pathway Analysis™ (IPA, Qiagen) pour effectuer cette fouille biologique. C'est un outil puissant d'analyse et de recherche qui permet de travailler à la fois avec des données de transcriptomique, mais aussi de protéomique et de métabolomique. IPA s'appuie sur un contenu exhaustif constamment mis à jour et vérifié, organisé dans une base de données unique (Ingenuity Knowledge Database) (Figure 32). IPA compare les données expérimentales soumises à cette base de données et l'appartenance des gènes modulés à des voies canoniques. Cette appartenance est calculée selon la probabilité p (définie par $-\log_{10}(p)$) que l'attribution de ces gènes aux voies canoniques soit due au hasard. Plus p est faible, plus cette valeur sera grande et plus les données seront significatives.

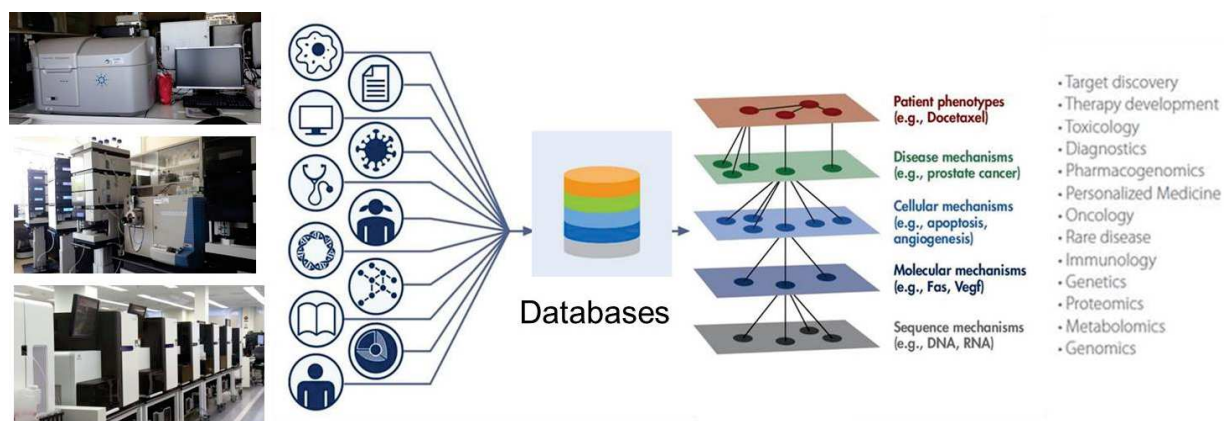


Figure 32. Ingenuity knowledge database regroupant des données issues de la littérature ainsi que des données transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques formant une base unique de données.

- La protéomique par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

Historique. La protéomique est la discipline qui permet d'analyser l'ensemble des protéines, d'un organisme ou tissu donné, exprimées simultanément, et liées à un état de développement ou à un environnement particulier à un instant donné. Des programmes similaires au séquençage du génome (human genome project) ont vu le jour pour le protéome, basé sur l'identification et la caractérisation des protéines par traduction du génome, à savoir le « Chromosome-Centric Human Proteome Project » et le « Biology/Disease-driven Human Proteome Project » (Aebersold *et al.*, 2013, Paik *et al.*, 2012). Historiquement, la protéomique est issue de la technique des gels bidimensionnels (Gel 2D). Cette technique permettait de détecter des centaines de protéines, mais souffraient d'un certain nombre de limitations (répétabilité, lenteur des analyses, intervalle limité de poids moléculaires). La spectrométrie de masse, quant à elle, a connu un essor fulgurant dans le domaine de la protéomique dès les années 80 grâce à l'émergence de deux nouvelles techniques d'ionisation permettant la mesure de masses de macromolécules : le MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) et l'ESI (ElectroSpray Ionization). Ces recherches ont été récompensées d'un prix Nobel de chimie en 2002 décerné aux chercheurs John B. Fenn et Koichi Tanaka. L'ESI a par ailleurs donné la possibilité de coupler la chromatographie en phase liquide aux spectromètres de masse, permettant notamment l'analyse de fluides biologiques complexes.

Principe et conception. Aujourd'hui les spectromètres de masse sont constitués de 4 éléments :

- Une source d'ionisation afin de produire des ions en phase gazeuse (ESI, MALDI)
- Un ou plusieurs analyseurs de masse pour séparer les ions sous vide selon leur rapport de masse sur charge (m/z) (Quadripôle, Temps de vol, Trappes ioniques)
- Un détecteur qui enregistre les ions séparés par l'analyseur de manière à produire un courant électrique dont l'intensité est corrélée au nombre d'ions détectés
- Un traitement de signal pour obtenir un spectre de masse d'intensité en fonction du rapport m/z

Dans cette thèse, l'appareil utilisé est le "ESI Q Exactive HF mass spectrometer" (ThermoFisher Scientific) (Figure 33) incorporant un Analyseur Orbitrap couplé à un système de nano chromatographie en phase liquide.

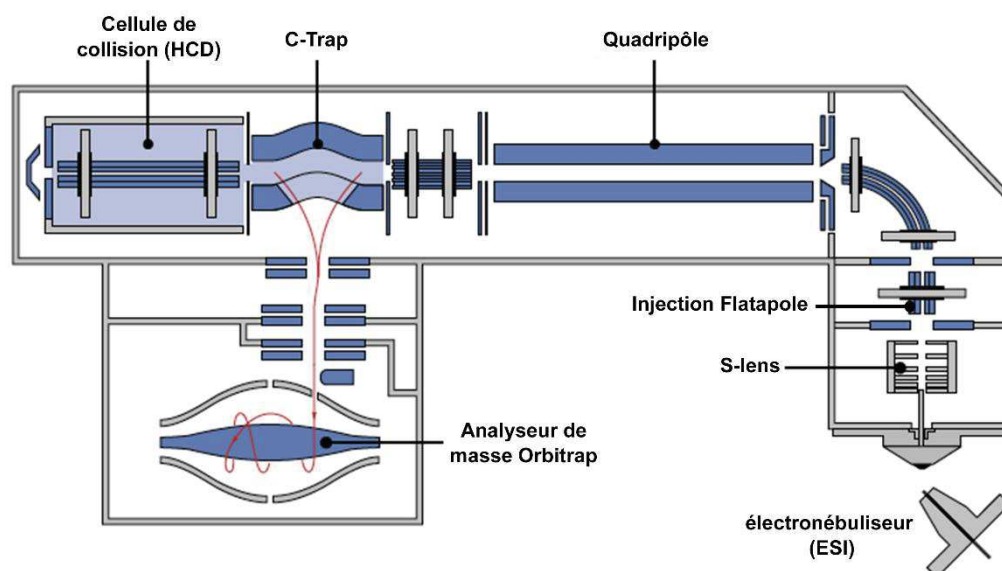


Figure 33. Représentation schématique du spectromètre de masse ESI Q Exactive HF (Thermofisher Scientific).

Les biomolécules ionisées par l'électronébuliseur (ESI) sont vaporisées sous l'action d'un puissant champ électrique, puis les ions sont dirigés et manipulés par des champs électriques sous vide dans différents guides d'ions avant d'arriver au quadripôle. Pour déterminer les rapports masse/charge (m/z), l'analyseur Orbitrap (trappe ionique) stocke les ions permettant de mesurer leur masse. Les ions peuvent également être détectés après fragmentation dans une cellule de collision.

L'Orbitrap est composé d'une électrode creuse à l'intérieur de laquelle est placée une électrode centrale en forme de fuseau. L'application d'une tension entre ces deux électrodes produit un champ électrostatique quadripolaire au sein duquel les ions acquièrent un mouvement d'oscillation, à l'image de satellites, dont l'amplitude et la fréquence sont dépendantes du rapport m/z des ions. En augmentant la tension appliquée, les ions sont éjectés selon leur rapport m/z pour être ainsi détectés.

La détection des ions par les analyseurs permet la génération de spectres révélant l'intensité des molécules en fonction de leur rapport m/z . En spectrométrie de masse en tandem

(MS/MS), les ions précurseurs sont fragmentés dans une cellule externe par collision avec un gaz inerte de type argon ou hélium, donnant naissance à des ions "fils" qui seront également séparés suivant leur m/z dans un autre analyseur (Steen & Mann, 2004). Après détection, l'ensemble des spectres obtenus forme une grande quantité de données permettant l'identification des protéines par différentes analyses bioinformatiques successives (Interprétation des spectres, attribution des séquences).

Mise en œuvre. Il existe ainsi deux stratégies d'analyse, l'approche descendante dite « Top-down » et l'approche ascendante dite « Bottom-up ». La stratégie top-down est une analyse de protéines intactes, c'est-à-dire qu'aucune protéolyse n'est effectuée. Les protéines sont donc introduites par la source d'ionisation et fragmentées dans le spectromètre en phase gazeuse. Cette stratégie requiert cependant des spécificités de fragmentation car les protéines ont des masses moléculaires importantes. Puisqu'aucun traitement n'est effectué sur les protéines, les spectres ainsi formés sont complexes mais permettent de différencier, notamment chez les eucaryotes, les isoformes de protéines (exemple : apolipoprotéines A et B) et les multiples modifications post-traductionnelles.

Néanmoins, la stratégie d'identification la plus utilisée est la stratégie bottom-up. Cette approche est basée sur le découpage des protéines par protéolyse après séparation sur gel, ou par fractionnement en solution, avant passage en spectrométrie de masse. La digestion enzymatique reste la méthode de protéolyse la plus courante. Elle est réalisée en général avec la trypsine qui coupe après les résidus basiques lysine (K) et arginine (R) (non suivis d'une proline (P)), générant des peptides d'une charge adaptée à la détection en MS/MS. Dans notre projet, c'est la méthode bottom-up qui a été utilisée couplée à une séparation par chromatographie en phase liquide, nommée technique Shotgun. Les échantillons biologiques sont mélangés à un détergent anionique LDS 1X (Lithium dodecyl sulfate) et du β -mercaptoéthanol permettant la dénaturation et la rupture des ponts disulfures des protéines (par chauffage 5 min à 99°C) (Figure 34A). Ils sont ensuite déposés dans un gel NuPAGE pour une migration courte (5min) à 200V (Figure 34B). Les bandes résultantes après migration et lavages sont ainsi découpées et protéolysées avec la ProteaseMax-Trypsine (Promega) (Figure 34C).

Les échantillons protéolysés sont ensuite injectés en nano chromatographie en phase liquide à haute performance (nanoHPLC) par phase inverse (polarité inversée) suivi d'une acquisition de spectres dans un spectromètre de masse en tandem (MS/MS), technique nommée nano-LC MS/MS (Figure 34D). La nano-LC s'effectue par différentes étapes incluant une étape de passage des échantillons dans une micro pré-colonne pour un dessalage en ligne, suivi d'une séparation sur une nano-colonne à débit et durée contrôlés. Les peptides passent ainsi par la source d'ionisation démarrant le processus d'acquisition des spectres MS/MS.

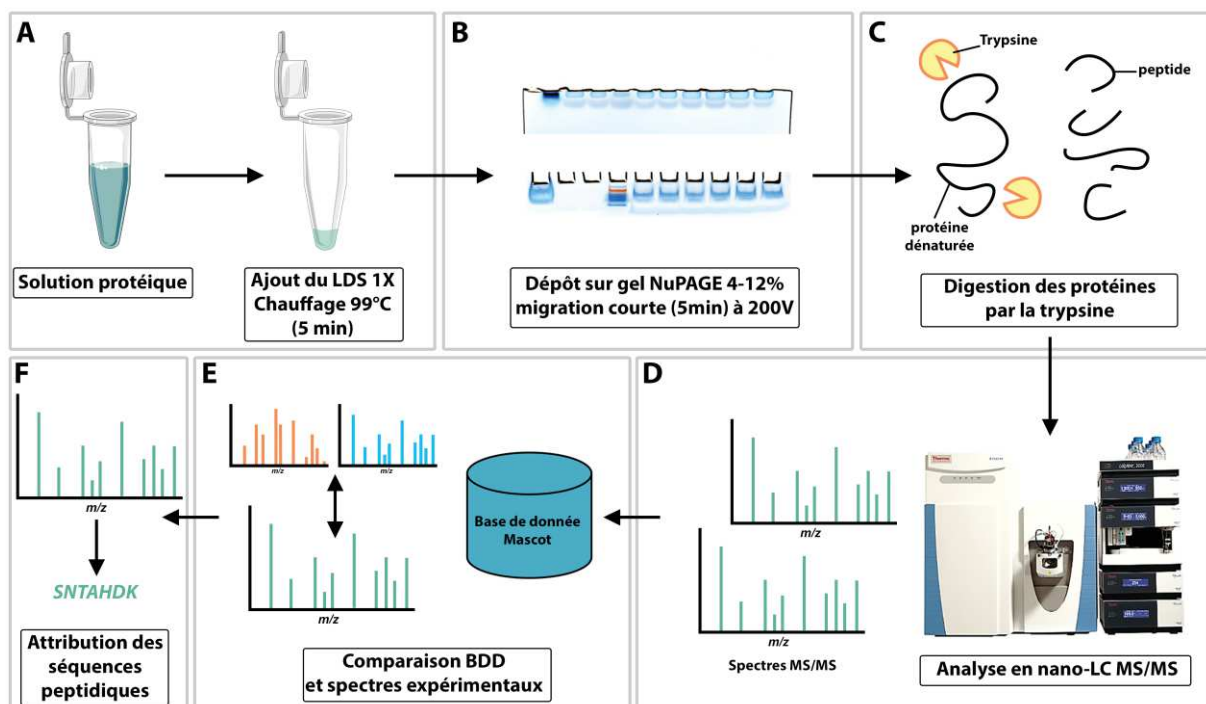


Figure 34. Mise en œuvre d'une analyse par nano-LC MS/MS en stratégie Shotgun. A) Les protéines sont dénaturées par ajout de LDS1X et de β -mercaptoéthanol et chauffage pendant 5min à 99°C. B) Les échantillons sont déposés sur gel NuPAGE pour une migration courte, puis les bandes sont découpées C) et protéolysées à la trypsine. D) Les spectres MS/MS sont obtenus par analyse en nano-LC MS/MS et E) l'identification peptidique est réalisée par le logiciel Mascot par comparaison avec une base de données protéiques. F) Des séquences peptidiques sont ainsi attribuées aux spectres obtenus (PSM).

Interprétation des données. Le spectromètre génère une grande quantité de données qu'il est impossible de traiter sans l'aide de logiciels adaptés. L'interprétation des spectres MS/MS est réalisée selon divers algorithmes permettant l'identification de protéines. Différentes approches d'attribution des spectres existent, à savoir le séquençage *de novo*, la

recherche d'étiquettes ou l'identification par bases de données protéiques. L'identification par recherche sur base de données est la méthode utilisée dans ce projet. Cette méthode est basée sur une identification indirecte des protéines à l'aide des peptides qui les composent. Chaque spectre MS/MS est en effet généré à partir d'un peptide. L'attribution des spectres est effectuée à l'aide du logiciel Mascot (Matrix Science) (Figure 34E). Le principe repose sur la comparaison des spectres expérimentaux avec une base de données (Cottrell & London, 1999). Le logiciel identifie la séquence du peptide ayant généré le spectre parmi les séquences peptidiques issues de la digestion théorique des protéines de la base de données choisie. Le logiciel attribue ainsi une à plusieurs séquences peptidiques à un spectre MS/MS (Figure 34F). L'attribution est appelée Peptide Spectrum Match (PSM). Le choix de la base de données est de ce fait déterminant afin d'identifier le maximum de spectres MS/MS expérimentaux. D'autres logiciels sont utilisés comme SEQUEST (ThermoFisher Scientific) ou X!Tandem (The Global Proteome Machine), chacun ayant son propre procédé algorithmique. Mascot calcule un score pour chaque PSM basé sur la probabilité p que l'attribution d'un peptide de la base de données à un spectre soit due au hasard. Le score est calculé par $-\log_{10}(p)$. Plus la probabilité est faible, plus ce score est élevé et l'attribution est significative. Enfin, le False Discovery Rate (FDR) est calculé afin d'évaluer le taux de peptides identifiés de manière incorrecte. Ce calcul est réalisé par simulation via la stratégie « target-decoy », confrontant les PSMs à une base de données protéiques leurre de la même taille que la base de données cible. Cette base « leurre » est composée d'un mélange aléatoire de données protéiques (protéines fictives, séquences inversées, *etc.*). L'attribution finale sera faite selon le principe de parcimonie, fournissant le plus petit ensemble final de protéines qui explique les séquences peptidiques identifiées.

Incontournable aujourd'hui, la spectrométrie de masse permet l'analyse d'échantillons biologiques complexes contenant des milliers de protéines avec une grande vitesse d'analyse et une résolution et une précision augmentées de mesure des masses. L'identification des protéines, mais également leur quantification, issues de l'expression des gènes et marqueurs de l'activité cellulaire, est un enjeu majeur pour la compréhension des mécanismes cellulaires (Aebersold & Mann, 2003).

5.2.c. La toxicologie prédictive et le concept des Adverse Outcome Pathways (AOP)

La toxicologie prédictive est basée sur les informations mécanistiques. Elle est devenue aujourd'hui un des aspects clés de l'évaluation du risque pour l'homme (Vinken, 2013). Dans cette optique, l'introduction du concept des AOP est une évolution majeure en toxicologie. Ce concept décrit des séries d'évènements clés qui appartiennent à des voies biologiques en partant de l'interaction initiale entre une substance et un organisme, jusqu'à l'effet final indésirable, selon le guide proposé par l'OCDE en 2012*⁵. L'EPA (US Environmental Protection Agency) a été l'initiateur en 2005 du concept des AOP dans le domaine du cancer*⁶. Dans la continuité, l'US National Academy of Sciences a publié un rapport en 2007 sur les stratégies et visions de la toxicologie du 21^{ème} siècle, incluant les AOP.

L'AOP est un concept relativement nouveau qui fournit un cadre pour collecter, organiser et évaluer des informations pertinentes sur les effets chimiques, biologiques et toxicologiques des substances toxiques. Cette construction permet de décrire les connaissances existantes liant un évènement moléculaire initial à un résultat indésirable à travers différentes échelles de l'organisation biologique comprenant les cellules, les tissus, les organismes ou les populations. Ainsi à la différence des modes d'action, l'AOP peut offrir un cadre bien plus large. Ce concept permet de structurer les informations expérimentales acquises afin de mieux comprendre la progression des évènements toxiques clés liés à l'exposition à une substance. L'intérêt pour l'outil AOP est grandissant depuis quelques années. En réponse à son utilisation de plus en plus importante, l'OCDE a publié un guide pour développer et utiliser pleinement les AOP (OCDE, 2012).

Ce concept a des répercussions dans de nombreux domaines, allant de la toxicologie environnementale à la pharmacotoxicologie. Les AOP sont destinés à évoluer de façon participative par un partage des connaissances mécanistiques, organisées de manière pragmatique dans des bases de données en ligne (Hartung, 2017c). Des plateformes publiques ont été mises en place à cet effet : AOP Wiki (<https://aopwiki.org>) et Effectopedia (<https://www.effectopedia.org>).

*⁵ OECD Guidelines for Adverse Outcome Pathways. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/adverse-outcome-pathways-molecular-screening-and-toxicogenomics.htm>

*⁶ Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. EPA. 2005. <https://www.epa.gov/risk/guidelines-carcinogen-risk-assessment>

Un AOP est structuré en trois blocs d'informations selon le guide édité par l'OCDE (2012), incluant l'évènement moléculaire initial (Molecular Initiating Event, MIE), une série d'étapes intermédiaires, et le résultat considéré indésirable (Adverse Outcome, AO) (Figure 35).

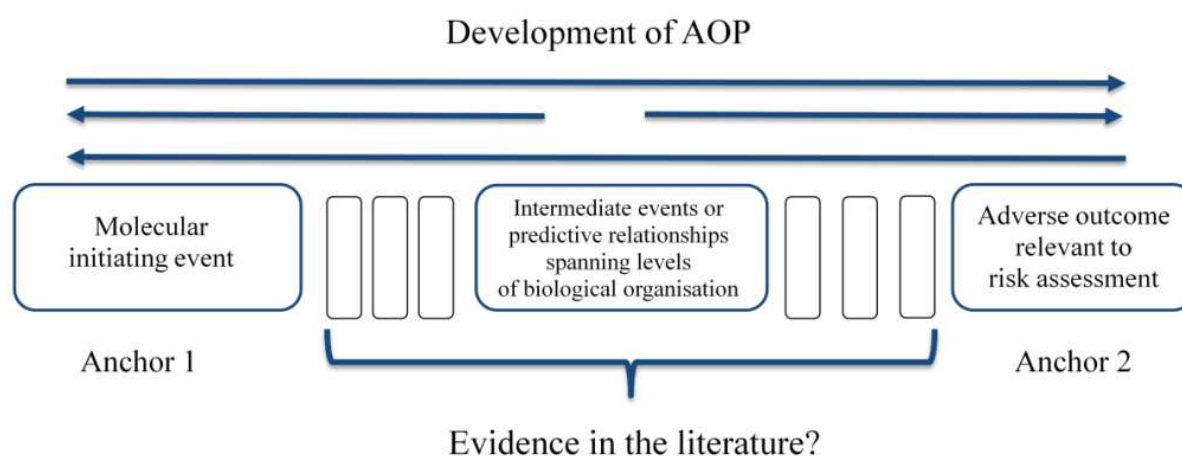


Figure 35. Représentation schématique du développement d'un AOP défini à partir de trois blocs d'informations indispensables : évènement moléculaire initial (Anchor 1), étapes intermédiaires supportées par la littérature, et le résultat indésirable (Anchor 2).

- Le MIE est le premier maillon d'un AOP et fait référence à l'interaction moléculaire directe entre une substance et une entité biologique, comme dans le cas des interactions ligand-récepteur, de liaisons aux biomolécules de types protéines ou acides nucléiques par exemple. Cette étape est critique car elle dicte directement la finalité de l'AOP.
- La finalité de l'AOP est la description d'un résultat indésirable (Adverse outcome, AO), décrivant les paramètres toxicologiques critiques qui découlent du MIE. Ils peuvent être définis selon différents niveaux biologiques, allant d'un type cellulaire à une population entière et peuvent faire référence à la fois à des effets toxicologiques aigus ou chroniques, localisés ou systémiques.
- Enfin, ces deux blocs de l'AOP sont séparés par des étapes intermédiaires qui expliquent les voies de régulation impliquées. Ces étapes incluent de ce fait des évènements clés qui sont expérimentalement justifiés et indispensables au résultat final. Ces étapes sont décrites par les voies de toxicité (Pathways of Toxicity ou PoT) qui sont issues d'analyses omics. Les PoT apportent des données moléculaires quantitatives (courbes dose-réponse et cinétiques) représentatives de la dynamique des réseaux perturbés (Hartung, 2017c).

Ils sont indispensables pour structurer les AOP en fournissant des blocs d'informations sur les mécanismes cellulaires impliqués. Par exemple, la plateforme Effectopedia prend en compte le caractère quantitatif des PoT dans l'élaboration des AOP.

L'identification de ces trois blocs est le résultat d'études approfondies de la littérature et traduit un ensemble de résultats expérimentaux. Généralement, tout type d'information peut alimenter un AOP, des données *in vitro* aux données épidémiologiques sur population. L'AOP n'est pas dépendant d'un produit chimique précis et peut donc être utilisé dans de nombreuses disciplines. Les AOP peuvent également s'imbriquer les uns avec les autres lorsqu'ils ont des blocs en commun, permettant une vision bien plus générale des effets observés. L'approche AOP peut être considérée comme une structuration de la connaissance mécanistique qui pourrait servir de point de référence aux études toxicologiques.

Exemple de la Cholestase hépatique. L'AOP de la cholestase hépatique a récemment été introduit par Mathieu Vinken et est encore en développement (AOP n°27 sur AOPWiki) (Figure 36) (Vinken *et al.*, 2013). Cet AOP décrit l'inhibition de l'export des sels biliaries par les hépatocytes avec pour conséquences des dommages hépatiques sévères. Le MIE de cet AOP est lié à l'inhibition des pompes d'efflux des sels biliaries, dont BSEP. L'accumulation de la bile dans les hépatocytes et les canalicules biliaries est ainsi la conséquence indésirable (AO). La présence de ces acides biliaries déclenche des réponses cellulaires qui sont les événements clés intermédiaires : d'une part des effets cytotoxiques (inflammation, production d'espèces réactives de l'oxygène, apoptose, *etc.*), et d'autre part des mécanismes adaptatifs pour contrer la présence trop importante de ces acides biliaries. Ces réponses adaptatives incluent notamment les mécanismes de détoxification, l'augmentation de l'export des acides biliaries, une diminution de leur prise en charge et de leur synthèse.

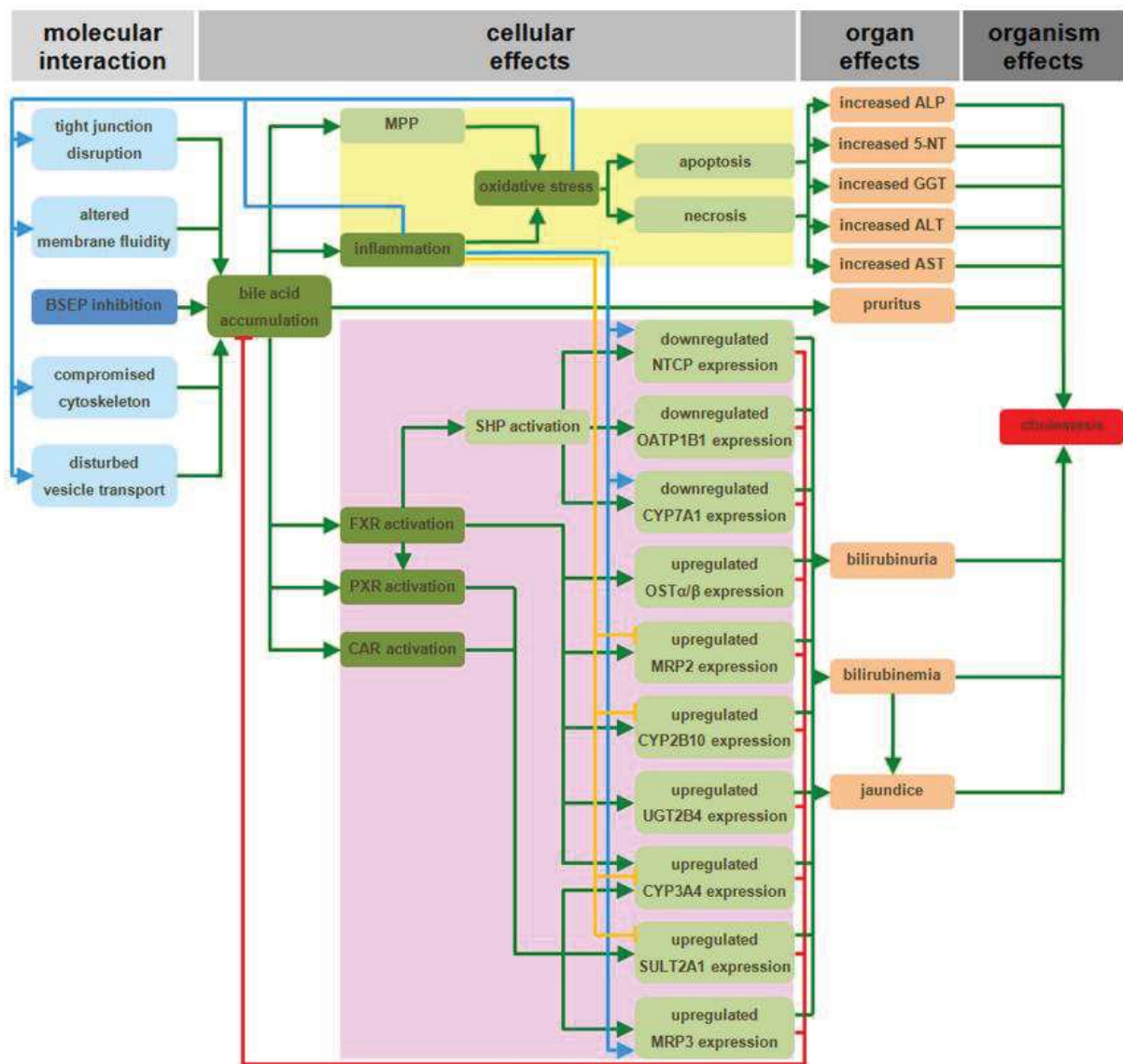


Figure 36. Représentation de l'AOP n°27 « Cholestatic Liver Injury induced by inhibition of the bile salt export pump », proposé par Mathieu Vinken (Vinken *et al.*, 2013).

Pour conclure, le concept des AOP constitue un saut qualitatif majeur en toxicologie. Néanmoins, il n'en est encore qu'à ses balbutiements et souffre parfois d'une simplicité qui reflète difficilement les aspects complexes des processus toxicologiques. Cette approche collaborative et structurée est encourageante car elle permet de rationaliser les mécanismes toxiques, d'identifier les étapes critiques pour proposer des tests ciblés et pertinents.

Objectifs de la thèse

Cette thèse a pour objectif de déterminer la toxicité de nanoparticules magnétiques de silice mésoporeuse (M-MSNs), possédant divers revêtements de surface, de façon à contribuer, en évaluant les mécanismes toxicologiques, à une conception plus sûre de ces nanovecteurs. Cet objectif s'inscrit dans une perspective plus large de mise au point d'outils d'évaluation pour la sécurité biologique de nanovecteurs. La toxicité des NPs est un frein potentiel à leur utilisation médicale en thérapie et en diagnostic (théranostic). Cette thèse se situe à l'interface entre la chimie et la biologie. Elle traite particulièrement de deux aspects fondamentaux de l'évaluation du risque biologique de ces NPs, à savoir l'aspect toxicologique à travers l'impact sur un modèle cellulaire hépatique humain et l'aspect chimie analytique par l'étude des interactions entre NPs et protéines sériques.

Pour cela, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des M-MSNs natives et modifiées par deux types de recouvrements (PEG ou DMPC). Différentes techniques physico-chimiques ont été utilisées comme : la diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering, DLS), la microscopie électronique à transmission (TEM) et la microscopie à force atomique (AFM). Il est important de connaître l'ensemble des paramètres physico-chimiques des NPs avant d'aborder l'aspect des interactions avec le vivant.

La technologie innovante d'impédance cellulaire en temps réel (xCELLigence, ACEA Biosciences) a été mise en place afin d'étudier la toxicité des NPs en mode cinétique pour compléter les études de toxicité par tests de viabilité.

L'objectif premier est la compréhension des mécanismes intracellulaires de toxicité par étude de profils d'expression génique en fonction de leur décoration. La mesure de l'effet des NPs sur la transcription permet de comprendre leur action sur les cellules hépatiques avec une extrême sensibilité. Pour ce faire, nous avons choisi un modèle cellulaire hépatique, HepaRG, proche des hépatocytes primaires humains. Un modèle de NPs de silice a été utilisé de façon préliminaire afin d'affiner une méthodologie de biologie intégrative utilisant les omics combinées à une interprétation bioinformatique basée sur la recherche des voies de toxicité (Pathway of toxicity, PoT).

Le second objectif consiste à qualifier et quantifier les protéines adsorbées sur les NPs par approche protéomique sans marquage. L'analyse par spectrométrie de masse permet de

connaître avec précision quelles macromolécules recouvrent les particules et ce qui conditionne leur devenir physiologique.

Les techniques utilisées, l'impédance cellulaire en temps réel, les puces d'expression génique et la spectrométrie de masse, pourraient incarner de futurs standards d'évaluation de la sécurité biologique des nanovecteurs dans une optique de toxicologie prédictive.

Partie expérimentale

CHAPITRE I

***Mise en place des technologies et de
méthodes pour l'évaluation toxicologique de
nanoparticules de silice***

Article n°1

***Evaluation quantitative des effets de nanoparticules
de silice à faible dose sur cellules pulmonaires :
Appréhender une toxicité complexe avec une grande
profondeur de champ***

Article n°1 : Evaluation quantitative des effets de nanoparticules de silice à faible dose sur cellules pulmonaires : appréhender une toxicité complexe avec une grande profondeur de champ

Ce premier article pose les bases de la méthodologie d'étude toxicologique *in vitro* qui sera employée dans le cadre de ce projet. Le principe en était de combiner les quantités massives de données obtenues avec les puces d'expression génique ainsi qu'avec la spectrométrie de masse en une méthodologie unique d'étude intégrative, dite « pathway driven », c'est-à-dire focalisée directement sur les mécanismes de réponse cellulaire (PoT) suite à l'exposition à un produit toxique. Les NPs utilisées ici ne sont pas à visée médicale, bien qu'ayant auparavant été testées en tant qu'adjuvant vaccinal (Powell *et al.*, 1995), mais ont été prises comme modèle afin de tester les différentes techniques et méthodes d'analyse à mettre en œuvre ultérieurement, une fois les objets d'étude de la thèse disponibles. Ce travail préliminaire a également permis la prise en main par le laboratoire d'un nouvel appareil d'impédance cellulaire (RTCA xCELLigence d'ACEA Biosciences) acheté dans le cadre de ce projet de thèse.

Les nano-objets étudiés sont des NPs commerciales de silice amorphe pyrogénée hydrophile non poreuse (SiO₂), préparée par oxydation du tétrachlorure de silicium (SiCl₄) à très haute température (Napierska *et al.*, 2010). Les NPs d'AEROSIL® 200 (A200) (n° CAS : 112945-52-5, 7631-86-9, Evonik Industries) ont un diamètre de 10 ± 4 nm et une surface spécifique de 200m²/g. Ces NPs sont utilisées dans de nombreux procédés de fabrication en tant qu'agent anti-mottant et pour améliorer les propriétés de viscosité et de stabilité d'une grande variété de produits industriels. Elles entrent dans la composition de produits cosmétiques, d'emballages alimentaires, de produits agrochimiques, de peintures et recouvrements de surface ou d'encre d'impression et sont utilisées dans l'industrie à l'état de poudre. La voie privilégiée pour l'étude de toxicité est l'inhalation, et nous avons donc pris pour modèle la lignée de cellules pulmonaires A549. Au niveau toxicologique, de toutes les silices amorphes testées par Reuzer *et al.*, l'A200 est le produit qui induit les effets les plus néfastes au niveau pulmonaire chez le rat (Reuzel *et al.*, 1991), et son caractère toxique sur des cellules pulmonaires A549 a récemment été établi (Irfan *et al.*, 2014).

La première étape de notre stratégie a été d'utiliser des tests de viabilité pour identifier des doses cohérentes, c'est-à-dire avec un impact minime sur les cellules, afin de mettre en évidence les modes d'actions impliqués dans la réponse cellulaire sans être dans un excès dosimétrique qui induirait une toxicité extrême.

Les résultats de la caractérisation physico-chimique que nous avons effectuée correspondent bien à ceux fournis par le fabricant. L'analyse par Dynamic Light Scattering (DLS) met en évidence leur polydispersité en milieu de culture, avec la présence à la fois de particules seules (10 ± 4 nm) et aussi sous forme agrégée. La microscopie à force atomique (AFM) nous a permis d'identifier les caractéristiques structurales des NPs. Celles-ci ne sont pas sphériques comme attendu, mais sous forme de disques de 10 ± 5 nm de diamètre et de 2 ± 0.3 nm d'épaisseur.

Après avoir réalisé des tests de viabilité (Tests ATP et XTT) sur A549, nous avons pu déterminer la gamme de concentrations toxiques des NPs A200. Ainsi, la baisse de viabilité maximum a été obtenue à $100 \mu\text{g/mL}$, induisant une diminution de la viabilité de $87.8 \pm 9.1\%$. A partir de ce stade, les doses ont été exprimées en masse par surface ($\mu\text{g/cm}^2$) et non en masse par volume ($\mu\text{g/mL}$). Cette unité permet de normaliser les doses entre les différentes techniques utilisées. En effet, dans les conditions de culture cellulaire, les NPs sédimentent et induisent des doses délivrées (au niveau du tapis cellulaire) différentes en fonction des supports de cultures de volume et surface variables. Avec une concentration en $\mu\text{g/cm}^2$ fixe, il est possible de faire varier la concentration en $\mu\text{g/mL}$ afin d'obtenir une correspondance entre les différents supports de culture. Par exemple, $100 \mu\text{g/mL}$ en plaque 96 puits équivalent à environ $30 \mu\text{g/cm}^2$. En boîte 25cm^2 , $30 \mu\text{g/cm}^2$ correspondent à $150 \mu\text{g/mL}$. Ainsi deux doses qui n'altèrent que faiblement la viabilité ont été choisies pour les techniques suivantes, à savoir 3.0 et $6.0 \mu\text{g/cm}^2$, correspondant respectivement à des viabilités de 99% et 90% . Des doses plus faibles ou plus fortes ont également été testées suivant les techniques utilisées afin d'obtenir des effets de type dose-réponse plus précis.

- **Suivi cellulaire par impédance en temps réel (xCELLigence)**

Cette technique enregistre tout un panel de paramètres (viabilité, morphologie, *etc.*) dont les effets sur l'impédance peuvent s'additionner ou se compenser. Quelques heures après exposition des cellules aux différentes concentrations, une légère augmentation du Cell

Index (CI) est enregistrée pour les trois faibles concentrations 1.5, 3.0 et 6.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Cette augmentation s'explique par des modifications morphologiques des cellules (jonctions cellulaires resserrées, internalisation des NPs). A 24h d'exposition, le CI de ces trois doses est très proche de celui des cellules contrôles. Néanmoins à 48h, les doses 3.0 et 6.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ induisent une diminution du CI. Cet effet est amplifié à 72h, temps auquel la dose 1.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ induit à son tour une diminution du CI. Cette baisse du signal est potentiellement due à une perte de viabilité. L'impédance cellulaire confirme donc les résultats des tests de viabilité obtenus à 24h et indique que ces doses sont potentiellement intéressantes à tester avec les techniques omics sur plusieurs durées d'exposition.

- **Analyse des modes d'action de A200 par techniques omics**

Les puces d'expression génique ont été réalisées avec 5 doses : 0.1, 1.0, 1.5, 3.0 et 6.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de A200. Nous avons pu déterminer la dose où aucun effet sur le transcriptome n'est observé, c'est à dire le NOTEL (No Observed Transcriptional Effect Level), soit 1.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. A cette dose, la transcription des gènes ne présente aucune différence significative avec les cellules contrôle. Nous avons également déterminé le LOTEL (Low Observed Transcriptional Effect Level) à 1.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, induisant 255 gènes modulés à 24h d'exposition mais aucune perte de viabilité observée par le test ATP. Outre le fait que les puces d'expression sont bien plus sensibles que les tests conventionnels de viabilité, le NOTEL pourrait être un indicateur intéressant dans l'évaluation toxicologique d'une substance. Sa mise en évidence faisait partie des objectifs.

Les mécanismes de réponse cellulaire aux NPs ont été identifiés grâce aux données d'expression génique, mais également par analyse des milieux de culture en spectrométrie de masse (nano-LC MS/MS) indiquant les protéines sécrétées par les cellules après exposition aux NPs. La combinaison de ces deux ensembles de données a permis, par comparaison avec une base de données de connaissance toxicologique (Ingenuity Knowledge Database), de mettre en évidence les modes d'action de ces NPs par identification des voies canoniques impliquées. Chaque voie canonique est constituée d'un nombre fini de gènes. Notre méthodologie intégrative a consisté à calculer, pour chaque ensemble de données (dataset) issu d'un point expérimental, un pourcentage de gènes, ou de protéines, altérés dans ce dataset divisé par le nombre total de gènes définissant cette

voie. Ceci nous a permis de quantifier l'implication des voies de signalisation canoniques pour chaque dose et durée d'exposition. Seules les voies les plus impactées par les NPs ont été analysées.

Pour donner un exemple, 51 % des gènes définissant la voie « coagulation system » sont différentiellement exprimés par rapport à ceux des cellules contrôle, après exposition à 6.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de NPs A200 pendant 72h (Figure 6 de l'article).

Enfin nous avons établi une échelle dose-dépendante de réponses cellulaires croissantes. Cette échelle est basée sur le paradigme décrit pour la première fois par André Nel et ses collaborateurs selon lequel le stress dû aux NPs déclenche une hiérarchie d'évènements cellulaires (Figure 37) (Meng *et al.*, 2009).

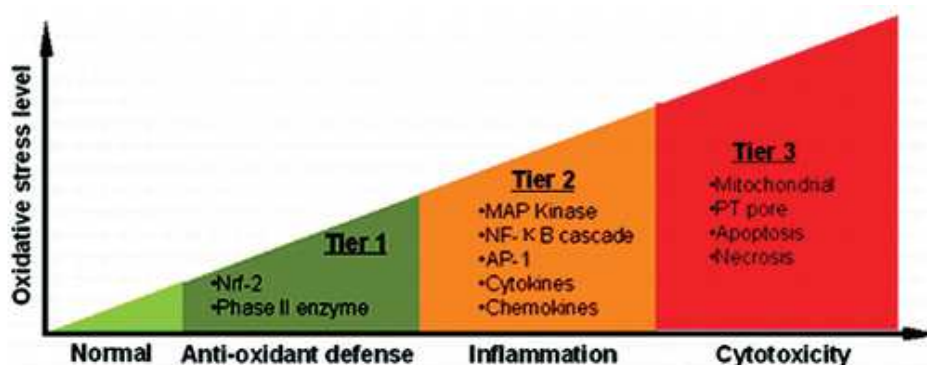


Figure 37. Paradigme de la réponse hiérarchique au stress oxydant selon Meng *et al.* (Meng *et al.*, 2009).

Dans l'article qui suit, la combinaison des données obtenues par nos techniques omics et notre méthode d'analyse intégrative dite « pathway driven », nous a conduit à établir trois niveaux d'effets en fonction des doses, regroupant des ensembles de voies de signalisation canoniques et des mécanismes de toxicité spécifiques à ces NPs A200. Ces niveaux correspondent ainsi au déclenchement de la réponse cellulaire adaptée, qui est fortement dépendante de la dose appliquée et amplifiée dans le temps.

En conclusion, l'impédance cellulaire en temps réel est une technique prometteuse dans l'évaluation des effets cellulaires induits par les NPs. Les approches de transcriptomique et de protéomique combinées ont permis d'étudier les effets de ces NPs sur ces cellules pulmonaires. Les modes d'action des NPs impliquent différentes voies de signalisation

canoniques que nous avons pu quantifier et classifier en fonction des doses appliquées. De plus, contrairement au schéma putatif de Meng *et al.*, nos données mettent en évidence des mécanismes de réponse cellulaire (remaniement du cytosquelette, induction de médiateurs proinflammatoires) qui se produisent à des doses inférieures à celles qui activent le stress oxydant.

L'analyse de données massives permet de naviguer des voies canoniques aux fonctions cellulaires jusqu'aux gènes ou protéines spécifiques, lui octroyant une réelle puissance de profondeur de champ (Figure 38).

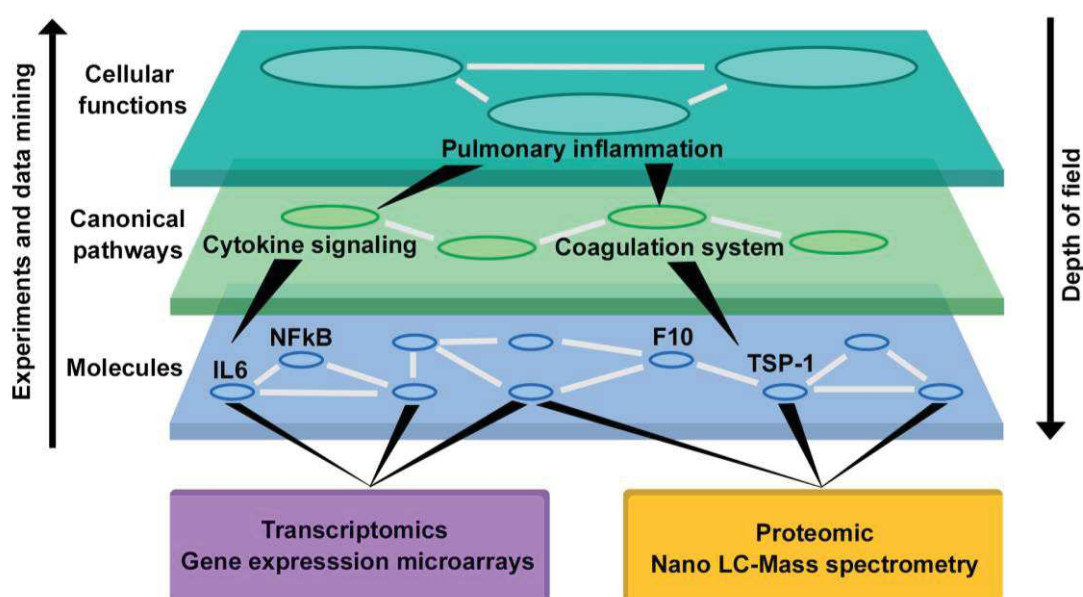


Figure 38. Représentation de la profondeur de champ analytique des données transcriptomiques et protéomiques (Poster présenté à EUROTOX 2015 (Pisani *et al.*, 2015)).

Cette stratégie *in vitro* est en réalité un outil prédictif avantageux qui pourrait permettre d'analyser de façon quantifiable les réponses biologiques à la toxicité de NPs, mais aussi de substances chimiques avant de planifier et d'exécuter des expériences *in vivo*.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

High-throughput, quantitative assessment of the effects of low-dose silica nanoparticles on lung cells: grasping complex toxicity with a great depth of field

Cédric Pisani¹, Jean-Charles Gaillard¹, Virginie Nouvel¹, Michaël Odorico¹, Jean Armengaud¹ and Odette Prat^{1,2*}

Abstract

Background: The toxicity of manufactured fumed silica nanoparticles (NPs) remains poorly investigated compared to that of crystalline silica NPs, which have been associated with lung diseases after inhalation. Amorphous silica NPs are a raw material for manufactured nanocomposites, such as cosmetics, foods, and drugs, raising concerns about their potential toxicity.

Results: The size of the NPs was determined by dynamic light scattering and their shape was visualized by atomic force microscopy (10 ± 4 nm). The pertinent toxicological concentration and dynamic ranges were determined using viability tests and cellular impedance. We combined transcriptomics and proteomics to assess the cellular and molecular effects of fumed silica in A549 human alveolar epithelial cells. The “no observed transcriptomic adverse effect level” (NOTEL) was set to $1.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, and the “lowest observed adverse transcriptional effect level” (LOTTEL) was set at $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. We carried out genome-wide expression profiles with microarrays and identified, by shotgun proteomics, the exoproteome changes in lung cells after exposure to NP doses (0.1, 1.0, 1.5, 3.0, and $6.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) at two time points (24 h and 72 h). The data revealed a hierarchical, dose-dependent cellular response to silica NPs. At $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, the Rho signaling cascade, actin cytoskeleton remodeling, and clathrin-mediated endocytosis were induced. At $3.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, many inflammatory mediators were upregulated and the coagulation system pathway was triggered. Lastly, at $6.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, oxidative stress was initiated. The proteins identified in the extracellular compartment were consistent with these findings.

Conclusions: The alliance of two high-throughput technologies allowed the quantitative assessment of the cellular effects and molecular consequences of exposure of lung cells to low doses of NPs. These results were obtained using a pathway-driven analysis instead of isolated genes. As in photography, toxicogenomics allows, at the same time, the visualization of a wide spectrum of biological responses and a “zoom in” to the details with a great depth of field. This study illustrates how such an approach based on human cell culture models is a valuable predictive screening tool to evaluate the toxicity of many potentially harmful emerging substances, alone or in mixtures, in the framework of future regulatory reinforcements.

Keywords: Transcriptomics, Proteomics, Toxicogenomics, Nanoparticles, Silica, Cytotoxicity, Adverse outcome pathways, Cellular impedance

* Correspondence: odette.prat@cea.fr

¹CEA, IBEB, SBTN, F-30207 Bagnols-sur-Cèze, France

²International Consortium for the Environmental Implications of Nanotechnology (iCEINT), Aix-en-Provence, France

Background

With the growing commercialization of nanotechnology products, human exposure to manufactured nanoparticles (NPs) is increasing, raising concerns about their potential toxicity. Synthetic, amorphous silica NPs are a raw material for the manufacture of many nanocomposites, such as cosmetics, foods, drugs, and printing ink additives, on a large industrial scale [1]. The toxicity of crystalline silica, the inhalation of which is involved in many lung diseases, such as silicosis, lung cancer, chronic obstructive pulmonary diseases, and pulmonary tuberculosis, has been widely studied [1,2]. However, few studies have been performed on amorphous silica, because it exists in many diverse forms of natural or synthetic origin [3,4]. Industrial processes use synthetic amorphous silica nanoparticles for the easy control of size, shape and physical properties. Fumed (or pyrogenic) silica is prepared by the oxidation of silicon tetrachloride at elevated temperature, leading to a very low bulk density and high specific surface area nanopowder (200 m²/g for AEROSIL® 200 NPs). Fumed silica is used extensively as strengthening filler and thickening agent in a wide variety of products, such as foodstuffs, paints, printing inks (toners) and adhesives. It also serves as a desiccant and is frequently added to cosmetics and toothpastes due to its respective light-diffusing and mild-abrasive properties. Along with applications in polyester, silicone, paints, and coatings, hydrophilic fumed silica AEROSIL® products are used with increasing success in high-technology fields such as electronics and optical fiber industries. Fumed silica poses an inhalation risk due to its extremely fine structure and the workers synthesizing or using it may be the first population exposed.

Some *in vivo* toxicological studies have been carried out with AEROSIL products. Reuzel *et al.* showed that AEROSIL® 200 (30 mg/m³) led to a clear dose–response relationship and to the accumulation of alveolar macrophages [5]. Of the amorphous silicas examined, AEROSIL® 200 induced the most severe changes in the lungs of rats, which only partly recovered. Previous *in vitro* studies also showed that amorphous silica nanoparticles were toxic to lung cells [4,6,7].

While *in vivo* toxicity assays in animals remain the gold-standard methodology for evaluating the toxicity of a compound, the existence of a growing number of manufactured products mandates an urgent requirement for alternative assays based on high-throughput, cell-based methodologies. Toxicogenomics, including in its broader scope transcriptomics and proteomics, is a promising tool not only for monitoring the toxicity of substances using human cell line assays but also for investigating and documenting the modes of action of unknown chemicals [8–12]. In this domain, Lobenhofer [13] developed

a new concept that could potentially be a new, sensitive, and informative parameter to be systematically documented for risk assessment and comparison [14]. This parameter is the highest concentration of a given chemical for which no effect on the transcriptome is observed and is named the “no observed transcriptional effect level” (NOTEL). Proteomics has, in addition, been proposed as a complementary approach to study the cellular response to toxicants [15]. Specifically, the analysis of human cell line secretomes appears to be a promising source of biomarkers documenting their physiological state in response to chemicals [16].

Here, we have focused on the cellular effects induced by fumed silica NPs (AEROSIL® 200 NPs) in A549 lung epithelial cells. For this, we established the transcriptomic dose–response curve over a range of silica concentrations and accurately determined the NOTEL threshold using commercial human 4x44k Gene Expression Microarrays. We also performed, by high-resolution shotgun proteomics, an analysis of the secretome of A549 cells after exposure. This new strategy allowed the highlighting, in a dose-dependent manner, of the significant cellular and molecular modifications triggered by the exposure to fumed silica NPs.

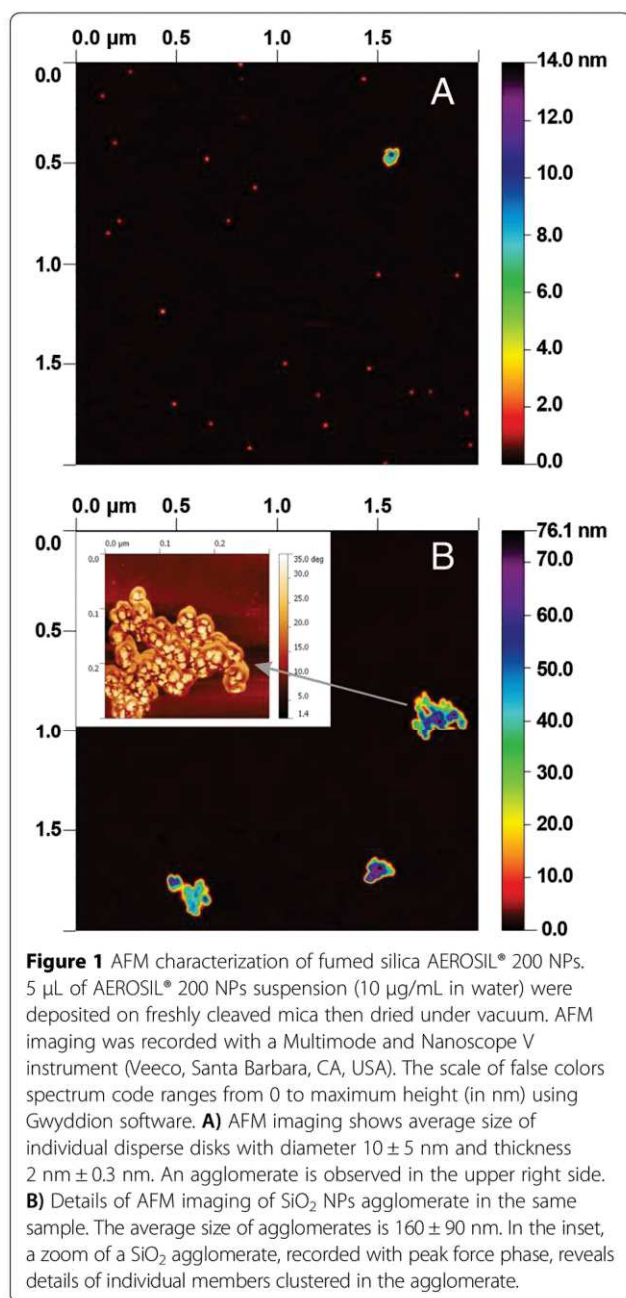
Results

Characterization of silica NPs

The silica NPs were first characterized in terms of aggregation and size. In DMEM/F12 culture medium comprising 10% fetal bovine serum (FBS), the average hydrodynamic diameter of the NPs was 10 ± 4 nm, as measured by dynamic light scattering (DLS). This value is close to the value provided by the manufacturer (12 nm). NPs in serum-free medium were in an agglomerated form with a mean size, evaluated by DLS, close to 350 nm (±8 nm). Atomic Force Microscopy (AFM) showed disperse disks with diameter 10 ± 5 nm and thickness 2 ± 0.3 nm (Figure 1A) and confirmed the existence of size heterogeneity. Figure 1B shows a typical 160 ± 90 nm agglomerate, where individual base units are clearly visible.

Viability tests and real-time cellular impedance

We evaluated the cytotoxicity of SiO₂ NPs in A549 human alveolar epithelial cells in serum-free medium. Two different toxicity assays, ATP (Cell Titer Glo, Promega) and XTT (TOX-2, Sigma), were carried out. These two assays comprised two different reporting systems – fluorescence and optical density, respectively – and were performed in parallel to identify potential bias due to possible interference from the nanoparticles. The ATP test based on the intracellular ATP content measurement is considered as a very sensitive viability test. The XTT test is based on the activity of succinate dehydrogenase, a mitochondrial



enzyme. This test was chosen to avoid the more standard MTT test. Indeed, the formation of insoluble MTT formazan in this assay is often interlaced with NP fibers or agglomerates, thus inhibiting its solubilization by the solvent [17,18]. As shown in Figure 2, both the ATP and XTT tests produced similar dose–response curves over the concentration range tested, from 0.3 - 30.3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of cell surface. AEROSIL® 200 NPs were cytotoxic from 3.0 - 30.3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. The no observed adverse effect level (NOAEL) for these NPs was estimated at 1.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and the lowest value for which an effect on cell viability was

observed (LOAEL) was established at 3.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ silica NPs (Figure 2).

An xCELLigence RTCA instrument was used to carry out real-time cell monitoring after exposure to NPs (Figure 3). The highest concentrations (i.e. 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) induced a drastic decrease in cell index (CI) compared with control cells. The lowest concentrations (1.5, 3.0, and 6.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) indicated a biphasic CI evolution with an early increase, followed by a decrease up to the end of the experiment.

Omics-based probing of the silica NP cellular effects

Correlation between gene expression profiles and viability assays

Gene expression changes depending on silica NP concentrations were evaluated in three biological replicates with Agilent Human V2 4x44K Microarrays. Figure 4 shows the number of differentially expressed genes detected in response to 0.1, 1.0, 1.5, 3.0, and 6.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ AEROSIL® 200 silica NPs during 24 h exposure. A dose-dependent response to silica NPs was observed, ranging from 5 to 2,258 significantly differentially modulated transcripts compared with controls, with a fold change of at least 1.5 and p-value < 0.05. The lists of modulated transcripts including fold changes and p-values are presented in Additional file 1: Table S1. These results showed a strong correlation between the numbers of modulated genes and the cell death percentage established with viability tests (ATP, XTT). From these results, the NOTEL was set at 1.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, with two successive concentrations (0.1 and 1.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) giving no significantly differentially expressed genes as the criterion (Figure 4). The LOTEL was set at 1.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, with 255 transcripts as compared with controls. Figure 5A shows the numbers of differentially expressed transcripts obtained with 3.0 and 6.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ silica NPs, and their overlaps. A strong concordance of the results is represented by the Venn diagram (Figure 5A). At 24 h, more than 80% of the transcripts modulated at 3.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ were also modulated at 6.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Finally, the 3.0 and 6.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ doses were also analyzed with whole genome microarrays after 72 h exposure, to further identify potentially conserved adverse outcome pathways. We found 983 and 3,221 modulated transcripts at 3.0 and 6.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively. After 72 h exposure, 88% of the transcripts modulated at 3.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ were also modulated at 6.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Exoproteome changes upon silica NP addition

To determine which secreted proteins were modulated upon silica NP exposure to 3.0 and 6.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ doses at 24 h, we collected the supernatants of cell cultures from the transcriptomic experiments. This ensured that the data from both of these omics-based approaches were

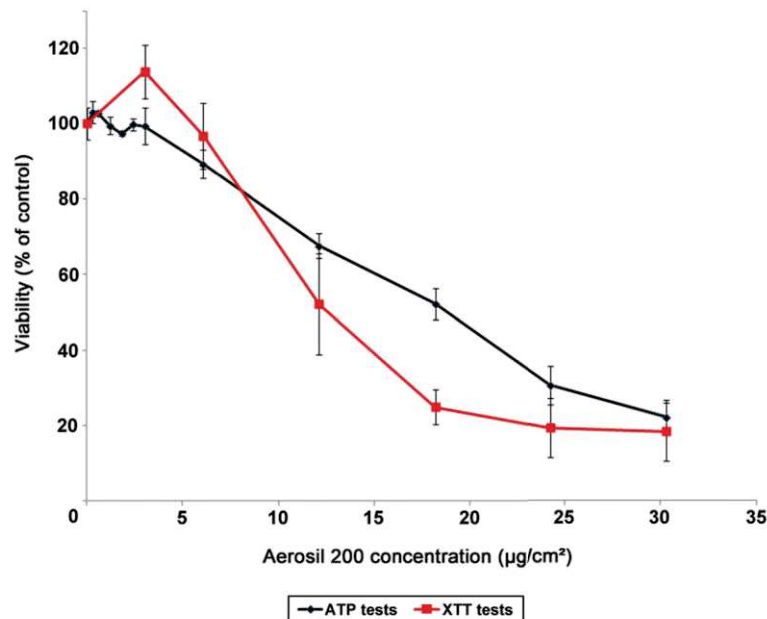


Figure 2 Cell viability of A549 cells exposed to fumed silica AEROSIL® 200 NPs. After 24 h exposure to silica AEROSIL® 200 NPs, the viability of A549 cells was determined using the ATP test (black line) (Cell Titer Glo, Promega) and the XTT test (red line) (TOX2, Sigma). The results are expressed as the mean percent viable cells $\pm$ SD (n = 3) compared with unexposed cells.

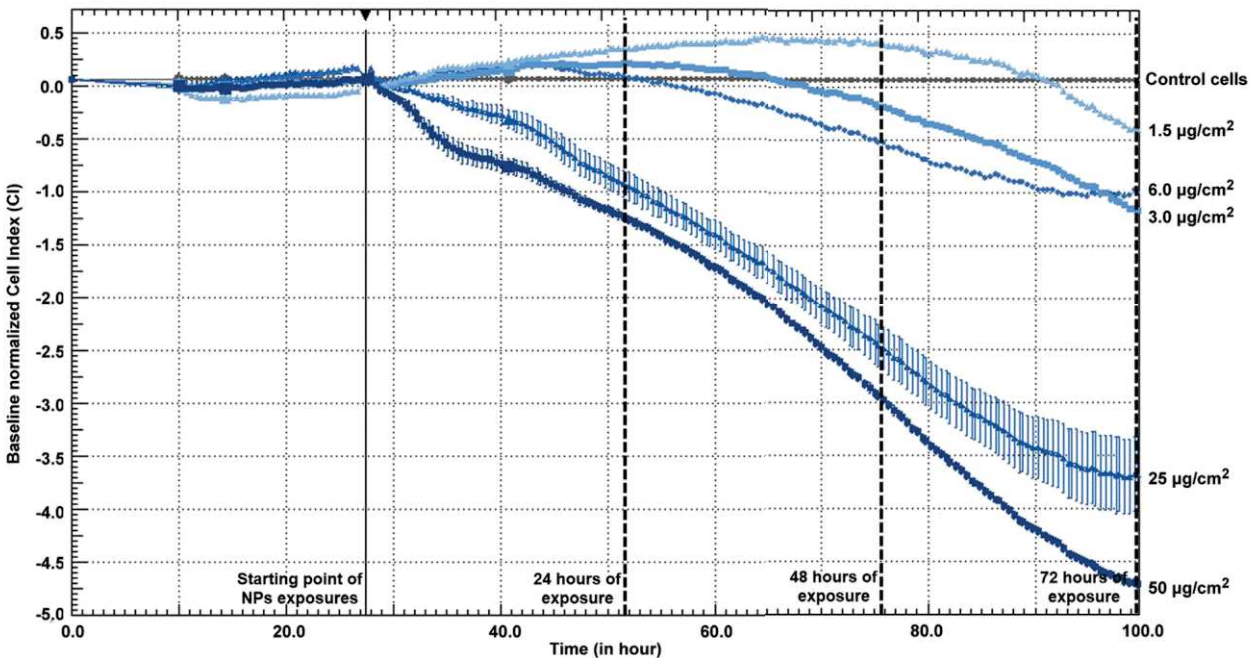
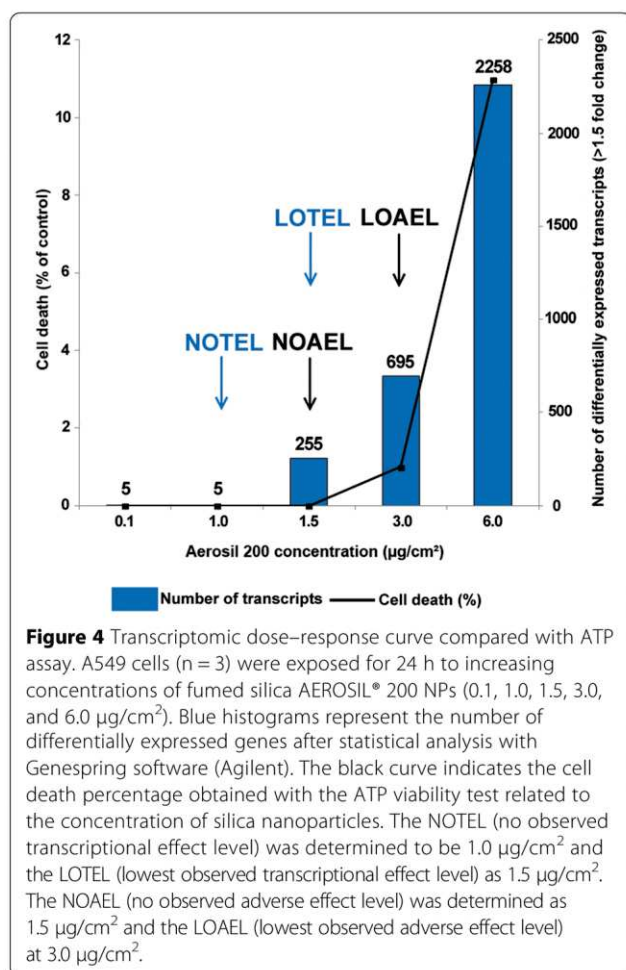


Figure 3 XCELLigence experiment. Real-time cell index (CI) monitoring of A549 cells (n = 3) exposed to 1.5, 3.0, 6.0, 25, and 50 µg/cm² fumed silica AEROSIL® 200 NPs for 72 h. The black arrow represents the starting point of exposure. Cell index was normalized on baseline (control cells) to ensure inter-dose comparison. The highest concentrations (i.e. 25 and 50 µg/cm²) induced a drastic CI decrease compared to control cells. The lowest concentrations (1.5, 3.0 and 6.0 µg/cm²) indicated a biphasic CI evolution with an early increase followed by a decrease up to the end of the experiment.



fully comparable. After protein extraction and trypsin proteolysis of the three biological replicates at the three conditions (zero, 3.0, and 6.0 µg/cm² NPs), the resulting peptides were analyzed by shotgun proteomics, i.e. nano-LC resolution on a reverse phase coupled to tandem mass

spectrometry operated with an Orbitrap mass analyzer. A total of 8,276 MS/MS spectra were assigned with confidence to human proteins (p-value ≤ 0.05) taking the nine samples into consideration, indicating the presence of 145 proteins (Additional file 2: Table S2). Figure 5B reports the number of significantly modulated proteins detected with this approach in the extracellular medium upon exposure to silica NPs. A total of 72 and 79 proteins were significantly modulated with 3.0 and 6.0 µg/cm² at 24 h, respectively, with a fold change of at least 2.0 (p-value ≤ 0.05). As for transcriptomics, the Venn diagram showed a good correlation of the results between silica NP doses, with more than 80% of the proteins that were modulated at 3.0 µg/cm² also modulated at 6.0 µg/cm² (Figure 5B).

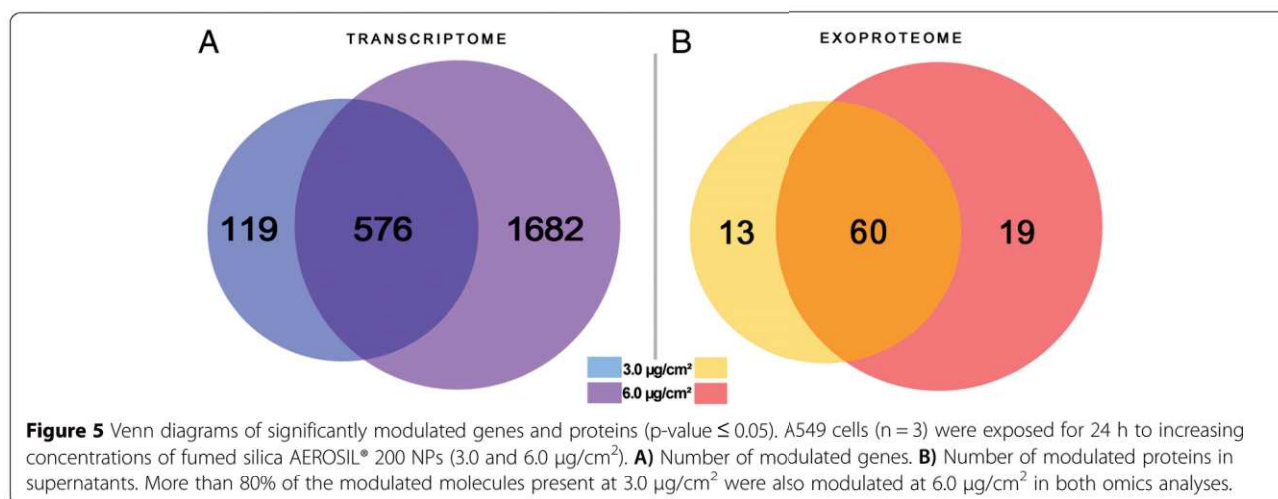
Canonical pathway analysis

Transcriptomic analysis

We identified the most relevant canonical pathways disturbed after 24 and 72 h exposure at all NP doses using the Ingenuity Pathway Analysis tool. Each canonical pathway is constituted of a finite number of genes. For each dose and time point, we calculated a ratio indicating the percentage of altered genes in our dataset belonging to a given canonical pathway. These pathways are all significant according to a Fisher statistical test (p-value < 0.05).

Figure 6 reports the seven canonical pathways mainly altered by fumed silica NPs in a time- and dose-dependent manner. The most highly altered canonical pathways were related to the “coagulation system”, including “intrinsic” and “extrinsic” “prothrombin activation pathways”.

Other pathways linked to the cell response, and involved at both times and both doses, included “acute phase response signaling”, “xenobiotic metabolism signaling”, “TREM1 signaling” and “oxidative stress response”. Some pathways are not represented in Figure 6 because they were only engaged at the lowest dose (1.5 µg/cm²). These



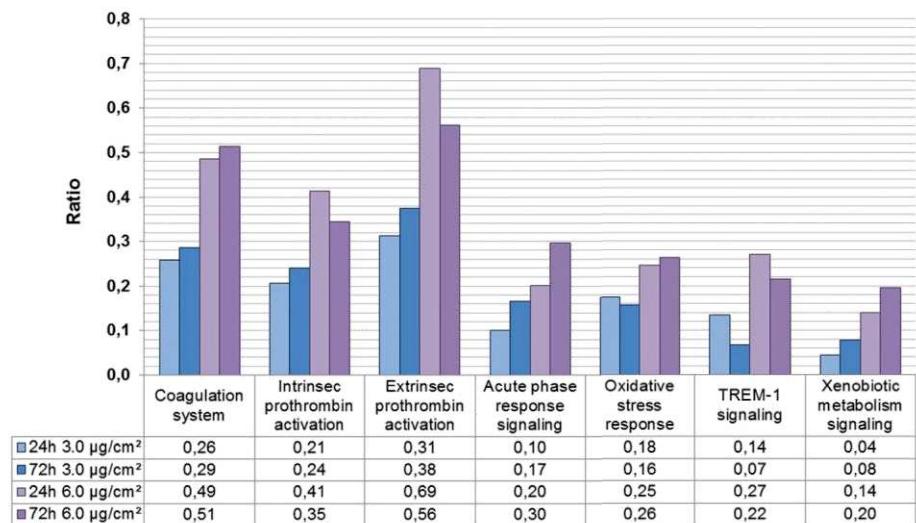


Figure 6 Altered canonical pathways. A549 cells (n = 3) were exposed for 24 h and 72 h to increasing concentrations of fumed silica AEROSIL® 200 NPs (3.0 and 6.0 µg/cm²). Seven relevant canonical pathways disturbed after 24 h and 72 h exposure with two doses of NPs (3.0 and 6.0 µg/cm²) were revealed with the Ingenuity Pathway Analysis tool. Each canonical pathway is constituted of a finite number of genes. For each dose and time point, we calculated a ratio indicating the percentage of altered genes in our dataset belonging to a given canonical pathway. These pathways are all significant according to a Fisher statistical test (p-value < 0.05).

pathways are “clathrin-mediated endocytosis”, “Rho signaling pathway” and “actin cytoskeleton remodeling”; they presented low ratios but were obtained with high significance. This allowed specific cellular effects triggered as a function of increasing NP concentrations to be distinguished and to be classified at three hierarchical levels of toxicological response. The Additional file 3: Table S3 indicates more precisely the genes characterizing each pathway for the three levels at all NP concentrations (1.5, 3.0, and 6.0 µg/cm²), with their fold changes and p-values.

Exoproteomic analysis

We used several tools such as SignalP, SecretomeP, Exocarta, and Vesiclepedia to distinguish the proteins secreted by classical (endoplasmic reticulum/golgi) and non-classical (such as exosomes and microvesicles) export mechanisms from those that were not secreted at 24 h exposure. We then identified their implication in toxicological functions using the IPA database.

Thus, at 3.0 µg/cm², 10 proteins had a signal peptide (score SignalP ≥ 0.9) and were likely secreted by classical mechanisms. In addition, 61 proteins were found in the Exocarta/Vesiclepedia databases and 22 proteins were identified with SecretomeP (without signal peptide and a score ≥ 0.5), representing 64 proteins potentially secreted by non-classical mechanisms. Finally, by appending all databases, it was found that 67/72 proteins were secreted. Remarkably, five proteins were not found with these tools and were considered as possible cellular waste with high half-lives in the extracellular compartment: histone H4 (H4), T-complex protein 1e (TCPE),

T-complex protein 1b (TCPB), tubulin b (TBB5) and transitional endoplasmic reticulum ATPase (TERA).

At 6.0 µg/cm², eight proteins had a signal peptide (score SignalP ≥ 0.9) and were secreted by classical mechanisms. At this dose, 71 proteins were found in the Exocarta/Vesiclepedia databases and 26 proteins were identified with SecretomeP (without signal peptide and a score ≥ 0.5), representing a total of 73 proteins potentially secreted by non-classical mechanisms. Finally, by merging all databases, it was found that 74/79 proteins were actually secreted and five proteins would possibly be cellular waste: heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (ROA2), transitional endoplasmic reticulum ATPase (TERA), histone H4 (H4), kynureninase (KYNU), and tubulin beta chain (TBB5).

Three predominant toxicological pathways were identified with IPA. The “NRF2-mediated oxidative stress response” was triggered. Among the proteins involved in the NRF2 response, six and seven proteins were identified at 3.0 and 6.0 µg/cm², respectively. The “xenobiotic metabolism signaling” was also involved, with five and six proteins at 3.0 and 6.0 µg/cm², respectively. These proteins include heat-shock proteins (HSP70 and HSP90), detoxification enzymes such as glutathione reductase (GSR), glutathione S-transferase (GSTP1), lactate dehydrogenase (LDHA), peroxiredoxins (PRDX1, PRDX6), thioredoxin reductase (TRXR1), protein disulfide isomerase (PDIA6), and aldo-keto reductases (AKR1B1, AKR1B10, AKR1C1/C2, and AKR1C3). All proteins were upregulated and detected with high sequence coverage (Additional file 2: Table S2).

Among the non-classically secreted proteins, some, initially involved in glycolysis, were upregulated. The list includes enolase 1 (ENO1), glyceraldehyde-3-phosphate (GAPDH), aldolase A (ALDOA), glucose-6-phosphate isomerase (GPI), phosphoglycerate mutase 1 (PGAM1), phosphoglycerate kinase 1 (PGK1), triosephosphate isomerase 1 (TPI1), and pyruvate kinase (PKM). Interestingly, only four proteins were downregulated compared to controls: thrombospondin-1 (TSP-1; -4.5 and -9.0 at 3.0 and $6.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively), transforming growth factor beta-induced (TGFB1; -4.375 at $6.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), agrin (AGRN; -21.0 at $6.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), and nucleobindin 1 (NUCB1; -4.33 at $6.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Discussion

This work evaluated the mode of action of AEROSIL® 200 fumed amorphous silica NPs in lung epithelial cells using complementary omics. We chose this cellular model because inhalation is the major route of exposure for workers in the NP industry. Any toxicity study with nanoparticles requires a thorough characterization of their size. We showed by atomic force microscopy (Figure 1A) that these NPs were disks with average diameter 10 ± 5 nm and thickness $2 \text{ nm} \pm 0.3$ nm. We also highlighted the presence of heterogeneous agglomerates (Figure 1B) of average size 160 ± 90 nm. Hydrodynamic diameters of fumed silica NPs were measured by DLS in the presence and absence of fetal bovine serum (FBS) in the culture medium. In the presence of FBS, these NPs were dispersed, with a mean size of 10 ± 4 nm in agreement with the data from the literature [19] and consistent with the data provided by the manufacturer i.e. 12 nm. In the absence of FBS, the silica NPs formed agglomerates whose hydrodynamic diameter reached 350 ± 8 nm. Interestingly, AFM identifies the size and shape of objects whereas DLS provides only their size. Cell exposure was carried out in the absence of serum for two reasons: i) the exoproteome can only be assessed if contaminants from the culture medium and reagents are present in low quantities [16], and ii) attempts to avoid agglomeration by artificial dispersion may lead to underestimation of possible adverse effects [20]. Indeed, interactions between serum proteins and nanoparticles can attenuate or abrogate the potentially harmful effects of NPs [21–23].

The concept of NOTEL

Previous studies have shown that the number of modulated genes in human cells may be a good indicator of the level of cellular disturbance induced by a xenobiotic (drugs, chemicals, metals, NP) [11,24–27]. The concept of the NOTEL (no observed transcriptional effect level, the concentration at which no effect on the transcriptome is observed) was described by Lobenhofer et al. [13]. Incorporating a genomic endpoint such as the

NOTEL, estimated from gene expression data, is of the highest importance in risk assessment [14]. We used conventional viability tests, ATP and XTT (Figure 2), and cell impedance monitoring (xCELLigence) (Figure 3) as preliminary tests to determine suitable NP concentrations and time points for subsequent toxicogenomic studies. With these preliminary techniques, we were thus able to frame the concentrations that were necessary and sufficient to trigger early effects on cellular mechanisms [28] while avoiding excessive cellular damage. Five concentrations (0.1 , 1.0 , 1.5 , 3.0 , and $6.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) inducing less than 10% cell death were chosen for transcriptomic experiments. A 24 h exposure was set as the early effect test according to impedance results. The 3.0 and $6.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ doses were also analyzed in gene expression microarrays with an exposure of 72 h (late effects). The secretomes corresponding to cultures exposed to these two concentrations for 24 h were studied by tandem mass spectrometry.

We noted that the NOTEL ($1.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) was lower (i.e. more sensitive) than the NOAEL identified with cytotoxicity assays ($1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), as shown in Figure 4. The LOTEL based on transcriptomics was also lower ($1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) than the LOAEL determined from cell viability ($3.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Thus, in our experiment, microarray technology may be considered to be more sensitive compared to viability tests. The NOTEL may be a relevant indicator of biological exposure to quickly benchmark toxic doses of chemicals and mixtures, especially within the framework of large toxicology programs such as REACH [13,14].

Advantages and pitfalls of omics

The data obtained with our two complementary omics approaches, transcriptomics and exoproteomics, were analyzed using the same bioinformatics tool (IPA), and the biological results were combined resulting in an illustrative example of toxicological integrative analysis. The Venn diagrams showed that more than 80% of genes (Figure 5A) and proteins (Figure 5B) modulated at $3.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ were also listed as modified at $6.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. The two approaches are thus consistent and the results obtained at the two NP doses reinforce the main toxicological findings extracted from the data. The canonical cellular pathways help to understand, in a fast and overall manner, the interactions between the modulated genes and the cellular mechanisms they belong to. The main pathways disturbed by silica NPs are represented in Figure 6. Regulation of gene expression is so finely tuned that two distinct experimental conditions can activate different transcripts (subunits of the same enzymatic complex, early or late molecules and redundant receptors), while belonging to the same pathway governing the same mode of action. Thus, looking at the overall

scheme rather than isolated genes allows for a better understanding of cellular mechanisms involved in the response to a toxic substance. *A fortiori*, analyzing the direction of regulation (induction or repression) of each regulated molecule seems pointless in such large eukaryotic systems, and in the state of our current knowledge. Moreover, the mRNAs are produced in an oscillatory manner (in bursts) according to Raj et al. [29]. Their production is likely to obey finely tuned processes that we do not necessarily know. Nevertheless, analyzing a direction of regulation is certainly more significant with multi-dose and multi-time analyses; potentially conserved regulations could therefore be confirmed. This is why, here, we operated microarrays at several times of exposure and doses of fumed silica NPs.

Regarding the analysis of proteins in the culture supernatants, comprehensive exoproteomics is tedious to perform because of the highly diluted nature of secreted proteins present in biological fluids or culture media [30]. Consequently, we had to concentrate the supernatants by precipitation prior to their analysis with a sensitive tandem mass spectrometer. In addition, one cannot exclude the possibility that some proteins may be released in the supernatant by cell death or lysis during the cell culture. This pitfall was minimized by optimizing experimental parameters (confluence maintained at 80%, intensive washing steps prior to exposure and upstream selection of appropriate NP doses) and using specific bioinformatics tools (SignalP, SecretomeP, Exocarta, Vesiclepedia) to distinguish the proteins that were genuinely excreted from those proteins arising from cell lysis. These secreted proteins illustrate the surroundings of the cells and how they interact with their environment.

Dose-dependent hierarchical response

The hierarchical oxidative stress paradigm, first described by A. Nel and colleagues [28,31], posits that ROS production leads to incremental cellular responses that can be classified as antioxidant defense, proinflammatory effects, and cytotoxicity. According to these authors, in Tier 1, the transcription factor Nrf2 is activated to enhance the expression of phase II enzymes, which attempt to restore redox equilibrium. If the level of oxidant injury increases (Tier 2), cells express proinflammatory cytokines by activating signaling pathways such as the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and nuclear factor-kappa B (NF- κ B) cascades. At the highest level of oxidative stress (Tier 3), interference in mitochondrial inner membrane electron transfer or changing the open/closed status of the permeability transition pore could lead to effects on ATP synthesis and the release of proapoptotic factors.

In this study, we illustrated this paradigm to demonstrate that increasingly severe cellular dysfunctions

were triggered by silica NPs in a dose-dependent manner (Figure 7). Moreover, our data show cellular mechanisms that occur at lower doses than those that activate oxidative stress.

No effect (Level 0)

As depicted in Figure 7, from 0.1 to 1.0 μg fumed silica NPs per cm^2 cell surface, no effect was detected by transcriptomics. The NOTEL point, the highest concentration of NPs giving no transcriptional effect, was set to 1.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, as two successive values gave no effect.

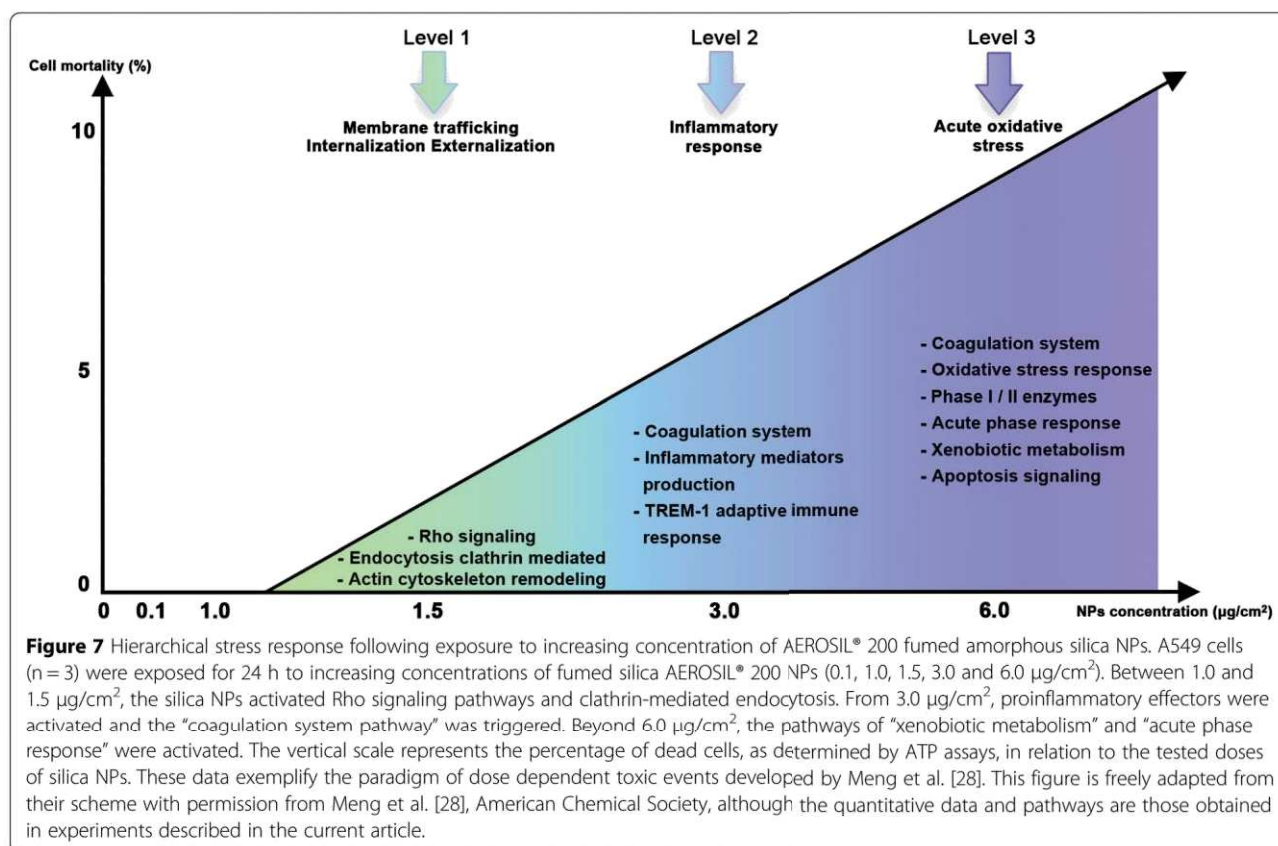
Internalization, externalization (Level 1)

At a very low dose of fumed silica NPs (1.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), we observed an intense signaling activity (Additional file 3: Table S3). Here, we highlighted five induced transcripts belonging to the pathway “clathrin-mediated endocytosis” (ACTA1, EPS15, HIP1, ORM1 and VEGFA). This pathway is the major pathway for the internalization of exogenous molecules from the plasma membrane into intracellular compartments. We also observed the induction of downstream effectors of the “Rho signaling pathway” (ROCK1, ARHGAP24, PPP1R12B and RAP-GEF group). Rho signaling attests to a cytoskeleton reorganization by stimulating actin dynamics. Rho GTPases regulate membrane trafficking and are important regulators of exocytosis through a process not yet elucidated [32,33].

We did not observe, among the 255 genes differentially expressed at this concentration, any element of antioxidant response. Typically, in our first level, we describe some events that are well below the events described by Nel and colleagues in their Tier 1, i.e. oxidative stress [28,31]. A possible reason may be that antioxidant defense has been shown to be triggered by a higher concentration ($>5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) [34], and another explanation is that our technology is extremely sensitive in apprehending very subtle events. In our data, the first level rather reflects the endocytosis and exocytosis of NPs, as attested by the cytoskeleton remodeling and membrane trafficking. This likely corresponds to a normal response of cellular defense.

Inflammation and nonspecific response (Level 2)

Starting from the 3.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ dose, upregulation of inflammatory mediators (IL-6, IL-8 and TNF- α) and chemokines (CCL5 and CCL20) was observed in a dose-dependent manner at 24 h exposure (Additional file 3: Table S3). These results are consistent with those found in the literature for silica and other NPs [4,35,36]. Perkins et al. previously compared crystalline and amorphous silica NPs, but found that only cristobalite upregulated IL6 and IL8 in lung BEAS-2B cells whereas amorphous silica NPs only modulated CCL5 (RANTES) expression [4].



Here, we observed that not only the above interleukins, but also *CCL5* and *CCL20*, were upregulated in the presence of AEROSIL® 200 fumed silica NPs, with a fold change of 4.5 and 10.2 at 3.0 and 6.0 µg/cm², respectively. This discrepancy between our data and previously published data illustrates the possible heterogeneity of the results in the NP literature, probably directly linked to the different nature of the NPs. In particular, fumed AEROSIL® 200 NPs differ from the amorphous silica NPs of the previous study [4], with a surface area 100 times greater. The “TREM1 signaling pathway” was triggered, leading to proinflammatory immune responses. The *TREM1* transcript, which belongs to the immunoglobulin family of cell surface receptors, was upregulated at 6.0 µg/cm².

Coagulation system perturbation as a specific response (Level 2)

At higher concentrations (3.0 and 6.0 µg/cm²), and for two exposure durations (24 and 72 h), the canonical “coagulation pathway” was altered by fumed silica NPs (Figure 6). This pathway, and more specifically the “intrinsic and extrinsic prothrombin activation” subgroups, is the most significant altered pathway. Besides the known functions of the alveolar epithelium, such as surfactant secretion (to maintain alveolar stability), gas exchange, and ion transport, these cells also have barrier

properties that protect against the passage of air pollutants into the circulation [37]. These authors also demonstrated that in A549 cells, the coagulation process responds to injury by the rapid formation of a clot and fibrin deposition [38].

Our data thus suggest that this pathway is a direct consequence of the alteration of the A549 cell monolayer by fumed silica nanoparticles, probably due to cell membrane alteration. Indeed, as demonstrated by Zhang and colleagues, fumed silica NPs (AEROSIL, diameter 16 nm) induce a dramatically higher cytotoxicity than colloidal silica in lung cells BEAS-2B [27]. The authors explained the increased toxicity of fumed silica by its thermally promoted surface properties, i.e. the formation of strained, three-membered siloxane rings on the silica surface via dehydroxylation. These rings are rapidly hydrolyzed upon rehydration in culture medium, exposing hydroxyl groups responsible for cell toxicity by interaction with cell membranes. In our proteomic data, the cell membrane alteration is confirmed by the release of the LDH protein, which is an indicator of cell membrane integrity.

Coagulation is a complex process that can be initiated via the extrinsic or intrinsic pathways. In the extrinsic pathway, a cascade of activation including factor VIIa (F7) and tissue factor (TF) leads to the generation of

thrombin (*F2*) and the production of fibrin (*FG*), which creates a clot. In the intrinsic pathway, a cascade of activations leads to the production of coagulation factors such as FXa (*F10*). The coagulation system includes a number of control proteins to maintain a fine balance between formation and dissolution of the clot. Plasmin is one of these proteins that are required for dissolution of the fibrin clot. Plasmin is activated by tissue plasminogen activator (*PLAT*) and urokinase (*PLAU*). Protein C, protein S, and thrombomodulin together degrade FVa and FVIIIa.

The modifications of expression of the key actors in the coagulation process are given in Additional file 3: Table S3. *F2* (thrombin), *F7*, *F10* and *F13b* are downregulated, as are *FGA*, *FGB* and *FGG* (fibrinogen chains), and *KLK1* (kallikrein 1). *THBD* (thrombomodulin) is upregulated, likely reducing coagulation and activating the anticoagulant pathway. *PROC*, *PROS1*, and *TFPI* (lipoprotein-associated coagulation inhibitor) are also differentially expressed in our datasets. In addition, *PLAT* (tissue plasminogen activator), *PLAU* (urokinase), and *PLAUR* are upregulated. These participate in the conversion of plasminogen to plasmin, thus activating fibrinolysis to dissolve fibrin clots.

Although the interpretation of the direction of the regulation (up or down) of each individual molecular component of a pathway is far from being straightforward in such a complex system, it is interesting to note that key molecules of the coagulation system have a conserved modulation with both dose and time of exposure. The modifications in expression of the main transcripts of the coagulation system were confirmed by qRT-PCR (Figure 8).

Hence it is difficult to determine if these genes activate wound healing by fibrinogenesis or if, on the contrary, they destroy fibrin clots by fibrinolysis. It is likely that both mechanisms are at work, as the coagulation system responds to injury through a cascade of events leading to the formation of a clot that is eventually degraded and resorbed through the process of fibrinolysis. It is possible that, at 24 h and 72 h after exposure, only the final stage of the process is detectable. Proteomics revealed the inhibition of thrombospondin (TSP-1) which participates in the plasminogen activation and fibrinolysis [39].

According to Napierska et al., inhaled particles are involved in a procoagulant response in lung models [40]. Available data from experimental instillation/inhalation of engineered nanoparticles are supportive of the hypothesis that a pulmonary and/or systemic inflammatory response induces a procoagulatory state [41,42]. Therefore, in coherence with the literature, our data support an effect of these silica nanoparticles on the coagulation system, and argue for the involvement of this specific mechanism starting at level 2.

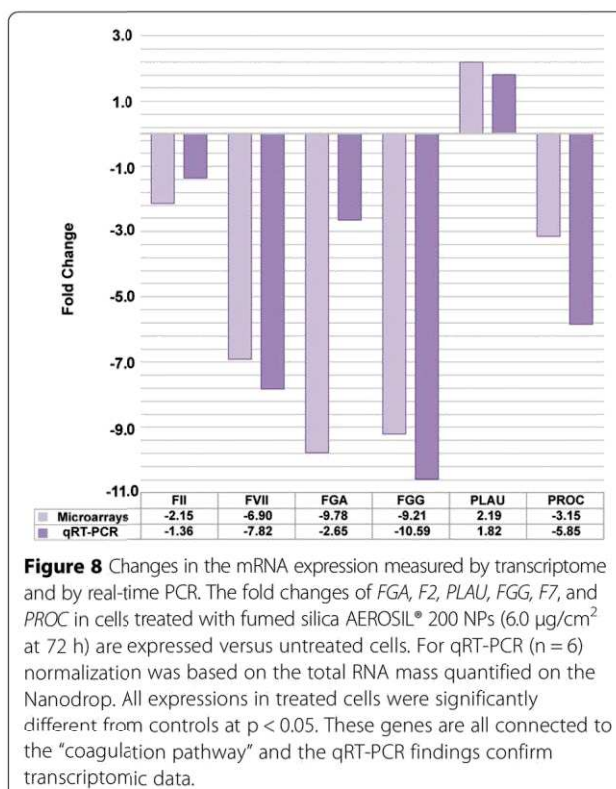


Figure 8 Changes in the mRNA expression measured by transcriptome and by real-time PCR. The fold changes of *FGA*, *F2*, *PLAU*, *FGG*, *F7*, and *PROC* in cells treated with fumed silica AEROSIL® 200 NPs (6.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ at 72 h) are expressed versus untreated cells. For qRT-PCR (n = 6) normalization was based on the total RNA mass quantified on the Nanodrop. All expressions in treated cells were significantly different from controls at $p < 0.05$. These genes are all connected to the “coagulation pathway” and the qRT-PCR findings confirm transcriptomic data.

Toxic oxidative stress (Level 3)

At the 6.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ dose, we observed by transcriptomics the first signs of oxidative stress (Additional file 3: Table S3), caused by an imbalance between the production of reactive oxygen and the detoxification of reactive intermediates, especially the NRF2 signaling cascade, antioxidant molecules (*SOD*, *GPX2*), and phase I and phase II enzymes (*GST*, *EPHX1*, *GCLC* and *AOX1*). Proteomics clearly indicated the presence of the “NRF2-mediated oxidative stress response”, with the induction of the enzymes, PRDX1 (R = 6.4) and TXNRD1 (R = 13).

Our transcriptomics results highlighted the “acute phase response signaling” pathway, a nonspecific defense mechanism. This pathway is triggered by tissue injury and characterized by the upregulation of proinflammatory cytokines and acute phase proteins such as *NFKB2*, *IL6*, and *SOD2* at 3.0 and 6.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. “Xenobiotic metabolism signaling” is also activated, with several transcripts encoding enzymes such as *ALDHA*, *MAP2K3*, and *TNF* at 6.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Proteomics confirmed this trend with the overexpression of aldehyde dehydrogenase *ALDHA* (FC = 20.4 and 21.5), glutathione transferase *GSTP1* (FC = 11.0 and 11.3), and heat-shock protein *HSP90A* (FC = 14.2 and 19.4), at 3.0 and 6.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively.

Toxicogenomics and risk assessment

The hierarchical response of alveolar epithelial lung cells (Figure 7) illustrates quantitatively the perspectives

developed by A. Nel and colleagues [28,31,43] regarding the safety assessment of nanomaterials.

The genome-wide response to nanomaterial exposure remains largely unexplored and the use of omics technologies in the safety assessment of nanomaterials would be interesting for predictive toxicology [25]. We have demonstrated that toxicogenomics can provide a quantitative assessment of toxicity and, at the same time, gives information about the mode of action of toxicants, possibly revealing adverse outcome pathways (AOPs). In their vision and strategy for toxicity testing in the 21st century, the National Research Council cited the linkage of adverse effects to specific toxicity pathways and “Applications of Toxicogenomic Technologies to Predictive Toxicology and Risk Assessment”. Recently, EFSA delivered a scientific report recommending for future work and research the use of omics technologies and AOPs in the context of the prioritization of chemicals for risk assessment [44].

In our study, the use of these two techniques allowed us to establish a precise dose–response curve of fumed silica NPs, with a NOTEL, and to link these doses to specific pathways, allowing insights into mechanistic information for both intracellular and extracellular compartments.

Conclusions

Transcriptomic and proteomic approaches were combined in the current study to investigate quantitatively the effects of AEROSIL® 200 fumed silica NPs in A549 epithelial lung cells, and within their close environment to decipher their mode of action. Such an alliance of omics has rarely been reported regarding the toxicological effects of NPs. Our main findings allowed the setting of a NOTEL (no observed transcriptional effect level) for fumed silica NPs at 1.0 µg/cm², a threshold lower than values previously obtained with conventional viability tests. Moreover, the NOTEL may be a relevant indicator of biological exposure for use in quickly benchmarking doses of chemicals and mixtures in toxicology.

These techniques allowed us to establish a hierarchical dose–response curve of fumed silica NPs, linking doses to adverse outcome pathways, and delivering not only quantified cytotoxic values but also mechanistic information for both the intracellular and extracellular compartments. Monitoring the overall effects rather than those of isolated genes/proteins thus allows for a better understanding of the cellular mechanisms involved in the response to a toxic substance, without losing the possibility to analyze very specific molecular effects. As in photography, toxicogenomics allows, at the same time, the acquisition of a wide vision of biological responses and a “zoom” into the details with a great depth of field. Indeed the hypotheses generated by these results

regarding a specific adverse effect can be studied further with more focused techniques. This approach might be adapted to any type of potentially toxic substance, alone or in a mixture, in cellular models as a predictive tool for toxicity assessment in a future regulatory perspective.

Methods

Nanoparticle characterization

AEROSIL® 200 particles (hydrophilic fumed silica, from Evonik, Germany) are extrapure (SiO₂ > 99.8%), nano-sized (12 nm diameter), and have a high specific surface area of 200 m²/g, according to the supplier. These nanoparticles were used “as received”. The aggregation states of the nanoparticles were analyzed by dynamic light scattering (n = 3) in the culture medium, with/without serum, using the Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, UK). Atomic force microscopy imaging was performed with a Multimode and Nanoscope V instrument (Veeco, Santa Barbara, CA, USA) mounted with an EV Scanner and silicon tips (K = 0.58 N/nm, Bruker). Sample preparation consisted of the deposition of 5 µl SiO₂ NP suspension (at 10 µg/ml in pure water) on freshly cleaved Mica (Muscovite from SPI, France). After 1 min., the sample was dried under vacuum. Amplitude and height images were recorded in peak force mode. The resulting pictures were plane-fitted and flattened with the supplied Nanoscope Analysis software (Bruker) V 1.40.

Cell culture

The A549 human alveolar epithelial cell line (CCL –185™) was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Cells were cultured in DMEM/F12 medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL, 100 µg/mL) and incubated in a humidified incubator at 37°C and 5% CO₂. Cells were used between passages 20 to 40. Cells were passed twice a week and the medium was changed three times per week, keeping confluence below 80%.

Cell viability tests

ATP tests. A549 cells were grown in 96-well plates. The cells were exposed for 24 h at serial dilutions of SiO₂ NPs in serum-free medium (from 0.3 µg/cm² to 30.3 µg/cm² of cell surface). Cells were washed with PBS and cell viability was determined by the ATP test (Cell Titer-Glo luminescent cell viability Assay), as specified by the supplier (Promega). Briefly, 100 µl kit reagent were added per well and the plate was shaken for 10 min. at RT before measuring bioluminescence with a LUMIstar Galaxy instrument (BMG).

XTT tests. A549 cells were grown in 96-well plates. The cells were exposed for 24 h at serial dilutions of SiO₂ NPs in serum-free medium. Cells were washed with

PBS and cell viability was determined by the XTT test (Sigma-TOX2, *In Vitro* Toxicology Assay Kit, XTT based), as recommended by the supplier (Sigma-Aldrich). Briefly, 20 μ l kit reagent were added per well and the plate was incubated for 2 h at 37°C before reading the absorbance at 450 nm and 690 nm with a Multiscan Spectrum spectrophotometer (Thermo Electron Corporation).

Real-time impedance measurement (Xcelligence)

A background resistance of the E-plates (ACEA) was determined with 100 μ l culture medium. A549 cells were seeded in E-plates at 10,000 cells in 100 μ L. E-plates were placed into the Real-Time Cell Analyzer (RTCA) station (ACEA) and incubated at 37°C. Cells were grown for 24 h, with impedance measured every minute during 14 h (adhesion phase), then every 15 min. (growth phase) for 14 h. After 28 h, cells were exposed ($n = 3$) to SiO₂ NPs at 1.5, 3.0, 6.0, 25, and 50 μ g/cm², and were monitored every minute during 12 h (early effects) then every 15 min. for 100 h (late effects). The impedance of control cells without SiO₂ NPs was also recorded. Cell index (CI) raw data values were calculated by the apparatus software (RTCA software 2.0). Normalized cell indexes were also calculated by the software at a selected normalization time point, which was chosen as the time just before the addition of nanoparticles.

Microarrays (Agilent Human V2 4x44K)

A549 cultures (biological triplicate) were exposed to five concentrations of SiO₂ NPs (0.1, 1.0, 1.5, 3.0, and 6.0 μ g/cm²) and serum-free medium (control cells) for 24 h, and exposed to two concentrations of SiO₂ NPs (3.0 and 6.0 μ g/cm²) for 72 h. Total RNAs were extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). RNAs were quantified with the NanoDrop 1000 spectrophotometer and their qualities were assessed with the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent). RNA samples were amplified and labeled with cyanine-3 fluorophore using a Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent). Hybridization ($n = 3$) was performed with Human V2 4x44K oligo microarrays (Agilent). Fluorescence was scanned (Agilent Scanner) and signal data were extracted with Feature Extraction software (Agilent).

Statistical analysis for transcriptomics

Five independent analyses were conducted, namely SiO₂ NP-exposed cells versus control cells at five different concentrations: 0.1, 1.0, 1.5, 3.0, and 6.0 μ g/cm². For each analysis, six fluorescence data files (three for exposed cells and three for control cells) were submitted to GeneSpring GX 11 software (Agilent Technologies) using a widespread method for determining the significance change of gene expression [45,46]. The fold change cutoff between control and exposed samples was

set to 1.5. Genes significantly up- or downregulated were determined by an unpaired t-test with a p-value below 0.05 and a Benjamini-Hochberg false discovery rate correction. We thus obtained lists of genes that were significantly induced or repressed after exposure to NPs.

qRT-PCR validation of microarray data focused on coagulation

Validation of whole-genome expression microarray was performed by qRT-PCR on a representative list of significant genes. Total RNA was isolated according to the manufacturer's instructions using the RNeasy kit (Qiagen) and treated with DNase. RNA purity and concentration were determined by UV on a Nanodrop® Spectrophotometer and integrity was assessed on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Differential analysis of transcripts from cells exposed to 6.0 μ g/cm² SiO₂ NPs for 72 h versus unexposed cells was performed by qRT-PCR on Opticon II (Biorad) with the Sybr Green PCR Master Mix (Finnzyme) kit according to the manufacturer's instructions. Measurements were means of sextuplets (duplicates of three independent experiments). Primer sequences are listed in the Additional file 4: Table S4.

Sample preparation for shotgun proteomics and tandem mass spectrometry

Culture supernatants of control cells and those exposed to fumed silica NPs during 24 h were collected and pooled ($v = 2.5$ mL per condition, biological triplicates). Proteins from each sample were precipitated with 10% trichloroacetic acid after the addition of a one-quarter volume of trichloroacetic acid at 50% (w/vol). The solutions were vortexed and then incubated on ice for 10 min. The samples were centrifuged at 16,000 g for 10 min. at 4°C. The resulting pellet was dissolved in 45 μ l 1X LDS (Invitrogen). These samples were heated at 99°C for 5 min. and then loaded onto a 10% NuPAGE gel (Invitrogen) for a short electrophoresis in MOPS buffer. The polyacrylamide bands containing the whole exoproteomes were processed as previously described [47]. The resulting peptides (10 μ l of the 40 μ l generated with the procedure) were analyzed with an LTQ-Orbitrap XL hybrid mass spectrometer (ThermoFisher) coupled to an UltiMate 3000 Nano LC System (Dionex-LC Packings), as described previously [48].

Protein identification and quantification by shotgun proteomics

The MS/MS spectra were searched against the SwissProt database (release SwissProt_2013_01.fasta) totaling 65,754 protein sequences from mammals. Searches for tryptic peptides were performed with the following parameters: full-trypsin specificity, a mass tolerance of 5 ppm on the parent ion and 0.5 Da on the MS/MS, carbamidomethyl

Cys as static modification and oxidized Met as dynamic modification, and maximum number of missed cleavages set at 2. All peptide matches with a peptide score below a p-value of 0.05 were filtered. A protein was considered to be validated when at least two different peptides were detected in the same experiment. The false-positive rate for protein identification was estimated using the appropriate decoy database as below 1%. The number of MS/MS spectra per protein (spectral counts) was determined for each sample. Spectral counts were then compared using the TFold method of the PatternLab software [49]. Fold change and p-value cutoffs were set at 2.0 and 0.05, respectively.

Integrative biological analysis

Cellular function and localization of identified genes and proteins were obtained with the Ingenuity Pathway Analysis software (Ingenuity Systems, US).

Lists of genes or proteins significantly induced or repressed after exposure to NPs were uploaded into Ingenuity Pathway Analysis software for biological analysis by comparison with the Ingenuity Knowledge Database. These lists of altered genes or proteins were then processed to investigate their functional distribution, as defined by Gene Ontology. Datasets were analyzed with several tools such as SecretomeP, SignalP, Exocarta and Vesiclepedia. Known canonical pathway associations were measured by IPA by using a ratio of the number of genes or proteins from datasets that map to the pathway divided by the total number of constitutive genes or proteins that map to the canonical pathway. A Fisher's exact test was used to determine a p-value representing the significance of these associations.

Availability of supporting data section

The data sets supporting the results of this article are available as Additional files. The raw data discussed in this publication have been deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) repository and are accessible through GEO Series accession number (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE63806>).

Additional files

Additional file 1: Table S1. List of genes significantly differentially expressed upon exposure to AEROSIL® 200 fumed amorphous silica NPs versus control cells. Three different A549 cultures were exposed to five concentrations of SiO₂ NPs (0.1, 1.0, 1.5, 3.0, and 6.0 µg/cm²) and serum-free medium (control cells) for 24 h, and to two concentrations (3.0 and 6.0 µg/cm²) for 72 h. Hybridization (n = 3) was performed with Human V2 4x44K oligo microarrays (Agilent). The fold change cutoff between control and exposed samples was set to 1.5. Genes significantly up- or downregulated were determined by an unpaired t-test with a p-value below 0.05 and a Benjamini-Hochberg false discovery rate (n = 3).

Additional file 2: Table S2. List of proteins identified in the exoproteome by nanoLC-MS/MS. Spectral counts per protein measured

for each of the nine samples; control (Ctrl), first concentration (C1), and second concentration (C2), with three replicates, are indicated, as well as the PatternLab statistical results (fold change, p-value, signal +, signal -, class) for the three possible comparisons (C1 versus Ctrl; C2 versus Ctrl; C2 versus C1). The patternLab classes are: blue (identifications that satisfied both the fold and statistical criteria), orange (identifications that did not meet the fold criterion but have low p-values), green (identifications that satisfied the fold criteria but this was most likely to have happened by chance), and red (identifications that did not meet the fold and p-value criteria).

Additional file 3: Table S3. List of genes and proteins supporting the hierarchical stress response. A549 cells were exposed to 1.5, 3.0, and 6.0 µg/cm² silica NPs for 24 h. Fold changes of genes and proteins significantly up- or downregulated were determined by an unpaired t-test (p < 0.05) and a false discovery rate correction. Gene symbols are indicated in italics, protein symbols are not italicized. * Transcripts whose expression is identical in control cells and in NPs-exposed cells.

Additional file 4: Table S4. List of primers used in qRT-PCR. Differential analysis of transcripts from cells exposed to 6.0 µg/cm² SiO₂ NPs for 72 h versus unexposed cells was performed by qRT-PCR with the Sybr Green PCR Master Mix (Finnzyme) kit according to the manufacturer's instructions on Opticon II (Biorad). This pool of genes represents the "coagulation system" pathway.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

CP carried out the cell culture, viability studies, size determination, microarray experiments, analyzed the data, and drafted the manuscript. JCG performed the mass spectrometry experiments. VN carried out the qRT-PCR experiments. MO performed the AFM characterization. JA participated in the exoproteomics study and contributed to the manuscript writing. OP conceived the study and its design, coordinated the experiments, analyzed the data, and wrote the final manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank Jérôme Rose from CEREGE (Centre de Recherche et d'Enseignement de Géosciences de l'Environnement) F-13545 Aix-en-Provence, France, for the gift of fumed silica AEROSIL® 200 NPs. This work was partially supported by the French ANR agency (Grant ANR-13-NANO-0007-03) and by the French Alternative Energies and Atomic Energy Commission.

Received: 15 December 2014 Accepted: 10 April 2015

Published online: 18 April 2015

References

1. Napierska D, Thomassen LC, Lison D, Martens JA, Hoet PI. The nanosilica hazard: another variable entity. Part. 2010;7(1):39.
2. Colvin VL. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. Nat Biotechnol. 2003;21(10):1166–70.
3. Mohamed BM, Verma NK, Prina-Mello A, Williams Y, Davies AM, Bakos G, et al. Activation of stress-related signalling pathway in human cells upon SiO₂ nanoparticles exposure as an early indicator of cytotoxicity. J Nanobiotechnology. 2011;9:29.
4. Perkins TN, Shukla A, Peeters PM, Steinbacher JL, Landry CC, Lathrop SA, et al. Differences in gene expression and cytokine production by crystalline vs. amorphous silica in human lung epithelial cells. Part Fibre Toxicol. 2012;9(1):6.
5. Reuzel PG, Bruijntjes JP, Feron VJ, Woutersen RA. Subchronic inhalation toxicity of amorphous silicas and quartz dust in rats. Food Chem Toxicol. 1991;29(5):341–54.
6. Xu Z, Wang SL, Gao HW. Effects of nano-sized silicon dioxide on the structures and activities of three functional proteins. J Hazard Mater. 2010;180(1–3):375–83.
7. Rabolli V, Thomassen LC, Princen C, Napierska D, Gonzalez L, Kirsch-Volders M, et al. Influence of size, surface area and microporosity on the in vitro cytotoxic activity of amorphous silica nanoparticles in different cell types. Nanotoxicology. 2010;4(3):307–18.

8. Jennings P, Limonciel A, Felice L, Leonard MO. An overview of transcriptional regulation in response to toxicological insult. *Arch Toxicol*. 2013;87(1):49–72.
9. Hartung T, McBride M. Food for Thought ... on mapping the human toxome. *ALTEX*. 2011;28(2):83–93. 1868-596X (Print).
10. Hartung T. Toxicology for the twenty-first century. *Nature*. 2009;460(7252):208–12.
11. Fischella M, Berenguer F, Steinmetz G, Auffan M, Rose J, Prat O. Toxicity evaluation of manufactured CeO₂ nanoparticles before and after alteration: combined physicochemical and whole-genome expression analysis in Caco-2 cells. *BMC Genomics*. 2014;15:700.
12. Ankley GT, Daston GP, Degitz SJ, Denslow ND, Hoke RA, Kennedy SW, et al. Toxicogenomics in regulatory ecotoxicology. *Environ Sci Technol*. 2006;40(13):4055–65.
13. Lobenhofer EK, Cui X, Bennett L, Cable PL, Merrick BA, Churchill GA, et al. Exploration of low-dose estrogen effects: identification of No Observed Transcriptional Effect Level (NOTEL). *Toxicol Pathol*. 2004;32(4):482–92.
14. Zarbl H, Gallo MA, Glick J, Yeung KY, Vouras P. The vanishing zero revisited: thresholds in the age of genomics. *Chem Biol Interact*. 2010;184(1–2):273–8.
15. Yu LR. Pharmacoproteomics and toxicoproteomics: the field of dreams. *J Proteomics*. 2011;74(12):2549–53.
16. Armengaud J, Christie-Oleza JA, Clair G, Malard V, Duport C. Exoproteomics: exploring the world around biological systems. *Expert Rev Proteomics*. 2012;9(5):561–75.
17. Fischella M, Dabboue H, Bhattacharyya S, Saboungi ML, Salvétat JP, Hevor T, et al. Mesoporous silica nanoparticles enhance MTT formazan exocytosis in HeLa cells and astrocytes. *Toxicol In Vitro*. 2009;23(4):697–703.
18. Worle-Knirsch JM, Pulskamp K, Krug HF. Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Lett*. 2006;6(6):1261–8.
19. Emmanuelawati I, Yang J, Zhang J, Zhang H, Zhou L, Yu C. Low-cost and large-scale synthesis of functional porous materials for phosphate removal with high performance. *Nanoscale*. 2013;5(13):6173–80.
20. Gualtieri M, Skuland T, Iversen TG, Lag M, Schwarze P, Bilanovic D, et al. Importance of agglomeration state and exposure conditions for uptake and pro-inflammatory responses to amorphous silica nanoparticles in bronchial epithelial cells. *Nanotoxicology*. 2012;6(7):700–12.
21. Lordan S, Higginbotham CL. Effect of serum concentration on the cytotoxicity of clay particles. *Cell Biol Int*. 2012;36(1):57–61.
22. Panas A, Marquardt C, Nalcaci O, Bockhorn H, Baumann W, Paur HR, et al. Screening of different metal oxide nanoparticles reveals selective toxicity and inflammatory potential of silica nanoparticles in lung epithelial cells and macrophages. *Nanotoxicology*. 2013;7(3):259–73.
23. Zhu Y, Li W, Li Q, Li Y, Li Y, Zhang X, et al. Effects of serum proteins on intracellular uptake and cytotoxicity of carbon nanoparticles. *Carbon*. 2009;47(5):1351.
24. Lee TL, Raitano JM, Rennert OM, Chan SW, Chan WY. Accessing the genomic effects of naked nanoceria in murine neuronal cells. *Nanomedicine*. 2012;8(5):599–608.
25. Lee T-L, Chan W-Y, Rennert OM. Assessing the Safety of Nanomaterials by Genomic Approach Could Be Another Alternative. *ACS Nano*. 2009;3(12):3830.
26. Prat O, Ansoborlo E, Sage N, Cavadore D, Lecoix J, Kurtzio P, et al. From cell to man: evaluation of osteopontin as a possible biomarker of uranium exposure. *Environ Int*. 2011;37(4):657–62.
27. Zhang H, Dunphy DR, Jiang X, Meng H, Sun B, Tam D, et al. Processing pathway dependence of amorphous silica nanoparticle toxicity: colloidal vs pyrolytic. *J Am Chem Soc*. 2012;134(38):15790–804.
28. Meng H, Xia T, George S, Nel AE. A predictive toxicological paradigm for the safety assessment of nanomaterials. *ACS Nano*. 2009;3(7):1620–7.
29. Raj A, Peskin CS, Tranchina D, Vargas DY, Tyagi S. Stochastic mRNA synthesis in mammalian cells. *PLoS Biol*. 2006;4(10):e309.
30. Malard V, Chardon L, Roussi S, Darolles C, Sage N, Gaillard JC, et al. Analytical constraints for the analysis of human cell line secretomes by shotgun proteomics. *J Proteomics*. 2012;75(3):1043–54.
31. Xiao GG, Wang M, Li N, Loo JA, Nel AE. Use of proteomics to demonstrate a hierarchical oxidative stress response to diesel exhaust particle chemicals in a macrophage cell line. *J Biol Chem*. 2003;278(50):50781–90.
32. Ridley AJ. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol*. 2006;16(10):522–9.
33. Ory S, Gasman S. Rho GTPases and exocytosis: what are the molecular links? *Semin Cell Dev Biol*. 2011;22(1):27–32.
34. Hussain S, Boland S, Baeza-Squiban A, Hamel R, Thomassen LC, Martens JA, et al. Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: role of particle surface area and internalized amount. *Toxicology*. 2009;260(1–3):142–9.
35. Cho WS, Choi M, Han BS, Cho M, Oh J, Park K, et al. Inflammatory mediators induced by intratracheal instillation of ultrafine amorphous silica particles. *Toxicol Lett*. 2007;175(1–3):24–33.
36. Veranth JM, Kaser EG, Veranth MM, Koch M, Yost GS. Cytokine responses of human lung cells (BEAS-2B) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared to soil dusts. *Part Fibre Toxicol*. 2007;4:2.
37. Wang L, Bastarache JA, Wickersham N, Fang X, Matthay MA, Ware LB. Novel role of the human alveolar epithelium in regulating intra-alveolar coagulation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;36(4):497–503.
38. Bastarache JA, Wang L, Geiser T, Wang Z, Albertine KH, Matthay MA, et al. The alveolar epithelium can initiate the extrinsic coagulation cascade through expression of tissue factor. *Thorax*. 2007;62(7):608–16.
39. Venkatraman L, Chia SM, Narmada BC, White JK, Bhowmick SS, Forbes Dewey Jr C, et al. Plasmin triggers a switch-like decrease in thrombospondin-dependent activation of TGF-beta1. *Biophys J*. 2012;103(5):1060–8.
40. Napierska D, Thomassen LC, Vanaudenaerde B, Luyts K, Lison D, Martens JA, et al. Cytokine production by co-cultures exposed to monodisperse amorphous silica nanoparticles: the role of size and surface area. *Toxicol Lett*. 2012;211(2):98–104.
41. Nemmar A, Hoylaerts MF, Hoet PH, Nemery B. Possible mechanisms of the cardiovascular effects of inhaled particles: systemic translocation and prothrombotic effects. *Toxicol Lett*. 2004;149(1–3):243–53.
42. Nemmar A, Hoylaerts MF, Hoet PH, Vermeylen J, Nemery B. Size effect of intratracheally instilled particles on pulmonary inflammation and vascular thrombosis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003;186(1):38–45.
43. Nel A, Xia T, Meng H, Wang X, Lin S, Ji Z, et al. Nanomaterial toxicity testing in the 21st century: use of a predictive toxicological approach and high-throughput screening. *Acc Chem Res*. 2013;46(3):607–21.
44. EFSA. Modern methodologies and tools for human hazard assessment of chemicals. *EFSA Journal*. 2014;12(4):3638. 43638:87.
45. Fischella M, Berenguer F, Steinmetz G, Auffan M, Rose J, Prat O. Intestinal toxicity evaluation of TiO₂ degraded surface-treated nanoparticles: a combined physico-chemical and toxicogenomics approach in caco-2 cells. *Part Fibre Toxicol*. 2012;9(1):18.
46. Wright WR, Parzych K, Crawford D, Mein C, Mitchell JA, Paul-Clark MJ. Inflammatory transcriptome profiling of human monocytes exposed acutely to cigarette smoke. *PLoS One*. 2012;7(2):e30120.
47. Clair G, Armengaud J, Duport C. Restricting fermentative potential by proteome remodeling: an adaptive strategy evidenced in *Bacillus cereus*. *Mol Cell Proteomics*. 2012;11(6):9.
48. Zivanovic Y, Armengaud J, Lagorce A, Leplat C, Guerin P, Dutertre M, et al. Genome analysis and genome-wide proteomics of *Thermococcus gammatolerans*, the most radioresistant organism known amongst the Archaea. *Genome Biol*. 2009;10(6):R70.
49. Carvalho PC, Fischer JS, Xu T, Yates 3rd JR, Barbosa VC. PatternLab: from mass spectra to label-free differential shotgun proteomics. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2012;Chapter 13:Unit13 19.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



CHAPITRE II

***Synthèse des M-MSNs, décorations PEG et
DMPC, et évaluation toxicologique sur
modèles hépatiques***

Article n°2

Synthèse, décoration, et effets cellulaires de nanoparticules de silice mésoporeuse

Article n°2 : Synthèse, décoration, et effets cellulaires de nanoparticules de silice mésoporeuse

Ce deuxième article marque le démarrage de l'étude des NPs à visée médicale synthétisées spécifiquement pour le projet ANR BioSiPharm. Ce sont des NPs magnétiques de silice mésoporeuse (M-MSNs) de type cœur-coquille destinées en particulier à des applications théranostiques. Dans ce travail, les M-MSNs ont été synthétisées selon une procédure optimisée pour obtenir des NPs monodisperses, d'une taille de 100nm, mésoporeuses, et avec un cœur unique au centre de la coquille de silice. Ces NPs synthétisées étant potentiellement des vecteurs de principes actifs, elles doivent donc répondre à des critères de qualité élevés qui ont été définis en début de projet.

L'optimisation du protocole était donc un axe majeur. En effet, au sein des premiers lots de NPs synthétisées, nous avons observé des NPs de silice mésoporeuse sans cœur de fer, à hauteur de 30%. Ces NPs résiduelles dépourvues de cœur, comme celles visualisées dans la figure 39A, pourraient fausser les études de toxicité des M-MSNs.

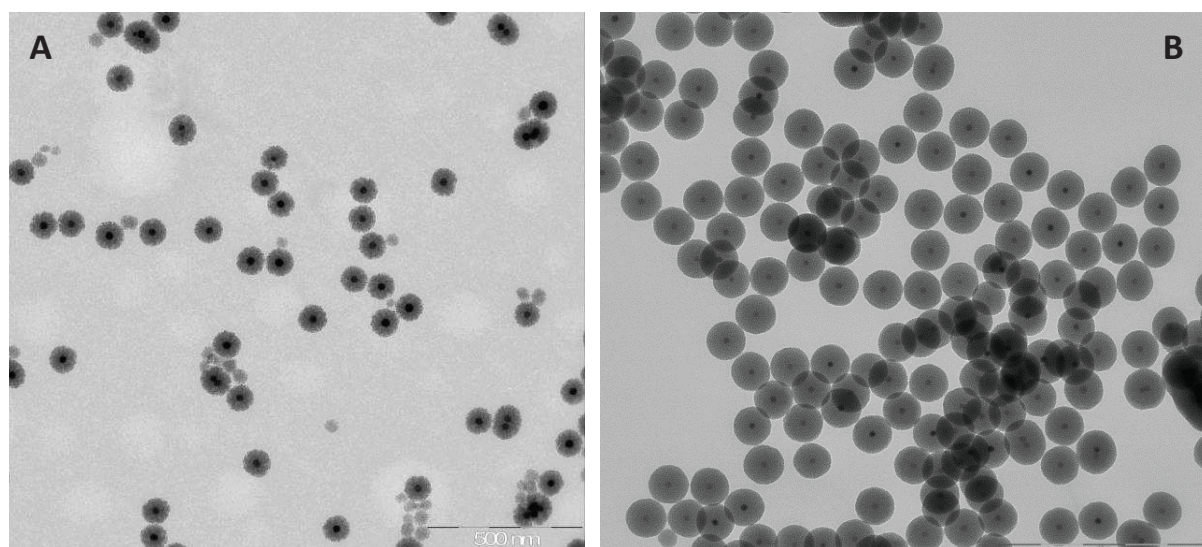


Figure 39. Microscopie électronique à transmission (TEM) de M-MSNs. A) Lot de M-MSNs comprenant des NPs avec un cœur de fer, plusieurs cœurs de fer, et des petites NPs de silice sans cœur de fer à hauteur de 30% (Analyse par Image J). B) Lot de M-MSNs après optimisation de la synthèse à cœur unique.

Ainsi brièvement, les étapes de synthèse qui ont été optimisées sont : La dispersion des nanocristaux Fe_3O_4 magnétiques (Magnetic Iron Oxide NPs, MIONs) dans du chloroforme puis l'injection des nanocristaux dispersés en plusieurs étapes dans du CTAB, afin que chaque micelle de CTAB ne contienne qu'un cœur, ce qui réduit la formation de M-MSNs sans cœur (et multi-cœurs) de Fe_3O_4 . La purification et les lavages des M-MSNs sont également importants afin d'éliminer totalement le CTAB. Cette optimisation a permis de produire des lots de M-MSNs avec moins de 5% de NPs sans cœur ou multi-cœurs. Ces optimisations de synthèse ont grandement joué sur la viabilité des cellules HepG2 (Figure 40). Ces effets négatifs sur la viabilité étant potentiellement multi-facteurs (population de NPs de tailles hétérogènes, présence résiduelle d'éléments de synthèse comme le CTAB, *etc.*).

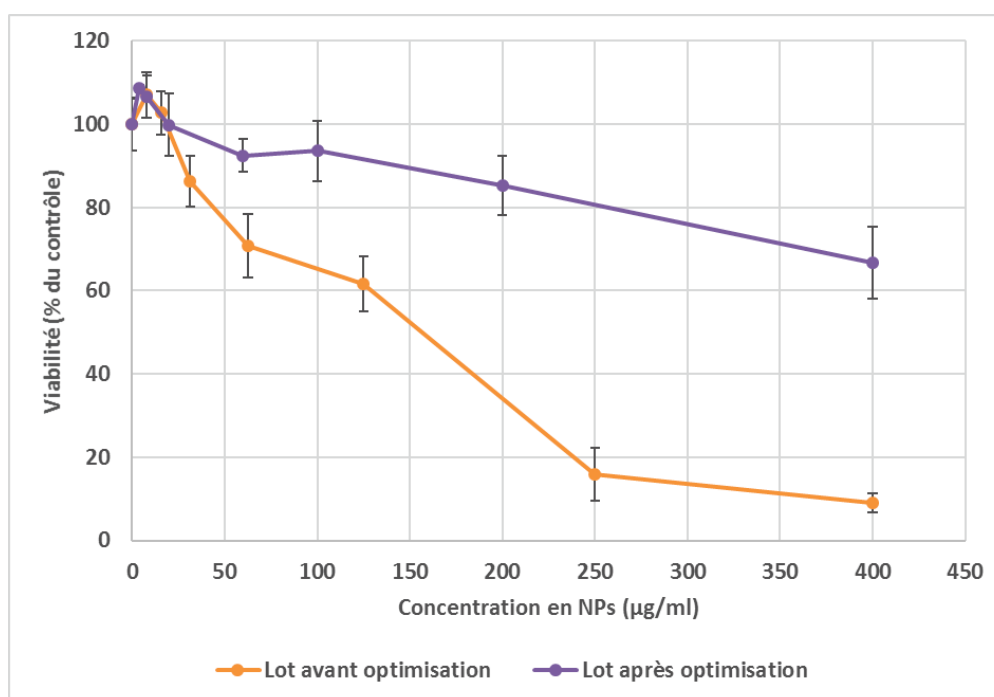


Figure 40. Viabilité des cellules HepG2 après exposition à des lots de M-MSNs natives pendant 24h, avant et après optimisation du protocole de synthèse.

Ces M-MSNs ont ensuite été recouvertes soit d'une bicouche lipidique de DMPC (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), soit de chaînes de PEG. Ainsi, la bicouche de DMPC est formée par contact entre des petites vésicules de DMPC (Small unilamellar vesicles, SUVs) et les M-MSNs. Les chaînes de PEG, quant à elles, sont fixées à la surface

pendant la synthèse des M-MSNs par ajout de PEG 2000 qui se lie de manière covalente aux groupements silanols.

La caractérisation physico-chimique de l'ensemble des différentes particules a été réalisée. Les nanocristaux de Fe_3O_4 ont une taille de 18 ± 3 nm, et confère aux NPs des propriétés superparamagnétiques. Avec la coquille de silice, les M-MSNs ainsi formées ont un diamètre hydrodynamique (DH) de 125.5 ± 1.6 nm et un potentiel zeta (PZ) de -32.9 ± 1.3 mV, gage de leur stabilité. Ces M-MSNs ont une surface spécifique considérable de 675 ± 7 m²/g, due notamment à une porosité importante (pores de 2.8 ± 0.2 nm). Les M-MSNs PEGylées ont une taille sensiblement identique aux natives. La PEGylation induit une légère augmentation du DH (141.7 ± 13.0 nm) en DLS et du PZ mesuré à -26.3 mV. L'analyse thermogravimétrique (TGA) a permis d'identifier une couverture de PEG de $10 \pm 2\%$. D'après Gref *et al.*, un pourcentage de PEG autour de 5% provoque une réduction de l'adsorption des protéines de 70% (Gref *et al.*, 2000). Enfin, les M-MSNs recouvertes d'une bicouche de DMPC ont un DH (179.4 ± 2.4 nm) et un PZ plus élevé (-10.8 ± 0.3 mV). La microscopie électronique à balayage par transmission (STEM) a confirmé la présence des phospholipides autour des NPs.

Nous nous sommes alors intéressés à l'évaluation de la cytotoxicité de ces M-MSNs natives, recouvertes de PEG ou d'une bicouche lipidique de DMPC, d'abord par tests de viabilité (MTT) suivi d'une analyse par impédance cellulaire en temps réel (xCELLigence). Les résultats montrent que ces NPs sont peu toxiques sur les cellules hépatiques HepG2. Les M-MSNs natives sont celles qui induisent le plus d'effets sur les cellules en impédance en temps réel, suivies des DMPC M-MSNs puis des PEG M-MSNs. La viabilité mesurée par le test MTT est de 90% pour 100 µg/mL de M-MSNs PEG, contre 70% pour celles recouvertes de DMPC et 60% pour les natives à dose équivalente. Enfin, les M-MSNs natives ont été internalisées en plus grande quantité dès 6h d'exposition à 50 µg/mL par rapport à celles recouvertes de PEG ou d'une bicouche DMPC.

En conclusion, l'optimisation du protocole de synthèse a permis d'obtenir des NPs stables avec un taux acceptable de NPs sans cœur de fer. Les M-MSNs natives et décorées sont globalement peu toxiques sur la lignée HepG2.

Cite this: *RSC Adv.*, 2016, 6, 57275

Synthesis, decoration, and cellular effects of magnetic mesoporous silica nanoparticles†

J. L. Nyalosaso,^a E. Rascol,^a C. Pisani,^{ab} C. Dorandeu,^a X. Dumail,^a M. Maynadier,^c M. Gary-Bobo,^d J. Lai Kee Him,^e P. Bron,^e M. Garcia,^d J. M. Devoisselle,^a O. Prat,^b Y. Guari,^a C. Charnay^a and J. Chopineau^{*af}

Mesoporous Silica Nanoparticles (MSN) are now considered as multifunctional platforms for pharmaceutical development. The goal of this study was to optimize a synthesis procedure to obtain reproducible monodisperse magnetic core@shell Fe_3O_4 @MSN with different coatings and study their uptake by cells. 100 nm core@shell nanoparticles with a unique 18 nm magnetic core were synthesized and covered with PEG groups or coated with a lipid bilayer in a controlled manner and their cellular fate was investigated. Both PEG and lipidic coated nanoparticles exhibit a low toxicity when incubated with Hep-G2 cells compared to pristine ones. Furthermore, the different real-time impedance cellular profiles that were observed and the particles uptake by the cells investigated by TEM suggest different internalization mechanisms or uptake kinetics depending on MSN coverage. This study is a first essential step to ensuring the preparation of well-defined nanomaterials for medical applications; it is considered as a crucial step to be able to perform detailed research about cellular trafficking and signaling pathways.

Received 7th April 2016

Accepted 7th June 2016

DOI: 10.1039/c6ra09017f

www.rsc.org/advances

1 Introduction

The emerging field of nanomedicine has been extensively developed over the past two decades taking advantage of the dual benefits of materials at the nanoscale. Firstly, due to the size reduction, new physicochemical properties such as optical, magnetic or thermal properties appear. Second, nanodrugs are able to overcome certain biological barriers and would therefore have a specific biological fate in terms of biodistribution and biokinetics that can be exploited for biomedical purposes. A major field of application of nanomedicines is that of cancer for diagnosis, imaging, drug delivery and cell targeting and many research studies are directed towards this broad area of application.¹ As part of this studies, it was shown that the biological behaviour of nanoparticles (NPs), *i.e.* the biodistribution, cellular uptake, or cytotoxicity is very dependent on their

physicochemical properties.^{2–4} Among the most important physicochemical parameters were identified the particle size, shape and surface chemistry.² As a general rule, in terms of size, it has been shown that the smaller nanoparticles are more toxic than their larger counterparts, any other parameter (chemical composition, coating, *etc.*) equivalent otherwise.^{5,6} Also, more specifically to the core@shell nanoparticles, the fact that in a given sample be present NPs without a core (underestimation) or with multiple cores (overestimation) false the real dose of used NPs. It is therefore necessary to establish standards for the use of nanoparticles and indeed the recent development of nanomedicine is now associated to official recommendations depending on countries. In France, the required characterizations are listed by the norm ISO/TR 13014. This norm argues the careful measured knowledge of NPs' physicochemical properties for comprehension of their biological fate. The European Medicinal Agency published guidelines for the evaluation of the safety of nanomaterials where it is notified that the physicochemical and pharmacokinetic comparison of generic NPs to a reference is not sufficient to approve the safety of those generic NPs (EMA/CHMP/SWP/100094/2011).⁷

The FDA created a section dedicated to the evaluation of nanotechnology since the first Nanotechnology Task Force Report published in 2007.⁸ This section elaborated guidance for industry considering whether an FDA-regulated product involves the application of nanotechnology in 2014.⁸ Each of these official recommendations refers to the major influence of the fundamental parameters that are the physicochemical properties, in particular size, chemical composition and surface

^aInstitut Charles Gerhardt de Montpellier (ICGM), CNRS UMR 5253/UM/ENSCM, Université Montpellier, Campus Triolet, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France. E-mail: joel.chopineau@enscm.fr

^bCEA – Marcoule, Direction de la Recherche Fondamentale, BIAM, BP 17171, 30207 Bagnols-sur-Cèze, France

^cNanoMedSyn, 15 avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier, France

^dIBMM, CNRS UMR 5247/UM/ENSCM, Faculté de Pharmacie de Montpellier, 15 avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier, Cedex 05, France

^eCentre de biochimie structurale CNRS UMR 5048/UM/INSERM U 1054, 34090 Montpellier, France

^fUniversité de Nîmes Rue Georges Salan, 30000 Nîmes, France

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c6ra09017f

properties on the NPs biological behaviour. It is therefore essential to have nano-objects that meet these standards in prior to any detailed research about the cellular trafficking and signaling pathways.

Among nanomedicines, the mesoporous silica nanoparticles (MSN) have been considered as a multifunctional platform for pharmaceutical development⁹ and found particularly advantageous for theranostic applications^{10,11}. MSN surface exhibits silanol groups, which could be functionalized by covalent ligands or by electrostatic coupling paving the way for an easy modification of their surface properties which could be one way to control the biodistribution of particles.¹² Concerning cancer applications, accumulation of the NPs (size range 30–200 nm) in the tumour has been explored due to the enhanced permeation and retention (EPR) effect.¹² The rapid neovascularisation (angiogenesis) occurring in the solid tumour presents imperfections, leading to fenestration; and the association of the blood pressure effect with fenestration is favourable for NPs accumulation into the tumour. Nevertheless, NPs could also accumulate into spleen and liver, due to important macrophages uptake of NPs by phagocytosis. To avoid the latter, surface functionalization with polyethylene glycol (PEG) moieties is now a well-known strategy for the production of furtive MSN.^{13,14} An alternative strategy modifying the fate of NPs consists in wrapping the nano-objects by a lipid bilayer, the latter including PEG grafted molecules and/or targeting probes.¹⁴ Among numerous properties, MSN pores could be loaded with cytotoxic molecules.^{15,16} Otherwise, MSN having a magnetic core allows following nanoparticles (NPs) using magnetic resonance imaging (MRI),¹⁷ or for drug release induced by the magnetic field.¹⁵ Indeed, drug release could be enhanced by heating through magnetic field application to a temperature of 50 °C. Plus, after MSN cell internalization, heating could enhance the intra-cellular temperature from 37 °C to 50 °C, leading to hyperthermia.¹⁸ Cell death generally occurred for a temperature upper to 42 °C, depending of cell type as cancer cells seemed more sensitive to heat stress than normal cells.

Sol-gel chemistry was developed since 2008 as a popular soft chemistry route to core@shell nanoparticles synthesis with well-ordered mesoporosity and tuneable pores.¹⁹ Since this date, numerous publications reported this synthesis; however few reached the initial required quality for nanomedicine. Most synthesis resulted in non-homogeneous shaped NPs^{15,20–23} or provide NPs presenting several magnetic cores per NPs.^{24–26} The goal of this work was to synthesize Fe₃O₄@MSN core-shell nanoparticles, monodisperse, homogeneous, and containing one magnetic core per particle. Even if MSN are generally considered as biocompatible, as previously mentioned their surface properties are often modified for biomedical applications²⁷ in order to enhance their colloidal stability in biologically relevant conditions¹² and then to improve their biostability and biocompatibility (reduced protein adsorption and resistance to nonspecific uptake).¹³ Plus, comparison of particles with sizes comprised between 150 and 500 nm with zeta potentials between –40 mV and +35 mV showed that NPs with slight negative charge (zeta potential of –15 mV) and 150

nm accumulates more efficiently in tumour than the other ones.²⁸ In the present work, a MSN size of about 100 nm was chosen for optimal penetration in tumors,²⁸ and the surface properties of NPs were modified by grafting PEG or coating with lipid bilayers. The cellular toxicity of the three types of particles, pristine, PEGylated or lipid coated, was measured on Human hepatocyte carcinoma cell line (Hep-G2 cells). Using the same cell line, real-time cellular effect of pristine, PEGylated or lipid coated NPs were compared by cellular impedance measurements. The cellular fate of NPs was analysed in relation with the nature of NPs coverage; the uptake of NPs was monitored using transmission electronic microscopy.

2 Results and discussion

2.1 Synthesis and characterization of pristine Fe₃O₄@MSN, PEG-Fe₃O₄@MSN and phospholipid coated Fe₃O₄@MSN

2.1.1 Pristine Fe₃O₄@MSN. In this work, Fe₃O₄@MSN synthesis process was optimized to obtain monodisperse, 100 nm sized, mesoporous nanoparticles with one magnetic core per MSN and key parameters were evidenced to obtain reproducible results. Purity, concentration and hydrophobicity of MIONS (magnetic iron oxide nanocrystals) are crucial parameters for obtaining monodisperse magnetic silica core-shell nanoparticles and preventing the formation of core-free silica particles. MIONS with a size of 18 ± 3 nm were prepared according to the thermal decomposition of iron oxide (II).²⁹ In this procedure, *n*-docosane was used as the solvent (boiling point 368 °C) and oleic acid was used as both reducing agent and nanocrystals stabilizer. The size of MIONS is related to the amount of oleic acid used in the synthesis. The more amount of oleic acid, the larger are the nanoparticles.³⁰ The synthesized and washed MIONS were better dispersed in non-polar solvents such as chloroform and were stabilized by addition of oleylamine. The resulting hydrophobic properties conferred to the MIONS ensure an optimal distribution of the magnetic nanoparticles into the micellar phase through the self-assembling between oleylamine and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). The concentration of MIONS in chloroform was estimated at 9.8 g L^{–1} (determined by thermogravimetric analysis (TGA) measurements, see ESI†).

It is important for MIONS to be well dispersed in chloroform in a way that each single nanocrystal compound ideally occupies one micelle of CTAB so that to obtain single core Fe₃O₄@MSN. Thus, in order to reduce the formation of multi-core MSN, MIONS were dispersed in chloroform during 3 hours using ultrasound bath and nanocrystals were injected by 10 steps into the CTAB micellar reaction medium, to enhance their distribution in micelles. However, the presence of chloroform in the core-shell reaction mixture interferes with the sol-gel reaction and does not promote the formation of uniform and regular mesoporous silica particles. Therefore, it is essential to eliminate the chloroform from the reaction mixture by applying a brief vacuum at 70 °C after each injection of the MIONS suspension in the reaction mixture. Before silica precursor injection, the reaction medium temperature was stabilized at 80 °C during one hour. After reaction completion,

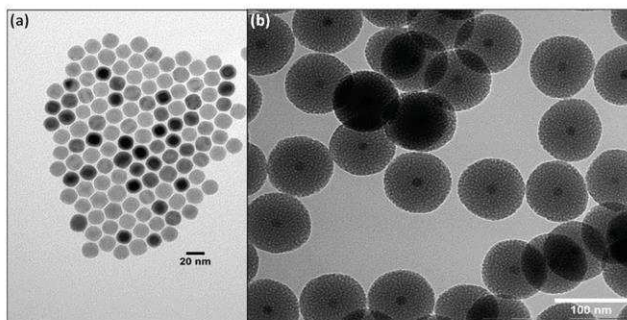


Fig. 1 TEM images of (a) magnetic iron oxide nanocrystals and (b) monodisperse magnetic mesoporous silica core-shell particles ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$) prepared according to the optimized synthesis protocol.

differential centrifugation steps were performed. Firstly, 5200g centrifugation was accomplished to pellet multicore MSNs. After that, 35 700g centrifugation step was performed. MSN without magnetic core were recovered in the supernatant. Finally, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ were extensively washed in an alcoholic solution of ammonium nitrate by reflux during 12 hours. The as-prepared $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ core-shell sample is a black powder. TEM images showed that the particles are monodisperse and regular silica spheres with radial mesostructures encapsulating 18 nm spherical Fe_3O_4 nanocrystals are observed (Fig. 1). It should be noted that no core-free silica particles were observed. The core-shell NPs have an overall diameter of 100 ± 5 nm. The size and monodispersity of native $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ were confirmed by dynamic light scattering (DLS). Hydrodynamic diameter (HD) and zeta potential (ZP) were measured in low ionic strength buffered medium (20 mM Hepes, 5 mM NaCl, pH = 7.4) to prevent NPs aggregation. The HD was measured at 125.47 ± 1.61 nm (see Table 2). The surface properties have been studied using a zeta potential (ZP) analyzer. The measurements revealed that the sample exhibits negative ZP values around -32.09 ± 1.30 mV (Table 2). This relatively high negative value confers to the nanoparticles a colloidal stability in aqueous solution and prevents them from aggregation in agreement with previous studies which argued that above the isoelectric point (pH > 2), the surface of silica is negatively charged due to the presence of deprotonated silanol groups (SiO^-).^{25,31}

Table 1 Textural parameters of native $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-MSN}$ and PEG $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-MSN}$ nanoparticles

	S_{BET} ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	S_{ext}^a ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	V_p^b ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	D_{BJH}^c (nm)
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$	675 ± 7	58 ± 1	0.97 ± 0.02	2.84 ± 0.20
PEG $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$	475.0 ± 3.6	55 ± 1	0.64 ± 0.02	2.75 ± 0.20

^a S_{ext} : external surface as inferred from the t -plot analysis applied to N_2 adsorption isotherms. ^b V_p : pore volume calculated at the saturation point of the N_2 sorption isotherms at the relative pressure $P/P_0 = 0.85$.

^c D_{BJH} : mesopore volume, as determined from the BJH method (desorption branch).

Textural properties of native $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ have been characterized by N_2 sorption and small-angles X-ray diffraction (sa-XRD). The textural parameters are given in Table 1. The material exhibits a type IV isotherm according to the IUPAC classification. The isotherm profile is characteristic of MCM-41 type materials with a surface area of $675 \pm 7 \text{ m}^2 \text{g}^{-1}$ and uniform mesopores of 2.84 ± 0.2 nm of diameter, according to the pore size distribution. The hysteresis observed at $P/P_0 > 0.85$ is likely related to inter-particles porosity and packing defects.³² The small-angle XRD pattern revealed that only the first-order scattering peak (d_{100}) appears well resolved at $2\theta = 1.69^\circ$. This may be due to the spherical morphology of the core-shell nanoparticles implying a constraint on the pore organisation. The wide-angle XRD pattern (ESI Fig. 3†) evidenced the presence of Fe_3O_4 nanocrystals with the related indexed diffraction peaks planes (311, 400 and 440) embedded in the characteristic broad signal of amorphous SiO_2 .^{29,33} The observed diffraction lines confirmed the magnetite crystals structure of magnetic iron oxide nanocrystals (Fig. 2).

2.1.2 PEG $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$. The grafting of polyethylene glycol at the surface of the NPs, PEG $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$, was achieved *in situ*.^{13,34} PEG molecules were covalently bound to the silanol groups at the end of the $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ synthesis. After the condensation process induced by the injection of TEOS, the mixture was slowly cooled to 50°C with continuous stirring. Then, 1 mL ethanol containing 100 mg of silanized PEG 2000 was slowly added and the reaction mixture was stirred overnight. After completion of the reaction, the mixture was cooled to room temperature before applying the same washing steps as those described above for the pristine $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$.

The PEG $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ core-shell sample is a black powder. TEM images (ESI Fig. 7†) showed that the particles are monodisperse and regular silica spheres with radial mesostructures were observed. There is no difference on TEM images between pristine $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ and PEG $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$. The PEGylation induced an HD increased to 141.76 ± 13.96 nm due to PEG groups and an increase of ZP from -32.03 to -26.30 mV (see Table 2). The presence of the PEG moieties at the particle surface was evidenced using Raman spectroscopy (Fig. 3c). Here, the Raman active vibrational modes of the PEG grafted at the MSN particle surface are highly decreased in intensity,

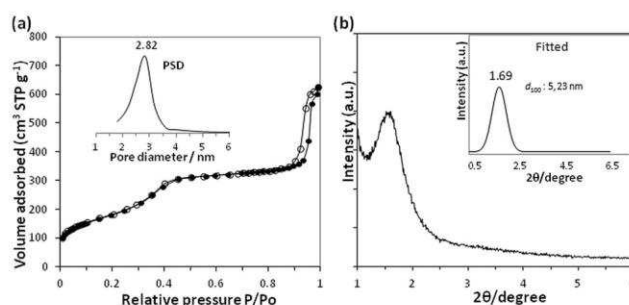


Fig. 2 Textural and structural properties of pristine $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ core-shell particles: (a) N_2 sorption isotherms with ● adsorption ○ desorption (inset is the pore size distribution), (b) small-angle X-ray diffraction pattern with the fitted peak.

twisting vibrations of methylene group of PEG at 1221–1366 cm^{-1} and $\text{CH}_2\text{--CH}_2$ bending vibration at 1458–1479 cm^{-1} . This could be due to hydrogen bonding/van der Waals' interaction with the silanol groups of the silica surface.³⁵

TGA analysis of pristine particles (Fig. 3a) exhibits a gradual change of mass loss of 4.4% in the temperature range 200–800 °C ascribed to a progressive dehydroxylation of the silica shell. It is known that a slow condensation of germinals, vicinals, and isolated silanols occurred upon heating of amorphous silica.³⁶ The grafted amount of PEG onto $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ was determined based on TGA analysis (Fig. 3b). The thermal decomposition of PEG is observed to start at 251 °C. The measured mass loss of 12% arisen from a grafted PEG amount of 2.36 mmol g^{-1} of particles taking into account the dehydroxylation of silica.

2.1.3 Phospholipid coated $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$. The coating of $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ with phospholipid was achieved after the synthesis and extensive washing of pristine $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$. The bilayer wrapping of $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ was achieved by addition of a suspension of DMPC small unilamellar vesicles (SUV) to the $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ mixture. Then, SUV rupture in contact with the MSN surface ensured the coating of the particles.^{37,38} DMPC coating of $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ have been achieved in a high ionic strength medium (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, pH = 7.4). This process has been described as a one-step event in a high ionic strength medium, by van der Waals attractions between zwitterionic SUV and MSN surface.³⁸

DMPC coated structures were firstly characterized using HD and ZP measurements. After lipid coating, the HD was increased to 179.40 ± 2.40 nm and ZP was increased to -10.80 ± 0.25 mV as compared to 125.47 ± 1.61 nm and -32.09 ± 1.30 mV for naked nanoparticles. The effective coating of $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ by the DMPC bilayer was confirmed by cryoTEM observations. CryoTEM observations show that no free SUV was present in the preparation; a unilamellar lipid bilayer is effectively wrapping the surface of the NPs (Fig. 4). Moreover, most of the NPs observed were covered by a complete DMPC lipid bilayer around the NPs in our experimental conditions. After counting 250 particles 84% were found completely wrapped. Scanning transmission electron microscopy (STEM) was used to confirm the presence of phospholipids around $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$. After TEM observation of $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ samples, topochemical analysis was performed by scanning with energy dispersive X-ray spectrometer (EDS). The STEM images (Fig. 4c and d) and the corresponding elemental analysis (ESI Fig. 8†) clearly distinguished from the inside to the outside part of the particles, the iron oxide core, the silica shell and in case of lipid covered particles the presence of a sphere

mapping the presence of phosphorus due to the presence of DMPC.

2.2 Cell viability and cell impedance measurements

We investigated the biocompatibility of the 3 types of nanoparticles. For this, the cytotoxicity of MSNs (ranging from 1 to 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$) on human hepatocyte carcinoma (Hep-G2) cells was measured with the MTT assay. The percentage of living cells was up to 90% for 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of PEG $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$, and 80% and 90% for 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of DMPC $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ and pristine ones, respectively (Fig. 5). This result demonstrates the absence

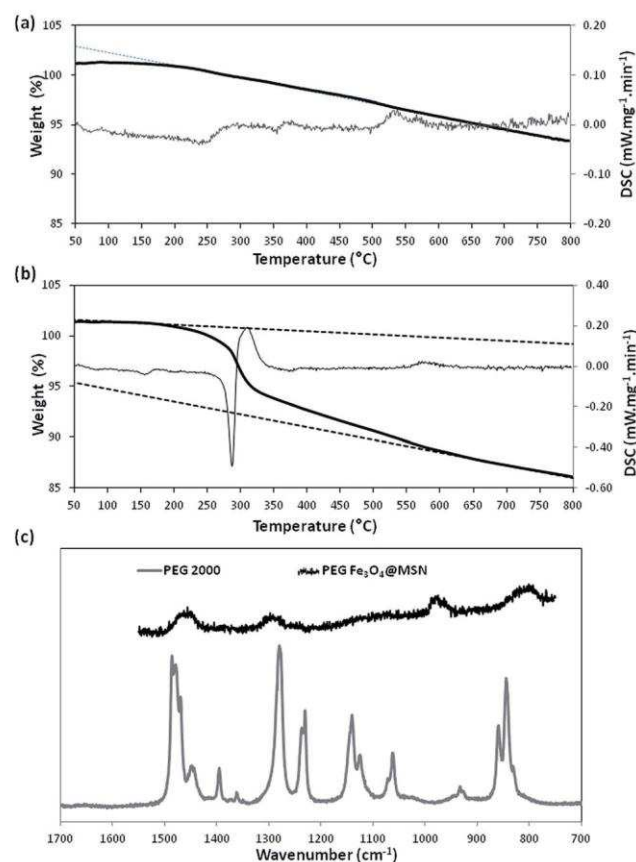


Fig. 3 Characterization of $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ PEG-grafting. TGA/DSC spectra of: (a) pristine $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ and (b) PEG- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$. Quantification of PEG grafted on $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ was calculated from TGA analysis, by comparison of the weight lost from PEG- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ to bare $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$. (c) Raman spectra is the proof that $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ are associated to PEG groups with characteristic bands at 1221–1366 cm^{-1} and 1458–1479 cm^{-1} .

Table 2 Physicochemical characterization of pristine, PEG-grafted and DMPC coated $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ in low ionic strength medium (Hepes 20 mM, NaCl 5 mM, pH 7.4)

NPs	Hydrodynamic diameter (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$	125.47 ± 1.61	0.14 ± 0.04	-32.09 ± 1.30
PEG $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$	141.76 ± 13.96	0.14 ± 0.05	-26.30 ± 1.35
DMPC $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$	179.40 ± 2.40	0.20 ± 0.02	-10.80 ± 0.25

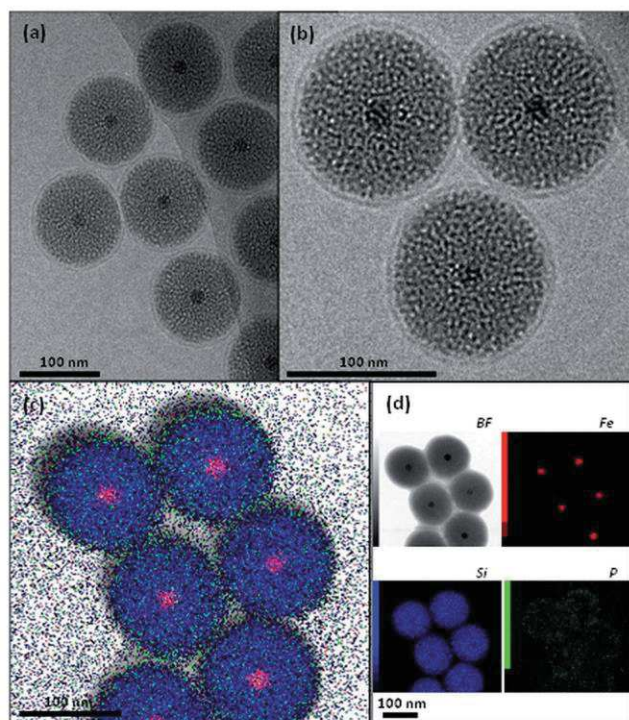


Fig. 4 Imaging of magnetic Fe_3O_4 @MSN core-shell particles after incubation with DMPC SUVs (a). All the MSN are covered with a complete lipid bilayer having a thickness of 5 nm. Three lipid-coated MSN are zoomed for a better observation of the lipid bilayer (b). STEM images DMPC Fe_3O_4 @MSN: (c) DMPC- Fe_3O_4 @MSN overlay of TEM black field (BF), iron (Fe), silica (Si) and phosphorus (P) element cartography. Each element is separately presented (d). The iron core at the centre of the silica NPs and phosphorus is located around the silica shell of Fe_3O_4 @MSN particles.

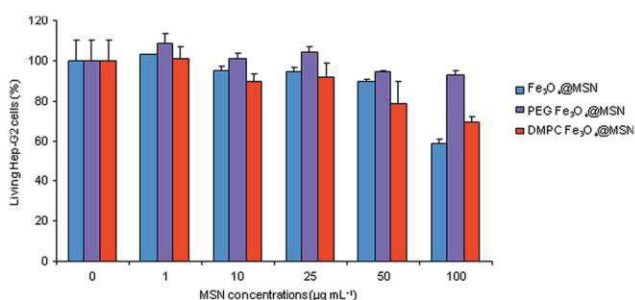


Fig. 5 Cytotoxicity analysis: Hep-G2 cells were incubated with increasing concentrations of MSNs (from 1 to $100 \mu\text{g mL}^{-1}$). After 72 h treatment, a MTT assay was performed and data are mean $\pm$ SD of 3 experiments.

of a significant toxicity of these batches of nanoparticles for the dose of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ and a higher biocompatibility for PEG Fe_3O_4 @MSN.

Following this cell viability assay, the two doses 50 and $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ were chosen for real-time cell impedance analyses. The impact of nanoparticles on cells was performed using the xCELLigence System (ACEA Biosciences), a cell-based micro-electronic biosensor which provides real-time and label-free

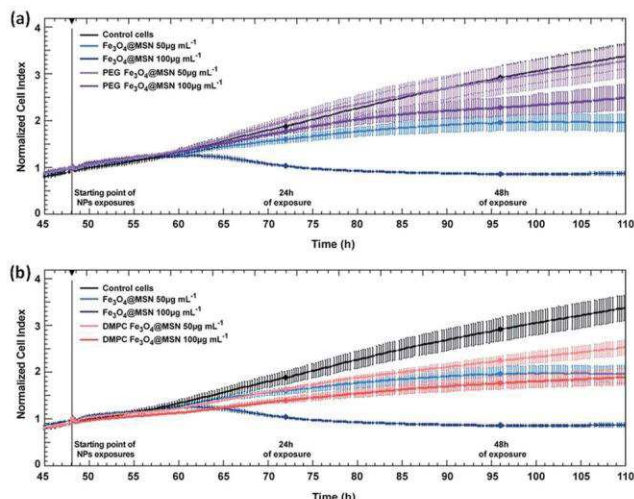


Fig. 6 xCELLigence experiment. Real-time cell index (CI) monitoring of Hep-G2 cells ($n = 3$) exposed to 50 and $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ of pristine, PEG- and DMPC Fe_3O_4 @MSN. (a) Pristine Fe_3O_4 @MSN versus PEG Fe_3O_4 @MSN. (b) Pristine Fe_3O_4 @MSN versus DMPC Fe_3O_4 @MSN.

cellular analyses, represented by a Cell Index (CI). This assay allows exceeding the limits of endpoint analysis by capturing data throughout the entire time course of an experiment and obtaining more physiologically relevant data. CI reflects both modifications of cell morphology and cell viability. As control, all these nanoparticles were tested in acellular conditions and no interference on impedance measurements was recorded (data not shown). Impedance was recorded for 60 h of exposure. Pristine Fe_3O_4 @MSN (blue curves in Fig. 6) induced a reduction of the CI in a dose-dependent manner, compared to control cells (black curve in Fig. 6). At both doses, *i.e.* 100 and $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, a biphasic CI response was observed with an increase followed by a decrease from 10 h of exposure until the end of the experiment. PEG- Fe_3O_4 @MSN (purple curves in Fig. 6) at $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ induced a dose-dependent reduction of the CI with a biphasic pattern, similar to that observed with pristine Fe_3O_4 @MSN. Interestingly, PEG Fe_3O_4 @MSN at $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ had no effect on the CI of Hep-G2 cells. DMPC Fe_3O_4 @MSN (red curves in Fig. 6) induced an early biphasic CI response (after 5 h of exposure) at both doses. After 60 h of exposure, DMPC Fe_3O_4 @MSN at $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ had the same CI than pristine Fe_3O_4 @MSN at $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. To summarize, pristine Fe_3O_4 @MSN are the most deleterious for Hep-G2 cells, followed by DMPC Fe_3O_4 @MSN and PEG Fe_3O_4 @MSN.

Finally, the uptake of the Fe_3O_4 @MSN, decorated or not with PEG or DMPC was assessed after 6 h of exposure at $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ via TEM. A high amount of Fe_3O_4 @MSN was observed inside the Hep-G2 cells, as showed in Fig. 7b. Pristine Fe_3O_4 @MSN were shown as individual dispersed NPs around the nucleus (Fig. 7b). In contrast, in the same experimental conditions, we observed a lower uptake of PEG Fe_3O_4 @MSN and DMPC Fe_3O_4 @MSN by Hep-G2 cells (Fig. 7c and d).

Results obtained in cellular assays shown, firstly, that pristine Fe_3O_4 @MSN, PEG grafted Fe_3O_4 @MSN, and lipid coated Fe_3O_4 @MSN, induced a dose-dependent response on liver Hep-

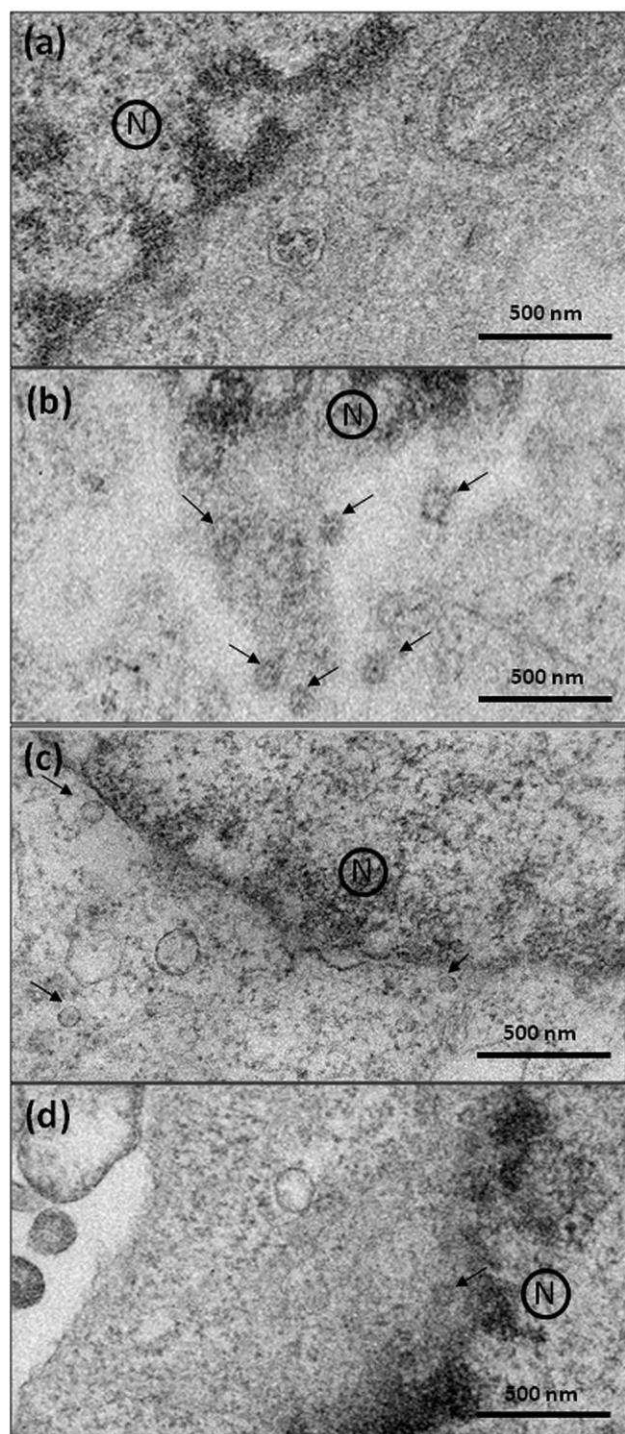


Fig. 7 TEM imaging of Hep-G2 cells (a) unexposed (control) and exposed at $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ for 6 h to (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$, (c) PEG $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$, (d) DMPC $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$. Hep-G2 cells were then fixed for TEM observation. Scale bar 500 nm, N indicates the nucleus and arrows evidence the NPs.

G2 cells. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ grafted with PEG did not impact the normal behavior of Hep-G2 cells at a dose of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. After the cells were exposed to NPs; changes in the cell impedance profiles were observed earlier for DMPC $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ than for

pristine and PEG $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$. The use of PEG is well known to produce a steric hindrance around nanoparticles which prevents the adsorption of serum proteins and can counteract the opsonization process.¹⁴ Similar observations were also applicable to DMPC $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$, but to a lesser extent. Indeed, DMPC $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ (*i.e.* 50 or $100 \mu\text{g mL}^{-1}$), induced a decrease of CI values all along the experiment, reflecting earlier and more deleterious effects on Hep-G2 cells than those observed with PEG $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$. Nevertheless, these two coverages were found to diminish the toxic potential of the pristine $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$.

Previous studies described a longer half-life *in vivo* (longer circulation time)³⁹ and better accumulation in tumors¹⁶ for MSN coated with lipid bilayers, associated to PEG groups. However, the individual effect of the lipid bilayer or PEG groups is not clear. Similarly, grafting of PEG onto commercially available liposomal formulations is currently used to reduce the amount of proteins adsorbed on liposome. However, the molecular consistency of the corona is not significantly different in the absence or in the presence of PEG coating.^{40,41} Plus, corona formation on liposomes inhibits their internalization and their pegylation reduces also the internalization of liposomes.

3 Conclusion

In this work, the synthesis procedure of magnetic NPs was fully optimized to obtain $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ core@shell nanoparticles, monodisperse, homogeneous, and containing one magnetic core per particle. These criteria were defined to obtain reproducible biological results after interactions of NPs with cells. Then, we performed a preliminary study of the impact on cell fate of the pristine, PEG-grafted and lipid-coated $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$.

The $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ were synthesized according to an adapted protocol that allows obtaining spherical NPs presenting one magnetic core per MSN and a primary diameter of $100 \pm 5 \text{ nm}$. The PEG grafting was achieved *in situ*, after the last step of the $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ synthesis; whereas SLB formation was achieved by vesicle fusion and rupture upon contact with the MSN surface. The polydispersity index for the hydrodynamic diameters measured for pristine $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$, PEG grafted ones and for lipid coated nanoparticles are always inferior to 0.2 indicating a monodispersity, and the absence of aggregates when NPs were dispersed in 20 mM Hepes pH 7.4 buffer containing 5 mM NaCl. It is noteworthy that the lipid coating ascertained using cryoTEM imaging was confirmed by appropriate STEM analyses.

The NPs behaviors with three different surfaces were compared using cellular tests. The results show differences in cell responses upon the exposure with NPs having three different surface properties. PEG $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ appear less toxic than lipid coated and pristine ones. Only the PEG $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ exhibits no toxic effect at a dose of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ which was not the case for DMPC and pristine $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$. DMPC $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ (*i.e.* 50 or $100 \mu\text{g mL}^{-1}$), induced a decrease of CI values all along the experiment, reflecting earlier and more deleterious effects on Hep-G2 cells than those observed with PEG $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$. Nevertheless, these two coverages were found to diminish the toxic potential of the pristine $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$.

To the best of our knowledge, this is the first study that compares the cellular effect of PEG grafting or lipid coating as individual strategies for enhancing the stealth effect of MSN. This is particularly interesting because different internalization mechanisms are involved for the MSN presenting different surface coatings. In a previous study, in which MSN coated with lipids were compared to pristine MSN for their interactions towards cells, the data suggested internalization of large aggregates of pristine MSN inside vesicles whereas lipid-coated MSN enter in the cells individually.⁴² The optimized synthesis protocol of Fe₃O₄@MSN developed in this work allows the comparison of MSN that were fully characterized in terms of physicochemical properties. This study is an essential step to ensure the quality of NPs material for medical applications. As a lower toxicity was observed for the PEG grafted or lipid coated Fe₃O₄@MSN compared to the pristine ones, as the real-time impedance profiles suggested different internalization processes; future work should be orientated towards intracellular trafficking of NPs and in depth analysis of cellular responses. Moreover, *in vitro* studies using model membranes will be needed to clarify the interactions between pristine, PEG and DMPC Fe₃O₄@MSN with membranes.

4 Experimental

4.1 Synthesis

4.1.1 Materials. All reagents were commercially available and used without any further purification. Hydrated iron oxide [FeO(OH), catalyst grade 30–50 mesh], oleic acid (90%), oleylamine (99%), ether (≥99.9%), anhydrous ethanol (≥99.8%), anhydrous pentane (99+%), anhydrous chloroform (99+%), tetraethoxysilane (TEOS, ≥99.9%), cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), ammonium nitrate (NH₄NO₃), dimethyl sulfoxide (DMSO) and (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (Hepes) were purchased from Sigma-Aldrich. Sodium hydroxide (NaOH) and *n*-docosane (99%) were purchased from Acros. 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC) was purchased from Avanti polar lipids. DPBS buffer (KCl 2.66 mM, KH₂PO₄ 1.47 mM, NaCl 137.93 mM, Na₂HPO₄·7H₂O 8.05 mM) was provided from Gibco (ThermoFisher scientific). Silanized PEG (CH₃O-PEG₂₀₀₀-Si(OCH₃)₃) was purchased from Rapp polymer. RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) and fetal calf serum (FCS) were obtained from Invitrogen. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was provided from Promega.

4.1.2 Preparation of magnetic Fe₃O₄ nanocrystals (MIONs). The synthesis of spherical magnetic Fe₃O₄ nanocrystals described in ESI† was achieved according to the procedure previously reported in the literature.⁴³

4.1.3 Synthesis of monodisperse mesoporous silica shell with magnetic cores (Fe₃O₄@MSN). The synthesis of Fe₃O₄@MSN followed the procedure initially reported by Rho *et al.*³³ This procedure was slightly modified in order to avoid efficiently the heterogeneous nucleation as depicted in ESI†. PEG Fe₃O₄@MSN nanoparticles have been synthesized with the protocol described in ESI†. After the condensation process induced by the injection of TEOS, the mixture was slowly cooled

to 50 °C with continuous stirring. Then, 1 mL ethanol containing 100 mg of silanized PEG 2000 was slowly added and stirred overnight. The mixture was cooled to room temperature before applying the same washing steps as described in ESI† for pristine Fe₃O₄@MSN. Lipid-coating of Fe₃O₄@MSN core-shell nanoparticles was performed as follows. Small unilamellar vesicles (SUVs) were prepared following Bangham's method.⁴⁴ Briefly, a dry lipid film was prepared from a DMPC lipid stock solution that was stored at 5 mg mL⁻¹ in chloroform at -20 °C. The dry lipid film at the bottom of a roundish glass tube was obtained by solvent evaporation under nitrogen flow and was kept under vacuum overnight. The lipid film was resuspended at 10 mg mL⁻¹ of lipids in PBS buffer and vortexed for 5 minutes. SUVs were obtained by extrusion through polycarbonate membranes. Lipid suspension was passed back and forth approximately 15 times through 100 nm pores and 25 times through 50 nm pores. The resulting SUVs have a hydrodynamic diameter of 67.0 ± 1.3 nm and a zeta potential of -4.45 ± 0.66 mV. For lipid coating, Fe₃O₄@MSN were dispersed ultrasonically for 2 minutes at 20 mg mL⁻¹ in absolute ethanol. Fe₃O₄@MSN dispersion was added to 6.4 mL of 5 mg mL⁻¹ SUV suspension (corresponding to a surface area ratio 8/1 SUVs/NPs). This mixture was vortexed for 1 minute and sonicated in ultrasound bath for 1 minute. Rotating agitation of the sample was performed for 3 hours at 37 °C. Lipid coated DMPC Fe₃O₄@MSN were then isolated by 4 centrifugation steps (4000g, 20 minutes), to remove exceeding SUVs.

4.2 Methods of characterization

Transmission electron micrographs (TEM) were obtained with a JEOL 1200 EX II microscope. Nitrogen adsorption and desorption isotherms were measured using a TriStar 3000 (V6.06 A) automated gas adsorption system with nitrogen as adsorbate at -196 °C. Prior to the sorption experiment, the sample air was evacuated under vacuum at 110 °C for 15 h. The specific surface area (*S*_{BET}) was calculated according to the Brunauer-Emmett-Teller (BET) method, taking the value of 0.162 nm² as a cross-sectional area per nitrogen molecule in the BET calculation. The total pore volume (*V*_p) was taken at *P*/*P*₀ = 0.85. Pore size distribution (PSD), used to measure the pore diameter (*D*_p), was obtained from the desorption branch of the nitrogen isotherm using the Barrett-Joyner-Halenda (BJH) equation. X-ray diffraction patterns (XRD) were collected on a Bruker AXS D8 Advance with Solid 1D Lynx Eyes Detector, using Ni-filtered Cu Kα radiation. XRD techniques were applied to determine the pore ordering and the presence of crystalline phases of Fe₃O₄. BJH parameters were employed to calculate the effective pore diameter.²⁰ Thermogravimetric analysis (TGA) was performed with DSC 7 (Perkin Elmer), from 30 to 780 °C.

Hydrodynamic diameter and zeta potential were determined using a Nano ZS apparatus (Malvern). Each measurement was performed at 20 μg mL⁻¹ dilution NPs from a stock suspension at 10 mg mL⁻¹ in EtOH 95%. The dilution required a 30 s bath sonication step of the stock suspension and 1 min bath sonication step of the dilution. The suspensions were prepared by dilution in Hepes 20 mM, NaCl 5 mM buffered at pH 7.4 and

25 °C. Data were collected from the He–Ne laser light source (633 nm) at 173° from the transmitted beam. Results are presented as Z-average obtained in intensity mode, associated to the polydispersity index.

CryoTEM experiments have been performed using a JEOL 220FS transmission electron microscope (Japan) with a 4k × 4k slow-scan CCD camera (Gatan, USA). Samples were prepared on copper quantifoil grids R 2/2 (Quantifoil, Germany). DMPC Fe₃O₄ MSN suspensions were prepared at a concentration of 3 mg mL^{−1} of particles. A 3 µL drop of suspension was filed on the copper grid, dried 2 seconds and frozen in ethane for approximately 6 seconds. Grids were kept in liquid nitrogen until microscope observation. Effective NPs coverage was characterized with cell counter (Image J). Scanning transmission electron microscopy (STEM) was performed using a JEOL 2100F transmission electron microscope (Japan) with 200 kV field emission and energy dispersive X-ray spectrometer. Pristine and DMPC Fe₃O₄@MSN samples were analyzed on copper grids from suspensions containing a concentration of 3 mg mL^{−1} of particles. After TEM observation of Fe₃O₄@MSN samples, element analysis have been performed by scanning with a counting rate of 398 and 422 counts per sec for pristine Fe₃O₄@MSN and DMPC Fe₃O₄@MSN, respectively. The scanning was performed using a 0.7 nm EDX probe with a probe current of 1 nA.

4.3 Biological materials and methods

4.3.1 Cell culture. The Human hepatocyte carcinoma (Hep-G2) cell line was obtained from Sigma-Aldrich. Cells were cultured in RPMI 1640 (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin (100 U mL^{−1}, 100 µg mL^{−1}) and incubated in a humidified incubator at 37 °C and 5% CO₂. Cells were used between passages 20 to 40. Cells were passed once a week and the medium was changed twice a week, keeping confluence below 80%.

4.3.2 Cytotoxic study. Hep-G2 cells were seeded into 96-well plates at 500 cells per well in 200 µL culture medium and allowed to grow for 24 h. Then, increasing concentrations of nanoparticles (from 1 to 150 µg mL^{−1}) were incubated in culture medium of Hep-G2 cells during 72 h. To evaluate the toxicity of these treatments, a MTT assay was performed. Briefly, cells were incubated for 4 h with 0.5 mg mL^{−1} of MTT in media. The MTT/media solution was then removed and the precipitated crystals were dissolved in EtOH/DMSO (1 : 1). The solution absorbance was read at 540 nm.

4.3.3 Real-time impedance measurement. The experiments were performed using an xCELLigence System from ACEA Biosciences. A background resistance of the E-plates (ACEA) was determined with 100 µL culture medium. Hep-G2 cells were seeded in E-plates at 10 000 cells in 200 µL total volume. E-plates were placed into the Real-Time Cell Analyzer (RTCA) station (ACEA) and incubated at 37 °C and 5% CO₂. Cells were grown for 48 hours corresponding to the adhesion and growth phases. After 48 hours, cells were exposed (*n* = 3) to three types of nanoparticles: pristine Fe₃O₄@MSN, PEG grafted and lipid-bilayer coated Fe₃O₄@MSN, exposed at 50 and 100 µg mL^{−1}. Real-time impedance measurements of control cells and

nanoparticles alone in culture cell media were also recorded as controls. Cell index (CI) raw data values were calculated by the RTCA software 2.0. Normalized cell indexes were also calculated at a selected normalization time point, which was chosen at the time of addition of nanoparticles.

4.3.4 Following NPs by TEM. Hep-G2 cells were seeded on glass coverslips for 24 h. After controlling their adherence and growing, cells were exposed to 50 µg mL^{−1} of NPs in RPMI cell culture medium for 6 h. The medium was removed and cells were rinsed twice with PBS. Cells were fixed by incubation with 2.5% (v/v) glutaraldehyde in PBS buffer, for 1 h at room temperature (RT). After that, cells were extensively washed with PBS. The staining of samples was obtained upon incubation with 1% osmium tetroxide. Samples were dehydrated by ascending grades of EtOH; for impregnation, the samples were firstly treated with a mix EtOH/EPON resin (1 : 1, v/v) for 1 h, and twice in EPON for 2 h. The polymerization is performed by embedding cells in EPON resin for 12 h at 60 °C, plunged in liquid nitrogen at −195 °C to detach the coverslip, and placed for two days at 60 °C for polymerization. The ultrathin sections (70 nm) were obtained using an ultramicrotome and disposed on the copper grids. The grids were incubated in uranyl acetate for 2 min, rinsed in water, and then incubated in lead citrate for 2 min, and finally rinsed in water.

Abbreviations

BET	Brunauer Emmett Teller
CI	Cell index
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
CryoTEM	Cryogenic transmission electron microscopy
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
EDS	Energy dispersive X-ray spectrometer
EDX	Energy dispersive X-ray
EPR	Enhanced permeation and retention
EtOH	Ethanol
FCS	Fetal calf serum
HD	Hydrodynamic diameter
Hepes	(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
Hep-G2 cells	Human hepatocyte carcinoma cells
MIONs	Magnetic iron oxide nanocrystals
MRI	Magnetic resonance imaging
MSN	Mesoporous silica nanoparticles
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NPs	Nanoparticles
PEG	Polyethylene glycol
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
STEM	Scanning transmission electron microscopy
SUV	Small unilamellar vesicles
TEM	Transmission electron microscopy
TGA	Thermogravimetric analysis
TEOS	Tetraethoxysilane
XRD	X-ray diffraction
ZP	Zeta potential

Acknowledgements

This work was supported by the French national research agency (ANR-13-NANO-0007, BioSiPharm project). We thank technological platform of microscopy of Montpellier University for the use of their electron microscope and their technical support, in particular Franck Godiard and Véronique Richard. We thank Gilles Renou from SIMaP of Grenoble for STEM analysis.

References

- 1 S. Nie, Y. Xing, G. J. Kim and J. W. Simons, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2007, **9**, 257–288.
- 2 A. E. Nel, L. Madler, D. Velegol, T. Xia, E. M. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova and M. Thompson, *Nat. Mater.*, 2009, **8**, 543–557.
- 3 H. Yang, C. Liu, D. Yang, H. Zhang and Z. Xi, *J. Appl. Toxicol.*, 2009, **29**, 69–78.
- 4 N. Ma, C. Ma, C. Li, T. Wang, Y. Tang, H. Wang, X. Moul, Z. Chen and N. Hel, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2013, **13**, 6485–6498.
- 5 B. Fadeel and A. E. Garcia-Bennett, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2010, **62**, 362–374.
- 6 T. Yu, K. Greish, L. D. McGill, A. Ray and H. Ghandehari, *ACS Nano*, 2012, **6**, 2289–2301.
- 7 EMA, *Reflection paper on non-clinical studies for generic nanoparticle iron medicinal product applications*, 2011.
- 8 FDA, *Nanotechnology task force report*, 2007.
- 9 D. Tarn, C. E. Ashley, M. Xue, E. C. Carnes, J. I. Zink and C. J. Brinker, *Acc. Chem. Res.*, 2013, **46**, 792–801.
- 10 M. Liong, J. Lu, M. Kovichich, T. Xia, S. G. Ruehm, A. E. Nel, F. Tamanoi and J. I. Zink, *ACS Nano*, 2008, **2**, 889–896.
- 11 Z. Li, J. C. Barnes, A. Bosoy, J. F. Stoddart and J. I. Zink, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 2590–2605.
- 12 K. Pombo Garcia, K. Zarschler, L. Barbaro, J. A. Barreto, W. O'Malley, L. Spiccia, H. Stephan and B. Graham, *Small*, 2014, **10**, 2516–2529.
- 13 V. Cauda, C. Argyo and T. Bein, *J. Mater. Chem.*, 2010, **20**, 8693–8699.
- 14 C. Graf, Q. Gao, I. Schutz, C. N. Noufele, W. Ruan, U. Posselt, E. Korotianskiy, D. Nordmeyer, F. Rancan, S. Hadam, A. Vogt, J. Lademann, V. Haucke and E. Ruhl, *Langmuir*, 2012, **28**, 7598–7613.
- 15 J. Liu, C. Detrembleur, D. Pauw-Gillet, S. Mornet, L. Vander Elst, S. Laurent, C. Jérôme and E. Duguet, *J. Mater. Chem. B*, 2014, **2**, 59–70.
- 16 H. Meng, M. Wang, H. Liu, X. Liu, A. Situ, B. Wu, Z. Ji, C. H. Chang and A. E. Nel, *ACS Nano*, 2015, **9**, 3540–3557.
- 17 J. Liu, S. Z. Qiao, Q. H. Hu and G. Q. Lu, *Small*, 2011, **7**, 425–443.
- 18 F. M. Martin-Saavedra, E. Ruiz-Hernandez, A. Bore, D. Arcos, M. Vallet-Regi and N. Vilaboa, *Acta Biomater.*, 2010, **6**, 4522–4531.
- 19 J. Kim, H. S. Kim, N. Lee, T. Kim, H. Kim, T. Yu, I. C. Song, W. K. Moon and T. Hyeon, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 2008, **47**, 8438–8441.
- 20 M. Kruk, M. Jaroniec and A. Sayari, *J. Phys. Chem. B*, 1997, **101**, 583–589.
- 21 Y.-S. Lin and C. Haynes, *Chem. Mater.*, 2009, **21**, 3979–3986.
- 22 K. R. Hurley, Y.-S. Lin, J. Zhang, S. M. Egger and C. L. Haynes, *Chem. Mater.*, 2013, **25**, 1968–1978.
- 23 R. G. Digigow, J.-F. Dechézelles, H. Dietsches, I. Geissbühler, D. Vanhecke, C. Geers, A. M. Hirt, B. Rothen-Rutishauer and A. Petri-Fink, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2014, **362**, 72–79.
- 24 V. Maurice, T. Georgelin, J.-M. Siaugue and V. Cabuil, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2009, **321**, 1408–1413.
- 25 E. Bringas, O. Koyure, D. V. Quach, M. Mahmoudi, E. Aznar, J. D. Roehling, M. D. Marcos, R. Martinez-Manez and P. Stroeve, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 5647–5649.
- 26 M. Perrier, M. Gary-Bobo, L. Lartigue, D. Brevet, A. Morère, M. Garcia, P. Maillard, L. Raehm, Y. Guari, J. Larionova, J.-O. Durand, O. Mongin and M. Blanchard-Desce, *J. Nanopart. Res.*, 2013, **15**, 1–17.
- 27 F. Tang, L. Li and D. Chen, *Adv. Mater.*, 2012, **24**, 1504–1534.
- 28 C. He, Y. Hu, L. Yin, C. Tang and C. Yin, *Biomaterials*, 2010, **31**, 3657–3666.
- 29 W. W. Yu, J. C. Falkner, C. T. Yavuz and V. L. Colvin, *Chem. Commun.*, 2004, 2306–2307.
- 30 J. Park, K. An, Y. Hwang, J.-G. Park, H.-J. Noh, J.-Y. Kim, J.-H. Park, N.-M. Hwang and T. Hyeon, *Nat. Mater.*, 2004, **3**, 891–895.
- 31 J.-F. Dechezelles, V. Malik, J. J. Crassous and P. Schurtenberger, *Soft Matter*, 2013, **9**, 2798–2802.
- 32 J. L. Nyalosaso, G. Derrien, C. Charnay, L.-C. de Menorval and J. Zajac, *J. Mater. Chem.*, 2012, **22**, 1459–1468.
- 33 W.-Y. Rho, H.-M. Kim, S. Kyeong, Y.-L. Kang, D.-H. Kim, H. Kang, C. Jeong, D.-E. Kim, Y.-S. Lee and B.-H. Jun, *J. Ind. Eng. Chem.*, 2014, **20**, 2646–2649.
- 34 M. Catauro, F. Bollino, F. Papale, M. Gallicchio and S. Pacifico, *Mater. Sci. Eng., C*, 2015, **48**, 548–555.
- 35 H. Y. Jung, R. K. Gupta, E. O. Oh, Y. H. W. Kim and C. M. Whang, *J. Non-Cryst. Solids*, 2005, **351**, 372–379.
- 36 S. Ek, A. Root, M. Peussa and L. Niinista, *Thermochim. Acta*, 2001, **379**, 201–212.
- 37 R. Veneziano, G. Derrien, S. Tan, A. Brisson, J. M. Devoisselle, J. Chopineau and C. Charnay, *Small*, 2012, **8**, 3674–3682.
- 38 H. Wang, J. Drazenovic, Z. Luo, J. Zhang, H. Zhou and S. L. Wunder, *RSC Adv.*, 2012, **2**, 11336–11348.
- 39 M. M. van Schooneveld, E. Vucic, R. Koole, Y. Zhou, J. Stocks, D. P. Cormode, C. Y. Tang, R. E. Gordon, K. Nicolay, A. Meijerink, Z. A. Fayad and W. J. Mulder, *Nano Lett.*, 2008, **8**, 2517–2525.
- 40 M. A. Dobrovolskaia, B. W. Neun, S. Man, X. Ye, M. Hansen, A. K. Patri, R. M. Crist and S. E. McNeil, *Nanomedicine*, 2014, **10**, 1453–1463.
- 41 M. Hadjidemetriou, Z. Al-Ahmady, M. Mazza, R. F. Collins, K. Dawson and K. Kostarelos, *ACS Nano*, 2015, **9**, 8142–8156.
- 42 D. B. Tada, E. Suraniti, L. M. Rossi, C. A. Leite, C. S. Oliveira, T. C. Tumolo, R. Calemczuk, T. Livache and M. S. Baptista, *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2014, **10**, 519–528.
- 43 S. Dib, M. Boufatit, S. Chelouaou, F. Sadi-Hassaine, J. Croissant, J. Long, L. Raehm, C. Charnay and J. O. Durand, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 24838–24841.
- 44 A. D. Bangham, M. M. Standish and J. C. Watkins, *J. Mol. Biol.*, 1965, **13**, 238–252.

Article n°3

***Evaluation de la biocompatibilité de nanoparticules
magnétiques de silice mésoporeuse fonctionnalisées
sur des cellules humaines HepaRG***

Article n°3 : Evaluation de la biocompatibilité de nanoparticules magnétiques de silice mésoporeuse fonctionnalisées sur des cellules humaines HepaRG

Ce troisième article traite de l'analyse approfondie des effets de ces M-MSNs natives, recouvertes de PEG ou de DMPC sur un modèle cellulaire hépatique humain, HepaRG (voir « modèle cellulaire hépatique innovant »), plus pertinent que HepG2. Pour cela, les études de viabilité ont été réalisées avec des tests de viabilité (MTT) et d'impédance cellulaire en temps réel (xCELLigence). L'internalisation cellulaire a été analysée par TEM et les réponses cellulaires ont été étudiées par puces d'expression génique avec la méthodologie « pathway driven ».

Ces nanovecteurs font partie des nanomatériaux les plus prometteurs en tant que nanovecteurs, regroupant tous les avantages procurés par une structure composée d'un cœur magnétique et d'une coquille fonctionnalisable. La coquille de silice est entièrement paramétrable (taille de la particule et des pores), ce qui ouvre de nombreuses perspectives pour le contrôle de la biodistribution de ces nanovecteurs de 4^{ème} génération vers des tissus cibles ainsi que pour leur effet cargo. Les deux fonctionnalisations étudiées sont un recouvrement de PEG et un recouvrement lipidique DMPC. Brièvement, les chaînes de PEG sont connues pour réduire fortement l'adsorption des protéines en surface, permettant d'échapper au système immunitaire (opsonisation) sur une plus longue période. Le deuxième type de recouvrement, DMPC, permet la combinaison des propriétés des M-MSNs avec les propriétés des liposomes, ce qui peut offrir des avantages accrus en termes de capacité d'encapsulation d'un principe actif et de stabilité en milieu biologique.

Après caractérisation physico-chimique de ces trois types de NPs, nous avons observé globalement les mêmes caractéristiques que sur l'article précédent. Notons qu'il nous a été possible de mesurer par TEM l'épaisseur de la couche de PEG après incubation dans du tétraoxyde d'osmium (OsO_4). Celle-ci mesure 6 ± 1 nm, ce qui est plutôt en accord avec la taille étirée des chaînes de PEG 2000 aux alentours de 15 nm. Concernant la bicouche lipidique, son épaisseur (7 nm) est proche de celle reportée dans la littérature (environ 5 nm) (Durfee *et al.*, 2016).

La viabilité cellulaire des HepaRG est très peu impactée par ces trois types de NPs, et ce jusqu'à de fortes concentrations (maximum $120 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, correspondant à $400 \mu\text{g}/\text{mL}$). Le taux maximum de perte observé est de 35% pour les M-MSNs natives, 25% pour les PEG et 20% pour les DMPC. Nous avons choisi de cibler trois doses : 1.6, 16 et $80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, correspondant à des viabilités autour des 100%, 81-94% et 75-80% respectivement. L'analyse de l'impédance cellulaire en temps réel montre que les doses de 1.6 et $16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ n'induisent aucun effet sur les cellules. A $80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, un léger effet est mesuré, potentiellement dû à des modifications morphologiques et de viabilité. Le contrôle positif, 100 μM de Chlorpromazine, un hépatotoxique, induit en comparaison un effet drastique sur les cellules. Cet effet est symbolisé par une diminution rapide du CI, suivi d'une augmentation progressive jusqu'à 24h après exposition, possiblement due à la métabolisation de ce composé par les cellules HepaRG, dont la capacité de métabolisation est connue.

Après les tests de viabilité, nous avons réalisé un suivi d'internalisation (6 et 24h) des différentes NPs par HepaRG en imagerie TEM à la concentration de $16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Nous avons ainsi observé que les M-MSNs natives et recouvertes de DMPC étaient internalisées en grande quantité dès 6h, ce qui n'était pas le cas de celles recouvertes de PEG. A 24h, le nombre de NPs DMPC internalisées était bien plus élevé comparé aux NPs natives, alors que les NPs PEGylées ne pénétraient quasiment pas dans les cellules. Le rôle des chaînes de PEG en surface est de ralentir la formation de la couronne de protéines. En milieu de culture, les protéines sériques bovines contraintes par l'encombrement stérique du PEG s'adsorbent vraisemblablement plus lentement à la surface des NPs. Ainsi, l'influence de la corona formée autour des NPs pourrait être fortement responsable de la vitesse d'internalisation des différentes NPs. Nous avons ensuite réalisé des puces d'expression génique (8 x 60k whole human gene expression, Agilent) afin d'étudier de manière fine les changements moléculaires subtils provoqués par ces différentes NPs aux trois doses testées à 24 et 48h. Nous avons ainsi pu distinguer :

- **Un effet modéré et transitoire à faible dose**

A 24h d'exposition, à des doses de 1.6 et $16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, les M-MSNs natives et PEG n'altèrent quasiment pas l'expression des gènes des cellules HepaRG, contrairement aux DMPC. A 48h,

l'expression des gènes est proche de celle des cellules contrôle (non traitées), témoignant d'un effet transitoire. Cet effet modéré et transitoire cesse à la dose de 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Celle-ci est suffisamment importante pour induire de fortes modulations de gènes à 24h, amplifiées à 48h d'exposition. Néanmoins, les M-MSNs recouvertes de PEG font exception, car à 24h elles n'induisent qu'un faible effet à 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ contrairement aux deux autres types de NPs. Cependant, après 48h d'exposition, les trois types de NPs déclenchent les mêmes effets.

Comme dans notre étude transcriptomique précédente ([article 1](#)), nous avons donc défini la dose 1.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ comme étant le NOTEL, et celle de 16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ en tant que LOTEL.

- **Des mécanismes de reconnaissance et d'internalisation à forte dose**

Il est intéressant de noter que nous n'avons pas mis en évidence les voies de signalisation classiques d'endocytose clathrine- ou calvéoline-dépendantes. Cependant, cette absence est contrebalancée par la présence de nombreux récepteurs transmembranaires dont l'expression est modulée. Cela est le cas par exemple de récepteurs couplés aux protéines G, d'intégrines ou de récepteurs de type Toll. L'activation de ce type de récepteurs n'est pas anodine, puisque ces trois types de NPs sont recouverts de protéines sériques et que ce sont elles qui gouvernent la reconnaissance des NPs par les cellules. Notre point de vue est que les cellules pourraient être leurrées par la corona, déclenchant ainsi des réponses cellulaires de défense du type de celles adaptées à la reconnaissance de pathogènes.

- **La perturbation du système hépatobiliaire**

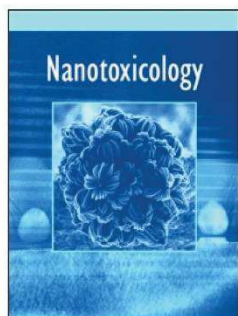
Nous avons ici utilisé notre méthode quantitative de traitement des données massives « pathway driven », sans *a priori*. Nous avons pu mettre en évidence un ensemble de voies de signalisation significativement altérées par la présence des différents types de NPs et ainsi pu déterminer la séquence possible d'évènements qui conduit à la perturbation du système hépatobiliaire en présence de 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de M-MSNs. Cette perturbation se décompose en différentes étapes :

- **Induction de cytokines pro-inflammatoires.** En plus du caractère pro-inflammatoire, ces cytokines sont capables d'inhiber des voies impliquant des récepteurs nucléaires.

- **Les récepteurs nucléaires, en particulier la voie PXR/RXR.** Les récepteurs X des rétinoïdes (RXR) sont des récepteurs nucléaires qui déclenchent l'induction de nombreuses molécules, dont les CYP. La voie RXR est ici réprimée.
- **Les enzymes de phases I et II.** Ces enzymes jouent un rôle important dans la réponse métabolique aux xénobiotiques, comprenant la famille des CYP (cytochrome P450), et les enzymes de conjugaisons de phase II. De nombreuses enzymes sont induites par la voie PXR. Chez les hépatocytes, les CYP sont également impliqués dans la synthèse des acides biliaires. Or, ces enzymes sont réprimées après exposition aux différentes NPs.
- **Les pompes d'efflux.** L'exportation des sels biliaires, des anions organiques, ou des phospholipides, est effectuée par des protéines de transport transmembranaires. Certaines sont également impliquées dans le recyclage de l'acide biliaire. Dans nos données, l'expression de l'ensemble de ses pompes est réprimée.
- **La cholestase hépatique.** L'expression réduite de l'ensemble de ces molécules correspond à une perturbation appelée cholestase hépatique. La cholestase est le résultat d'une accumulation des acides biliaires au niveau intrahépatique. Lors de dommages cholestatiques élevés les hépatocytes réagissent en déclenchant tout une série de mécanismes protecteurs. Ces mécanismes de défense incluent notamment la répression de la synthèse et de l'import d'acides biliaires pour bloquer leur accumulation cytotoxique.

En conclusion, les NPs natives et fonctionnalisées ne déclenchent pas de toxicité à 1.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et induisent une légère toxicité parfaitement réversible à 16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Ce qui nous permet de définir cette dernière valeur comme un seuil de biocompatibilité avec les cellules HepaRG. Nous avons également montré le ralentissement de l'internalisation des NPs lorsqu'elles sont PEGylées ainsi que leurs effets transcriptomiques différés par rapport aux NPs natives et aux lipidiques. Nous avons également montré qu'une dose de 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) déclenche l'enchaînement des événements de l'AOP (Adverse Outcome Pathway) de la cholestase hépatique.

Ce résultat démontre que cette méthodologie est adaptée à la toxicologie prédictive par analyse des réponses biologiques cellulaires après exposition à des substances exogènes.



Biocompatibility assessment of functionalized magnetic mesoporous silica nanoparticles in human HepaRG cells

Cédric Pisani, Estelle Rascol, Christophe Dorandeu, Clarence Charnay, Yannick Guari, Joël Chopineau, Jean-Marie Devoisselle & Odette Prat

To cite this article: Cédric Pisani, Estelle Rascol, Christophe Dorandeu, Clarence Charnay, Yannick Guari, Joël Chopineau, Jean-Marie Devoisselle & Odette Prat (2017): Biocompatibility assessment of functionalized magnetic mesoporous silica nanoparticles in human HepaRG cells, *Nanotoxicology*, DOI: [10.1080/17435390.2017.1378749](https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1378749)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/17435390.2017.1378749>



© 2017 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.



Published online: 22 Sep 2017.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 6



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Biocompatibility assessment of functionalized magnetic mesoporous silica nanoparticles in human HepaRG cells

Cédric Pisani^{a,b}, Estelle Rascol^a, Christophe Dorandeu^a, Clarence Charnay^c, Yannick Guari^c, Joël Chopineau^a, Jean-Marie Devoisselle^a and Odette Prat^b

^aMACS, UMR 5253 CNRS-ENSCM-UM, Institut Charles Gerhardt de Montpellier, Montpellier, France; ^bDirection de la Recherche Fondamentale-BIAM, CEA, Bagnols-sur-Cèze, France; ^cIMNO, UMR 5253 CNRS-ENSCM-UM, Institut Charles Gerhardt de Montpellier, Montpellier, France

ABSTRACT

Magnetic mesoporous silica nanoparticles (M-MSNs) are a promising class of nanoparticles for drug delivery. However, a deep understanding of the toxicological mechanisms of action of these nanocarriers is essential, especially in the liver. The potential toxicity on HepaRG cells of pristine, pegylated (PEG), and lipid (DMPC) M-MSNs were compared. Based on MTT assay and real-time cell impedance, none of these NPs presented an extensive toxicity on hepatic cells. However, we observed by transmission electron microscopy (TEM) that the DMPC and pristine M-MSNs were greatly internalized. In comparison, PEG M-MSNs showed a slower cellular uptake. Whole gene expression profiling revealed the M-MSNs molecular modes of action in a time- and dose-dependent manner. The lowest dose tested ($1.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) induced no molecular effect and was defined as 'No Observed Transcriptional Effect level.' The dose $16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ revealed nascent but transient effects. At the highest dose ($80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), adverse effects have clearly arisen and increased over time. The limit of biocompatibility for HepaRG cells could be set at $16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ for these NPs. Thanks to a comparative pathway-driven analysis, we highlighted the sequence of events that leads to the disruption of hepatobiliary system, elicited by the three types of M-MSNs, at the highest dose. The Adverse Outcome Pathway of hepatic cholestasis was implicated. Toxicogenomics applied to cell cultures is an effective tool to characterize and compare the modes of action of many substances. We propose this strategy as an asset for upstream selection of the safest nanocarriers in the framework of regulation for nanobiosafety.

ARTICLE HISTORY

Received 23 June 2017
Revised 22 August 2017
Accepted 8 September 2017

KEYWORDS

Nanomedicine; particle characterization; whole-gene expression; adverse outcome pathway; hepatic cholestasis

Introduction

Mesoporous silica nanocarriers (MSNs) are one of the most promising nanomaterials for drug delivery in nanomedicine because of their outstanding features, such as easy synthesis, tunable size, tailorable pore volume, and highly versatile surface (Lu et al. 2010; Yang, Gai, and Lin 2012). Silanol groups present on the surface of MSNs can be functionalized with various ligands, which could be one way of controlling nanoparticle (NP) biodistribution and the design of specific targeted delivery systems (Bouchoucha et al. 2016; Li et al. 2016). MSNs have been widely studied for their capability to load and release various drugs (Vallet-Regí, Balas, and Arcos 2007; Deodhar, Adams, and Trewyn 2017). More specifically, by creating a core-shell structure

composed of an Fe_3O_4 core surrounded by a mesoporous silica shell, magnetic properties have been added to MSNs (Rho et al. 2014; Nyalosaso et al. 2016). These magnetic MSNs (M-MSNs) are of particular interest in nanomedicine as targeting tools for theranostics, combining co-delivery of therapeutic and imaging functions in cancer diagnostics and therapy (Vivero-Escoto et al. 2010; Xie, Lee, and Chen 2010; Li et al., 2012).

The main challenge in developing effective nanocarriers is to achieve a design that combines optimal targeted delivery, biocompatibility of the nanocarrier itself in order to avoid collateral cell toxicity, and a stealth capability to escape the rapid clearance triggered by the immune system after injection into the blood. Indeed, investigation of the

CONTACT Odette Prat  odette.prat@cea.fr  Direction de la Recherche Fondamentale-BIAM, CEA, Bagnols-sur-Cèze, France

© 2017 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, and is not altered, transformed, or built upon in any way.

in vivo biodistribution of functionalized MSNs has shown that the majority are observed in the liver and spleen (Liu et al. 2011; Rascol et al. 2017), with most of the Si injected into mice excreted in the urine and feces (94%) (Lu et al. 2010).

The most common functionalization is the grafting of poly(ethylene glycol) (PEG) onto the NP surface. PEG is known to be able to minimize the nonspecific binding of biomolecules, especially proteins, by steric hindrance (He et al. 2011; Uz, Bulmus, and Alsoy Altinkaya 2016) and to increase the life-time in the bloodstream (Perry et al. 2012). Ashley et al. reported another class of nanocarriers combining the properties of liposomes and mesoporous silica particles, that is high specificity, enhanced cargo capacity, and long-term stability (Ashley et al. 2011). A lipid-bilayer coating composed of 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) around mesoporous silica NPs was reported to be especially adapted for this use (Savarala et al. 2010; Durfee et al. 2016).

To assess the biocompatibility of these various nanocarriers, cell-based assays must be used at first-line, in accordance with the 3Rs rule of Russell and Burch (1959). The metabolically competent human HepaRG cell-line represents a pertinent surrogate for primary human hepatocytes to investigate drug toxicity *in vitro* (Guillouzo 1998; Antherieu et al. 2012). This cell-line has the capability to differentiate into two types of cells: hepatocyte-like colonies surrounded by clear primitive biliary cells. Recently, omics technologies have entered the field of toxicology, leading to toxicogenomics, a very powerful tool for studying the toxicity of substances using cell-based assays and for deciphering chemical modes of action (Hartung 2010; Jennings et al. 2013; Pisani et al. 2015). In particular, the transcriptomic similarity of HepaRG to primary human hepatocytes is encouraging for the use of this model to study xenobiotic metabolism and hepatotoxicity (Hart et al. 2010).

Nevertheless, cellular responses to NP exposure remain largely unexplored with transcriptomics, albeit the use of this technology in the safety assessment of nanomaterials would certainly be an asset for predictive toxicology (Jennings et al. 2013; Pisani et al. 2015).

In this study, we used HepaRG cells to investigate the *in vitro* biocompatibility of functionalized M-MSNs. We aimed to differentiate the cellular impact of the additional coatings, PEG and DMPC,

compared with pristine M-MSNs. It is necessary to differentiate the drug-loaded nanocarrier, of which toxicity is wanted against the target cells, and the unloaded nanocarrier itself, which should be safe for the rest of the organism. An exclusive targeting is currently difficult to obtain and collateral effects on healthy cells must be avoided. To this end, we have investigated the cell viability and cellular uptake of these three types of nanocarriers using MTT assays, real-time cell impedance, and transmission electron microscopy (TEM). We carried out gene expression profiling of HepaRG cells at 24 and 48 h after exposure to three concentrations of pristine and coated M-MSNs (1.6, 16, and 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). This strategy allowed the significant hepatic responses triggered by the exposure to these nanocarriers to be highlighted in a time- and dose-dependent manner.

Methods

Synthesis and characterization of M-MSNs

Chemicals

All reagents were obtained commercially and used without any further purification. Hydrated, catalyst-grade, 30–50 mesh iron oxide $\text{FeO}(\text{OH})$, oleic acid (90%), oleylamine (99%), ether ($\geq 99.9\%$), anhydrous ethanol ($\geq 99.8\%$), anhydrous pentane ($\geq 99\%$), anhydrous chloroform ($\geq 99\%$), tetraethoxysilane (TEOS, $\geq 99.9\%$), cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), and ammonium nitrate (NH_4NO_3) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Sodium hydroxide (NaOH) and *n*-docosane (99%) were purchased from Acros (Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France), and chlorpromazine hydrochloride from Sigma Aldrich.

1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) was purchased from Avanti Polar Lipids (Paris, France). 1X PBS (2.66 mM KCl, 1.47 mM KH_2PO_4 , 137.93 mM NaCl, 8.05 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) was provided by Gibco (Thermo Fisher Scientific). Silanized PEG ($\text{CH}_3\text{O}-\text{PEG}2000-\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$) was purchased from Rapp Polymere (Tuebingen, Germany). 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was provided by Promega (Charbonnières les Bains, France). The Epoxy Embedding Medium kit (EponTM) was purchased from Sigma Aldrich.

Synthesis of pristine, PEG-, and DMPC-coated M-MSNs. The complete synthesis procedures of

pristine, PEG-, and DMPC-coated M-MSNs were described in detail by Nyalosaso et al. (2016). Pristine M-MSNs were synthesized in a two-step method. This method allows the formation of monodisperse and homogeneous core-shell Fe_3O_4 MSN NPs with a single magnetic iron oxide core per NP surrounded by a mesoporous silica shell. For PEG M-MSNs, the pegylation of NPs was carried out during the synthesis of the mesoporous silica shell. After the condensation induced by the injection of TEOS during the silica shell procedure, the mixture was slowly cooled to 50 °C with continuous stirring. A solution of 1 mL ethanol supplemented with 100 mg silanized PEG 2000 was slowly added. The resulting mixture was stirred overnight. This mixture was cooled to room temperature before applying the washing steps, as described in Nyalosaso et al. (2016).

Lipid coating of M-MSNs was performed in a two-step method encompassing the preparation of small unilamellar vesicles (SUVs) according to the Bangham method (Bangham, Standish, and Watkins 1965), followed by mixing of these SUVs with pristine M-MSNs (with a correspondence of 8/1 surface-area ratio of SUVs/NPs). After sonication and agitation, DMPC-coated M-MSNs were isolated by four centrifugation steps (4000g, 20 min) to remove excess SUVs. All processes were carried out in an endotoxin-free environment.

Characterization of nanoparticles. TEM observations were carried out on a JEOL 1200 EX II electron microscope (JEOL, Japan). NP samples were prepared on copper grids with a thin layer of Formvar and evaporated carbon (Agar scientific, UK). Cryogenic TEM (CryoTEM) observations of the NPs covered by a lipid bilayer were performed using a JEOL 220FS electron microscope (JEOL, Japan) with a $4\text{ k} \times 4\text{ k}$ slow scan CCD camera (Gatan, Evry, France). Samples were prepared on copper grids with a Lacey R 2/2 carbon film (Eloise, France).

Hydrodynamic diameter and zeta potential were determined using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., UK). Each measurement was performed at 20 µg/mL NPs after 2 min bath sonication in HBS (20 mM Hepes, 5 mM NaCl) or 1X PBS (ThermoFisher Scientific) at pH 7.4 and 20 °C.

Cell culture and analyses

Cell culture (HepaRG)

Cryopreserved, differentiated HepaRGTM cells were obtained from Biopredic International (Rennes, France). Cells were thawed in William's E medium (Biopredic International) supplemented with additives (Biopredic International) composed of elements essential for the culture, such as fetal bovine serum and antibiotics, according to the supplier's procedure. Cells were seeded into flat-bottom multi-well plates at concentrations depending on the plate format (480 000 and 72 000 cells per well for 24- and 96-well plates, respectively). The medium was renewed as recommended. Cells were incubated at 37 °C and 5% CO_2 for 7 days in order to constitute a monolayer with active CYP activities.

Cell viability assay (MTT). Cell viability assays were performed using the MTT assay (TOX1 Kit, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). For this, 72 000 cells per well were seeded into 96-well plates in William's E medium supplemented with ADD670 additive (Biopredic International). Cells were exposed to increasing NP concentrations (pristine, PEG-, and DMPC-coated M-MSNs). After 48 h exposure, samples were processed according to the supplier's procedure. Absorbance was recorded using Multiskan Spectrum (Thermo Fisher Scientific) at 470 nm. Results are expressed as mean percentage of viable cells $\pm$ SD ($n = 3$) compared with control cells.

Due to the presence of the iron core, M-MSNs sediment quickly onto the well bottom and dosimetry are expressed as mass per well surface. Thus, for other techniques, doses were expressed in µg/cm² to allow direct comparison between techniques that did not use the same well surface in cell culture plates.

Real-time cell impedance measurement (XCELLigence technology)

A background resistance of the E-plates (ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA) was determined with 100 µL culture medium. HepaRGTM cells were seeded at 44 000 cells per well. E-plates were placed into the Real-Time Cell Analyzer (RTCA) station (ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA) and incubated at 37 °C. The adhesion phase of cells was recorded every 1 min during the first 12 h and then every 15 min up to 7 days. After 7 days, cells were exposed ($n = 3$) to pristine, PEG-,

and DMPC-coated M-MSNs at 1.6, 16, and 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, and impedance data were monitored every 1 min for 24 h (early effects), then every 15 min for 96 h (late effects). The impedance of unexposed control cells was also recorded. Cell index (CI) raw data values were calculated by the RTCA software 2.0 (ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA). Normalized CIs were also calculated by the software, based on the NP exposure time-point.

Human gene expression microarrays (Agilent Human SurePrint V3 8x60K). HepaRGTM cultures ($n=3$) were exposed for 24 or 48 h to three concentrations of NPs, including pristine, PEG-, and DMPC-coated M-MSNs (1.6, 16, and 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Unexposed cells were used as the control for each time-point. Total RNAs were extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Quantification and qualification of total RNAs were performed using the NanoDrop 2000c spectrophotometer (ThermoFisher Scientific) and the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Les Ulis, France), respectively. mRNAs were amplified and labeled with Cyanine-3 fluorophore using the One-color Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent). Hybridization was performed using Human SurePrint V3 8 $\times$ 60K microarrays (Agilent). Fluorescence was recorded (Agilent Scanner) and signal data were extracted with Feature Extraction software (Agilent).

Statistical analysis for transcriptomics. Raw fluorescence data files were submitted to GeneSpring GX 13 software (Agilent Technologies) using a widespread and robust method for determining the significant modulation of gene expression (Wright et al. 2012; Pisani et al. 2015). Eighteen independent analyzes were conducted, namely for each experimental condition (18), three fluorescence data files from exposed cells were compared with three fluorescence data files from unexposed cells. Genes significantly up- or downregulated were determined using a Student's *t*-test with a *p* value set at 0.05 and a Benjamini–Hochberg false discovery rate correction. The fold-change cutoff was set at 2. We, thus, obtained lists of genes that were significantly induced or repressed after exposure to NPs.

Integrative biological analysis. Lists of genes significantly induced or repressed (datasets) obtained

after exposure to different types of NPs were uploaded into Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software (Qiagen) for biological analysis. These datasets were processed to investigate gene functional annotation and distribution into known cell functions and canonical pathways, according to the IPA knowledge database. The significance of highlighted functions and pathways was calculated using a Fisher's exact test with a *p* value set at 0.05. For each dataset, associations with known canonical pathways were expressed by ratios (in percentage), meaning the number of genes in a dataset that belong to a canonical pathway divided by the total number of known genes mapping this pathway. A Fisher's exact test was used to determine a *p* value representing the significance of these associations.

Cellular uptake and localization by TEM.

HepaRGTM cells were seeded on cell-chamber glass coverslips according to the cell culture procedure detailed above. After controlling their adherence and growth for 7 days, cells were exposed to 16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ NPs in William's E medium for 6 and 24 h. The medium was removed and the cells were washed twice with 0.1 M PBS. Cells were fixed by incubation with 2.5% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M PBS for 1 h at room temperature then stained by incubation with 1% osmium tetroxide. Cells were dehydrated using solutions of increasing concentration of EtOH in water. The polymerization was performed by embedding cells in EPON resin. Ultrathin sections (70 nm) were obtained using an ultramicrotome and placed on the copper grids.

Results

Characterization of pristine and coated M-MSNs

Pristine M-MSNs were observed by TEM, which showed NPs composed of a unique magnetic Fe_3O_4 core per particle surrounded by a mesoporous silica shell (Figure 1(A)), with a mean diameter of 117 ± 2 nm (Table 1). These M-MSNs were monodisperse with a low polydispersity index (0.17) and stable at physiological pH with a zeta potential of -39.1 ± 1.4 mV. The PEGylation around the M-MSNs did not alter the silica shell structure (Figure 1(B)) and increased the zeta potential of the NPs up to -30.4 ± 2.9 mV (Table 1). These PEG M-MSNs were monodisperse and stable at physiological pH with a

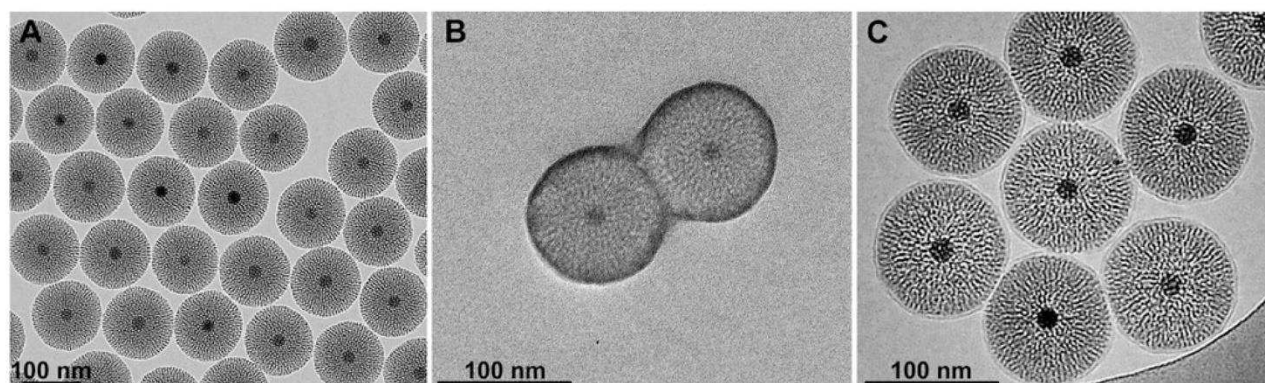


Figure 1. TEM characterization of M-MSNs. (A) As the pristine state, (B) covered with PEG, and (C) cryogenic TEM characterization of lipid bilayer DMPC M-MSNs.

Table 1. Physicochemical characterization of pristine M-MSNs and those covered with PEG or DMPC lipid bilayer.

Nanoparticles	Diameter by TEM and CryoTEM* (nm)	Hydrodynamic diameter by DLS (nm)	Polydispersity index	Zeta potential at pH 7.4 (mV)
Pristine M-MSNs	117 (± 2)	172 (± 6)	0.17	−39.1 (± 1.4)
PEG M-MSNs	123 (± 3)	156 (± 1)	0.18	−30.4 (± 2.9)
DMPC M-MSNs*	132 (± 4)	180 (± 2)	0.12	−10.3 (± 0.4)

Values are mean $\pm$ standard deviation ($n = 3$).

*Characterization by CryoTEM.

size of 123 ± 3 nm. The polyethylene glycol grafted at the nanoparticles' surface was differentiated by heavy staining with OsO_4 (Brown and Butler 1997). With TEM imaging we measured the PEG layer thickness at 7 ± 1 nm. The lipid-bilayer DMPC coating of M-MSNs induced an increase of the zeta potential up to -10.3 ± 0.4 mV, close to the zeta potential of small unilamellar DMPC vesicles alone (-4.5 ± 0.7 mV). These DMPC M-MSNs were monodisperse and also stable at physiological pH. CryoTEM imaging showed a mean diameter of 132 ± 4 nm, including the DMPC bilayer.

Cell viability assays

The viability of HepaRG cells exposed to pristine, PEG-, and DMPC-coated M-MSNs was performed by MTT assay after 48 h exposure. As shown in Figure 2, the presence of NPs did not induce a drastic loss of viability of HepaRG cells. We observed a small dose-dependent decrease of the cell viability for all type of NPs, with a maximum loss of viability observed for pristine M-MSNs around 35% at $400 \mu\text{g/mL}$ (corresponding to $120 \mu\text{g/cm}^2$ in a 96-well plate). The viability of PEG M-MSNs was close to that of pristine M-MSNs, with a maximum loss of

viability of around 25% at the highest dose. DMPC M-MSNs induced a less than 20% decrease of cell viability and reached a plateau from $60 \mu\text{g/mL}$. Chlorpromazine, a hepatotoxic drug, was used as the positive control and induced a drastic cytotoxic effect on HepaRG cells, with an IC_{50} of $12 \mu\text{g/mL}$ ($34 \mu\text{M}$). Based on these results, three concentrations of NPs (1.6 , 16 , and $80 \mu\text{g/cm}^2$) were chosen to follow their cellular uptake by TEM, to analyze their physiological impact by cell impedance, and to identify the molecular events triggered by these different NPs by gene expression profiling.

xCELLigence experiments

HepaRG cells were exposed to pristine M-MSNs, PEG M-MSNs, and DMPC M-MSNs at 16 and $80 \mu\text{g/cm}^2$ for 3 days and viability and morphology modulations were monitored by real-time cell impedance on HepaRG cells (Figure 3). As a control, all NPs were tested in acellular conditions and no interference on impedance measurements was observed, in accordance with other studies of cell impedance with NPs (Sergent, Paget, and Chevillard 2012).

At $16 \mu\text{g/cm}^2$, the real-time cell impedance did not detect any change in morphology or viability

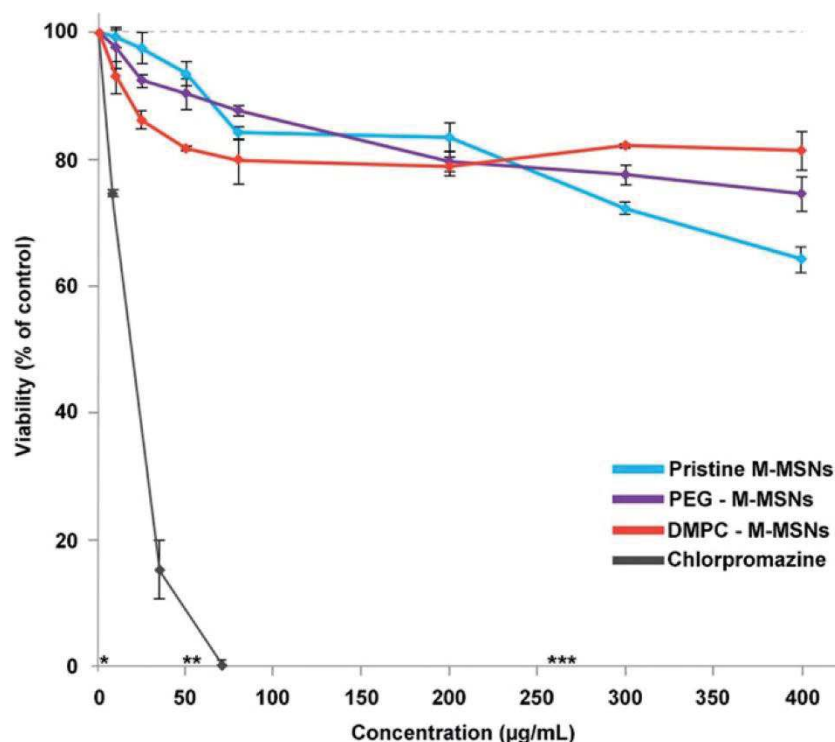


Figure 2. MTT cell viability assay of HepaRG cells exposed for 48 h to increase concentrations of pristine M-MSNs (blue curve), PEG M-MSNs (purple curve), DMPC M-MSNs (red curve), and chlorpromazine as the positive control (grey curve). Concentration equivalences: * = 1.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, ** = 16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, and *** = 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Results are expressed as mean percent viable cells $\pm$ SD ($n=3$) compared with control cells.

over the experimental time-period for these three types of NPs (Figure 3(A)). At 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, we observed a biphasic response for the three types of NPs, including a small decrease in the CI during the first 24 h of exposure followed by a stabilization until the end of the experiment (Figure 3(B)). Chlorpromazine showed a drastic deleterious effect on CI, and a slow increase until 24 h.

Kinetics of cellular NP uptake and localization

The kinetics of cellular uptake and localization of pristine, PEG-, and DMPC-coated M-MSNs at 16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ were observed by TEM after 6 and 24 h exposure (Figure 4). The results showed a rapid cellular internalization of pristine (Figure 4(A)) and DMPC (Figure 4(C)) M-MSNs from 6 h of exposure. No cellular uptake was observed for PEG M-MSNs at 6 h exposure (Figure 4(B)). After 24 h exposure, pristine M-MSNs (Figure 4(D)) and DMPC M-MSNs (Figure 4(F)) were internalized as large groups in vesicles, whereas PEG M-MSNs were internalized in much smaller quantities (Figure 4(E)). None of these NPs were observed in the nucleus.

Transcriptomic analyses

Gene expression changes were evaluated in three biological replicates using Agilent Human V3 SurePrint 8 $\times$ 60K Microarrays. Figure 5 shows the number of differentially expressed transcripts detected in response to exposure to 1.6, 16, and 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pristine, PEG-, and DMPC-coated M-MSNs for 24 h (Figure 5(A)) and 48 h (Figure 5(B)). The number of differentially expressed transcripts reflects the magnitude of the cellular effects of NPs.

At 24 h exposure, a dose-dependent response to the three types of M-MSNs was observed, ranging from 137 to 3580, 198 to 5447, and 557 to 1185 differentially expressed transcripts for pristine, PEG-, and DMPC-coated M-MSNs, respectively. At this time, DMPC M-MSNs induced the greatest modulation of gene expression at 1.6 and 16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, whereas pristine M-MSNs induced the lowest effect on gene expression at these two doses. However, pristine M-MSNs induced the highest effect at 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, with 3580 modulated transcripts.

After 48 h exposure, gene expression was not differentiated from control cells with 1.6 and 16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

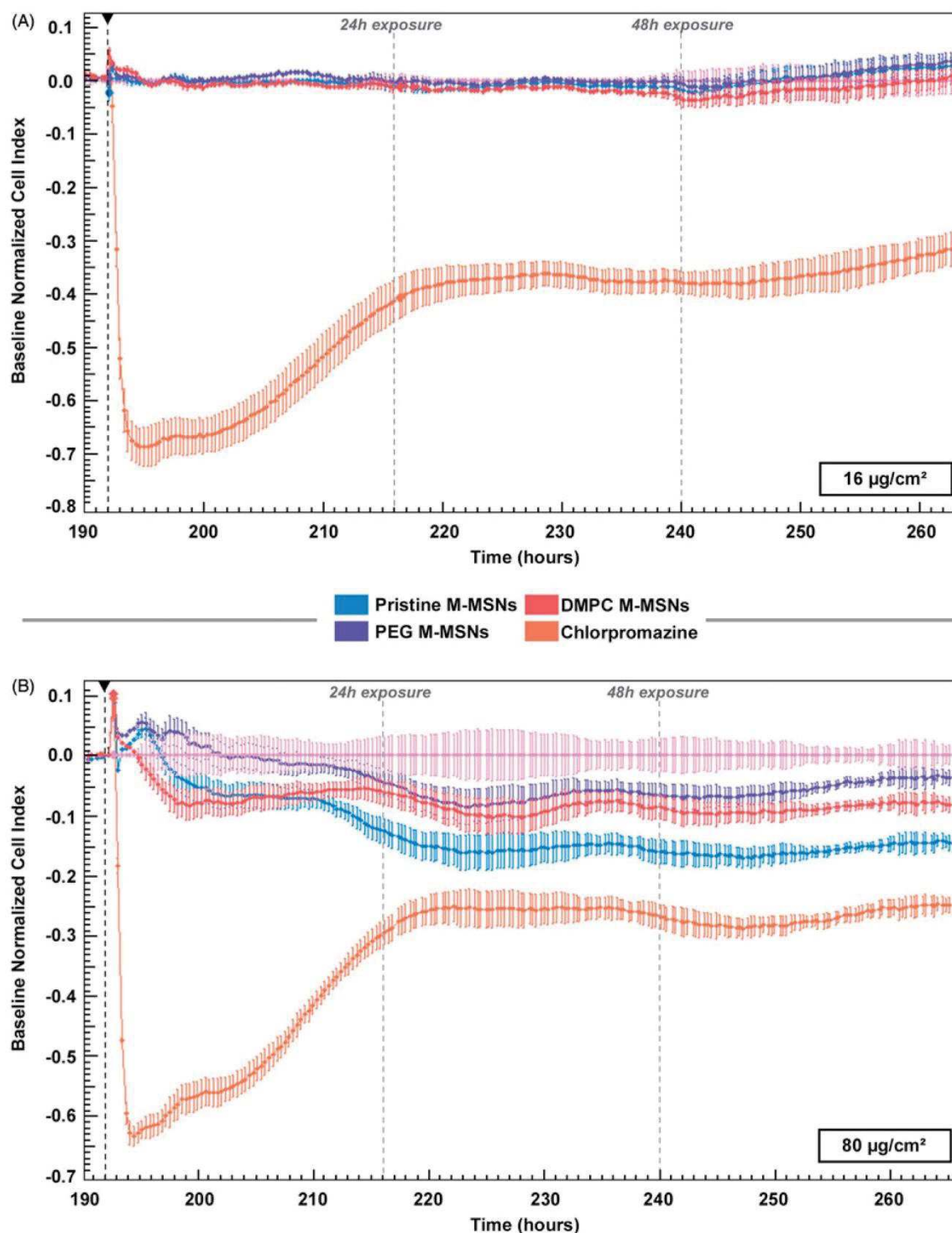


Figure 3. Real-time impedance cell index (CI) monitoring of HepaRG cells ($n = 3$) exposed to (A) $16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ and (B) $80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ pristine M-MSNs (blue), PEG M-MSNs (purple), and DMPC M-MSNs (red) for 72 h. The black arrow represents the starting point of exposure. CI was normalized at this point to ensure inter-dose comparison and control cells were defined as baseline.

cm^2 pristine M-MSNs and DMPC M-MSNs, indicating a transient effect for the first 24 h. The highest dose showing no effect ($16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) can be defined here as the 'No Observed Transcriptional Effect Level' (NOTEL). However, this transient effect no longer

existed at $80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$: pristine M-MSNs altered 3440 transcripts at 48 h versus 3580 at 24 h and at this concentration the cellular impact of DMPC M-MSNs was even highly amplified (2800 modulated transcripts at 48 h versus 1185 at 24 h). For PEG M-

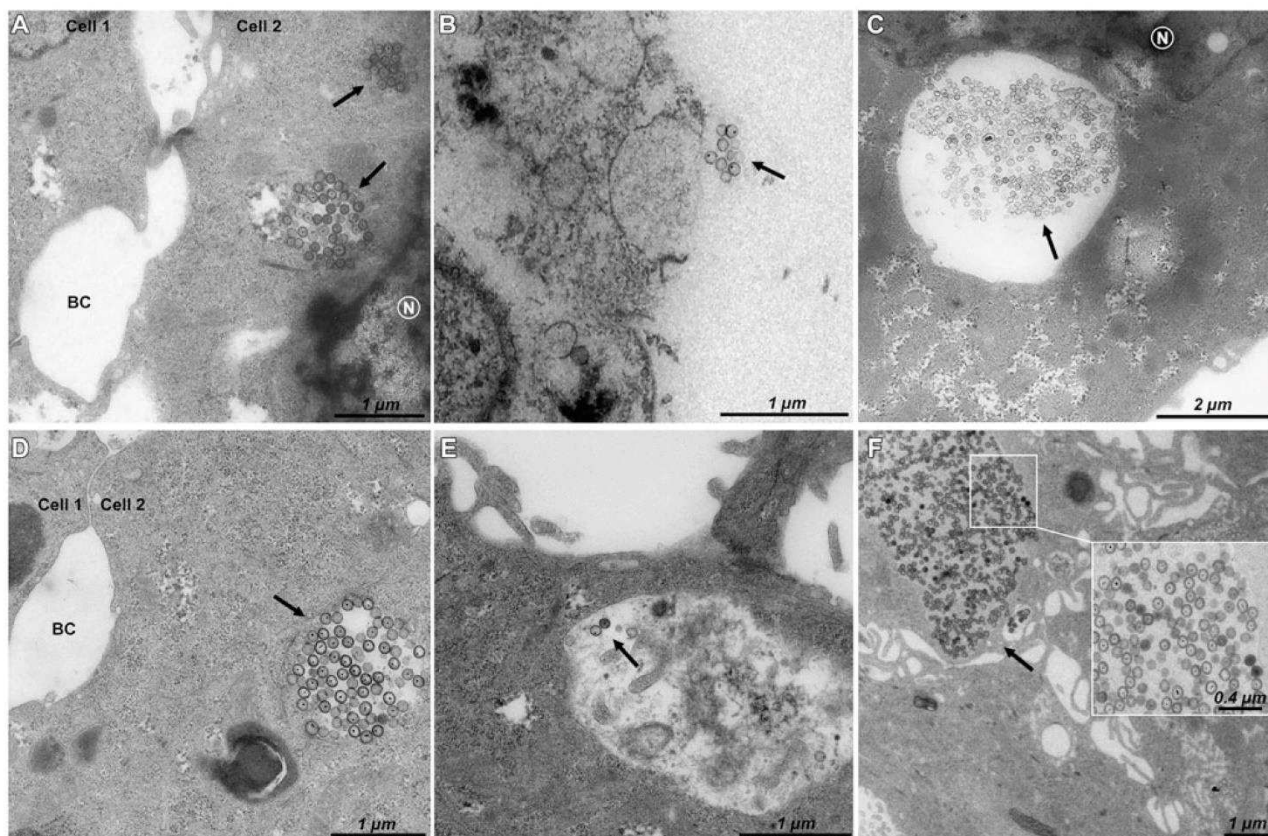


Figure 4. TEM imaging of HepaRG cells exposed to $16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ for 6 h to (A) pristine M-MSNs, (B) PEG M-MSNs, (C) DMPC M-MSNs, and for 24 h to (D) pristine M-MSNs, (E) PEG M-MSNs, (F) DMPC M-MSNs. N indicates the nucleus, BC indicates bile canaliculi, and arrows indicate NPs.

MSNs, we observed a reversible effect on gene expression only at $1.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ between 24 and 48 h. A dose of $16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ induced a steady moderate effect between 24 and 48 h but the highest dose, $80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, gave rise to a drastic increase in the number of altered genes between 24 and 48 h exposure. All fold-changes and p values of modulated transcripts by condition (doses and time-points) are listed in ESI, Tables S1–S3.

We identified the most relevant canonical pathways involved, in the hepatic environment, after 24 and 48 h exposure, for all NP doses, using the IPA software. For each dose and time-point, we calculated several ratios indicating the percentage of modulated genes in our dataset belonging to known canonical pathways. The significance of these pathways was tested according to a Fisher's statistical test (p value < 0.05). Figure 6 reports the six most relevant canonical pathways altered by pristine, PEG-, and DMPC-coated M-MSNs ($80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, at 24 and 48 h). All modulated genes

belonging to these pathways, with their fold-changes and p values, are reported in ESI Table S4 for all time-points and doses. These pathways belong to well-known hepatic functions and xenobiotic responses.

At 24 h exposure (Figure 6(A)), pristine M-MSNs induced the highest effect on these six pathways, followed by DMPC M-MSNs and then PEG M-MSNs. Few genes were modulated by the presence of PEG M-MSNs at 24 h, with less than 10% of modulated genes involved in these pathways. Despite the difference of differentially expressed genes measured between pristine and DMPC M-MSNs (i.e. 3580 and 1185 modulated transcripts at 24 h, respectively), the 'bile acid biosynthesis' pathway was modulated within the same magnitude (61.5% and 53.8%, respectively). In addition, 'bile acid biosynthesis' was the most affected pathway at 24 and at 48 h exposure. It should be noted that PEG-coated M-MSNs also modulated this pathway, despite a level of 7.7% at 24 h (ESI

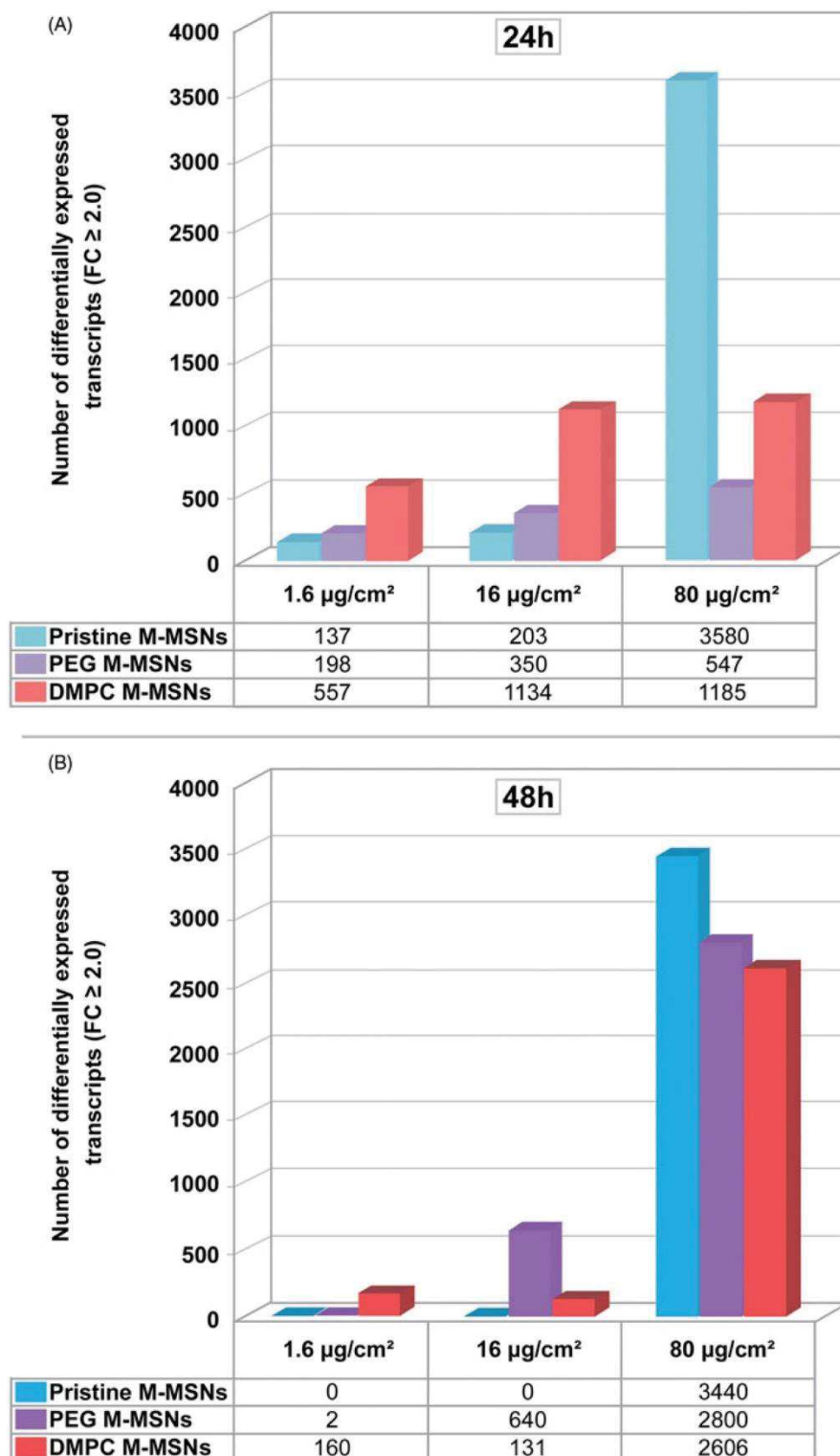


Figure 5. Time- and dose-dependent effects of exposure to NPs on the number of significantly differentially expressed genes. HepaRG cells were exposed to 1.6, 16, and 80 µg/cm² pristine, PEG-, and DMPC-coated M-MSNs for 24 or 48 h. After extraction and labeling, RNA was hybridized to a human oligo microarray (6 × 60 k Agilent V3 SurePrint). Bars represent the number of differentially expressed transcripts after statistical analysis using Genespring GX13 software (Agilent), with a *p* value ≤ 0.05 and a fold-change ≥ 2.

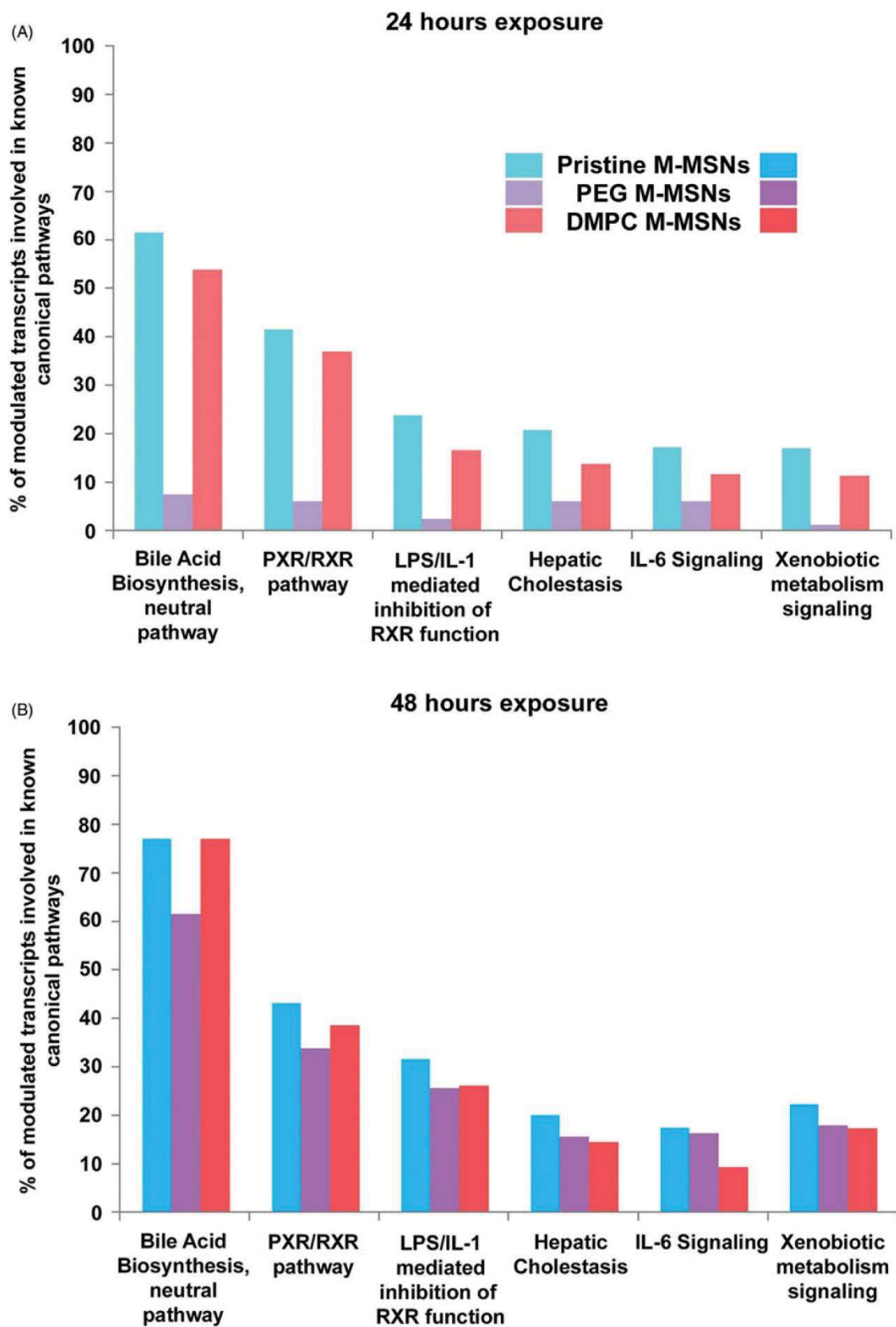


Figure 6. Canonical pathways elicited by each M-MSN ($80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). The percentage of modulated transcripts of our datasets belonging to six major altered canonical pathways after (A) 24 h and (B) 48 h exposure to $80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ M-MSNs. These pathways were all significant according to a Fisher's statistical test (p value < 0.05), revealed with Ingenuity Pathway Analysis (IPA, QIAGEN).

Table S4). At 48 h exposure (Figure 6(B)), the most important finding was that PEG M-MSNs drastically increased the involvement of these pathways, from 7.7% at 24 h to 61.5% at 48 h for 'bile acid biosynthesis', and from 6.2% at 24 h to 33.8% at 48 h for 'PXR/RXR pathway'. This increase was observed for all pathways.

Discussion

In the current study, we investigated the biocompatibility of M-MSNs with two different types of coverage, PEG or lipid-bilayer DMPC, compared to pristine M-MSN. The physicochemical characterization showed that these three types of nanocarriers were monodisperse spheres with a diameter close to 100 nm (Table 1), composed of a single magnetic Fe_3O_4 core surrounded by a mesoporous silica shell (Figure 1). Both decorations, that is PEG and DMPC, did not alter the silica shell structure (Figure 1(B, C)). The PEGylation around the M-MSN surface allowed the creation of a steric hindrance of 7 nm. The lipid bilayer DMPC coating of M-MSNs induced an increase of the zeta potential up to around -10 mV, close to the zeta potential of small unilamellar DMPC vesicles (-4.5 mV) (Nyalosaso et al. 2016). Moreover, cryoTEM imaging showed a DMPC bilayer thickness close to 7.5 nm (Figure 1(C)), as reported in the literature (Durfee et al. 2016).

The HepaRG model is a promising alternative to primary hepatocytes. In particular, they are able to express numerous P450 cytochromes, allowing the performance of many normal metabolic liver functions such as the production of phase I and II enzymes and transmembrane transport proteins, unlike other hepatocyte cell lines such as HepG2 (Guillouzo et al. 2007; Kanebratt and Andersson 2008; Turpeinen et al. 2009; Jennen et al. 2010).

In the current study, due to the presence of the iron core, M-MSNs sediment quickly onto the cell surface and dosimetry is expressed as mass per well surface ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$). This enables direct comparison between techniques that do not use the same well surface in cell culture plates (Lison et al. 2008). The choice of doses is essential in toxicology and must be as close as possible from the *in vivo* situation. Three concentrations to be tested were chosen for all types of NPs, that is 1.6, 16, and $80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

(corresponding to 6, 60, and $300 \mu\text{g}/\text{mL}$, respectively) in accordance with both literature and our viability assays data (Hudson et al. 2008; Witaspl et al. 2009). In particular, this choice was based on the concentration of $40 \text{ mg}/\text{kg}$ already used for bio-distribution studies by injection in mice (Lu et al. 2010; Liu et al. 2011; Rascol et al., 2017). One milligram per mouse of 25 g with 2 mL of blood corresponds approximately to a concentration of $500 \mu\text{g}/\text{mL}$. This concentration did not alter liver tissues as observed by Rascol et al., despite M-MSNs presence in the liver, attested by the silica content measured by ICP-MS. In the current study, the testing concentration range has been limited to $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ so as not to trigger an excessive cell mortality.

Biocompatibility at low doses

HepaRG cells were exposed to a range of nanocarrier concentrations to assess their impact on cell viability. Pristine, PEG, or DMPC M-MSNs induced a slight dose-dependent decrease in cell viability (Figure 2) that did not exceed 35%, a maximum reached with the highest concentration tested ($400 \mu\text{g}/\text{mL}$, corresponding to $120 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) of pristine NPs after 48 h exposure.

For studying kinetics, we used real-time cell impedance technology (RTCA). The CI reflects modifications of both cell morphology and cell viability (Atienzar et al. 2013). HepaRG cells were exposed to 16 and $80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ pristine, PEG, and DMPC M-MSNs for 3 days (Figure 3). At $16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, the real-time cell impedance did not detect any change in morphology or viability for these three types of NPs (Figure 3(A)). At $80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, we observed a biphasic response for the three types of NPs, including a small decrease of the CI during the first 24 h exposure followed by a stabilization until the end of the experiment (Figure 3(B)). Chlorpromazine ($100 \mu\text{M}$), as the positive control, showed a fast deleterious effect on CI because of cell damage, followed by a slow recovery until 24 h, likely due to the drug metabolism and the rearrangement of the cell layer.

Based on these assays, none of these NPs presented a real toxicity at the concentrations tested. This was an encouraging evaluation as NPs are intended for use as drug nanocarriers and should not cause any kind of cellular change or toxicity.

M-MSN uptake

Albeit we did not observe any modifications of impedance at $16\mu\text{g}/\text{cm}^2$, TEM observations at this dose showed an NP uptake by HepaRG cells. Surprisingly, we observed a rapid internalization of pristine (Figure 4(A)) and DMPC (Figure 4(C)) M-MSNs after 6 h exposure at this dose, while no internalization was observed for PEG M-MSNs (Figure 4(B)), which stayed around the cell membrane. After 24 h exposure, pristine (Figure 4(D)) and DMPC (Figure 4(E)) M-MSNs were internalized to a greater extent, while a low level of internalization was observed for PEG M-MSNs. DMPC M-MSNs in particular were trapped as large groups. These three types of NPs were observed in large vesicles without any observable modification of their size and structure. According to Danhier et al., negatively and neutrally charged NPs co-localize mostly with lysosomes (Danhier et al. 2012). With negative zeta potentials at physiological pH (between -40 and -10 mV), the currently studied nanocarriers are probably located in lysosomes. DMPC M-MSNs were observed in larger vesicles, probably phagosomes with respect to their large size. Once in a biological medium containing proteins, the NPs were covered with a protein corona. Our previous experiments showed that M-MSNs were still negatively charged (-20 mV) when surrounded by a protein corona (Pisani et al. 2017a). The main difference is that PEG at the surface of M-MSN may reduce the formation of the corona, thus impeding cellular uptake. Consequently, the internalization of PEG M-MSNs is slowed compared to pristine and DMPC M-MSNs. In addition, it is possible that the use of bovine serum in the human cell culture medium may influence internalization and intracellular functional mechanisms, as suggested by Kim et al. (2014) and as we demonstrated in a recent publication (Pisani et al. 2017b). Indeed, if the cell recognizes the NP-protein complex as non-self, it is probable that this recognition does not take place *in vivo*, where the corona will be constituted of human proteins recognized as self.

Gene expression profiles in HepaRG

We therefore undertook a transcriptomic analysis, a unique technology capable of detecting subtle molecular changes that may occur before any

macroscopic physiological changes are visible. This technique is very sensitive and very low doses of exogenous compounds allow the first deleterious molecular events to be deciphered without triggering multiple and extreme deleterious effects. Indeed, beyond a certain threshold, the cell defense pathways are overwhelmed and numerous signaling pathways are triggered, as well as apoptosis and necrosis. These responses must be avoided because they are no longer compound specific (Pisani et al. 2015). Thereby, HepaRG cells were exposed to the pristine, PEG, and DMPC M-MSNs at the three doses: 1.6 , 16 , and $80\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (corresponding to 6 , 60 , and $300\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively), for 24 and 48 h.

A moderate and transient adverse effect at low doses

The number of differentially expressed transcripts reflects the magnitude of the cellular disruption caused by NPs (Figure 5). In terms of number of genes differentially expressed, a very small dose-dependent response was observed after 24 h exposure with the three types of M-MSNs. At this time-point, the lowest concentrations (1.6 and $16\mu\text{g}/\text{cm}^2$) did not really alter the expression of HepaRG transcripts, with less than 640 differentially expressed genes out of the whole human genome, except for DMPC M-MSNs (1134 altered transcripts). Most importantly, after 48 h exposure, there was no longer any obvious modulation of gene expression at 1.6 and $16\mu\text{g}/\text{cm}^2$ with any of the M-MSNs, clearly indicating a transient effect during the first 24 h. This result was in accordance with the viability and impedance assays.

However, this transient effect was not observed at $80\mu\text{g}/\text{cm}^2$: pristine M-MSNs altered as many transcripts at 48 h as at 24 h, and DMPC M-MSNs altered twice as many transcripts after 48 h than 24 h, reflecting an amplified disruption. For PEG M-MSNs, the effect on gene expression was strictly reversible at $1.6\mu\text{g}/\text{cm}^2$, and the $16\mu\text{g}/\text{cm}^2$ dose induced a steady low-level effect between 24 and 48 h. However, the highest dose, $80\mu\text{g}/\text{cm}^2$, led to a drastic increase in the number of altered genes between 24 and 48 h exposure.

According to Vivero-Escoto et al. (2010), MSN materials are biocompatible with HeLa and CHO cells at concentrations below $100\mu\text{g}/\text{mL}$, while

Table 2. Fold changes (FC) of main transcripts modulated by exposure to pristine, PEG, and DMPC M-MSNs (80 µg/cm² at 24 and 48 h) corresponding to hepatobiliary system disruption.

Gene symbol	Entrez gene name	Pristine M-MSNs		PEG M-MSNs		DMPC M-MSNs		Pathways
		FC (24 h)	FC (48 h)	FC (24 h)	FC (48 h)	FC (24 h)	FC (48 h)	
ABC11	ATP binding cassette subfamily B member 11	–	–4.0	–	–	–	–3.8	1, 2, 4
ABC4	ATP binding cassette subfamily B member 4	–2.4	–2.2	–	–2.2	–	–3.5	4
ABG5	ATP binding cassette subfamily G member 5	–6.3	–17.0	–	–7.0	–3.5	–19.8	1, 4
ABG8	ATP binding cassette subfamily G member 8	–	–9.1	–	–5.7	–3.3	–9.0	1, 4
ACOX2	Acyl-CoA oxidase 2	–2.5	–6.5	–	–3.8	–2.6	–7.6	1
AHR	Aryl-hydrocarbon receptor repressor	–	–2.1	–	–	–	–	6
AKR1C4	Aldo-keto reductase family 1 member C4	–2.9	–3.7	–	–3.6	–2.6	–5.2	1
AKR1D1	Aldo-keto reductase family 1 member D1	–2.3	–6.1	–	–7.5	–2.7	–8.9	1
ALDH1A1	Aldehyde dehydrogenase 1 family member A1	–4.1	–3.0	–	–2.7	–2.8	–2.7	6
ALDH1A3	Aldehyde dehydrogenase 1 family member A3	–	–2.2	–	–2.0	–	–3.6	6
ALDH1L1	Aldehyde dehydrogenase 1 family member L1	–3.6	–6.4	–	–4.7	–2.8	–4.2	1
ALDH1L1	Aldehyde dehydrogenase 1 family member L1	–3.6	–6.4	–	–4.7	–2.8	–4.2	6
ALDH3A1	Aldehyde dehydrogenase 3 family member A1	–2.3	–	–	–3.0	–	–	6
ALDH5A1	Aldehyde dehydrogenase 5 family member A1	–2.1	–2.6	–	–2.2	–	–2.7	6
ALDH6A1	Aldehyde dehydrogenase 6 family member A1	–2.4	–3.9	–	–3.2	–	–3.9	6
ALDH7A1	Aldehyde dehydrogenase 7 family member A1	–4.2	–5.0	–	–4.6	–	–2.4	1, 6
CAT	Catalase	–2.3	–3.4	–	–2.4	–	–3.5	6
CHST11	Carbohydrate sulfotransferase 11	2.8	2.8	–	3.1	2.4	2.9	6
CHST13	Carbohydrate sulfotransferase 13	–	–2.5	–	–	–	–2.3	6
CHST15	Carbohydrate sulfotransferase 15	4.3	2.8	–	–	3.8	–	6
CHST3	Carbohydrate sulfotransferase 3	–	2.3	–	4.0	–	–	6
CITD2	Cbp/p300 interacting transactivator with Glu/Asp rich carboxy-terminal domain 2	–	–2.7	–	–	–	–	6
CRP	C-reactive protein	8.1	12.9	2.1	10.7	4.8	6.6	5
CSF2	Colony stimulating factor 2	6.2	3.0	–	3.0	4.2	–	4
CUL3	Cullin 3	3.0	–	–	–	–	–	6
CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8	3.9	–	–	–	–	–	5
CYP1A1	Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1	–	–	–	–	–2.6	–	6
CYP1A2	Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 2	–5.2	–7.5	–	–9.2	–6.4	–10.8	2, 6
CYP27A1	Cytochrome P450 family 27 subfamily A member 1	–	–3.3	–	–2.1	–	–2.4	4
CYP2A6 (includes others)	Cytochrome P450 family 2 subfamily A member 6	–6.1	–339.0	–	–22.0	–7.7	–89.2	1, 2
CYP2B6	Cytochrome P450 family 2 subfamily B member 6	–2.6	–37.9	–	–7.1	–2.4	–26.3	1, 2, 6
CYP2C19	Cytochrome P450 family 2 subfamily C member 19	–5.0	–13.8	–	–4.3	–2.7	–10.5	1, 2, 6
CYP2C8	Cytochrome P450 family 2 subfamily C member 8	–8.9	–20.7	–	–4.7	–4.9	–10.4	1, 2, 6
CYP2C9	Cytochrome P450 family 2 subfamily C member 9	–3.4	–12.3	–	–4.3	–2.7	–10.8	1, 2, 6
CYP3A4	Cytochrome P450 family 3 subfamily A member 4	–13.1	–70.3	–	–19.0	–4.8	–35.9	1, 2, 6
CYP3A5	Cytochrome P450 family 3 subfamily A member 5	–3.2	–2.5	–	–2.7	–2.6	–2.9	1, 2, 6
CYP3A7	Cytochrome P450 family 3 subfamily A member 7	–7.1	–9.8	–	–9.8	–3.7	–8.6	1, 2, 6
CYP4A11	Cytochrome P450 family 4 subfamily A member 11	–3.0	–19.8	–	–5.5	–4.3	–16.3	1
CYP7A1	Cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1	–90.4	–83.1	–2.7	–48.8	–21.9	–42.3	1, 2, 4
CYP8B1	Cytochrome P450 family 8 subfamily B member 1	–2.1	–5.4	–	–	–	–6.4	1, 4
FM01	Flavin containing monooxygenase 1	–5.7	–6.2	–	–3.6	–5.1	–6.4	6
FM05	Flavin containing monooxygenase 5	–7.8	–12.7	–	–5.5	–3.5	–9.1	6
FOS	Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	4.1	3.6	2.8	3.2	3.0	2.4	5
G6PC	Glucose-6-phosphatase catalytic subunit	–8.9	–52.0	–	–8.5	–7.1	–44.3	2
GSTA2	Glutathione S-transferase alpha 2	–3.0	–6.5	–	–4.2	–2.6	–4.4	2, 6

(continued)

Table 2. Continued

Gene symbol	Entrez gene name	Pristine M-MSNs		PEG M-MSNs		DMPC M-MSNs		Pathways
		FC (24 h)	FC (48 h)	FC (24 h)	FC (48 h)	FC (24 h)	FC (48 h)	
GSTM1	Glutathione S-transferase mu 1	–	–3.3	–	–2.2	–	–	6
GSTM2	Glutathione S-transferase mu 2	–	–2.9	–	–2.6	–	–2.4	6
GSTM3	Glutathione S-transferase mu 3	–2.5	–2.8	–	–	–	–	6
HMGCS2	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2	–4.2	–10.0	–	–5.0	–2.7	–5.0	2
HNF4A	Hepatocyte nuclear factor 4 alpha	–2.1	–	–	–	–2.3	–	2, 4
HSPB2	Heat shock protein family B (small) member 2	–2.9	–4.0	–	–3.7	–	–	5
IGFBP1	Insulin like growth factor binding protein 1	3.4	3.8	–	7.6	3.8	3.4	2
IKKB	Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit beta	–	–2.4	–	–	–	–	4
IL1B	Interleukin 1 beta	3.3	–	–	3.2	3.8	–	1, 4, 5
IL1F10	Interleukin 1 family member 10 (theta)	2.7	–	–	–	–	–	5
IL1R2	Interleukin 1 receptor type 2	–2.4	–6.1	–	–3.5	–	–	1, 5
IL1RAP	Interleukin 1 receptor accessory protein	2.9	2.2	–	2.5	2.7	–	1, 4, 5
IL1RL1	Interleukin 1 receptor like 1	6.1	5.8	–	3.6	3.7	3.8	1, 4, 5
IL1RN	Interleukin 1 receptor antagonist	–2.2	–5.7	–	–3.3	–	–5.8	4, 5
IL6	Interleukin 6	55.1	13.0	7.1	9.2	21.6	5.9	2, 4, 5
IL6R	Interleukin 6 receptor	–2.1	–	–	–	–	–	5
IRAK2	Interleukin 1 receptor associated kinase 2	4.6	3.0	2.7	3.9	3.2	–	4
JUN	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	2.5	2.2	2.3	2.6	2.3	–	4, 5
KLB	Klotho beta	–3.1	–3.6	–	–6.7	–2.0	–6.4	5
LBP	Lipopolysaccharide binding protein	–	2.1	–	–	–	–	4
LIF	Leukemia inhibitory factor	7.1	3.4	2.5	4.1	2.8	–	4
LY96	Lymphocyte antigen 96	–	3.4	2.2	3.0	2.2	2.8	4
MAP2K6	Mitogen-activated protein kinase kinase 6	–3.1	–	–	–2.6	–2.1	–	5
NDST4	N-deacetylase and N-sulfotransferase 4	–3.0	–5.3	–	–3.0	–2.0	–2.3	1
NFKB1	Nuclear factor kappa B subunit 1	2.0	–	–	–	–	–	5, 6
NFKB2	Nuclear factor kappa B subunit 2	2.1	–	–	2.2	–	–	5, 6
NFKBIB	NFKB inhibitor beta	–	2.1	–	–	–	–	4
NR0B2	Nuclear receptor subfamily 0 group B member 2	–7.2	–10.7	–3.6	–5.6	–5.0	–	1, 2, 4
NR1I2	Nuclear receptor subfamily 1 group I member 2	–2.9	–2.6	–	–	–2.1	–2.9	1, 2, 4, 6
NR1I3	Nuclear receptor subfamily 1 group I member 3	–4.1	–17.1	–	–5.7	–2.6	–18.9	1, 2, 6
PIK3R1	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1	–2.8	–2.8	–	–2.1	–2.1	–2.2	5
PPARA	Peroxisome proliferator activated receptor alpha	–2.5	–2.0	–	–	–	–	2, 4
PPRC1	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator-related 1	3.0	2.8	–	2.5	2.3	–	4
PRKAR1B	Protein kinase cAMP-dependent type I regulatory subunit beta	–	2.1	–	–	–	–	4
PRKAR2B	Protein kinase cAMP-dependent type II regulatory subunit beta	–9.6	–11.4	–4.3	–20.6	–9.3	–6.7	2, 4
SLC10A1	Solute carrier family 10 member 1	–5.3	–16.4	–	–9.1	–3.8	–12.4	1, 4
SLC22A7	Solute carrier family 22 member 7	–2.5	–8.9	–	–2.8	–2.3	–9.6	4
SLC27A2	Solute carrier family 27 member 2	–	–	–	–2.1	–	–2.3	1
SLC27A5	Solute carrier family 27 member 5	–2.7	–15.3	–	–5.7	–3.0	–19.6	1
SLC01B1	Solute carrier organic anion transporter family member 1B1	–	–3.9	–	–	–	–4.9	4
SLC01B3	Solute carrier organic anion transporter family member 1B3	–3.6	–	–	–	–	–	1
SOC51	Suppressor of cytokine signaling 1	24.2	13.5	4.2	9.4	9.2	5.2	5

(continued)

Table 2. Continued

Gene symbol	Entrez gene name	Pristine M-MSNs		PEG M-MSNs		DMPC M-MSNs		Pathways
		FC (24 h)	FC (48 h)	FC (24 h)	FC (48 h)	FC (24 h)	FC (48 h)	
SOC3	Suppressor of cytokine signaling 3	8.9	7.3	—	2.8	3.1	2.5	5
SULT2A1	Sulfotransferase family 2A member 1	−4.7	−6.9	—	−4.8	−2.4	−4.4	1, 2, 6
UGT2B10	UDP glucuronosyltransferase family 2 member B10	−2.2	−3.5	—	−2.7	—	−5.1	6
UGT2B11	UDP glucuronosyltransferase family 2 member B11	−2.6	−4.0	—	−2.7	−2.4	−4.8	6
UGT2B15	UDP glucuronosyltransferase family 2 member B15	−2.4	−2.5	—	−2.6	−2.1	−4.0	6
UGT2B4	UDP glucuronosyltransferase family 2 member B4	−2.7	−4.1	—	−3.1	−2.5	−5.6	6
UGT2B7	UDP glucuronosyltransferase family 2 member B7	2.0	−2.1	—	—	—	−3.2	6

The exhaustive list with fold-changes and *p* values is provided in ESI Table S4. Pathway 1, 2, 3, 4, 5, 6 are 'Bile acid Biosynthesis', 'RXR/RXR', 'LPS/IL-1 mediated inhibition of RXR function', 'Hepatic cholestasis', 'IL-6 signaling', and 'Xenobiotic metabolism signaling', respectively.

concentrations above 200 $\mu\text{g/mL}$ result in cell damage. For HepaRG cells, we set the limit of biocompatibility below 16 $\mu\text{g/cm}^2$ (i.e. 60 $\mu\text{g/mL}$).

The dose without effect (1.6 $\mu\text{g/cm}^2$) can be defined here as a NOTEL, according to Lobenhofer et al. (2004). The first dose with an effect (16 $\mu\text{g/cm}^2$) can be considered as a 'Lowest Observed Transcriptional Effect Level' (LOTEL). This point is important to underline because, in search of a quantitative method to classify and compare hepatotoxic substances, transcriptomics techniques could be very helpful by providing quantitative responses for toxicity prediction at low doses (Zarbl et al. 2010). The dose 16 $\mu\text{g/cm}^2$ probably triggers the onset of effects that are more clearly observable with a higher dose.

Despite the fact that no tissue alteration was observed at a higher dose in mice with M-MSN (Rascol et al. 2017), an in-depth study at 80 $\mu\text{g/cm}^2$ could then reflect a predictive fate of HepaRG cells under exposure to M-MSNs.

Mechanisms of uptake at higher dose

We investigated which known pathways were involved in the internalization of these nanocarriers. However, in our case, none of the conventional pathways such as clathrin or caveolar-mediated endocytosis seem to be involved. Indeed, with 80 $\mu\text{g/cm}^2$ pristine M-MSNs after 48 h, only 12 and 27 genes belonging to 'caveolar-mediated endocytosis signaling' and 'clathrin-mediated endocytosis signaling' were modulated, respectively, out of the hundreds of genes that describe these two pathways. Alternatively, many G protein-coupled receptors were involved, as well as integrins and Toll-like transmembrane receptors. After 24 h exposure, we observed that many G-PCR receptors were heavily induced or repressed by pristine and DMPC M-MSNs (63 and 19, respectively), while conversely PEG M-MSNs altered them in a lesser extend (5) (ESI Tables S1–S3).

It is important to note that, in a biological medium, NPs become surrounded by proteins, thus forming a protein–NP complex. This corona confers to the NP a new identity. Cells may identify this large protein–NP complex differently to pristine NPs, and set up appropriate recognition mechanisms. In the current case, the corona is composed

of bovine proteins originating from additional FBS in the cell culture medium. According to Cedervall et al., the corona could alter biological functions by the high presence of proteins in a restricted cellular area (Cedervall et al. 2007). Thereby, this complex may appear to the cell as an exogenous compound, leading to a recognition by G protein-coupled receptors, integrins, and Toll-like transmembrane receptors, acting as gateways to the cell and triggering the proinflammatory response (Hild et al. 2010). Thus, due to the presence of a protein corona around them, NPs may 'mislead' the cells, which may recognize these NPs as pathogen-like invaders, such as lipopolysaccharides (LPS) originating from bacterial outer membranes. The membrane receptors that act as 'molecular switches' may control the NP uptake and promote, as for LPS, the secretion of proinflammatory cytokines. Precisely, in our datasets, IL-1, TNF α , IL-6, IL-8 were heavily induced (Table 2). The gene encoding the C-reactive protein was heavily upregulated (FC = 12). This protein is involved in several host defense-related functions based on its ability to recognize foreign pathogens or injured cells and to initiate their elimination by interacting with humoral and cellular effector systems in the blood. Consequently, the level of this protein in plasma increases greatly during acute phase response to tissue injury, infection, or other inflammatory stimuli such as NP invasion.

We can infer that M-MSNs are not engulfed by a clathrin and caveolin endocytosis-dependent pathway but rather by a receptor-mediated mechanism, more in accordance with the size of these NPs (100 nm) (Vivero-Escoto et al. 2010).

Hepatobiliary system disruption

We performed biological data mining for all doses and time-points to extract all molecular signatures with no *a priori* hypothesis. We then analyzed and compared these responses, not in terms of gene-to-gene comparison but in terms of altered molecular pathways. The most relevant canonical pathways involved in the hepatic environment and revealed by this analysis are depicted in Figure 6. From this comparative pathway-driven analysis, we highlighted the possible sequence of events that leads to the disruption of hepatobiliary system, as represented

schematically in Figure 7. All the genes mentioned in the text below are reported in Table 2.

Inflammation

We observed a strong induction of the proinflammatory cytokines, IL-1 and TNF α . The most significant altered pathway was the 'LPS/IL-1-mediated inhibition of RXR pathway'. This pathway describes the junction between inflammation and the disruption of hepatobiliary functions. The subsequent inflammation downregulates the expression of hepatic genes involved in a variety of physiological processes, collectively known as the negative hepatic acute phase response (APR) (Beigneux et al. 2002). Many of the genes repressed during APR are regulated by the nuclear hormone receptor, retinoid X receptor α (RXR α).

Nuclear receptors

The 'PXR/RXR pathway' is one of the most pertinent pathways elicited by M-MSN exposure in our results. Retinoid X receptors (RXRs) are nuclear receptors that mediate strong biological effects by dimerization with type II nuclear receptors, such as the pregnane X receptor (PXR/NR1L2), the constitutive androstane receptor (CAR/NR1L3), and the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR/PPARA). Many of these nuclear receptors were modulated in our datasets, including the small heterodimer partner (SHP/NR0B2), a regulator of bile acid metabolism (Miao et al. 2009), as shown in Table 2.

Phase I and II enzymes

Expressed predominantly in the liver, activated PXR in conjunction with RXR plays a central role in xenobiotic metabolism by inducing the cytochrome P450 family, including phase I metabolism enzymes, in response to cell injury. Here, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A5, and CYP3A7 were highly downregulated at 48 h in the presence of all M-MSNs (80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). This also included CYP3A4, an enzyme involved in the modification of bile acids, and CYP7A1, responsible for bile acid synthesis. In addition, PXR/RXR is an important regulator of drug phase II metabolism and excretion. This complex induces the downregulation of xenobiotic conjugation phase II enzymes (SULT2A1, UGT1A9, GSTA2, GSTM1, and GSTM2).

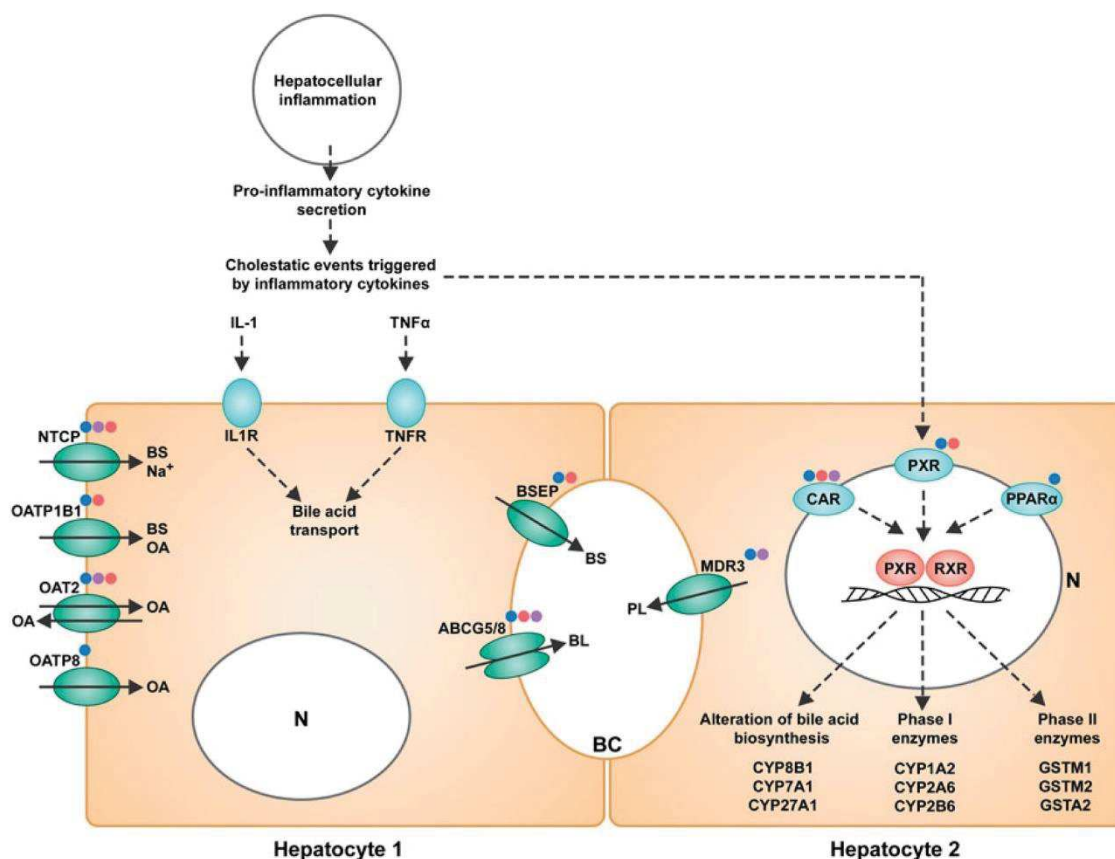


Figure 7. Representation of M-MSN mode of action on HepaRG hepatocytes. HepaRG cultures ($n = 3$) were exposed for 24 and 48 h to three concentrations (1.6, 16, and $80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) of NPs including pristine (blue dot), PEG- (purple dot) and DMPC- (red dot)-coated M-MSNs. N = nucleus. At $80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, the hepatic cholestasis pathway is highlighted by the downregulation of most of its main effectors such as BSEP and NTCP, characterized by an intrahepatic accumulation of cytotoxic bile acids, which ultimately causes liver injury.

In general, exposure to xenobiotics triggers a cellular 'stress' response leading to increased gene expression of phase I or phase II genes, which ultimately enhances the elimination and clearance of the xenobiotics (Rushmore and Tony Kong 2002).

Efflux pumps

The bile salt export pump (BSEP/*ABCB11*) was down-regulated, as well as *ABCG5/G8*. We also observed that mRNA levels of an essential transport system for bile salts (NTCP, *SLC10A1*) were impaired, as were organic anion transporters (OAT2/*SLC22A7*, OATP1B1/*SLCO1B1*, OATP8/*SLCO1B3*), and phospholipid export (MDR3/*ABCB4*).

Hepatic cholestasis

The reduced expression of transcripts related to the hepatobiliary transport system contributes to the evidence of a disturbed 'hepatic cholestasis pathway' (Zollner et al. 2001). Cholestasis results in intrahepatic

accumulation of cytotoxic bile acids. The observed inhibition of BSEP/*ABCB11* should lead to increased intrahepatic concentrations of bile acids and subsequent cholestasis. Nevertheless, cholestatic liver damage may be counteracted by a variety of intrinsic hepatoprotective mechanisms. Such defense mechanisms include the repression of hepatic bile acid uptake and *de novo* bile acid synthesis (Zollner et al. 2006). Here, while the former mechanism was activated, as shown above, there was no *de novo* biosynthesis of bile acids as all genes belonging to 'bile acid biosynthesis neutral pathway' were severely repressed, the most repressed being *CYP3A4*, *CYP7A1*, *CYP8B1*, and *SLC27A5*. Later key events include bile accumulation, the induction of inflammation, and the activation of specific nuclear receptors.

IL-6 signaling

IL-6 is strongly upregulated. One consequence of IL-6 secretion is the inhibition of xenobiotic transport

by acting on the PXR/RXR pathway. IL-6 combined with the action of IL-1 and TNF α , leads to the reduced expression of hepatic proteins, such as metabolism enzymes. This chain of events leads to an impaired metabolism, encompassing the biosynthesis of lipid, cholesterol, and bile acids. The down-regulation of xenobiotics conjugation phase II enzymes (Figure 7) alters the transport of xenobiotics, represented by the 'xenobiotic metabolism pathway'.

Collectively, these mechanisms belong to the adverse outcome pathway (AOP) (Edwards et al. 2016; Hartung 2017) for cholestatic liver injury, and drive a deteriorative cellular response, ultimately causing liver injury leading to jaundice, and biliary fibrosis (Vinken 2016).

Conclusion

Using up-to-date technologies, we have investigated the hepatic biocompatibility of M-MSNs as future nanocarriers for nanomedicine. The potential toxicity of these NPs, separately from any drug with which they may be combined, must be evaluated in order to avoid collateral toxicity to healthy cells, especially cells of the liver, which is the primary accumulative organ. The significant responses of HepaRG cells triggered by exposure to pristine M-MSNs as well as PEG and DMPC M-MSNs were compared.

In our hands, M-MSNs were not extremely harmful to liver cells compared to known hepatotoxins. From the current transcriptomic study, we determined that 1.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ is a dose without any molecular effect. The dynamic aspect of these effects is very important and we were able to demonstrate that at 16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ they were transient, disappearing after 48 h. We set the limit of biocompatibility for HepaRG cells below 16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (i.e. 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of these NPs. At 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, we identified initial molecular events and pathways of toxicity elicited by all M-MSNs, such as negative hepatic APR. The hepatic cholestasis AOP was triggered by inhibition of the bile salt export pump transporter protein (BSEP, *ABCB11*). At this highest dose, adverse effects were amplified after 48 h. Pristine and DMPC M-MSNs showed deleterious effects from 24 h exposure, whereas PEG M-MSNs

triggered the same effects only after 48 h, probably because of an impaired corona formation.

In vitro cell culture with 'omics' technology complemented with microscopic observation is a powerful combination of tools for testing and comparing substance toxicity, while accessing their molecular mechanisms of action. More broadly, in a regulatory perspective we showed that it is possible to distinguish the doses with no effect (NOTEL) from the doses inducing a lowest observed effect (LOTEL) and thus classify drugs, chemicals, endocrine disruptors, and NPs independently of their structure. This strategy might be an asset for upstream selection of the safest nanocarriers in the framework of nanobiosafety regulation.

Acknowledgements

We thank Mme Véronique Viguier and Dr. Erwan Oliviero for Osmium tetroxide staining and TEM observation.

Disclosure statement

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This work was supported by the French National Research Agency (ANR) [Grant ANR-13-NANO-0007-03].

Supplemental data

The underlying research materials for this article can be accessed at <https://zenodo.org/deposit/891409> ESI Tables S1 to S3 : fold-changes and p-values of modulated transcripts by experimental condition for all doses and time-points. ESI Table S4 : modulated transcripts belonging to pathways mentioned in the text with their fold-changes and p-values.

The transcriptomic raw data supporting this publication have been deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) repository and are accessible via GEO Series accession number (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE98236>).

References

- Antherieu, S., C. Chesne, R. Li, C. Guguen-Guillouzo, and A. Guillouzo. 2012. "Optimization of the HepaRG Cell Model for Drug Metabolism and Toxicity Studies." *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with Bibra* 26: 1278–1285.
- Ashley, C. E., E. C. Carnes, G. K. Phillips, D. Padilla, P. N. Durfee, P. A. Brown, T. N. Hanna, et al. 2011. "The

- Targeted Delivery of Multicomponent Cargos to Cancer Cells by Nanoporous Particle-Supported Lipid Bilayers." *Nature Materials* 10: 389–397.
- Atienzar, F. A., H. Gerets, K. Tilmant, G. Toussaint, and S. Dhalluin. 2013. "Evaluation of Impedance-Based Label-Free Technology as a Tool for Pharmacology and Toxicology Investigations." *Biosensors* 3: 132–156.
- Bangham, A., M. M. Standish, and J. Watkins. 1965. "Diffusion of Univalent Ions Across the Lamellae of Swollen Phospholipids." *Journal of Molecular Biology* 13: 238–252.
- Beigneux, A. P., A. H. Moser, J. K. Shigenaga, C. Grunfeld, and K. R. Feingold. 2002. "Reduction in Cytochrome P-450 Enzyme Expression is Associated with Repression of CAR (Constitutive Androstane Receptor) and PXR (Pregnane X Receptor) in Mouse Liver During the Acute Phase Response." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293: 145–149.
- Bouchoucha, M., M.-F. Côté, R. C. Gaudreault, M.-A. Fortin, and F. Kleitz. 2016. "Size-Controlled Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles for Tunable Drug Release and Enhanced Anti-Tumoral Activity." *Chemistry of Materials* 28: 4243–4258.
- Brown, G., and J. Butler. 1997. "New Method for the Characterization of Domain Morphology of Polymer Blends Using Ruthenium Tetroxide Staining and Low Voltage Scanning Electron Microscopy (LVSEM)." *Polymer* 38: 3937–3945.
- Cedervall, T., I. Lynch, S. Lindman, T. Berggård, E. Thulin, H. Nilsson, K. A. Dawson, and S. Linse. 2007. "Understanding the Nanoparticle-Protein Corona Using Methods to Quantify Exchange Rates and Affinities of Proteins for Nanoparticles." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 2050–2055.
- Danhier, F., E. Ansorena, J. M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, and V. Préat. 2012. "PLGA-Based Nanoparticles: An Overview of Biomedical Applications." *Journal of Controlled Release* 161: 505–522.
- Deodhar, G. V., M. L. Adams, and B. G. Trewyn. 2017. "Controlled Release and Intracellular Protein Delivery from Mesoporous Silica Nanoparticles." *Biotechnology Journal* 12(1). doi: 10.1002/biot.201600408.
- Durfee, P. N., Y.-S. Lin, D. R. Dunphy, A. J. Muñoz, K. S. Butler, K. R. Humphrey, A. J. Lokke, et al. 2016. "Mesoporous Silica Nanoparticle-Supported Lipid Bilayers (Protocells) for Active Targeting and Delivery to Individual Leukemia Cells." *ACS Nano* 10: 8325–8345.
- Edwards, S. W., Y.-M. Tan, D. L. Villeneuve, M. E. Meek, and C. A. McQueen. 2016. "Adverse Outcome Pathways—Organizing Toxicological Information to Improve Decision Making." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 356: 170–181.
- Guillouzo, A. 1998. "Liver Cell Models in *In Vitro* Toxicology." *Environmental Health Perspectives* 106(Suppl 2): 511–532.
- Guillouzo, A., A. Corlu, C. Aninat, D. Glaire, F. Morel, and C. Guguen-Guillouzo. 2007. "The Human Hepatoma HepaRG cells: A Highly Differentiated Model for Studies of Liver Metabolism and Toxicity of Xenobiotics." *Chemico-Biological Interactions* 168: 66–73.
- Hart, S. N., Y. Li, K. Nakamoto, E. A. Subileau, D. Steen, and X. B. Zhong. 2010. "A Comparison of Whole Genome Gene Expression Profiles of HepaRG Cells and HepG2 Cells to Primary Human Hepatocytes and Human Liver Tissues." *Drug Metabolism and Disposition* 38: 988–994.
- Hartung, T. 2010. "Food for Thought... on Alternative Methods for Nanoparticle Safety Testing." *Altex* 27: 87–95.
- Hartung, T. 2017. "Utility of the Adverse Outcome Pathway Concept in Drug Development." *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 13: 1–3.
- He, Q., Z. Zhang, F. Gao, Y. Li, and J. Shi. 2011. "In vivo Biodistribution and Urinary Excretion of Mesoporous Silica Nanoparticles: Effects of Particle Size and PEGylation." *Small* 7: 271–280.
- Hild, W., K. Pollinger, A. Caporale, C. Cabrele, M. Keller, N. Pluym, A. Buschauer, et al. 2010. "G Protein-Coupled Receptors Function as Logic Gates for Nanoparticle Binding and Cell Uptake." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 10667–10672.
- Hudson, S. P., R. F. Padera, R. Langer, and D. S. Kohane. 2008. "The Biocompatibility of Mesoporous Silicates." *Biomaterials* 29: 4045–4055.
- Jennen, D. G. J., C. Magkoufopoulou, H. B. Ketelslegers, M. H. M. Van Herwijnen, J. C. S. Kleinjans, and J. H. M. Van Delft. 2010. "Comparison of HepG2 and HepaRG by Whole-Genome Gene Expression Analysis for the Purpose of Chemical Hazard Identification." *Toxicological Sciences* 115: 66–79.
- Jennings, P., A. Limonciel, L. Felice, and M. O. Leonard. 2013. "An Overview of Transcriptional Regulation in Response to Toxicological Insult." *Archives of Toxicology* 87: 49–72.
- Kanebratt, K. P., and T. B. Andersson. 2008. "HepaRG Cells as an *In Vitro* Model for Evaluation of Cytochrome P450 Induction in Humans." *Drug Metabolism and Disposition* 36: 137–145.
- Kim, J. A., A. Salvati, C. Aberg, and K. A. Dawson. 2014. "Suppression of Nanoparticle Cytotoxicity Approaching *In Vivo* Serum Concentrations: Limitations of *In Vitro* Testing for Nanosafety." *Nanoscale* 6: 14180–14184.
- Li, T., X. Shen, Y. Geng, Z. Chen, L. Li, S. Li, H. Yang, C. Wu, H. Zeng, and Y. Liu. 2016. "Folate-Functionalized Magnetic-Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug/Gene Codelivery To Potentiate the Antitumor Efficacy." *ACS Applied Materials & Interfaces* 8: 13748–13758.
- Li, Z., J. C. Barnes, A. Bosoy, J. F. Stoddart, and J. I. Zink. 2012. "Mesoporous Silica Nanoparticles in Biomedical Applications." *Chemical Society Reviews* 41: 2590–2605.
- Lison, D., L. C. Thomassen, V. Rabolli, L. Gonzalez, D. Napierska, J. W. Seo, M. Kirsch-Volders, P. Hoet, C. E. Kirschhock, and J. A. Martens. 2008. "Nominal and Effective Dosimetry of Silica Nanoparticles in Cytotoxicity Assays." *Toxicological Sciences* 104: 155–162.
- Liu, T., L. Li, X. Teng, X. Huang, H. Liu, D. Chen, J. Ren, J. He, and F. Tang. 2011. "Single and Repeated Dose Toxicity of Mesoporous Hollow Silica Nanoparticles in Intravenously Exposed Mice." *Biomaterials* 32: 1657–1668.

- Lobenhofer, E. K., X. Cui, L. Bennett, P. L. Cable, B. A. Merrick, G. A. Churchill, and C. A. Afshari. 2004. "Exploration of Low-Dose Estrogen Effects: Identification of No Observed Transcriptional Effect Level (NOTEL)." *Toxicologic Pathology* 32: 482–492.
- Lu, J., M. Liong, Z. Li, J. I. Zink, and F. Tamanoi. 2010. "Biocompatibility, Biodistribution, and Drug-Delivery Efficiency of Mesoporous Silica Nanoparticles for Cancer Therapy in Animals." *Small* 6: 1794–1805.
- Miao, J., S. Fang, J. Lee, C. Comstock, K. E. Knudsen, and J. K. Kemper. 2009. "Functional Specificities of Brm and Brg-1 Swi/Snf ATPases in the Feedback Regulation of Hepatic Bile Acid Biosynthesis." *Molecular and Cellular Biology* 29: 6170–6181.
- Nyalosaso, J., E. Rascol, C. Pisani, C. Dorandeu, X. Dumail, M. Maynadier, M. Gary-Bobo, et al. 2016. "Synthesis, Decoration, and Cellular Effects of Magnetic Mesoporous Silica Nanoparticles." *RSC Advances* 6: 57275–57283.
- Perry, J. L., K. G. Reuter, M. P. Kai, K. P. Herlihy, S. W. Jones, J. C. Luft, M. Napier, J. E. Bear, and J. M. Desimone. 2012. "PEGylated PRINT Nanoparticles: The Impact of PEG Density on Protein Binding, Macrophage Association, Biodistribution, and Pharmacokinetics." *Nano Letters* 12: 5304–5310.
- Pisani, C., J.-C. Gaillard, M. Odorico, J. L. Nyalosaso, C. Charnay, Y. Guari, J. Chopineau, J.-M. Devoisselle, J. Armengaud, and O. Prat. 2017a. "The timeline of corona formation around silica nanocarriers highlights the role of the protein interactome." *Nanoscale* 9: 1840–1851.
- Pisani, C., J. C. Gaillard, V. Nouvel, M. Odorico, J. Armengaud, and O. Prat. 2015. "High-Throughput, Quantitative Assessment of the Effects of Low-Dose Silica Nanoparticles on Lung Cells: Grasping Complex Toxicity with a Great Depth of Field." *BMC Genomics* 16: 315.
- Pisani, C., E. Rascol, C. Dorandeu, J.-C. Gaillard, C. Charnay, Y. Guari, J. Chopineau, J. Armengaud, J.-M. Devoisselle, and O. Prat. 2017b. "The Species Origin of the Serum in the Culture Medium Influences the *In Vitro* Toxicity of Silica Nanoparticles to HepG2 cells." *PLoS One* 12: e0182906.
- Rascol, E., M. Daurat, A. Da Silva, M. Maynadier, C. Dorandeu, C. Charnay, M. Garcia, et al. 2017. "Biological Fate of Fe₃O₄ Core-Shell Mesoporous Silica Nanoparticles Depending on Particle Surface Chemistry." *Nanomaterials* 7: 162.
- Rho, W.-Y., H.-M. Kim, S. Kyeong, Y.-L. Kang, D.-H. Kim, H. Kang, C. Jeong, D.-E. Kim, Y.-S. Lee, and B.-H. Jun. 2014. "Facile Synthesis of Monodispersed Silica-Coated Magnetic Nanoparticles." *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 20: 2646–2649.
- Rushmore, T. H., and A. Tony Kong. 2002. "Pharmacogenomics, Regulation and Signaling Pathways of Phase I and II Drug Metabolizing Enzymes." *Current Drug Metabolism* 3: 481–490.
- Russell, W. M. S., and R. L. Burch. 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London, UK: Methuen & Co., Ltd.
- Savarala, S., S. Ahmed, M. A. Ilies, and S. L. Wunder. 2010. "Formation and Colloidal Stability of DMPC Supported Lipid Bilayers on SiO₂ Nanobeads." *Langmuir* 26: 12081–12088.
- Sergeant, J.-A., V. Paget, and S. Chevillard. 2012. "Toxicity and Genotoxicity of Nano-SiO₂ on Human Epithelial Intestinal HT-29 Cell Line." *Annals of Occupational Hygiene* 56: 622–630.
- Turpeinen, M., A. Tolonen, C. Chesne, A. Guillozo, J. Uusitalo, and O. Pelkonen. 2009. "Functional Expression, Inhibition and Induction of CYP Enzymes in HepaRG Cells." *Toxicology in Vitro* 23: 748–753.
- Uz, M., V. Bulmus, and S. Alsoy Altinkaya. 2016. "Effect of PEG Grafting Density and Hydrodynamic Volume on Gold Nanoparticle–Cell Interactions: An Investigation on Cell Cycle, Apoptosis, and DNA Damage." *Langmuir* 32: 5997–6009.
- Vallet-Regí, M., F. Balas, and D. Arcos. 2007. "Mesoporous Materials for Drug Delivery." *Angewandte Chemie International Edition* 46: 7548–7558.
- Vinken, M. 2016. "The Adverse Outcome Pathway for Cholestatic Liver Injury: From Mechanisms to Predictive Human Toxicology." *Toxicology Letters* 258: S47.
- Vivero-Escoto, J. L., I. Slowing, B. G. Trewyn, and V. S. Lin. 2010. "Mesoporous Silica Nanoparticles for Intracellular Controlled Drug Delivery." *Small* 6: 1952–1967.
- Witasz, E., N. Kupferschmidt, L. Bengtsson, K. Hultenby, C. Smedman, S. Paulie, A. E. Garcia-Bennett, and B. Fadeel. 2009. "Efficient Internalization of Mesoporous Silica Particles of Different Sizes by Primary Human Macrophages without Impairment of Macrophage Clearance of Apoptotic or Antibody-Opsonized Target Cells." *Toxicology and Applied Pharmacology* 239: 306–319.
- Wright, W. R., K. Parzych, D. Crawford, C. Mein, J. A. Mitchell, and M. J. Paul-Clark. 2012. "Inflammatory Transcriptome Profiling of Human Monocytes Exposed Acutely to Cigarette Smoke." *PLoS One* 7: e30120.
- Xie, J., S. Lee, and X. Chen. 2010. "Nanoparticle-Based Theranostic Agents." *Advanced Drug Delivery Reviews* 62: 1064–1079.
- Yang, P., S. Gai, and J. Lin. 2012. "Functionalized Mesoporous Silica Materials for Controlled Drug Delivery." *Chemical Society Reviews* 41: 3679–3698.
- Zarbl, H., M. A. Gallo, J. Glick, K. Y. Yeung, and P. Vouros. 2010. "The Vanishing Zero Revisited: Thresholds in the Age of Genomics." *Chemico-Biological Interactions* 184: 273–278.
- Zollner, G., P. Fickert, R. Zenz, A. Fuchsichler, C. Stumptner, L. Kenner, P. Ferenci, et al. 2001. "Hepatobiliary Transporter Expression in Percutaneous Liver Biopsies of Patients with Cholestatic Liver Diseases." *Hepatology* 33: 633–646.
- Zollner, G., H.-U. Marschall, M. Wagner, and M. Trauner. 2006. "Role of Nuclear Receptors in the Adaptive Response to Bile Acids and Cholestasis: Pathogenetic and Therapeutic Considerations." *Molecular Pharmacology* 3: 231–251.

CHAPITRE III

Relation entre les nanoparticules et les protéines sériques– Influence et formation de la corona

Article n°4

L'origine des protéines sériques contenues dans le milieu de culture cellulaire influence la toxicité in vitro de nanoparticules de silice mésoporeuse sur les cellules humaines hépatiques HepG2

Article n°4 : L'origine des protéines sériques contenues dans le milieu de culture cellulaire influence la toxicité in vitro de nanoparticules de silice mésoporeuse sur les cellules humaines hépatiques HepG2

Dans ce nouveau chapitre, nous abordons le sujet des interactions NPs/protéines sériques et en particulier l'influence de la corona sur la cytotoxicité. Dans cet article, nous avons utilisé l'impédance cellulaire en temps réel pour analyser les différences entre une corona humaine et une corona bovine autour des M-MSNs sur des cellules HepG2.

Nous avons vu précédemment (voir partie « Interactions avec les biomolécules ») qu'à la différence des substances chimiques, les NPs sont des objets qui interagissent de façon très importante avec le milieu environnant. En effet lorsque des NPs entrent en contact avec un fluide biologique tel qu'un milieu de culture cellulaire, elles ont tendance à adsorber des biomolécules, et en particulier des protéines formant une couche protéique, la « corona », dont la présence influence le comportement des NPs au contact des cellules. Dans les tests *in vitro* sur culture cellulaire, le milieu de culture est classiquement supplémenté par du sérum de veau fœtal (SVF), qui fournit les protéines essentielles à l'adhésion et à la croissance cellulaire. La présence de ces protéines bovines octroie une nouvelle identité biologique aux NPs, qui va impacter l'évaluation toxicologique qui en est faite.

Dans ce contexte, nous avons évalué l'impact de la corona protéique autour de M-MSNs sur une lignée cellulaire hépatique humaine (HepG2) en préformant deux types distincts de corona pendant 24h, à savoir une corona composée de protéines issues du SVF telle qu'elle pourrait se former en condition de culture cellulaire, et une corona composée de protéines humaines issues du sérum humain (SH) dans un scénario d'administration de nanovecteurs par injection. D'une part, ces deux nouveaux nano-objets ont été analysés par spectrométrie de masse (ESI Q-Exactive, ThermoFisher) afin d'identifier l'ensemble des protéines adsorbées sur les NPs. D'autre part, nous avons comparé l'impact cellulaire de ces deux nano-objets via la technologie d'impédance cellulaire en temps réel (xCELLigence System, ACEA Biosciences), qui permet de visualiser les modifications de morphologie et de viabilité cellulaire.

- En condition acellulaire, l'identification des protéines de chaque corona (SVF et SH) a révélé 127 protéines bovines et 150 protéines humaines. Ces deux pools de protéines présentent 62 protéines homologues entre les deux espèces, soit 49% et 41% des protéines contenues dans les coronas SVF et SH, respectivement. Outre ces similarités, on observe également de nombreuses différences. La première est révélée par calcul du « Normalized Spectral Abundance Factor » (NSAF), qui permet de déterminer l'abondance relative d'une protéine au sein d'un échantillon. Certaines protéines homologues occupent ainsi une part significativement différente dans chacune des coronas humaine ou bovine. C'est le cas par exemple de l'Alpha-2-HS-glycoprotéine, cette protéine constitue 16% de la corona bovine contre 2,7% de la corona humaine. La deuxième différence est révélée par la classification fonctionnelle des deux ensembles de protéines. En effet, on observe que les apolipoprotéines sont plus représentées dans la corona SH (14.1%) que dans la corona SVF (8.9%). L'absence totale d'immunoglobulines (Ig) dans la corona bovine est par ailleurs observée, alors que ces Ig constituent plus de 17% de la corona humaine. Cette différence s'explique par la nature des deux sérums, fœtal pour le SVF et adulte pour le SH.
- En condition cellulaire, l'impédance cellulaire en temps réel met en évidence deux résultats majeurs.

Premièrement, l'impact sur HepG2 de nanoparticules avec une corona SVF préformée est très proche voir identique à celui de NPs sans corona (natives). Ce résultat confirme donc la formation très rapide de la corona autour des nanoparticules natives, dès que celles-ci entrent en contact avec un milieu biologique. En effet, la corona préformée par 24h d'incubation en SVF est équivalente, en termes d'impact cellulaire, à celle formée autour des nanoparticules natives en quelques minutes après introduction dans le milieu cellulaire juste avant leur contact avec les cellules. Malgré les échanges intervenant vraisemblablement entre la corona et les protéines du milieu, la formation de la corona est certainement un phénomène de l'ordre de la minute et les modifications ultérieures de celle-ci n'ont qu'un impact modéré sur les cellules, sur la base de ce que nous pouvons visualiser avec cette technologie.

Deuxièmement, en présence d'une corona composée de protéines humaines, l'impact délétère sur les cellules HepG2 est bien moins important qu'avec une corona bovine. Dans

ce cas, deux hypothèses sont plausibles, soit les protéines humaines agissent comme un revêtement protecteur autour des NPs, atténuant l'effet cytotoxique observé, soit c'est au contraire la présence d'un taux anormal de protéines exogènes (non soi) apportées par la corona bovine qui, lors de l'internalisation des NPs, crée une toxicité plus importante. Ces deux hypothèses ne sont ni exclusives ni exhaustives. Hors du cadre de cette publication, ce résultat a également été observé ultérieurement sur la lignée HepaRG (Figure 41).

Ce résultat pose la problématique d'une potentielle surestimation de la toxicité des nanoparticules lors d'essais *in vitro*. Pour minimiser l'impact du SVF, une alternative proposée serait de pré-incuber les nanoparticules dans un milieu protéique humain proche de la composition des fluides biologiques en accord avec la voie d'exposition des NPs (sérum humain en prévision de leur injection, fluide gastro-intestinal pour celles destinées à l'ingestion, mucus dans le cas de l'inhalation).

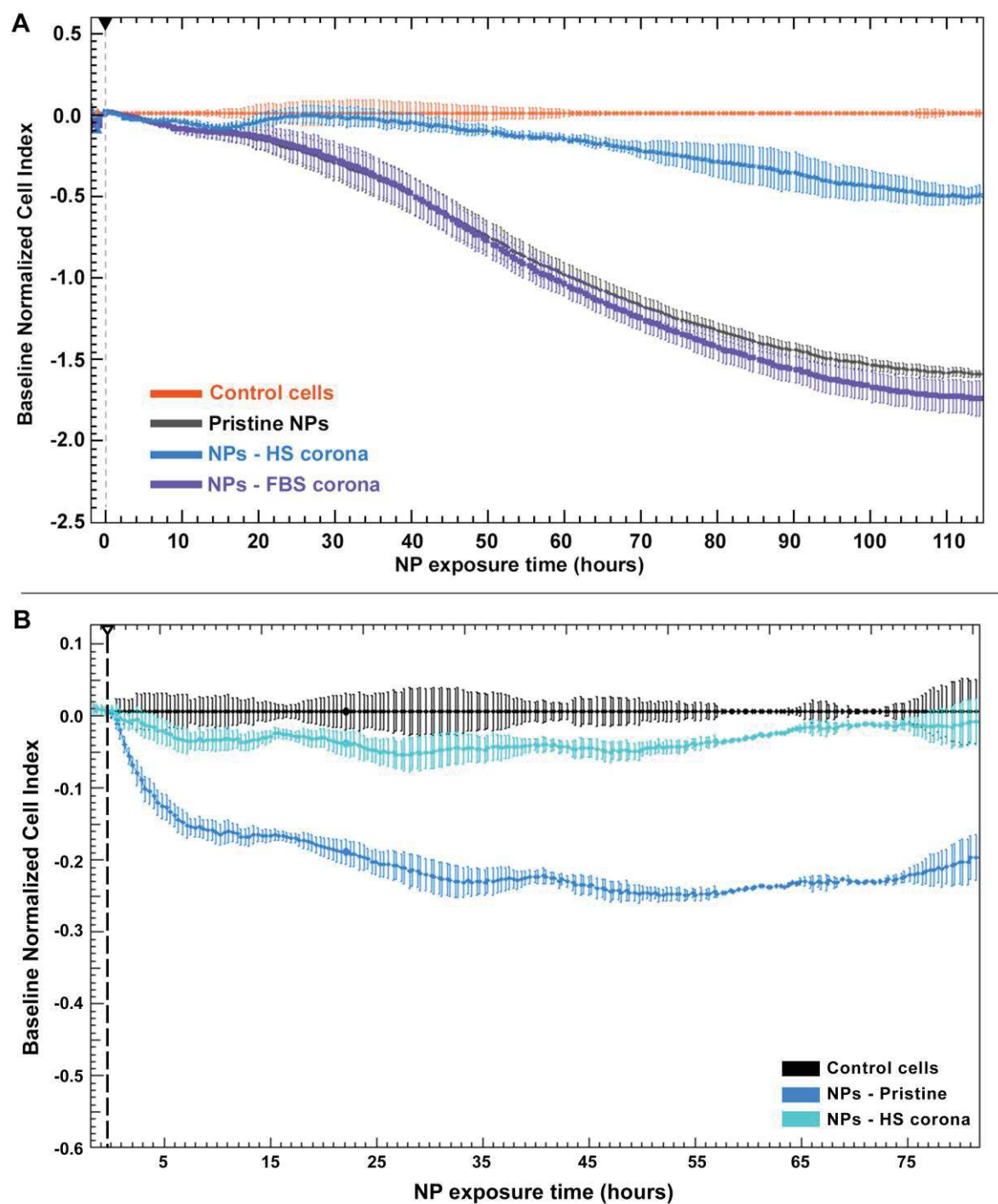


Figure 41. Comparaison des effets de la corona autour de M-MSNs sur HepG2 et HepaRG mesurés par impédance cellulaire en temps réel. A) Les cellules HepG2 ont été exposées à 50 µg/mL de M-MSNs natives ou recouvertes d'une corona préformée de protéines sériques humaines ou bovines fœtales. B) Les cellules HepaRG ont été exposées à 50 µg/mL de M-MSNs natives ou recouvertes d'une corona préformée de protéines sériques humaines.

RESEARCH ARTICLE

The species origin of the serum in the culture medium influences the *in vitro* toxicity of silica nanoparticles to HepG2 cells

Cédric Pisani^{1,2}, Estelle Rascol¹, Christophe Dorandeu¹, Jean-Charles Gaillard³, Clarence Charnay⁴, Yannick Guari⁴, Joël Chopineau^{1,5}, Jean Armengaud³, Jean-Marie Devoisselle¹, Odette Prat^{2*}

1 Institut Charles Gerhardt de Montpellier, MACS, UMR 5253 CNRS-ENSCM-UM, Place Eugène Bataillon, Montpellier, France, **2** CEA, Direction de la Recherche Fondamentale—BIAM, Site de Marcoule, Bagnols-sur-Cèze, France, **3** CEA, Direction de la Recherche Fondamentale—IBITECS, Site de Marcoule, Bagnols-sur-Cèze, France, **4** Institut Charles Gerhardt de Montpellier, IMNO, UMR 5253 CNRS-ENSCM-UM, 1701, Place Eugène Bataillon, Montpellier, France, **5** Université de Nîmes Rue Georges Salan, Nîmes, France

* odette.prat@cea.fr



OPEN ACCESS

Citation: Pisani C, Rascol E, Dorandeu C, Gaillard J-C, Charnay C, Guari Y, et al. (2017) The species origin of the serum in the culture medium influences the *in vitro* toxicity of silica nanoparticles to HepG2 cells. PLoS ONE 12(8): e0182906. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182906>

Editor: Valentin Ceña, Universidad de Castilla-La Mancha, SPAIN

Received: January 31, 2017

Accepted: July 26, 2017

Published: August 10, 2017

Copyright: © 2017 Pisani et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the French National Research Agency (ANR), Grant ANR-13-NANO-0007-03, to JMD.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

The formation of a protein corona around nanoparticles can influence their toxicity, triggering cellular responses that may be totally different from those elicited by pristine nanoparticles. The main objective of this study was to investigate whether the species origin of the serum proteins forming the corona influences the *in vitro* toxicity assessment of silica nanoparticles. Coronas were preformed around nanoparticles before cell exposures by incubation in fetal bovine (FBS) or human (HS) serum. The compositions of these protein coronas were assessed by nano-LC MS/MS. The effects of these protein-coated nanoparticles on HepG2 cells were monitored using real-time cell impedance technology. The nanoparticle coronas formed in human or fetal bovine serum comprised many homologous proteins. Using human compared with fetal bovine serum, nanoparticle toxicity in HepG2 cells decreased by 4-fold and 1.5-fold, when used at 50 and 10 µg/mL, respectively. It is likely that “markers of self” are present in the serum and are recognized by human cell receptors. Pre-forming a corona with human serum seems to be more appropriate for *in vitro* toxicity testing of potential nanocarriers using human cells. *In vitro* cytotoxicity assays must reflect *in vivo* conditions as closely as possible to provide solid and useful results.

Introduction

Magnetic mesoporous silica nanoparticles (M-MSNs) are of particular interest in nanomedicine as targeting tools for theranostics: the combined discipline of therapeutics and diagnostics [1–3]. These nanoparticles (NPs) are intended for development as injectable nanocarriers for drug delivery, but their safety must first be established. Indeed, nanomedicine and nanotoxicology are two sides of the same coin, the main difference between the toxicological and pharmacological aspects being whether or not a specific effect is desired [4, 5]. While the toxicity of

drug-loaded nanocarriers is wanted against targeted tissues, the biocompatibility of the carrier itself must be investigated to avoid collateral toxicity, especially for the liver which is the main accumulation organ of mesoporous silica nanocarriers [6–8].

Although animal experimentation remains the gold standard in regulatory toxicology, it is being replaced where possible with *in vitro* cytotoxicity assays using human cell cultures, for both ethical considerations and scientific reasons regarding the limits to the information that can be gained by extrapolation from animals to humans [9–11]. *In vitro* cell culture assays provide high-throughput systems for rapid and cost-effective hazard screening. At present, NP cytotoxicity testing is based on the same *in vitro* methods established for the hazard characterization of chemicals. Nevertheless, nanotoxicology is a special area of toxicology, with evidence accumulating that the effects of NPs differ widely from those of chemicals, and that they may interfere with cell cultures and commonly used test systems [12]. This is due to the specific features (particle size, size distribution, density, surface modification, aggregation/agglomeration state, shape) that confer on NPs their special physical properties. According to the REACH Nano Consultation [13], further research is required to gain a better understanding of how representative experimental conditions are of real human exposure conditions, which parameters differ, and how these may affect the observed toxicity. The challenge for NP toxicity testing is the development of new, standardized *in vitro* methods that cannot be affected by the NP properties [12].

In biological fluids or cell media, NPs are known to adsorb a variety of biomolecules, especially proteins, forming a layer called the corona. In particular, in contact with blood, NPs are covered with multiple human serum proteins, which control the NP cellular fate and potential toxicity. The corona around NP creates a new nano-object, whose interactions with living cells are different from those induced by pristine NP [14, 15]. The protein corona is influenced by the physico-chemical parameters of NPs (size, shape, surface charge, atom composition) and proteins (charge, plasticity, conformation) [16, 17], and also by biological parameters (protein-protein interactions, biomolecule composition) [18, 19]. Some experimental protocols in the nanotoxicology field are available in the public domain. For instance, the European Joint Action Nanogenotox proposed an NP dispersion protocol using bovine serum albumin (BSA) solution to avoid NP aggregation in biological media [20]. For *in vitro* cell assays, the Nanotechnology Characterization Laboratory (NCL) provides protocols such as an MTT cytotoxicity assay on HepG2 cells using fetal bovine serum (FBS) in cell culture (NCL Method GTA-2) [21].

In cellular toxicology studies, the supplementation of FBS in cell culture media is a convention that is followed for practical and economic reasons. FBS contains all the factors required for cell growth, stimulation of cell proliferation, and cellular metabolism, and is included in the majority of growth supplements used in the culture of human and animal cells. Nevertheless, in the special case of NPs, the systematic use of animal sera in cell culture for toxicology studies raises concerns about the correct evaluation of cytotoxicity. There is no doubt that the presence of adsorbed proteins influences the biological and toxicological fates of NPs, even if it is difficult to determine how the protein composition of the corona affects cell behavior. According to Anders *et al.*, the improved dispersion stability induced by FBS leads to increased NP bioavailability in suspension cell models, and reduced NP sedimentation onto adherent cell layers, resulting in more accurate *in vitro* toxicity assessments [22]. NP uptake has also been shown to be mediated by the protein corona [23, 24].

Despite the advantages of standardized protocols, the impact of the formation of a protein corona on nanomaterial toxicity evaluations needs to be taken into consideration. Although there is scientific interest in the corona, its influence on the NP cytotoxicity remains unclear [25].

In this study, we analyzed the impact of the species origin of the serum on the assessment of nanotoxicity in cell cultures *in vitro*. For this, we built preformed coronas around M-MSNs by incubation in sera of different species before exposing cells to NPs. These nanoparticles intended to be used in nanomedicine are reproducible and well characterized [26]. The protein content of these coronas, composed of either fetal bovine serum (FBS) or human serum (HS) proteins, was firstly identified by mass spectrometry (nano-LC MS/MS). Hepatic HepG2 cells were then exposed to these NPs, with or without a preformed corona. Cellular effects were analyzed by real-time cell impedance technology (xCELLigence System, ACEA Biosciences). This technology, a cell-based microelectronic biosensor which provides real-time and label-free cellular analyses, allows the limits of endpoint analysis to be extended by capturing data throughout the entire time-course of an experiment in order to obtain data that are more physiologically relevant. The xCELLigence platform is a powerful and reliable tool that can be used for toxicity and pharmacology studies [27].

Materials and methods

1. Synthesis of magnetic mesoporous silica nanoparticles (M-MSNs)

Magnetic mesoporous silica nanoparticles (M-MSN) were synthesized according to an optimized procedure, previously described [26]. This two-step method allows the formation of monodisperse and homogeneous core@shell Fe_3O_4 @MSN nanoparticles with a single magnetic iron oxide core per nanoparticle surrounded by a mesoporous silica shell.

2. Nanoparticle characterization

Transmission electron micrographs (TEM) were obtained using a JEOL 1200 EX II microscope.

Hydrodynamic diameters and zeta potentials were determined using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, UK). Measurements ($n = 3$) were performed at 20 $\mu\text{g/mL}$ NPs after sonication for 2 min in an ultrasonic bath (Elma Transsonic T780/H) in 1X PBS for hydrodynamic diameters and in 20 mM HEPES, 5 mM NaCl buffer for zeta potentials at 20°C, pH 7.4.

3. Formation of a preformed corona

A stock suspension of M-MSNs (1 mg/mL) in 1X PBS (Invitrogen) was prepared. After sonication in an ultrasonic bath (Elma Transsonic T780/H) at 4°C for 2 min, the M-MSN suspension was supplemented with 10% HS (Sigma-Aldrich) or HyClone™ FBS (Thermo Fisher Scientific). Exposure started at the time of serum addition. Twenty-four hours after the addition of serum, samples containing M-MSNs coated with proteins were washed three times with 1 mL 1X PBS (Invitrogen) by gently mixing, followed by magnetization separation for 30 s (1.4 Tesla magnets). Washing steps were necessary to eliminate non-adsorbed proteins.

4. Sample preparation for nano-LC mass spectrometry

M-MSNs coated with proteins were suspended in 20 μL 1X PBS and 10 μL 1X LDS (lithium dodecyl sulfate, Invitrogen). 1X LDS working solution contained: 106 mM Tris/HCl, 141 mM Tris base, 2% lithium dodecyl sulfate, 10% glycerol, 0.51 mM EDTA, 0.22 mM G250 SERVA® Blue, 0.175 mM Phenol Red, buffered at pH8.5 and was supplemented with 2.5% beta-mercaptoethanol. Samples were heated at 99°C for 5 min and loaded onto a 4–12% NuPAGE gel (Invitrogen) for a short (5 min) denaturing electrophoresis run at 200 V in 1X MES/SDS running buffer (2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid) from Sigma Aldrich. Proteins migrated into the gel, whilst nanoparticles were retained in the wells. Gels were stained with

Coomassie Blue Safe stain (Invitrogen). Densitometric analyses of polyacrylamide gels were performed using Quantity One software (Biorad). The polyacrylamide bands containing all proteins were processed as previously described [28]. Briefly, after overnight destaining at 4°C with milliQ water, the protein content from each well was excised with a scalpel as a single polyacrylamide band. These bands were treated with 25 mM DTT, then with iodoacetamide and finally proteolyzed with 0.01% proteasMAX (Promega). The resulting peptides (10 µL) were analyzed using an ESI-Q Exactive HF mass spectrometer (ThermoFisher Scientific) incorporating an ultra-high-field Orbitrap analyzer and coupled to an Ultimate 3000 RSL Nano LC System (Dionex-LC Packings). For nano-liquid chromatography, samples were loaded and desalted on-line on a reverse phase Acclaim PepMap100 C18 micro precolumn (5 µm, 100 Å, 300 µm internal diameter x 5 mm, ThermoFisher) and resolved on an Acclaim PepMap100 C18 nano column (3 µm, 100 Å, 75 µm internal diameter x 50 cm, ThermoFisher) at a flow rate of 0.2 µL/min, with a 4–25% gradient of solvent B (80% acetonitrile, 20% water, 0.1% formic acid) against solvent A (0.1% formic acid, 99.9% water) for 70 min and then 25–40% for 20 min, for a total gradient run time of 90 min. A top20 data-dependent method was used for MS/MS spectrum acquisition. Full-scan mass spectra were measured from 350 to 1500 m/z with an Automatic Gain Control Target set at 3×10^6 ions and a resolution of 60,000. MS/MS scan was initiated at a resolution of 15,000 for ions with potential charge of 2+ and 3+ and with a dynamic exclusion of 10 s. MS/MS were recorded with an Automatic Gain Control Target set at 1×10^5 ions.

5. Protein identification and proteomic quantification

MS/MS spectra were analyzed using MASCOT DAEMON software version 2.2.2 (Matrix Science) with the SwissProt database (release SwissProt_2016). Searches for peptides were performed using the following parameters: full-trypsin specificity, a mass tolerance of 5 ppm on the parent ion and 0.5 Da on the MS/MS, carbamidomethylCys as static modification and oxidized Met as dynamic modification, and maximum number of missed cleavages set at 2. All peptide matches with a peptide score below a p-value of 0.05 were filtered. A protein was considered to be validated when at least two different peptides were detected in the same experiment. The false-positive rate for protein identification was estimated using the appropriate decoy database as below 1%. The number of MS/MS spectra per protein (spectral counts, SC) was determined for each sample and compared using the TFold method of the PatternLab software v3.2.0.3 as previously described, with a minimal SC cut-off set at 5 [29]. The relative quantitative proteomic analysis was calculated according to the method of normalized spectral abundance factors (NSAF) [18, 30]. The normalized spectral abundance factor is a ratio calculated by normalizing spectral counts (SC) obtained for a protein (i) by the respective molecular weight (MW) as follows:

$$NSAF_i (\%) = \left(\frac{\frac{SC_i}{MW_i}}{\sum_{i=1}^n \left(\frac{SC_i}{MW_i} \right)} \right) \times 100$$

6. Cell culture

The HepG2 human hepatic cell line (HB-8065™) was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Cells were cultured in RPMI 1640 (Gibco™, Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% Hyclone™ FBS (ThermoFisher Scientific), and penicillin/streptomycin (100 U/mL and 100 µg/mL, respectively). Cells were incubated in a humidified incubator at 37°C and 5% CO₂. Cells were passaged twice a week, keeping the confluence below 80%. Cells were used between passages 20 to 40.

7. Real-time cell impedance measurements

Real-time cell impedance measurements were performed with the xCELLigence system (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA). The background resistance of the E-plates (ACEA Biosciences) was determined using 100 μ L culture medium. HepG2 cells were seeded in E-plates at 1.10^4 cells per well. The E-plates were placed into the Real-Time Cell Analyzer (RTCA) station (ACEA Biosciences) and incubated at 37°C. Cells were grown for 24 h, with impedance recorded every minute for 12 h for the adhesion phase, then every 15 min for 36 h for the growth phase. After this, cells were exposed ($n = 3$) to pristine M-MSNs, M-MSNs-FBS corona or M-MSNs-HS corona, at 25, 50, and 100 μ g/mL for 115 h, with monitoring every minute for the first 24 h (early effects) and every 15 minutes for the next 91 h (late effects). The impedance of control cells in the absence of M-MSNs was also recorded. Cell index (CI) raw data values were calculated using the RTCA software 2.0. Normalized cell indexes were calculated using this software at a selected normalization timepoint set just before the addition of nanoparticles. For a better understanding, the time-point zero of the X-axis on the figures corresponds to the NP exposure point. As a control, all nanoparticles were tested in acellular conditions and no interference on impedance measurements was observed, in accordance with other studies of cell impedance with nanoparticles [31].

Results

1. Characterization of synthesized M-MSNs

M-MSNs were composed of an Fe_3O_4 nanocrystal core surrounded by a mesoporous silica shell [26]. In the pristine state, these NPs had a diameter of 116.6 nm (± 2.1) measured by TEM (Fig 1), and a hydrodynamic diameter of 143.5 nm (± 1.5) measured by DLS (Table 1). They were monodispersed and stable at physiological pH with a zeta potential of -39.1 mV (± 1.5).

After incubation of the M-MSNs in serum for 24 h, the zeta potential increased to -20.1 mV and -19.9 mV for FBS and HS, respectively. The hydrodynamic diameter increased to 193.3 nm and 220.8 nm for FBS and HS, respectively.

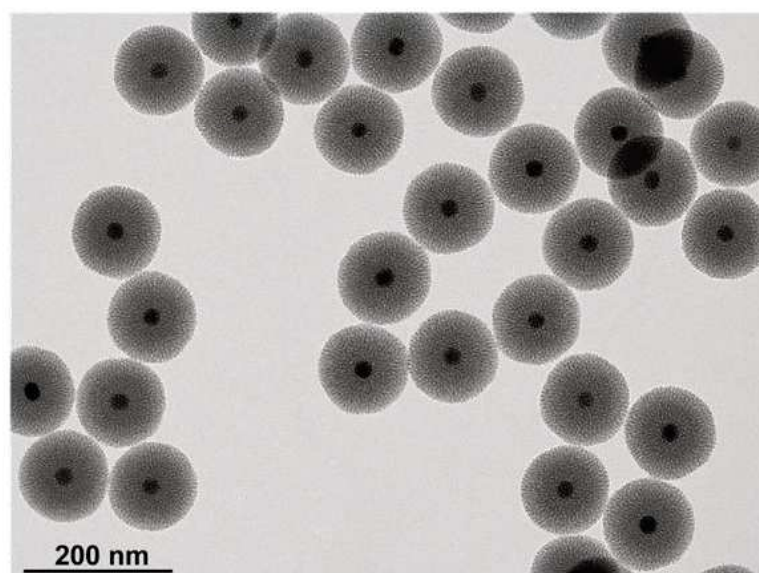


Fig 1. Transmission electron microscopy of synthesized magnetic mesoporous silica nanoparticles (M-MSNs). Mean diameter $\pm$ SD: 116.6 $\pm$ 2.1 nm.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182906.g001>

Table 1. Hydrodynamic diameter and zeta potential measurements of M-MSNs, either pristine or in the presence of a preformed HS or FBS protein corona. Measurements were performed in physiological pH. Values are mean $\pm$ standard deviation ($n = 3$).

	Hydrodynamic Diameter (nm)	Polydispersity Index	Zeta Potential (mV)
Pristine M-MSNs	143.5 $\pm$ 1.5	0.111 $\pm$ 0.024	-39.1 $\pm$ 1.5
M-MSNs—preformed FBS corona	193.3 $\pm$ 6.5	0.187 $\pm$ 0.003	-20.1 $\pm$ 2.7
M-MSNs—preformed HS corona	220.8 $\pm$ 2.8	0.288 $\pm$ 0.018	-19.9 $\pm$ 1.7

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182906.t001>

2. Identification of corona proteins adsorbed around nanoparticles

Proteomic analyses were performed to identify proteins contained within the corona formed around M-MSNs after 24 h of contact.

For FBS coronas more than 9,200 MS/MS spectra were analyzed, corresponding to 127 proteins (S1 Table). Proteins in the FBS corona included components of the complement system, apolipoproteins, and coagulation factors. The top 20 most abundant proteins in the corona (Table 2), included transporters (serum albumin, vitamin D-binding protein, fetal hemoglobin) and acute-phase response proteins (alpha-2-HS-glycoprotein, inter-alpha-trypsin inhibitor).

For HS coronas, more than 13,600 MS/MS spectra were analyzed corresponding to 150 proteins (S2 Table). Proteins contained in the HS corona included components of the complement system, coagulation factors, and apolipoproteins. The top 20 most abundant proteins included complement factors (C3, B) and some IgGs (Table 3).

The two coronas were similar, with nine homologous proteins in the top 20, including serum albumin (P02769, P03768), complement component C3 (Q2UVX4, P01024), serotransferrin (Q29443, P02787), apolipoprotein A-1 (P15497, P02647), gelsolin (Q3SX14, P06396),

Table 2. Top 20 most abundant proteins in the fetal bovine serum corona. M-MSN samples exposed to sera were separated magnetically, washed with 1X PBS, and analyzed by nano-LC mass spectrometry as indicated in the Methods section. The number of MS/MS spectra per protein was determined for each sample and the relative quantitative proteomic analysis was calculated according to the method of normalized spectral abundance factors (NSAF). The twenty most abundant proteins are listed below.

Fetal Bovine Serum Protein Description	Uniprot accession	MS/MS Spectra	MW (Da)	NSAF (%)
Serum albumin	P02769	2296	69248	18.8
Alpha-2-HS-glycoprotein	P12763	1082	38394	16.0
Hemoglobin fetal subunit beta	P02081	176	15849	6.3
Apolipoprotein A-1	P15497	230	30258	4.3
Alpha-1-antitrypsin	P34955	282	46075	3.5
Serotransferrin	Q29443	373	77703	2.7
Alpha-fetoprotein	Q3SZ57	307	68543	2.5
Vitamin D-binding protein	Q3MHN5	196	53307	2.1
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	Q3T052	363	101449	2.0
Fetuin-B	Q58D62	143	42636	1.9
Plasma serine protease inhibitor	Q9N2I2	147	45268	1.8
Apolipoprotein A-II	P81644	33	11195	1.7
Beta-2-glycoprotein 1	P17690	106	38227	1.6
Pigment epithelium-derived factor	Q95121	116	46200	1.4
Hemoglobin subunit alpha	P01966	38	15175	1.4
Gelsolin	Q3SX14	202	80681	1.4
Cystatin-C	P01035	40	16254	1.4
Complement C3	Q2UVX4	434	187135	1.3
Tetranectin	Q2KIS7	47	22130	1.2
Antithrombin-III	P41361	101	52314	1.1

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182906.t002>

Table 3. Top 20 most abundant proteins in the human serum corona. M-MSN samples exposed to sera were separated magnetically, washed extensively with 1X PBS, and analyzed by nano-LC mass spectrometry as indicated in the Methods section. The number of MS/MS spectra per protein was determined for each sample and the relative quantitative proteomic analysis was calculated according to the method of normalized spectral abundance factors (NSAF). The twenty most abundant proteins are listed below.

Human Serum Protein Description	Uniprot accession	MS/MS Spectra	MW (Da)	NSAF (%)
Serum albumin	P02768	4268	69321	25.5
Apolipoprotein A-I	P02647	324	30759	4.4
Ig kappa chain C region	P01834	120	11602	4.3
Ig gamma-1 chain C region	P01857	348	36083	4.0
Ig lambda-2 chain C regions	P0CG05	73	11287	2.7
Alpha-2-HS-glycoprotein	P02765	254	39300	2.7
Complement C3	P01024	1167	187030	2.6
Serotransferrin	P02787	398	77014	2.1
Hemopexin	P02790	253	51643	2.0
Beta-2-glycoprotein 1 (Apolipoprotein H)	P02749	157	38273	1.7
Vitamin D-binding protein	P02774	208	52929	1.6
Alpha-1-antitrypsin	P01009	183	46707	1.6
Apolipoprotein A-IV	P06727	153	45371	1.4
Apolipoprotein A-II	P02652	36	11168	1.3
Ig gamma-3 chain C region	P01860	121	41260	1.2
Plasminogen	P00747	254	90510	1.2
Apolipoprotein E	P02649	97	36132	1.1
Complement factor B	P00751	206	85479	1.0
Gelsolin	P06396	187	85644	0.9
Apolipoprotein D	P05090	46	21262	0.9

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182906.t003>

alpha-2-HS-glycoprotein (P12763, P02765), vitamin D-binding protein (Q3MHN5, P02774), and beta-2-glycoprotein 1 (P17690, P02749).

VENN diagram (Fig 2) showed homologous proteins between preformed coronas. These proteins represented 49% of the FBS preformed corona and 41% of the HS preformed corona.

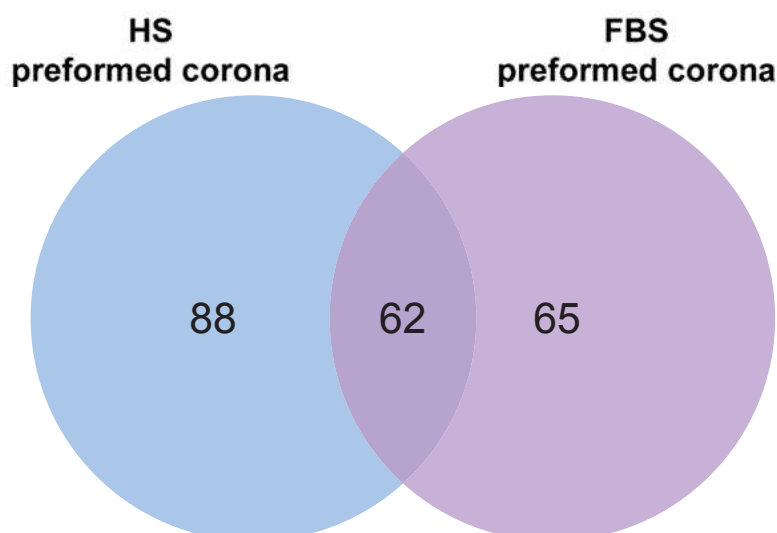


Fig 2. VENN diagram. This diagram represents the number of specific proteins per preformed corona identified by nano-LC MS/MS. The two coronas present 62 homologous proteins.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182906.g002>

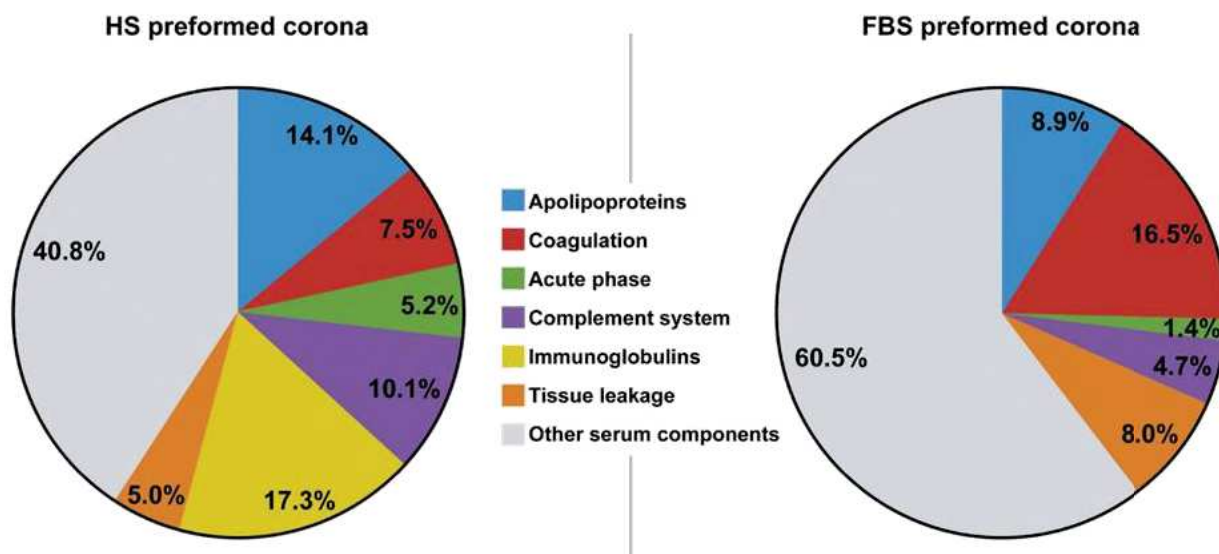


Fig 3. Classification of corona components. Proteins identified in respective preformed coronas by nano-LC MS/MS were grouped according to their biological processes in the blood system (Uniprot DB). Values are expressed as percentages.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182906.g003>

However, despite the large part of homologies between both coronas, these homologous proteins had quantitative differences, as represented by their normalized spectral abundance factors (NSAF) in Tables 2 and 3. For instance, Serum Albumin (FBS: P02769; HS: P02768), represented 18.8 and 25.5% of the FBS and HS preformed coronas, respectively, or Alpha-2-HS-Glycoprotein (FBS: P12763; HS: P02765), constituted 16.0% of the FBS versus 2.7% of the HS preformed corona.

Proteins identified in both preformed coronas were classified according to their functional annotations from the Uniprot database (Fig 3). We observed firstly the complete absence of Immunoglobulins (Ig) in the FBS corona, while these Ig constituted 17.3% of the HS preformed corona. Apolipoproteins were more frequently present in the HS (14.1%) than FBS (8.9%) corona, while Coagulation components constituted 7.5% of the HS corona and 16.5% of the FBS corona.

3. Cytotoxicity of nanoparticles recorded by real-time cell impedance

3.1 HepG2 cells exposed to pristine M-MSNs. Real-time cell impedance monitoring was used to investigate the effects of pristine M-MSNs on human HepG2 hepatocytes, including viability, adhesion, and morphology. Fig 4 represents a multiple-dose test of the exposure of cells to pristine M-MSNs.

Pristine M-MSNs induced a dose-dependent reduction in the cell index (CI), as compared with control cells. At 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$, these nanoparticles induced a drastic effect in a biphasic pattern, with a slow decrease in the CI over the first 20 h of exposure followed by a strong decrease to the end of the experiment. At 25 $\mu\text{g/mL}$, we observed a biphasic effect composed of a slow decrease in the CI during the first 60 h of exposure followed by a slow increase to the end of the experiment. At the end of the experiment, i.e. after 115 h exposure, the dose-dependent trend was conserved. At 25 and 50 $\mu\text{g/mL}$, the toxicity of M-MSNs on HepG2 cells was 7- and 1.5-fold lower than at 100 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

3.2 HepG2 cells exposed to M-MSNs in the pristine state or covered with serum proteins. HepG2 cells were exposed to pristine M-MSNs or protein-covered M-MSNs. Fig 5

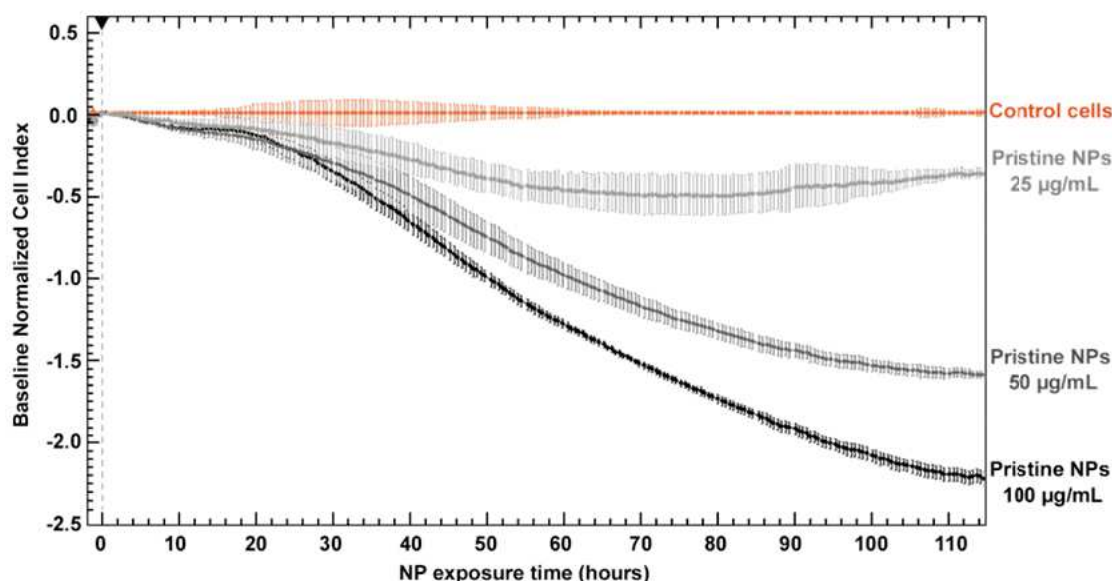


Fig 4. Real-time cell index (CI) monitoring of HepG2 cells ($n = 3$) exposed to 25, 50, or 100 $\mu\text{g/mL}$ pristine M-MSNs for 115 hours. All curves represent the mean of three curves with recorded standard deviations at each time-point. The black arrow represents the starting point of exposure. Cell index was normalized to baseline (control cells) to ensure inter-dose comparison.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182906.g004>

shows that M-MSNs covered with bovine proteins behaved as pristine M-MSNs, i.e. showing a biphasic pattern with a slow decrease in the CI for the first 20 h followed by a rapid decrease until the end of the experiment. This effect was visible at the two concentrations tested (50 and 100 $\mu\text{g/mL}$). Interestingly, M-MSNs covered with human proteins induced a quite different effect, with a less disturbed CI, likely reflecting much lower cytotoxicity than with pristine and bovine protein-covered M-MSNs. At the end of the experiment using HS instead of FBS decreased toxicity by 4-fold and 1.5-fold at 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$ M-MSNs, respectively.

Discussion

Magnetic mesoporous silica nanoparticles (M-MSNs) are nanoparticles with a great potential in theranostics. Nevertheless, their behavior in biological fluids needs further investigation. In particular, the formation of a corona of proteins around the nanoparticles influences nanoparticle toxicity by triggering cellular mechanisms that may be totally different from those associated with pristine nanoparticles [14, 25, 32–36]. The main objective of this study was to investigate whether the species origin of the serum proteins forming the corona around the M-MSN influences the nanoparticle toxicity in cell cultures *in vitro*. The strategy used for this investigation was to preform coronas around M-MSNs before the exposure of cells, by incubating the M-MSNs in either fetal bovine serum (FBS) or human serum (HS) (Fig 6). We then monitored the impact of these protein-coated particles on HepG2 cells using real-time cell impedance technology. Cell-based phenotypic assays are being more often used in drug discovery, and thus label-free technologies based on impedance measurements represent a powerful tool. Atienzar *et al.* demonstrated a very good correlation between cell index (CI) determined by RTCA and cell viability measured by a standard and traditional assay in HepG2 cells exposed to a set of 50 compounds [27]. The CI reflects modifications of both cell morphology and cell viability.

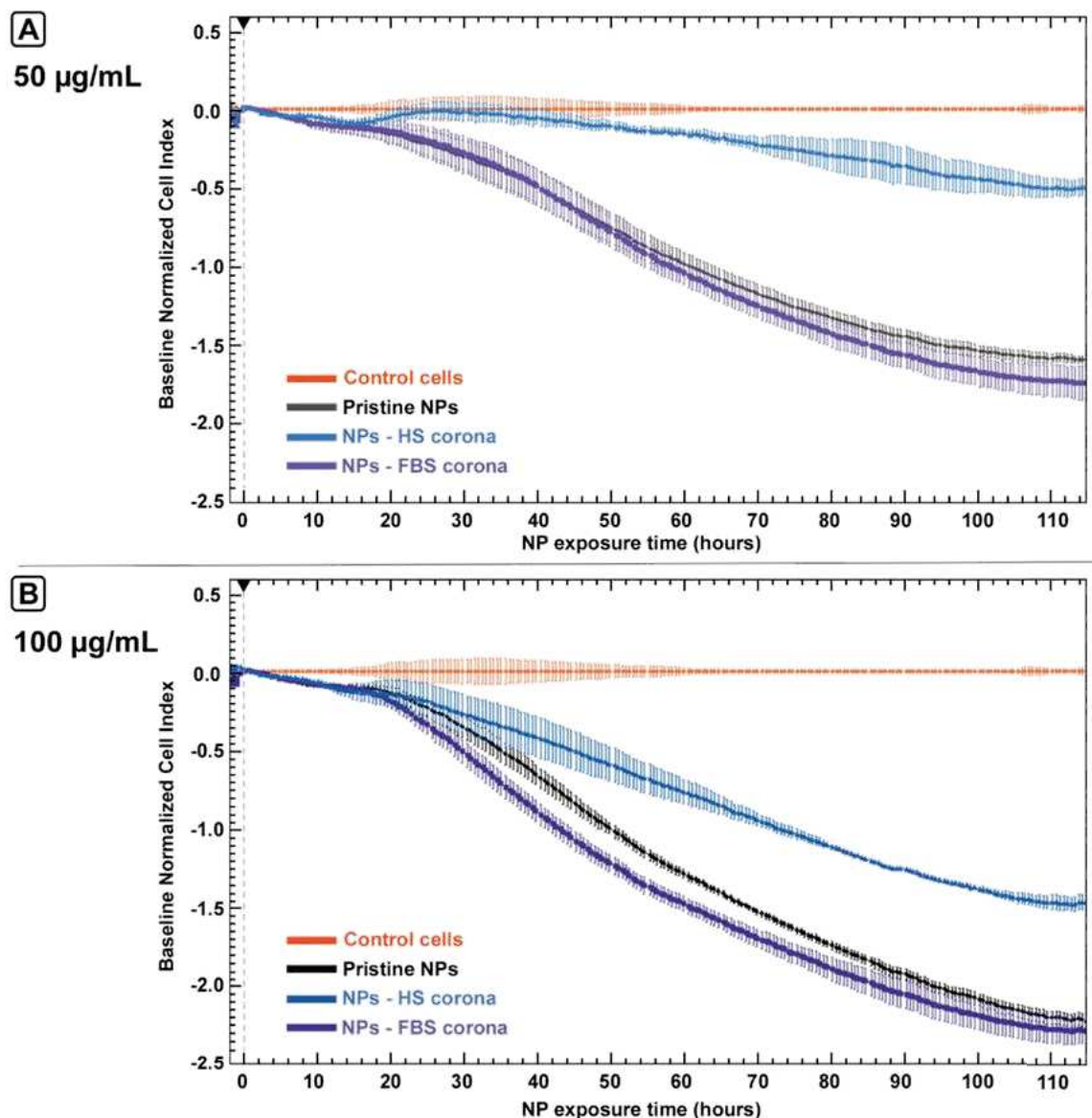


Fig 5. Real-time cell index (CI) monitoring of HepG2 cells ($n = 3$) exposed to A) 50 $\mu\text{g/mL}$, B) 100 $\mu\text{g/mL}$ M-MSNs, in a pristine state or covered with serum proteins, for 115 hours. All curves represent the mean of three curves with recorded standard deviations at each time-point. The black arrow represents the starting point of exposure. Cell index was normalized to baseline (control cells).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182906.g005>

M-MSNs were synthesized and characterized by TEM and DLS, showing homogeneous spheres (Fig 1) that were stable at physiological pH (Table 1) as described previously [26]. With preformed FBS or HS coronas, nanoparticle size increased. The proteins enabled the nanoparticles to remain in a dispersed form, as indicated by their low polydispersity indexes (Table 1).

In the acellular condition, the proteins adsorbed around M-MSNs after 24 h were identified by mass spectrometry and the results were consistent with those reported in the literature [19, 36–39]. A panel of proteins was identified, including abundant serum proteins such as

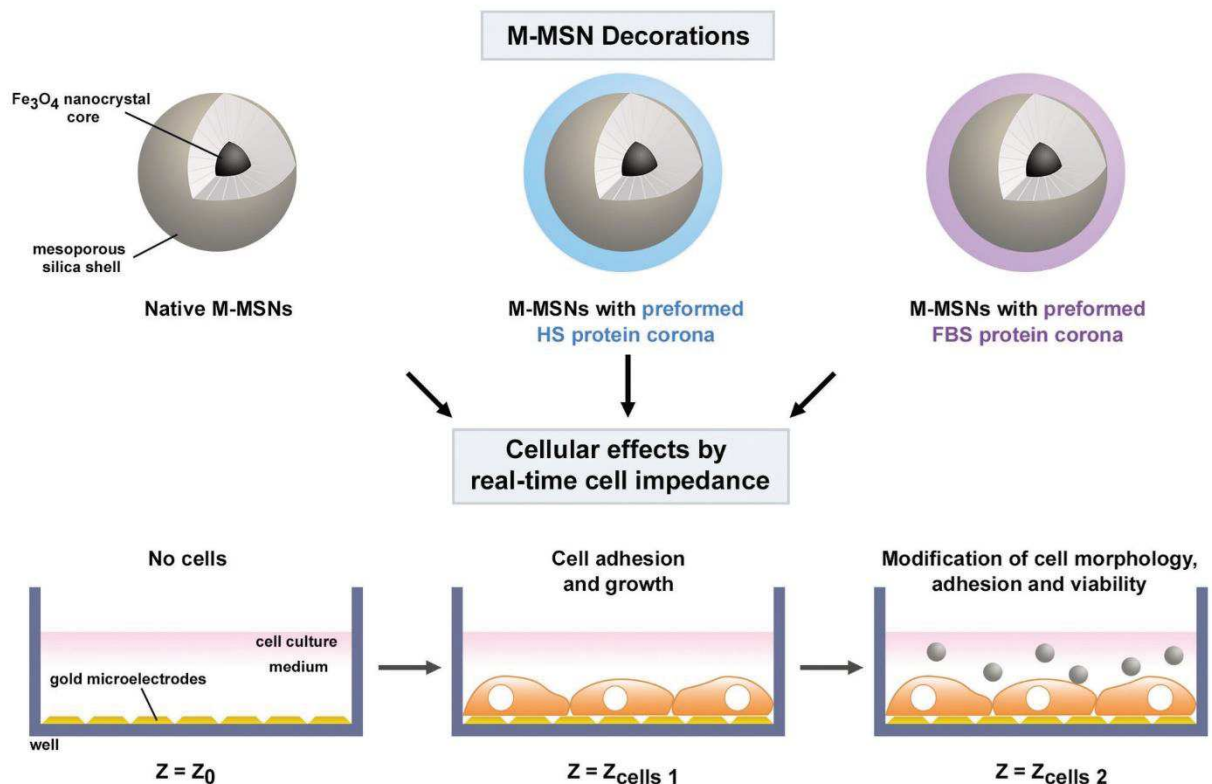


Fig 6. Strategy used to investigate the impact of the corona on toxicological outcomes using real-time cell impedance.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182906.g006>

albumin, and well-known protein families including components of the complement system, coagulation factors, and apolipoproteins. Very recently Strojan *et al*, 2017 described a list of 30 proteins found in the FBS-corona of silica NPs; all these proteins are included in our data set (S1 Table), especially complement factor H, complement C3 and complement C4, all part of the complex complement system [39]. The components of both coronas included 62 homologous proteins as depicted in Fig 2. These proteins represented 49% of the FBS preformed corona and 41% of the HS preformed corona. However, despite the large homology between both coronas, these proteins showed quantitative differences, as represented by their normalized spectral abundance factors (NSAF) in Tables 2 and 3. For instance, Serum Albumin (FBS: P02769; HS: P02768), represented 18.8 and 25.5% of the FBS and HS preformed coronas, respectively. Alpha-2-HS-glycoprotein (P12763) constitutes 16.0% of the bovine corona whereas the homologous human protein (P02765) represents only 2.7% of the human corona. We observed the complete absence of Immunoglobulins (Ig) in the FBS corona while these Ig constituted 17.3% of the HS preformed corona (Fig 3). This result is expected since fetal serum is not equipped with antibodies. Apolipoproteins were more frequently present in HS corona (14.1%) than in FBS corona (8.9%), while coagulation components constituted 7.5% of the HS corona and 16.5% of the FBS corona (Fig 3). This difference could be a reason for the increased toxicity of bovine vs. human serum.

In an *in vitro* toxicity assay, the cell culture medium contains protein serum and a similar corona formation is expected. Some studies have described the effect of serum on nanomaterial toxicity [14, 19, 25, 35, 40–42]. Corona formation was found to affect hemolysis, thrombocyte activation, nanoparticle uptake and endothelial cell death [19]. When in contact with a

biological environment, the protein corona confers on NPs a new bioidentity. Some of the proteins in this corona can be recognized by specific cell membrane receptors, triggering internalization mechanisms that are different to those generated by pristine NPs [40]. Once inside cells, NPs may cause adverse effects and permanent cell damage. Mechanisms including oxidative stress, inflammation, genetic instability, and the inhibition of correct cell division may be involved and may contribute to cell death [5].

In this context, hepatic HepG2 cells were exposed to three different concentrations of pristine M-MSNs. A dose-dependent response of the HepG2 cell index was observed with exposure to pristine nanoparticles (Fig 4). HepG2 cells were then exposed to M-MSNs covered with coronas of two different species origins, each at two different concentrations (Fig 5). M-MSNs covered with bovine proteins induced similar effects to pristine NPs at both doses tested 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig 5A) and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig 5B). This result is related to the kinetics of corona formation [18, 23, 36]. Indeed, corona formation begins as soon as NPs are in contact with the proteins contained in the culture medium. We have previously shown that after 30 seconds the corona has already formed around the NP [18]. Thus, by the time the nanoparticles and cells come into contact, the corona has already formed around the pristine M-MSNs, producing similar effects to those elicited by a 24-hour preformed FBS corona. The formation of the corona occurs within the first minutes [18, 19]. The fact that the cellular effects are similar between the 24h- and the minute-corona proves that the subsequent exchanges between the corona proteins and the surrounding medium are of little importance on the cellular toxicity of NP. Nevertheless, Fig 5 also clearly shows that M-MSNs with a preformed human corona induced much lower toxicity on HepG2 cells than M-MSNs with a preformed bovine corona. Using HS instead of FBS mitigated M-MSN toxicity by 4-fold and 1.5-fold at 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively.

Consequently our findings show that sera from different species induce different cellular behaviors. This discrepancy may be explained by the presence of cell membrane receptors able to distinguish between human proteins and homologous proteins of other species [24]. The latter are likely to be preferentially internalized to be destroyed in lysosomes [43]. When protected by human proteins, M-MSNs may appear more “neutral” to the human cells, as summarized in Fig 7. It is likely that some “markers of self” are present in sera. For example, CD47 is described as a “marker of self” [44] and is present at the surface of exosomes in normal human serum [45]. The phagocytes possess a cell surface receptor similar to immunoglobulin for CD47 (SIRP α) which binds exclusively to human but not bovine CD47 [46]. CD47 or another circulating human “marker of self” protein effectively acting as a cellular passport might be recognized at the HepG2 cell surface by an as-yet unknown receptor. This could explain the species recognition that we observed.

For economic reasons, most *in vitro* toxicity assays use FBS in the cell culture media. Taking into consideration the results of this study, it is then possible that the toxicities of nanoparticles might sometimes be overestimated when FBS is used in this type of assay. For *in vitro* assays of nanoparticles intended for drug delivery, the use of nanoparticles preincubated in solutions close to the biological composition of human blood would be more representative of an *in vivo* situation and would enable their toxicity to human cells to be determined more accurately. From a broader perspective, the route of exposure should be taken into account in developing a preincubation solution for nanoparticles, in order to represent the *in vivo* scenario as closely as possible. For economic reasons, it is probably not currently possible to replace the use of FBS with HS in cell cultures for high-throughput *in vitro* toxicity screening. Some solutions that have been proposed include alternative culture media to avoid the use of FBS in cell culture [47]. Alternative media (human platelet lysates for instance) to maintain the cell culture growth necessitate a case-by-case basis optimization. The toxicity of nanoparticles in such a

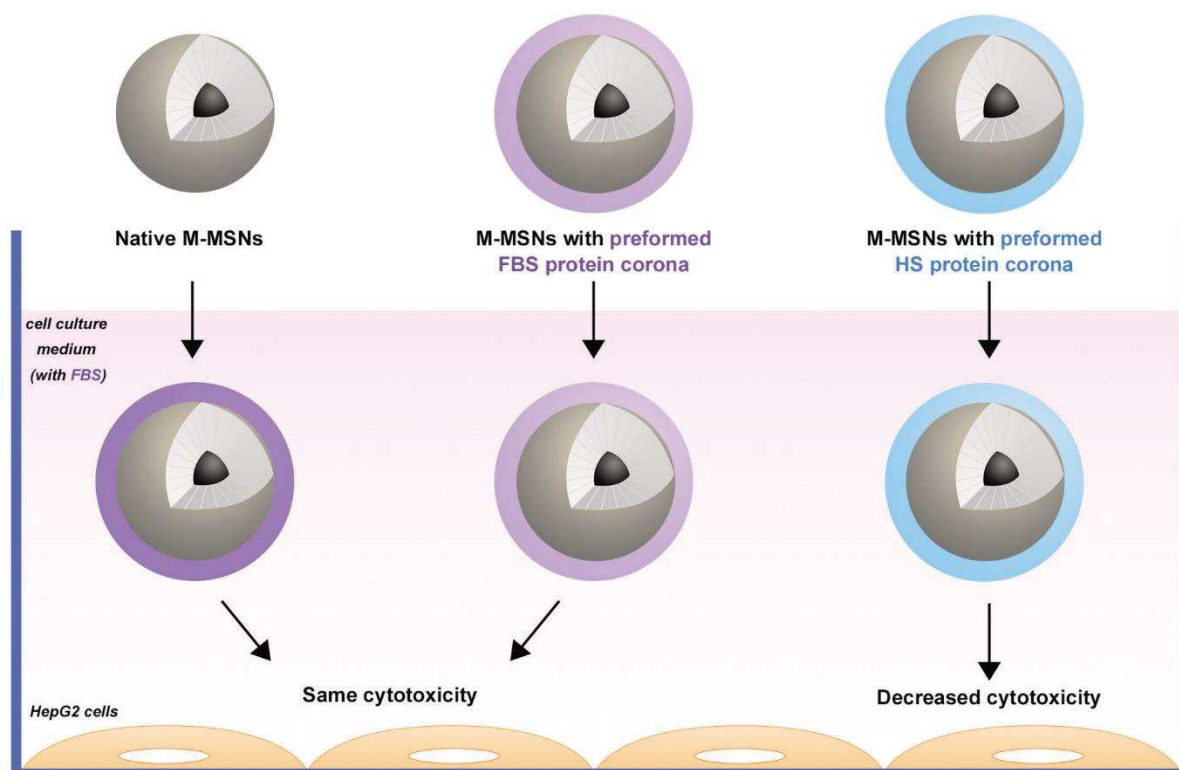


Fig 7. M-MSNs with a protein corona preformed in fetal bovine serum induced the same effects as pristine M-MSNs in HepG2 cells, because the corona forms instantly around the pristine M-MSNs when they encounter the cell medium containing 10% FBS. Using HS instead of FBS to preform coronas mitigated M-MSN (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) toxicity by 4-fold in HepG2 cells.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182906.g007>

xeno-free medium would eliminate the side effect of bovine serum. However, this introduces questions of relevance and biological equivalence, because *in vivo* exposures do not occur in the absence of host proteins [48]. Another solution is to induce a human corona before cell culture assays by preincubating nanoparticles in a human protein solution, chosen according to the route of exposure (injection, inhalation, etc.). In the case of injectable nanocarriers, the use of human serum before testing the toxicity of NP would be more relevant, in order to more closely represent the *in vivo* situation. This solution could limit the influence of the biological medium (containing FBS or alternative mixtures) used in these *in vitro* assays. Other developments will be needed, such as spheroid 3D models, which have been demonstrated to be less sensitive to the toxic effects of NPs as compared with 2D cultures of the same cells (HepG2) [49].

Conclusions

Magnetic mesoporous silica nanoparticles (M-MSNs) are being developed for use as injectable drugs, but their safety must first be proven. Nanotoxicological testing is firstly assessed using *in vitro* methods established for the hazard characterization of chemicals. Nevertheless, special considerations are needed to assess *in vitro* effects of nanoparticles, compared to molecular forms of drugs. Unlike chemicals, the formation of a protein corona around nanoparticles complicates these tests, in particular because of the presence of fetal bovine serum as a common additive in standard culture media of human cells. In this study we showed that M-MSNs surrounded by a corona originating from fetal bovine serum in the cell medium induced toxic

effects on HepG2 cells that were greater than with M-MSNs carrying a preformed human serum corona. This situation may lead to the overestimation of nanoparticle toxicity using standardized protocols. It will be necessary to minimize the impact of the corona on toxicity assays. The route of nanocarrier delivery must be considered for hazard testing, and preforming a corona with human serum seems to be more appropriate for *in vitro* testing than using nonhuman serum. To provide solid and reliable results and to offer a robust alternative to animal testing, *in vitro* cytotoxicity assays must closely represent conditions *in vivo*.

Supporting information

S1 Table. List of protein relative abundances in fetal bovine corona, obtained by NSAF ratio.
(XLSX)

S2 Table. List of protein relative abundances in human corona, obtained by NSAF ratio.
(XLSX)

Author Contributions

Conceptualization: Cédric Pisani, Jean-Charles Gaillard, Jean Armengaud, Jean-Marie Devoisselle, Odette Prat.

Data curation: Cédric Pisani, Jean Armengaud, Odette Prat.

Formal analysis: Cédric Pisani.

Funding acquisition: Jean-Marie Devoisselle.

Investigation: Cédric Pisani, Estelle Rascol, Christophe Dorandeu, Jean-Charles Gaillard, Clarence Charnay, Yannick Guari.

Methodology: Cédric Pisani, Christophe Dorandeu, Jean-Charles Gaillard, Yannick Guari, Jean Armengaud, Odette Prat.

Project administration: Joël Chopineau, Jean-Marie Devoisselle.

Resources: Yannick Guari, Jean Armengaud, Odette Prat.

Supervision: Jean Armengaud, Jean-Marie Devoisselle, Odette Prat.

Validation: Cédric Pisani, Christophe Dorandeu, Jean-Charles Gaillard, Yannick Guari.

Visualization: Cédric Pisani.

Writing – original draft: Cédric Pisani.

Writing – review & editing: Odette Prat.

References

1. Li Z, Barnes JC, Bosoy A, Stoddart JF, Zink JL. Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications. *Chemical Society reviews*. 2012; 41(7):2590–605. <https://doi.org/10.1039/c1cs15246g> PMID: 22216418
2. Tarn D, Ashley CE, Xue M, Carnes EC, Zink JL, Brinker CJ. Mesoporous Silica Nanoparticle Nanocarriers: Biofunctionality and Biocompatibility. *Accounts of Chemical Research*. 2013; 46(3):792–801. <https://doi.org/10.1021/ar3000986> PMID: 23387478
3. Vivero-Escoto JL, Slowing II, Trewyn BG, Lin VS. Mesoporous silica nanoparticles for intracellular controlled drug delivery. *Small*. 2010; 6(18):1952–67. <https://doi.org/10.1002/sml.200901789> PMID: 20690133

4. Hartung T. Food for thought. ... on alternative methods for nanoparticle safety testing. *Altex*. 2010; 27(2):87–95. PMID: [20686741](#)
5. Nyström AM, Fadeel B. Safety assessment of nanomaterials: Implications for nanomedicine. *Journal of Controlled Release*. 2012; 161(2):403–8. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.027> PMID: [22306428](#)
6. He Q, Zhang Z, Gao F, Li Y, Shi J. In vivo biodistribution and urinary excretion of mesoporous silica nanoparticles: effects of particle size and PEGylation. *Small*. 2011; 7(2):271–80. <https://doi.org/10.1002/sml.201001459> PMID: [21213393](#)
7. Wu SH, Lin YS, Hung Y, Chou YH, Hsu YH, Chang C, et al. Multifunctional mesoporous silica nanoparticles for intracellular labeling and animal magnetic resonance imaging studies. *Chembiochem*. 2008; 9(1):53–7. <https://doi.org/10.1002/cbic.200700509> PMID: [17999392](#)
8. Lu J, Liong M, Li Z, Zink JI, Tamanoi F. Biocompatibility, Biodistribution, and Drug-Delivery Efficiency of Mesoporous Silica Nanoparticles for Cancer Therapy in Animals. *Small*. 2010; 6(16):1794–805. <https://doi.org/10.1002/sml.201000538> PMID: [20623530](#)
9. Hartung T. Toxicology for the twenty-first century. *Nature*. 2009; 460(7252):208–12. <https://doi.org/10.1038/460208a> PMID: [19587762](#)
10. Krewski D, Acosta D, Andersen M, Anderson H, Bailar JC, Boekelheide K, et al. TOXICITY TESTING IN THE 21ST CENTURY: A VISION AND A STRATEGY. *Journal of toxicology and environmental health Part B, Critical reviews*. 2010; 13(0):51–138.
11. McKim JM. The Journal of Applied In Vitro Toxicology: Its Time Has Come!: Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA; 2015.
12. Kroll A, Pillukat MH, Hahn D, Schneckeburger J. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2009; 72(2):370–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.08.009> PMID: [18775492](#)
13. Aitken R, Bassan A, Friedrichs S, Hankin S, Hansen SF, Holmqvist J, et al. Specific Advice on Exposure Assessment and Hazard/Risk Characterisation for Nanomaterials under REACH (RIP-on 3)-Final Project Report. European Commission, 2011.
14. Gunawan C, Lim M, Marquis CP, Amal R. Nanoparticle-protein corona complexes govern the biological fates and functions of nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry B*. 2014; 2(15):2060–83.
15. Monopoli MP, Walczyk D, Campbell A, Elia G, Lynch I, Bombelli FB, et al. Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles. *J Am Chem Soc*. 2011; 133(8):2525–34. <https://doi.org/10.1021/ja107583h> PMID: [21288025](#)
16. Izak-Nau E, Voetz M, Eiden S, Duschl A, Puentes VF. 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):56. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-56> PMID: [24206572](#)
17. Klein G, Devineau S, Aude JC, Boulard Y, Pasquier H, Labarre J, et al. Interferences of Silica Nanoparticles in Green Fluorescent Protein Folding Processes. *Langmuir*. 2016; 32(1):195–202. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b03890> PMID: [26649773](#)
18. Pisani C, Gaillard J-C, Odorico M, Nyalosaso JL, Charnay C, Guari Y, et al. The timeline of corona formation around silica nanocarriers highlights the role of the protein interactome. *Nanoscale*. 2017; 9:1840–51. <https://doi.org/10.1039/c6nr04765c> PMID: [27858044](#)
19. Tenzer S, Docter D, Kuharev J, Musyanovych A, Fetz V, Hecht R, et al. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat Nano*. 2013; 8(10):772–81.
20. Jensen KA. Towards a method for detecting the potential genotoxicity of nanomaterials. 2013.
21. Stern S, Potter T. NCL Method GTA-2. Version. 2010; 1:1–11.
22. Anders CB, Chess JJ, Wingett DG, Punnoose A. Serum proteins enhance dispersion stability and influence the cytotoxicity and dosimetry of ZnO nanoparticles in suspension and adherent cancer cell models. *Nanoscale research letters*. 2015; 10(1):1–22.
23. Barran-Berdon AL, Pozzi D, Caracciolo G, Capriotti AL, Caruso G, Cavaliere C, et al. Time evolution of nanoparticle-protein corona in human plasma: relevance for targeted drug delivery. *Langmuir*. 2013; 29(21):6485–94. <https://doi.org/10.1021/la401192x> PMID: [23631648](#)
24. Kim JA, Salvati A, Aberg C, Dawson KA. Suppression of nanoparticle cytotoxicity approaching in vivo serum concentrations: limitations of in vitro testing for nanosafety. *Nanoscale*. 2014; 6(23):14180–4. <https://doi.org/10.1039/c4nr04970e> PMID: [25340311](#)
25. Docter D, Strieth S, Westmeier D, Hayden O, Gao M, Knauer SK, et al. No king without a crown—impact of the nanomaterial-protein corona on nanobiomedicine. *Nanomedicine (Lond)*. 2015; 10(3):503–19.

26. Nyalosaso J, Rascol E, Pisani C, Dorandeu C, Dumail X, Maynadier M, et al. Synthesis, decoration, and cellular effects of magnetic mesoporous silica nanoparticles. *RSC Advances*. 2016; 6(62):57275–83.
27. Atienzar FA, Gerets H, Tilmant K, Toussaint G, Dhalluin S. Evaluation of impedance-based label-free technology as a tool for pharmacology and toxicology investigations. *Biosensors*. 2013; 3(1):132–56. <https://doi.org/10.3390/bios3010132> PMID: 25587404
28. Clair G, Armengaud J, Duport C. Restricting fermentative potential by proteome remodeling: an adaptive strategy evidenced in *Bacillus cereus*. *Molecular & cellular proteomics: MCP*. 2012; 11(6): M111.013102.
29. Pisani C, Gaillard JC, Nouvel V, Odorico M, Armengaud J, Prat O. High-throughput, quantitative assessment of the effects of low-dose silica nanoparticles on lung cells: grasping complex toxicity with a great depth of field. *BMC Genomics*. 2015; 16:315. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1521-5> PMID: 25895662
30. Paoletti AC, Parmely TJ, Tomomori-Sato C, Sato S, Zhu D, Conaway RC, et al. Quantitative proteomic analysis of distinct mammalian Mediator complexes using normalized spectral abundance factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006; 103(50):18928–33.
31. Sergent J-A, Paget V, Chevillard S. Toxicity and Genotoxicity of Nano-SiO₂ on Human Epithelial Intestinal HT-29 Cell Line. *Annals of Occupational Hygiene*. 2012; 56(5):622–30. <https://doi.org/10.1093/annhyg/mes005> PMID: 22378843
32. Pearson RM, Juettner VV, Hong S. Biomolecular corona on nanoparticles: a survey of recent literature and its implications in targeted drug delivery. *Front Chem*. 2014; 2:108. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00108> PMID: 25506050
33. Monopoli MP, Aberg C, Salvati A, Dawson KA. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat Nano*. 2012; 7(12):779–86.
34. Cedervall T, Lynch I, Lindman S, Berggård T, Thulin E, Nilsson H, et al. Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007; 104(7):2050–5.
35. Yallapu MM, Chauhan N, Othman SF, Khalilzad-Sharghi V, Ebeling MC, Khan S, et al. Implications of protein corona on physico-chemical and biological properties of magnetic nanoparticles. *Biomaterials*. 2015; 46:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.12.045> PMID: 25678111
36. Mortensen NP, Hurst GB, Wang W, Foster CM, Nallathamby PD, Retterer ST. Dynamic development of the protein corona on silica nanoparticles: composition and role in toxicity. *Nanoscale*. 2013; 5(14):6372–80. <https://doi.org/10.1039/c3nr33280b> PMID: 23736871
37. Walkey CD, Chan WC. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chemical Society reviews*. 2012; 41(7):2780–99. <https://doi.org/10.1039/c1cs15233e> PMID: 22086677
38. Shannahan JH, Lai X, Ke PC, Podila R, Brown JM, Witzmann FA. Silver Nanoparticle Protein Corona Composition in Cell Culture Media. *PLOS ONE*. 2013; 8(9):e74001. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074001> PMID: 24040142
39. Strojan K, Leonardi A, Bregar VB, Križaj I, Svete J, Pavlin M. Dispersion of Nanoparticles in Different Media Importantly Determines the Composition of Their Protein Corona. *PLOS ONE*. 2017; 12(1): e0169552. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169552> PMID: 28052135
40. Corbo C, Molinaro R, Parodi A, Toledano Furman NE, Salvatore F, Tasciotti E. The impact of nanoparticle protein corona on cytotoxicity, immunotoxicity and target drug delivery. *Nanomedicine*. 2015; 11(1):81–100. <https://doi.org/10.2217/nnm.15.188> PMID: 26653875
41. Mirshafiee V, Kim R, Park S, Mahmoudi M, Kraft ML. Impact of protein pre-coating on the protein corona composition and nanoparticle cellular uptake. *Biomaterials*. 2016; 75:295–304. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.019> PMID: 26513421
42. Tenzer S, Docter D, Rosfa S, Wlodarski A, Kuharev J, Reik A, et al. Nanoparticle size is a critical physicochemical determinant of the human blood plasma corona: a comprehensive quantitative proteomic analysis. *ACS Nano*. 2011; 5(9):7155–67. <https://doi.org/10.1021/nn201950e> PMID: 21866933
43. Peng H-H, Martel J, Lee Y-H, Ojcius DM, Young JD. Serum-derived nanoparticles: de novo generation and growth in vitro, and internalization by mammalian cells in culture. *Nanomedicine*. 2011; 6(4):643–58. <https://doi.org/10.2217/nnm.11.24> PMID: 21506688
44. Anselmo AC, Mitragotri S. Cell-Mediated Delivery of Nanoparticles: Taking Advantage of Circulatory Cells to Target Nanoparticles. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*. 2014; 0:531–41.

45. Kibria G, Ramos EK, Lee KE, Bedoyan S, Huang S, Samaeekia R, et al. A rapid, automated surface protein profiling of single circulating exosomes in human blood. *Scientific reports*. 2016; 6:36502. <https://doi.org/10.1038/srep36502> PMID: 27819324
46. Subramanian S, Parthasarathy R, Sen S, Boder ET, Discher DE. Species- and cell type-specific interactions between CD47 and human SIRPalpha. *Blood*. 2006; 107(6):2548–56. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1463> PMID: 16291597
47. Brunner D, Frank J, Appl H, Schöffl H, Pfaller W, Gstraunthaler G. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *Altex*. 2010; 27(1):53. PMID: 20390239
48. Lordan S, Higginbotham CL. Effect of serum concentration on the cytotoxicity of clay particles. *Cell biology international*. 2012; 36(1):57–61. <https://doi.org/10.1042/CBI20100587> PMID: 21883092
49. Lee J, Lilly GD, Doty RC, Podsiadlo P, Kotov NA. In vitro toxicity testing of nanoparticles in 3D cell culture. *Small*. 2009; 5(10):1213–21. <https://doi.org/10.1002/sml.200801788> PMID: 19263430

Article n°5

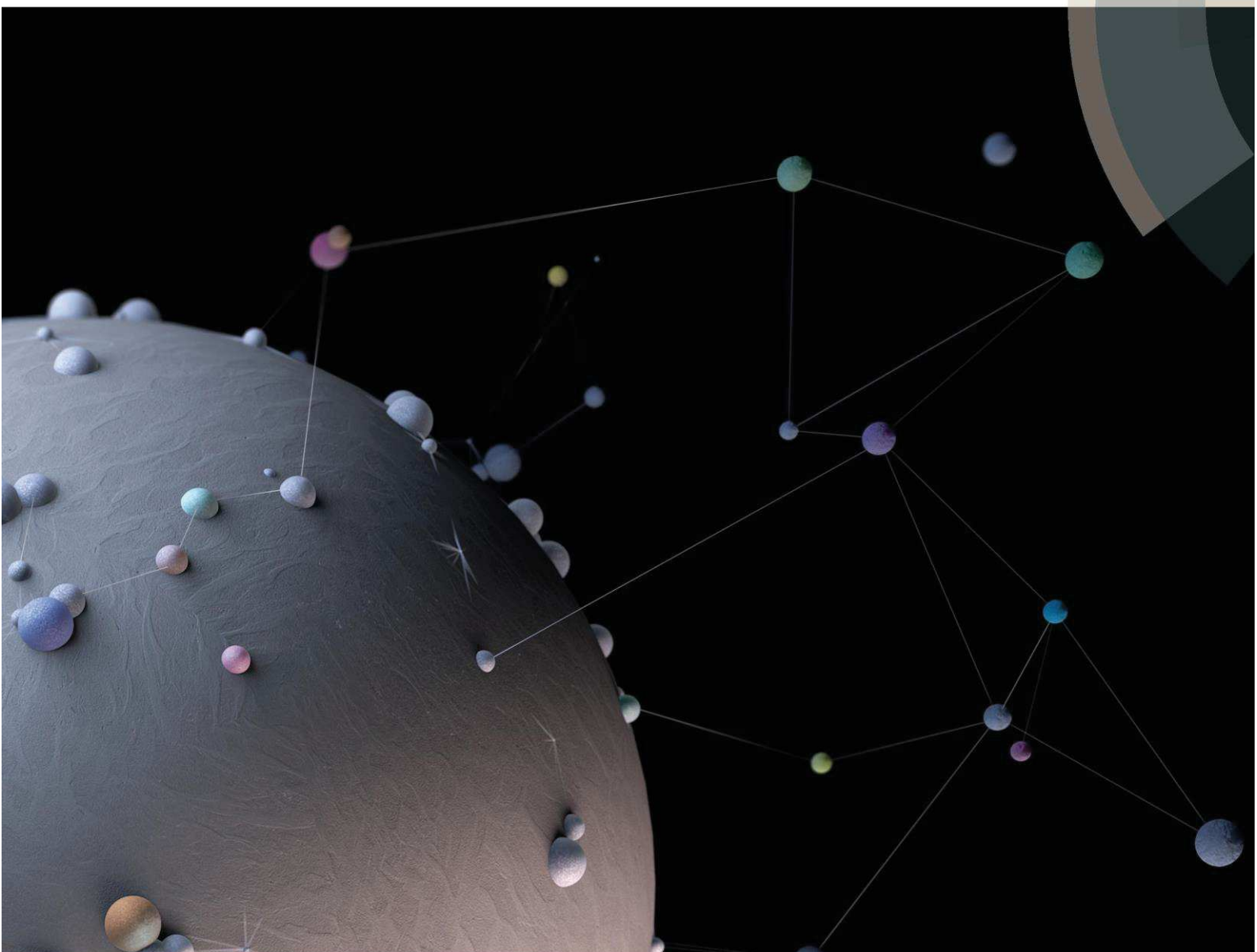
La chronologie de la formation de la corona autour de nanovecteurs de silice met en évidence le rôle de l'interactome de protéines.

Cet article et cette illustration personnelle ont fait l'objet de la couverture du journal *Nanoscale* en février 2017.

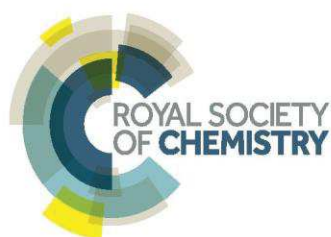
Volume 9 | Number 5 | 7 February 2017 | Pages 1749–2096

Nanoscale

rsc.li/nanoscale



ISSN 2040-3372



PAPER

Odette Prat *et al.*

The timeline of corona formation around silica nanocarriers highlights the role of the protein interactome



Article n°5 : La chronologie de la formation de la corona autour de nanovecteurs de silice met en évidence le rôle de l'interactome de protéines

Nous avons précédemment constaté que la corona influençait la réponse cellulaire, diminuant l'impact délétère sur cellules hépatiques lorsque celle-ci est composée de protéines humaines, comparée à celle composée de protéines bovines ([article n°4](#)). De plus, un ralentissement de l'internalisation des NPs dans les cellules HepaRG a été observé lorsque celles-ci sont recouvertes de PEG ([article n°3](#)), avec un décalage temporel de la réponse transcriptomique par rapport aux NPs natives ou recouvertes d'une bicouche lipidique. Le PEG octroie effectivement un bouclier organique aux NPs, ralentissant ainsi la formation de cette corona. Dans ce 5^{ème} article, nous nous sommes focalisés sur la formation chronologique de la corona autour des M-MSNs via une étude cinétique par spectrométrie de masse. Malgré une attention croissante de la communauté scientifique pour ce sujet, les mécanismes influençant la formation de la corona restent aujourd'hui encore peu identifiés.

La furtivité des nanovecteurs, c'est-à-dire la capacité d'échapper à l'opsonisation, est un des enjeux majeurs en nanomédecine. La compréhension de la corona est ainsi un axe primordial de recherche, mais soulève également des questions dans le domaine de la toxicologie *in vitro* et *in vivo*. La difficulté de déchiffrer la formation de cette corona et son évolution au cours du temps est due à de nombreux facteurs. L'adsorption des protéines autour des NPs dépend à la fois des propriétés physico-chimiques des NPs, des propriétés des protéines, mais aussi d'autres paramètres dynamiques tels que les interactions avec d'autres types de biomolécules comme les lipides par exemple. Pour étudier le comportement des protéines au contact des NPs, deux types de sérums ont été utilisés : humain et veau fœtal. Les M-MSNs ont ainsi été incubées dans ces deux sérums séparément puis lavées et analysées sur une période de 30 secondes à 7 jours.

Les caractéristiques physico-chimiques des M-MSNs sont les mêmes que dans les études précédentes. Il faut cependant noter que la présence de protéines autour des M-MSNs augmente sensiblement le diamètre hydrodynamique (DH) des particules. Ce diamètre est bien plus élevé avec une corona composée de protéines humaines (DH : 235 ± 7 nm) qu'avec une corona composée de protéines bovines (DH : 190 ± 8 nm). En particulier, nous avons pu

visualiser la corona humaine et l'analyser par microscopie à force atomique (AFM), ce qui, à notre connaissance, n'avait encore jamais été réalisé.

Dans un premier temps, le suivi quantitatif de la formation de la corona a été réalisé par dosage BCA (Acide Bicinchoninique), entre 30 secondes et 7 jours d'incubation. Les deux types de corona se forment de manière croissante autour des NPs, démarrant dès 30 secondes d'incubation. A noter, 1 mg de M-MSNs peut adsorber plus d'1 mg de protéines humaines et environ 0.5 mg de protéines bovines, au bout de 7 jours d'incubation. Dans cet intervalle, 10 prélèvements ont été analysés par spectrométrie de masse (0.5 min ; 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 8 h, 1 jour, 2 jours, 7 jours). Cette étude consiste en trois points: l'étude de la composition des coronas, l'analyse dynamique des protéines dans le temps, et l'identification des interactions protéines-protéines.

- **La composition de la corona**

Comme dans la précédente étude, nous avons constaté la présence d'immunoglobulines (Ig) dans la corona humaine et non dans la corona bovine. Cette différence est due à la présence d'un côté, d'un sérum adulte, et de l'autre, d'un sérum fœtal. Cette inégalité explique sans doute la différence de concentration protéique entre les deux coronas par dosage BCA. Parallèlement, d'autres familles de protéines détectées dans la corona humaine contiennent plus d'isoformes que dans la corona bovine (apolipoprotéines, facteurs du complément, etc.). La corona humaine semble donc être plus diversifiée. On enregistre une forte adsorption de protéines dès 30 secondes de contact entre M-MSNs et sérum, formant une corona humaine composée de 134 protéines et une corona bovine composée de 90 protéines. Au final, sur l'ensemble de la plage de temps, 157 protéines différentes ont été identifiées dans la corona humaine, et 137 protéines dans la corona bovine. En comparaison, les contrôles de sérums respectifs contiennent 90 protéines identifiées pour le sérum humain et 75 protéines pour le sérum de veau fœtal. La question s'est posée de savoir pourquoi nous détectons beaucoup plus de protéines sur les NPs que dans le sérum d'origine. Cette disparité est due à l'enrichissement qualitatif en protéines spécifiques grâce à leur adsorption en surface des NPs. Ces protéines sont présentes initialement en trop faible quantité dans les sérums contrôle, ce qui les placent en dessous de la limite de détection de la spectrométrie de masse.

Grâce à des outils développés sur R (<https://www.r-project.org>), nous avons pu comparer la composition en acides aminés (AA) des protéines de la corona humaine (157 protéines) à des listes aléatoires de 157 protéines issues de la base de données humaine Uniprot. Ainsi, bien qu'un plus grand nombre de listes aléatoires soit recommandé pour avoir une force statistique suffisante, il en ressort néanmoins que les taux des différents AA composant les protéines adsorbées ne sont pas différents de ceux composant une liste de protéines prises au hasard. Le corollaire de ce constat est que les propriétés physico-chimiques des acides aminés n'interviennent pas de manière évidente dans l'adsorption en surface des M-MSNs (Figure 42). Ce résultat montre que la formation de la corona ne peut se limiter à l'analyse primaire des séquences protéiques, mais est due à de nombreux paramètres plus complexes.



Figure 42. Comparaison des protéines humaines adsorbées aux M-MSNs avec deux listes aléatoires de protéines. Classification des acides aminés par (A) la nature des chaînes latérales, (B) la charge et (C) la polarité.

- **La dynamique d'adsorption met en évidence les tendances de comportements protéiques**

Afin de dégager de nouvelles hypothèses, nous avons ensuite opéré plusieurs traitements statistiques (« normalized spectral abundance factor, NSAF » et clusterisation comme décrit dans la partie expérimentale du présent article) afin de visualiser les principales tendances d'évolution d'adsorption des protéines dans le temps. Ainsi, trois tendances dynamiques différentes se dégagent, et ce pour les deux types de coronas avec des corrélations humain/bovin très importantes. Les 3 tendances identifiées sont :

- ***La désorption des protéines abondantes dans le temps***

Ce cluster contient un ensemble de protéines qui s'adsorbent dès 30 secondes de contact avec les NPs, puis se désorbent lentement au fil du temps. Que ce soit avec du sérum humain ou bovin, ce cluster contient de nombreuses protéines identifiées par NSAF comme étant les plus abondantes au sein des sérums de contrôle, comme par exemple l'albumine et la sérotransferrine. Ce cluster contient également l'ensemble des Ig humaines détectées. Du fait de leur forte abondance dans le sérum, ces protéines ont une probabilité de rencontre avec les M-MSNs plus grande comparée aux protéines en faibles quantités. Cela peut justifier leur forte présence dans la corona, leur désorption au fil du temps étant peut-être due à la faiblesse des interactions qui les maintiennent à la surface des M-MSNs. Néanmoins, cette hypothèse n'explique pas le comportement de l'ensemble des protéines de ce cluster qui contient d'autres protéines présentes en très faibles quantités.

- ***L'enrichissement progressif de familles de protéines***

Ce cluster contient un ensemble de protéines qui s'adsorbent dès 30 secondes de contact avec les NPs puis s'enrichissent de manière progressive au fil du temps. De nombreuses protéines issues des mêmes familles sont présentes dans ce cluster incluant les apolipoprotéines, les facteurs de coagulation, ou les facteurs du complément. Ces familles ont déjà été identifiées comme faisant partie de la corona dans la littérature, mais leur adsorption continue dans le temps est une information nouvelle et cruciale. La balance quantitative de ces protéines est importante car elle peut influencer sur la biodistribution ou

l'internalisation cellulaire. Les facteurs du complément, par exemple, ont été identifiés comme directement impliqués dans l'opsonisation des NPs.

- ***L'enrichissement tardif de protéines peu abondantes***

Ce dernier cluster comprend un ensemble de protéines qui sont identifiées de manière tardive au sein de la corona. Quelques similarités avec le précédent cluster sont à noter, notamment la présence de quelques apolipoprotéines. Compte tenu que la corona se forme dès le premier contact entre NPs et protéines, ce qui est intéressant dans ce cluster est que l'apparition tardive de protéines traduit en réalité une forte interaction avec la corona déjà formée et non plus uniquement avec la NP. Ceci démontre que les interactions protéines-protéines ont donc un impact potentiel sur la formation dynamique de la corona.

• **L'intéractome de protéines influence la formation de la corona**

Les connaissances acquises dans l'étude des réseaux de gènes et protéines nous ont permis de cartographier un réseau d'interactions protéines-protéines, ou interactome, au sein de la corona humaine grâce à l'outil NetworkAnalyst. Ces interactions sont basées sur des interactions physiques décrites dans la littérature. Cette analyse nous a conduit à établir une représentation graphique du réseau potentiel des protéines issues de nos données (figure 6 de l'article). Cette représentation inclut toutes les possibilités d'interactions directes au sein de la corona, ainsi que leur appartenance aux différents clusters, le tout sur une échelle dynamique selon leur ordre d'apparition dans la corona.

Grâce à cela, nous avons pu déterminer une chaîne d'évènements possibles de la formation de la corona. Nous avons pu démontrer que l'interactome d'un milieu biologique est également fortement impliqué dans la formation de la corona, au même titre que les interactions physico-chimiques. Dès le premier contact entre NPs et milieu biologique, les protéines sont adsorbées rapidement au sein de la corona à la fois sous forme libre et sous forme complexée. Des protéines peuvent ainsi être « tractées » vers la corona par des protéines très affines aux NPs, alors qu'elles-mêmes n'ont pas forcément d'affinités fortes avec les NPs, d'où leur désorption au fil du temps. La corona étant en constante interaction avec le milieu biologique environnant, d'autres protéines s'adsorbent ainsi via leurs interactions directes avec les protéines déjà présentes au sein de la corona.

Comme présenté dans la partie « interactions avec les biomolécules », Mirshafiee *et al.* ont réalisé, en 2016, une étude sur la possibilité d'orienter la formation de la corona par pré-recouvrement avec des immunoglobulines et d'utiliser sa composition en tant qu'outil de ciblage de macrophages (Mirshafiee *et al.*, 2016). Selon cet auteur, les stratégies de ciblage des NPs médiées par la corona doivent optimiser à la fois le choix des protéines de recouvrement, le recrutement des protéines plasmatiques souhaitées ainsi que leur accessibilité dans la corona. Selon Kenneth Dawson et son équipe qui se sont largement penchés sur l'étude de la corona, les nanomatériaux mettent au défi les paradigmes de tests *in vitro* parce que, contrairement aux espèces moléculaires, les biomolécules dans le milieu de dispersion modulent leurs interactions avec les cellules (Kim *et al.*, 2014). Même si l'homologie des protéines bovines et humaines est assez élevée, l'effet de la corona est souligné en passant au sérum humain sur les cellules humaines, où les affinités des protéines humaines pour les récepteurs humains seront nécessairement plus élevées que celles des protéines bovines.

En conclusion, la forte implication des interactions protéines-protéines dans la formation de la corona ouvre des perspectives encourageantes. Il devient possible d'identifier des protéines ayant de fortes affinités avec les NPs et peu d'interactions physiques avec d'autres protéines sériques, en particulier les opsonines, afin de former une corona artificielle biocompatible à la surface des NPs. Il serait donc envisageable de créer des nanovecteurs furtifs, en évitant les interactions protéines-opsonines dans un milieu biologique.

Cite this: *Nanoscale*, 2017, 9, 1840

The timeline of corona formation around silica nanocarriers highlights the role of the protein interactome†

Cédric Pisani,^{a,b} Jean-Charles Gaillard,^c Michaël Odorico,^d Jeff L. Nyalosaso,^e Clarence Charnay,^e Yannick Guari,^e Joël Chopineau,^{a,f} Jean-Marie Devoisselle,^a Jean Armengaud^c and Odette Prat^{*b}

Magnetic mesoporous silica nanoparticles (M-MSNs) represent promising targeting tools for theranostics. Engineering the interaction of nanoparticles (NPs) with biological systems requires an understanding of protein corona formation around the nanoparticles as this drives the biological fate of nanocarriers. We investigated the behavior of proteins in contact with M-MSNs by high-throughput comparative proteomics, using human and bovine sera as biological fluids, in order to assess the adsorption dynamics of proteins in these media. Using system biology tools, and especially protein–protein interaction databases, we demonstrated how the protein network builds up within the corona over the course of the experiment. Based on these results, we introduce and discuss the role of the “corona interactome” as an important factor influencing protein corona evolution. The concept of the “corona interactome” is an original methodology which could be generalized to all NP candidates. Based on this, pre-coating nanocarriers with specific proteins presenting minimal interactions with opsonins might provide them with properties such as stealth.

Received 13th June 2016,
Accepted 31st October 2016

DOI: 10.1039/c6nr04765c

rsc.li/nanoscale

Introduction

Nanoparticle (NP)-based imaging and therapy, investigated separately, have evolved to a point where they have enabled the birth of NP-based theranostics, which can be defined as nano-platforms that can co-deliver therapeutic and imaging functions in cancer diagnostics and therapy.¹ From this dual perspective, magnetic nanoparticles are very good candidates for clinical applications because of their superparamagnetism, easily functionalizable surface and potential low toxicity.^{2–4} However, controlling the interactions of nanomaterials with biological systems is a fundamental challenge in nano-

medicine. The relationships between the designs of drug nanocarriers, their interactions with biomolecules and the resulting physiological responses have been studied for many years.⁵ Used in the native state in living organisms, NPs interact with numerous biomolecules, in particular with a large panel of proteins that compete for binding to their surface and form a layer, known as the corona. The corona around NPs creates a new nano-object, whose interactions with living cells, and thus its long-term fate, are different from those induced by the pristine NP.^{6–8} To target specific organs, NPs must be able to escape rapid clearance by the immune system and remain in the blood circulation for extended time periods.⁹ The development of nanocarriers with stealth properties is essential. Despite the great attention of the scientific community to the corona, the criteria influencing its formation remain unclear. The difficulty in deciphering how this corona is built and evolves over time is due to many factors. Protein adsorption onto NPs depends on NP physicochemical properties, protein features, and also dynamic parameters such as the impact of the blood flow or interactions with other types of biomolecules (phospholipids or hormones for instance).^{10–14} The knowledge of corona formation around NPs is essential in many fields, from preliminary *in vitro* and *in vivo* toxicology studies to therapy and medical imaging, and constitutes a key point in developing effective and injectable nanocarriers.

^aInstitut Charles Gerhardt de Montpellier, MACS, UMR 5253 CNRS-ENSCM-UM, 1701, Place Eugène Bataillon, F-34095 Montpellier, France

^bCEA, Direction de la Recherche Fondamentale-BIAM, Site de Marcoule, F-30207 Bagnols-sur-Cèze, France. E-mail: odette.prat@cea.fr

^cCEA, Direction de la Recherche Fondamentale-IBITECS, Site de Marcoule, F-30207 Bagnols-sur-Cèze, France

^dInstitut de Chimie Séparative de Marcoule, UMR 5257 CEA-CNRS-ENSCM-UM, Site de Marcoule, F-30207 Bagnols-sur-Cèze, France

^eInstitut Charles Gerhardt de Montpellier, IMNO, UMR 5253 CNRS-ENSCM-UM, 1701, Place Eugène Bataillon, F-34095 Montpellier, France

^fUniversité de Nîmes Rue Georges Salan, F-30000 Nîmes, France

†Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c6nr04765c

In this work, we used well characterized magnetic mesoporous silica NPs (M-MSNs) as the nanoparticle model because they sparked a special interest as targeting tools for theranostics. These core-shell-type NPs combine the magnetic properties of a core magnetite (Fe_3O_4) with a high-loading-capacity silica shell.¹ The magnetic feature of these M-MSNs is a significant advantage in the study of the corona, because magnetic separation steps allow minimization of the loss of adsorbed proteins, unlike other purification techniques such as centrifugation, especially for proteins that have weak interactions with the NPs.¹⁵ We investigated the dynamics of pristine M-MSN/protein interactions by high-throughput comparative shotgun proteomics with two types of sera: human and fetal bovine. We obtained a rich collection of comparative data. Thereby, these two different but related biological media yielded very similar results. Serum proteins adsorbed onto M-MSNs were also quantified by BCA assay and identified by high-resolution mass spectrometry during long-term kinetics. By implementing computational tools of system biology, based on the use of a comprehensive, up-to-date protein-protein interaction database, combined with the kinetic behavior of proteins of the corona, we highlighted the expansion of a protein network within the corona, named the "corona interactome". This approach allows identifying all the known interactions between proteins in a surrounding medium. The main advantage of this original approach is that the methodology used is independent of the influence of the physicochemical properties of nanoparticles. Therefore, it could be adapted to any nanocarrier candidates regardless of their differences (surface chemistry, chemical composition, size, shape, functionalized or not, *etc.*). Beyond the understanding of the corona formation, this study may help in the conception of nanocarriers pre-coated with proteins that present minimal interactions with opsonins, and could facilitate the design of new types of nanocarriers with stealth capabilities.

Experimental

Synthesis of magnetic mesoporous silica nanoparticles (M-MSNs)

- **Chemicals.** All reagents were commercially available and used without any further purification. Hydrated iron oxide $\text{FeO}(\text{OH})$, catalyst grade 30–50 mesh, oleic acid (90%), oleylamine (99%), diethyl ether (Chromasolv® HPLC grade $\geq 99.9\%$), anhydrous ethanol ($\geq 99.8\%$), anhydrous pentane ($\geq 99\%$), anhydrous chloroform ($\geq 99\%$), tetraethoxysilane (TEOS, $\geq 99.9\%$), cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and ammonium nitrate (NH_4NO_3) were purchased from Sigma-Aldrich. Sodium hydroxide (NaOH) and *n*-docosane (99%) were purchased from Acros.

- **Preparation of magnetic Fe_3O_4 nanocrystals (MIONS).** The synthesis of spherical magnetic iron oxide nanoparticles (MIONS) was performed according to the protocol previously reported in the literature.^{16,17} 0.18 g of hydrated iron oxide(II) was mixed with 5 g of docosane and 3.2 g of oleic acid in a

100 mL two necked round bottom flask. Prior to reaction, the mixture was stirred under vacuum for 30 min, and then placed under Ar (Alphagaz 1, Argon smartop from Air Liquide) flow for 30 min at room temperature. The thermal decomposition of iron oxide occurred under reflux at 340 °C for 1 h 30 min. After completion of the reaction, the mixture was cooled down slowly without stirring to a temperature of 50 °C and then collected in a beaker. At room temperature, 15 mL of pentane and 30 mL of the mixture ether:ethanol (2:1, v:v) were added to the reaction mixture. This black suspension was ultrasonically dispersed for 2 min and then centrifuged (18 °C) for 10 min at 35 700g (20k rpm). The collected black solid was washed, sonicated and centrifuged the first time with 2 mL of pentane plus 30 mL of the mixture ether:ethanol (2:1, v:v), and the last time with 30 mL of the mixture ether:ethanol (1:1, v:v). Finally, the black magnetic Fe_3O_4 nanocrystals were stored in 15 mL of chloroform and stabilized by adding 200 μL of oleylamine, to form a homogeneous solution.

- **Synthesis of a monodisperse mesoporous silica shell with magnetic cores (M-MSNs).** The synthesis of M-MSNs followed the procedure initially reported by Rho *et al.* but was slightly modified.¹⁷ Typically, 0.125 g of CTAB was placed in a 250 mL three-necked round bottom flask containing 60 g of ultrapure water and 0.44 mL of a solution of NaOH (2 M). This micellar solution was heated to 70 °C under vigorous stirring (750 rpm). After 1 hour of stabilization, 0.5 mL of the suspension of MIONS, previously dispersed with ultrasonics for 3 h, was injected stepwise ($10 \times 50 \mu\text{L}$) into the micelle solution over 50 min. The presence of chloroform in the core-shell mixture interferes with the sol-gel reaction and does not promote the formation of uniform and regular mesoporous silica nanoparticles. Therefore, it is essential to eliminate the chloroform from the reaction mixture. Between each injection, a partial and brief vacuum of 2 seconds was applied followed by a gas stream (Ar or air) in order to remove the chloroform (MION solvent) from the micellar solution. Following these injections, the reaction mixture was heated to 80 °C. At this temperature, a vacuum was one more time applied briefly followed by a gas stream. This was repeated once again before leaving the reaction mixture to stabilize under stirring for 1 hour at 80 °C. Then, an initial amount of 0.1 mL of TEOS was added to the mixture. Finally, after 30 min of the reaction, an additional 0.5 mL of TEOS was added to complete the sol-gel reaction. The condensation process was conducted for 1 h 30 min.

After the reaction, the mixture was slowly cooled down at room temperature while stirring, and then collected in Nalgene™ tubes for centrifugation at 5200g (7.5k rpm) for 10 min. This first centrifugation (18 °C) at 5200g was carried out in order to extract more dense multicore silica particles that may be present in the sediment. Then, the supernatant was centrifuged a second time at 35 700g (20k rpm) for 10 min in order to collect the solid. To extract efficiently the surfactant from the nanoparticles, the solid was redispersed in a 100 mL round bottom flask containing 50 mL of an alcoholic solution of ammonium nitrate (6 g L^{-1} in EtOH) and was refluxed at 80 °C for 2 h, then at 60 °C overnight. The sample was centri-

fused at 35 700g for 10 min and washed 4 times consecutively with 30 mL of EtOH, 2 times with water, and then EtOH. Each washing step involved 15 min of sonication and a centrifugation operation at 35 700g for 10 min. Finally, the sample was dried for 4 hours under vacuum at room temperature.

Nanoparticle characterization

Transmission electron micrographs (TEM) were obtained with a JEOL 1200 EX II microscope.

Nitrogen adsorption and desorption isotherms were measured using a TriStar 3000 (V6.06 A) automated gas adsorption system with nitrogen as the adsorbate at $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Prior to the sorption experiment, the sample was evacuated under vacuum at $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 h. The specific surface area (S_{BET}) was calculated according to the Brunauer–Emmett–Teller (BET) method, taking the value of 0.162 nm^2 as a cross-sectional area per nitrogen molecule in the BET calculation. The total pore volume (V_{p}) was taken at $P/P_0 = 0.85$.

Hydrodynamic diameter and zeta potential were determined using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, UK). Each measurement was performed at $20\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ NPs after 2 min of bath sonication in Hepes buffer (HBS: Hepes 20 mM, NaCl 5 mM) or PBS 1 $\times$ buffer (ThermoFisher Scientific) at pH 7.4 and $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Atomic force microscopy imaging was performed with a Multimode 8 and Nanoscope V instrument (Veeco, Santa Barbara, CA, USA) mounted with an EV Scanner and SNL tips ($K = 0.35\text{ N nm}^{-1}$, Bruker). Sample preparation consisted of the deposition of a $2\text{ }\mu\text{L}$ M-MSN suspension ($1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ in pure water) on freshly cleaved mica (Muscovite from SPI, France) stuck onto a small magnet. After 1 min, the sample was dried under vacuum. Amplitude and height images were recorded in the peak force mode. The resulting pictures were plane-fitted and flattened with the supplied Nanoscope Analysis software (Bruker) V 1.40. NP mean AFM diameters ($n = 20$) were established by measuring the interspace between two peaks on recorded profiles in order to avoid convolution errors.

Exposure of M-MSNs to sera and purification

A stock solution of M-MSNs was made in PBS 1 $\times$ (Invitrogen) at a concentration of 1 mg mL^{-1} . After 2 min of sonication in an ultrasonic bath (Elma Transsonic T780/H) at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, the M-MSN solution was supplemented with HS (human serum, Sigma-Aldrich) or FBS (fetal bovine serum, HycloneTM, ThermoFisher Scientific). Exposure starts at the time of injection of the serum. After a chosen time of exposure, 1 mL of the solution was sampled at room temperature. This sample containing M-MSNs coated with proteins was extensively washed with PBS 1 $\times$ with the retention process of M-MSNs by magnetisation. Experimental time points cover the range from 0.5 min to 7 days.

Quantification by BCA protein assay

The BCA protein assay (PierceTM BCA protein assay kit, ThermoFisher Scientific) is based on the well-known reduction

of Cu^{2+} to Cu^{+} in a protein solution (biuret reaction) and the detection of these Cu^{+} ions *via* bicinchoninic acid. Experiments were realized according to the supplier protocol with different lots of synthesized M-MSNs ($n = 3$). Protein concentrations in all experimental points (10 time points and a serum control per serum type) were measured at 562 nm with a Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific).

Sample preparation for nano-LC mass spectrometry

M-MSNs exposed to sera solutions were magnetically separated and extensively washed with PBS 1 $\times$ (Invitrogen), and suspended in $20\text{ }\mu\text{L}$ of PBS 1 $\times$ and $10\text{ }\mu\text{L}$ of LDS 1 $\times$ (Invitrogen). Samples were heated at $99\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min and then loaded onto a 10% NuPAGE gel (Invitrogen) for a short electrophoresis (5 min) at 200 V in MES 1 $\times$ buffer. Only proteins migrated into the gel and nanoparticles were retained in the wells. Densitometric analyses of polyacrylamide gels were performed using Quantity One software (Biorad). The polyacrylamide bands containing the whole solubilized protein content were processed as previously described.¹⁸ Briefly, they were subjected to DTT reduction, treated with iodoacetamide and then, proteolyzed with sequencing grade trypsin (Roche) using 0.01% of proteaseMAX detergent (Promega). The resulting peptides ($10\text{ }\mu\text{L}$) were analyzed in the data-dependent mode with an ESI-Q Exactive HF mass spectrometer (ThermoFisher) coupled to an Ultimate 3000 176 RSL Nano LC System (ThermoFisher). Peptides were injected onto a reverse phase Acclaim PepMap 100 C18 column ($3\text{ }\mu\text{m}$, $100\text{ }\text{\AA}$, $75\text{ }\mu\text{m}$ id $\times$ 500 mm) and resolved at a flow rate of $0.2\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$ with a 90 min gradient of CH_3CN in the presence of 0.1% formic acid.

Protein identification and quantification by proteomics

The Q-Exactive HF instrument was operated with top 20 standard parameters and a dynamic exclusion of 10 s as previously described.¹⁹ MS/MS spectra were analysed with the SwissProt database (release SwissProt_2015). Searches for tryptic peptides were performed with the following parameters: full-trypsin specificity, a mass tolerance of 5 ppm on the parent ion and 0.5 Da on the MS/MS, carbamidomethylCys as the static modification and oxidized Met as the dynamic modification, and the maximum number of missed cleavages set at 2. All peptide matches with a peptide score below a p -value of 0.05 were filtered. A protein was considered to be validated when at least two different peptides were detected in the same experiment. The false-positive rate for protein identification was estimated using the appropriate decoy database as below 1%. The number of MS/MS spectra per protein (spectral counts, SC) was determined for each sample and compared using the TFold method of the PatternLab software v3.2.0.3 as previously described with a minimal SC cut-off set at 5.²⁰

Bioinformatics analyses

- **Normalized spectral abundance factor (NSAF).** The normalized spectral abundance factor (NSAF) is a ratio calculated

by normalizing spectral counts (SC) obtained for a protein by the respective molecular weight (MW) as follows:

$$\text{NSAF}_i(\%) = \left(\frac{\frac{\text{SC}_i}{\text{MW}_i}}{\sum_{i=1}^n \left(\frac{\text{SC}_i}{\text{MW}_i} \right)} \right) \times 100$$

• **Data clustering.** Clustering of spectral counts was performed using the TrendQuest module of the PatternLab software V3.2.0.3. For it, SC data were formatted in text files including, for each analysis, an “index file” containing protein identifiers and a “Sparse Matrix” containing the corresponding spectral counts. Clusters were obtained with parameters including a minimum average signal of 2, minimal data points of 6 and minimal items per cluster of 5.

• **Network analysis.** The network analysis of the corona interactome was performed with the NetworkAnalyst software developed by Xia *et al.* (2014; 2015).^{21,22} The final list of 157 human protein Uniprot identifiers was loaded to NetworkAnalyst with the H. sapiens (human) specific organism option. The resulting graphical representation uses gene symbols. The process is run according to the InnateDB, a comprehensive literature curated protein–protein interaction database.²³ The analysis is reduced only to proteins of our dataset which interact between themselves. The resulting network was designed in order to gather the timeline information and the cluster membership results.

Results and discussion

To investigate the behavior of proteins in contact with nanoparticles based on a protein–protein interaction approach, we have used well-known and characterized magnetic mesoporous silica nanoparticles (M-MSNs). Pristine M-MSNs were used as the model and synthesized according to the optimized procedure of Nyalosaso *et al.*,²⁴ based on Dib *et al.* and Rho *et al.*, composed of a Fe₃O₄ nanocrystal core (Fig. 1a) surrounded by a mesoporous silica shell (Fig. 1b).^{16,17} With their reproducible physicochemical characteristics (Table 1), these M-MSNs were stable when maintained at physiological pH and had a high specific surface area. Size and shape characterization was performed with TEM and AFM imaging (Fig. 1b and 2a) and showed highly homogeneous spheres. These significant advantages make these nanoparticles good candidates to develop nanocarriers for medical applications.^{25–28}

Time-resolved description of protein corona formation with M-MSNs

Because the lifetime of particle–ligand complexes ranges from microseconds to days,¹³ we investigated possible M-MSN/protein interactions over a broad time range, from 30 seconds to 7 days, with two types of sera: fetal bovine serum (FBS) and human serum (HS). The first one is interesting in the field of *in vitro* toxicology and the second for diagnosis and therapy. Above all the comparison of both media presents very interesting results. Fig. 3 shows the monitoring of the amount of proteins retained by the M-MSNs after their immersion in sera, by

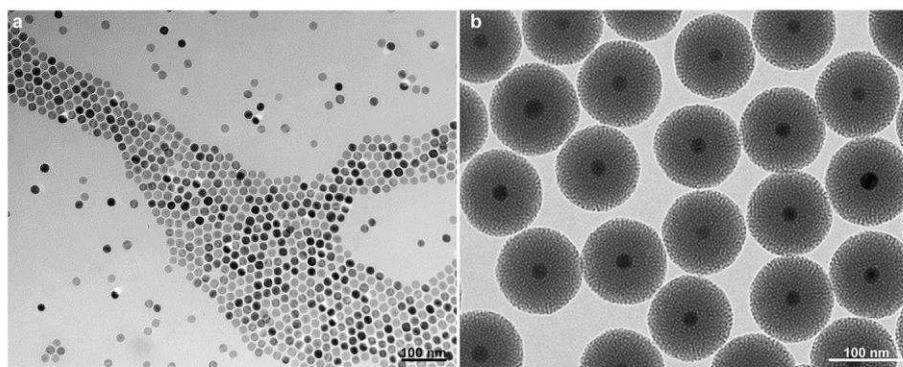


Fig. 1 Characterization of magnetic mesoporous silica nanoparticles (M-MSNs). TEM images of Fe₃O₄ nanocrystals (a) and magnetic mesoporous silica nanoparticles (b) (M-MSNs).

Table 1 Physicochemical characterization of M-MSNs with and without protein corona

Nanoparticles	Diameter by TEM (nm)	Hydrodynamic diameter by DLS (nm)	Zeta potential at pH 7.4 (mV)	Specific surface area (m ² g ^{−1})	Pore diameter (nm)
M-MSN	103 (±2)	159 (±11)	−38.7 (±0.6)	640	3
M-MSN/corona FBS	ND	190 (±8)	−15.1 (±2.6)	ND	ND
M-MSN/corona HS	ND	235 (±7)	−11.6 (±1.3)	ND	ND

Values are mean ± standard deviation (*n* = 3). ND = not determined. Immersion time in sera: 24 h.

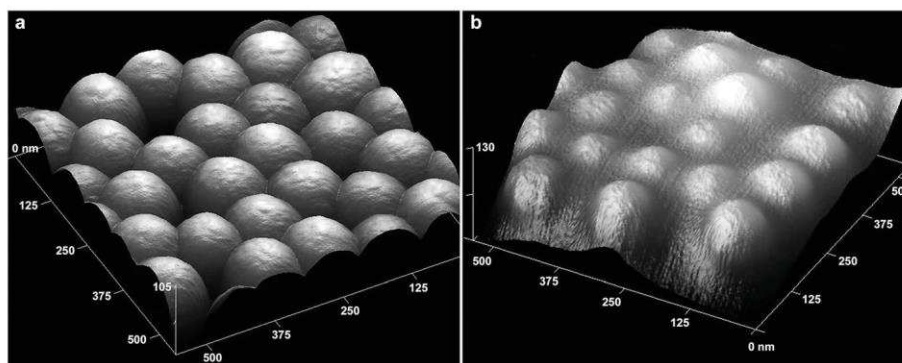


Fig. 2 Size and shape characterization of magnetic mesoporous silica nanoparticles (M-MSNs) with and without protein corona. AFM imaging of native M-MSNs (a) and protein covered M-MSNs (b). Bar scale: 125 nm. Immersion time in sera: 24 h.

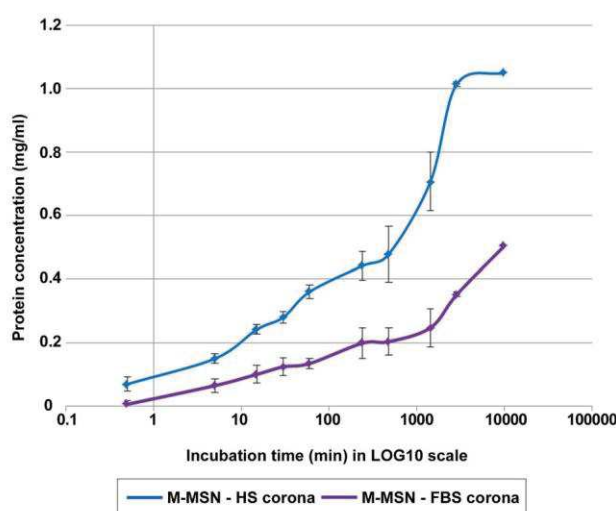


Fig. 3 Protein quantification of HS and FBS coronas by BCA assay. Protein concentrations of coronas around M-MSNs were determined in human and fetal bovine serum using the BCA assay (ThermoFisher Scientific) and recorded on a Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific). Results are expressed as the mean concentration $\pm$ SD ($n = 3$).

means of a BCA protein assay. A strong increase in the amount of proteins adsorbed onto the M-MSNs was observed over time, starting from the first few seconds of contact with the serum. Furthermore, the presence of proteins was sustained by the increase of the zeta potential of nanoparticles: -15.1 and -11.6 mV, with bovine and human corona, respectively, at pH 7.4 (Table 1). In addition, we were able to visualize for the first time the presence of a protein layer on the nanoparticle surface with high resolution AFM imaging, measured at 125 ± 5 nm for the HS corona (Fig. 2b). In terms of the quantity adsorbed, a clear difference was observed for the two sera, human proteins being more prone to adsorption than proteins from FBS. We used high-resolution mass spectrometry (MS) to identify the proteins forming the corona during its growth in both types of sera (Table 1 in the ESI†). The compositions of the initial sera were analyzed and taken as controls. Fig. 4 shows the number of different proteins detected over time.

The growth of the corona (Fig. 3) was correlated with an increase in the number of proteins adsorbed onto the M-MSNs over time. While the growth of the corona began almost instantly after immersion, a large diversity of proteins was observed. After 30 seconds of contact with the serum, we detected 134 and 90 distinct adsorbed proteins in the human and bovine coronas, respectively. The number of adsorbed proteins grew faster in HS compared with FBS and reached a stable level earlier. The number of proteins for HS varied little from 30 seconds (134) to 7 days (153), while in FBS this number increased gradually from 90 to 128 over the same time period. These noteworthy differences are likely due to the fact that the adult HS exhibits a more polymorphic nature than the FBS, as an adult serum contains many immunoglobulins not present in a fetal serum. When comparing both lists of proteins, we detected 17 distinct immunoglobulin polypeptides in HS and none in FBS. We also observed many more protein iso-

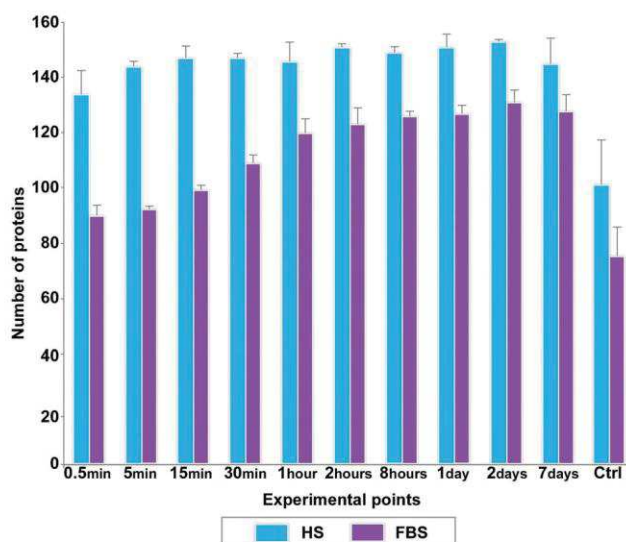


Fig. 4 Time evolution of protein numbers in the corona evaluated by nano LC-MS/MS. The bar chart represents the distribution of identified proteins adsorbed onto M-MSNs. Proteins were also identified in control sera (HS and FBS).

forms, *e.g.*, apolipoproteins (11 *versus* 5) and complement proteins (44 *versus* 8). In addition, analysis of the HS control content (101 proteins detected) showed that the corona protein composition was more diverse, with a total of 157 proteins distributed over all the time points analyzed. Similar observations were made for the FBS coronas, where 137 proteins were identified when merging all time points while only 75 proteins were detected in the bovine control serum. These differences are due to the enrichment of specific proteins adsorbed onto the M-MSNs, which are present in low quantities (below the detection limit of the mass spectrometry approach) in the control sera. M-MSNs increased the number of detectable distinct serum proteins by 1.5 and 1.8 times for the human and bovine sera, respectively. To summarize, M-MSNs have a strong capacity for protein adsorption and can be selective for low-represented proteins, as shown by mass spectrometry measurements. Most of the detected adsorbed proteins have been identified as being adsorbed onto other types of silica nanoparticles.^{7,10,29,30} The experiment performed here was carried out over a longer time period and the results highlight the large diversity of proteins that can be identified in NP coronas and the strong enrichment of polypeptides by NPs.

The adsorption dynamics highlights three main trends of protein behavior

The normalized spectral abundance factor (NSAF), which represents the relative proportion of each protein in a sample, is reported for all the detected proteins (Table 2 in the ESI†). This value is calculated by normalizing the spectral count (SC) of a protein by its respective molecular weight (MW), as detailed in the Experimental section.

We thus determined the normalized abundance of proteins within the corona at each time point. To analyze various protein behaviors during the growth of the corona, all the MS data were clustered using PatternLab software. These two treatments allowed visualization of the evolution of the timeline of the protein corona and of the main overall trends emerging over a broad time period, up to seven days. Fig. 5 shows the three main dynamics clusters represented by the medians of protein abundances, which were found to be identical with both serum types. Venn diagrams reveal homologous proteins between both species with the same behavior. The protein lists corresponding to all clusters are available in Table 3 in the ESI.†

• Desorption of abundant proteins is observed over time.

The first cluster comprises a pool of proteins adsorbed from 30 seconds of contact with M-MSNs, followed by a slow desorption over time. It includes 40 and 30 proteins for the human and bovine coronas, respectively (Fig. 5a). This cluster contains 10 of the most abundant proteins in HS, as assessed by their NSAF ratio (Table 3 in the ESI†): albumin (28.5%), which is by far the most abundant protein, serotransferrin (4.6%), alpha-1-antitrypsin (4.2%), and hemopexin (2.2%). Almost all immunoglobulins detected in the human corona belong to this cluster: Ig gamma-1 chain C region (6.2%), Ig kappa chain C region

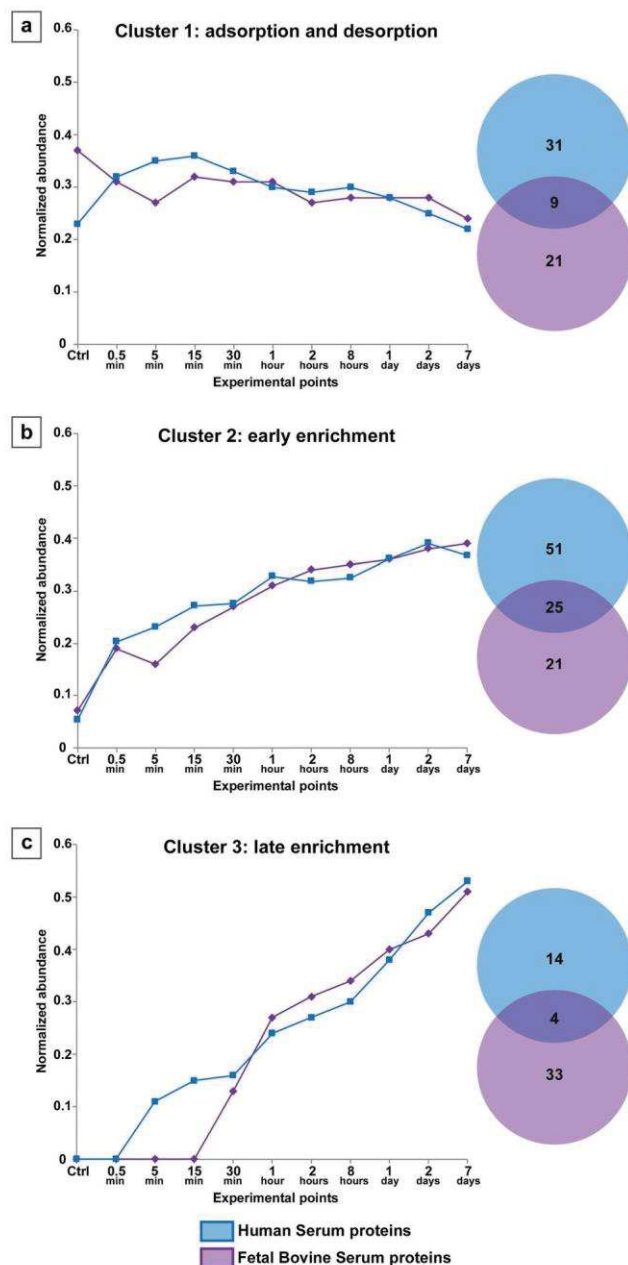


Fig. 5 Hierarchical clustering of protein abundances in corona over time. Three main trends were obtained from the clustering of spectral counts using the TrendQuest module of PatternLab software. The curves represent medians of protein abundances in each cluster for HS (blue) and FBS (purple) coronas. Inserted VENN diagrams represent the numbers of proteins in HS (blue) and FBS (purple) for each cluster. The intersections reveal the numbers of homologous proteins with the same behavior in both sera.

(4.8%), and Ig lambda-2 chain C regions (4.0%). Likewise for FBS coronas, the first cluster contains several abundant proteins, such as albumin (34.3%), alpha-2-HS-glycoprotein (16.6%), alpha-1-antiproteinase (9.2%), and serotransferrin (5.3%). The desorption of these abundant proteins during corona growth could be due to their lower affinities for these

M-MSNs. Nevertheless because of their high abundance in serum, these proteins are more likely to be in close contact with NPs and thus to adsorb onto their surfaces. A hypothesis frequently invoked^{13,15,31} is the presence at the nanoparticle surface of potential exchanges between proteins, based on the “Vroman effect”. This effect describes a time-dependent protein adsorption on a flat surface, and is governed by the rapid and weak binding of highly abundant proteins, followed by their subsequent replacement by less abundant but high-affinity proteins.³² Here, the “Vroman effect” alone cannot explain the behavior of all the proteins of this cluster. Indeed, the cluster also includes low-abundance proteins that tend to desorb over time.

In addition, the human corona at 30 seconds had around 5% abundance variation compared with the HS control, and almost 10% at 7 days (NSAF ratios, Table 2 in the ESI†). We infer that at the first contact between NPs and proteins in serum, NPs capture not only very abundant proteins but also some low abundance proteins, reflecting their abundance in the initial serum. At 30 seconds, exchanges have already occurred, explaining the 5% variation. The striking similarities in the behavior between human and bovine proteins reinforce these observations, including in particular nine homologous proteins as represented in the Venn diagram (Fig. 5a).

• Steady enrichment of some protein families over time.

The second cluster represents a pool of proteins adsorbed from 30 seconds of contact with M-MSNs that were enriched over time. It comprises 76 and 46 proteins for the human and bovine coronas, respectively, including 25 homologous proteins (Fig. 5b). Due to its increasing abundance over time, this cluster represents the hard corona parts, *i.e.* a long-life protein layer with strong interactions with the M-MSN surface. This cluster includes both in human and bovine coronas important groups of proteins, such as apolipoproteins, complement components and coagulation factor families. Many studies have already revealed the presence of these protein families in coronas around nanoparticles, as presented in a comprehensive review.⁵ Thus, adsorption of these proteins was expected, but the observation of their continuous adsorption over time is a new and important piece of information. The balance between these proteins is of utmost interest because this drives the biological fate of the coated M-MSNs if used as therapeutic nanocarriers. Indeed, in addition to the stability of this coating,⁸ the composition of the hard corona could affect the biodistribution, cellular uptake and intracellular location of NPs.^{33–35} For example, it has been demonstrated that the presence of apolipoproteins in the corona can promote passage through the blood–brain barrier.³⁶ Conversely, complement factors are involved in opsonization, by promoting elimination of the nanoparticles by macrophages.^{13,30} The presence of the so-formed corona contributes to engendering a novel nanoparticle entity whose physicochemical characteristics are obviously different from the initial object. To our knowledge, few kinetic studies have been performed on the corona protein composition.^{7,29} The entire pool of proteins found to be enriched during corona formation, and reported

by Tenzer *et al.*,²⁹ is included in the “Early Enrichment” cluster observed here. Extending the kinetic study up to seven days allows a better understanding of the evolution of the corona over time.

• Late enrichment of several very low abundance proteins.

The last cluster comprises a pool of proteins adsorbed onto M-MSNs in the later steps of the kinetics. These proteins were, in most cases, not detected in control sera, due to their low abundance. Thus, they were enriched over time with high fold changes (Fig. 5c). The cluster includes 18 and 37 proteins for the human and bovine coronas, respectively, including 4 - homologous proteins. It is interesting to note some similarities with the previous cluster, such as the presence of a few apolipoproteins and complement factors. Due to their high enrichment in the corona, these proteins were rendered detectable by tandem mass spectrometry, whereas their initial abundance in the serum was too low to be detected. Thus, this enrichment is potentially due to the formation of a new protein layer around the hard corona. In our opinion, this new layer has to be distinguished from the so called “soft corona”, the latter being composed of proteins with weak and reversible interactions with NPs.^{37–39} Here, the proteins of this cluster adsorb continuously over time and appear in the corona after the formation of the first layer. Their late arrival suggests that they are likely not adsorbed onto the M-MSN surface *via* NP–protein interactions, but rather *via* protein–protein interactions, and thus participate in the compositional change of the corona.

Influence of the protein interactome in understanding corona formation

There is currently no clear explanation for the presence of some proteins in the corona around NPs and it is difficult to predict which proteins may adsorb onto NPs in a complex physiological environment, and in what quantities.^{15,40,41} Despite tremendous efforts, the proposed models^{29,30,38,41–48} struggle to explain the formation of the corona because a lot of parameters are involved, both in terms of the physical chemistry and biology. Currently, gaps remain about the involvement of the biology in the formation of the corona. In order to explain the protein kinetics observed here, we introduced the central notion of an interactome for the interpretation of the corona. The dynamics of the corona interactome helps to describe the sequence of events occurring during corona formation and is an essential parameter to be considered. To this end, we used the NetworkAnalyst software^{21,22} (based on InnateDB²³), which allowed the construction of a relevant network with the adsorbed human proteins on M-MSNs. For each of the 157 adsorbed human proteins, a search was performed to identify proteins that directly interacted with each other. The computational analysis led to a network comprising 83 proteins (Table 5 in the ESI†).

Fig. 6 shows an overall picture of the resulting network, highlighting the kinetics monitored in our experiment. The corona interactome was subsequently merged both with kinetic and cluster data. Thereby, Fig. 6 was designed as a

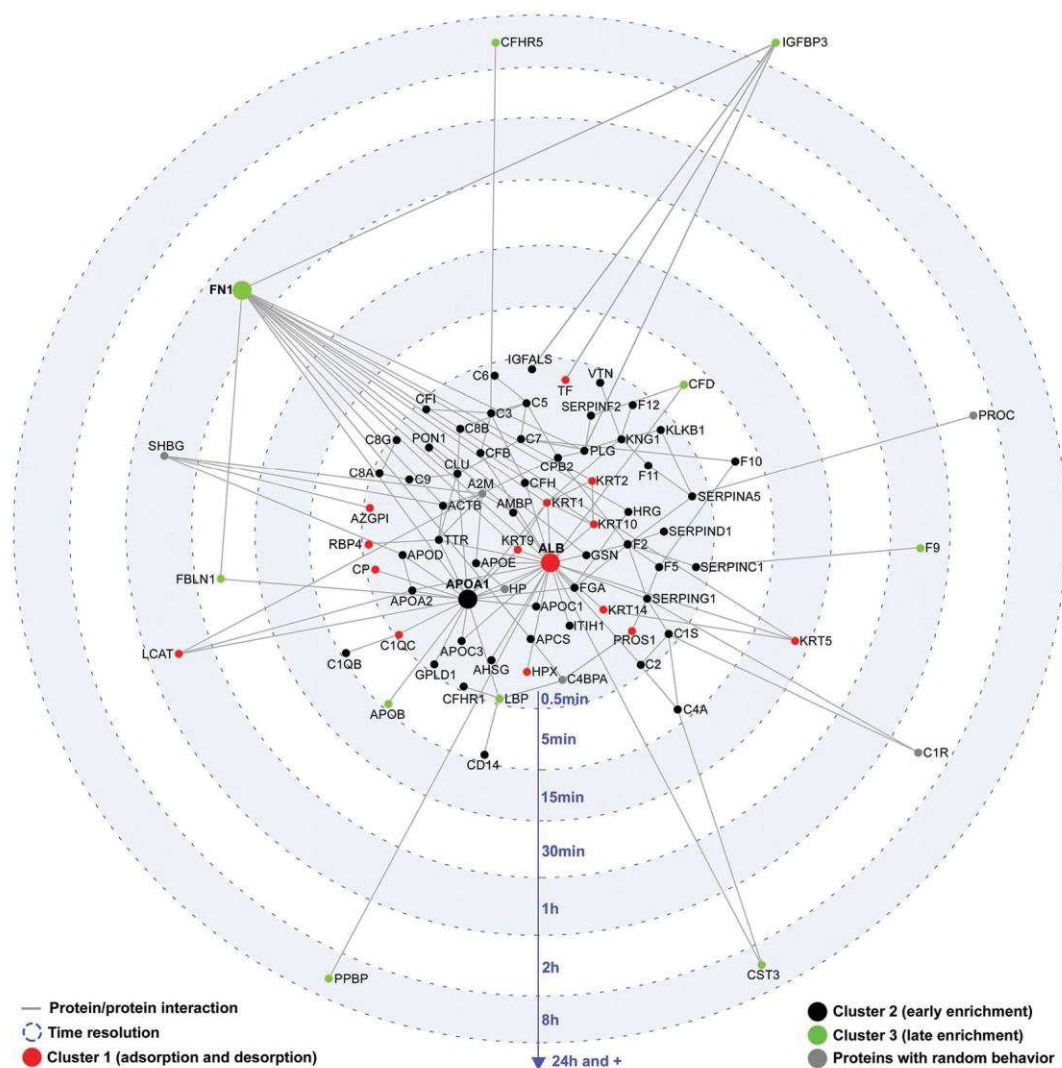


Fig. 6 Representation of the corona interactome. Protein–protein interactions are represented in a network developed using the NetworkAnalyst software, based on InnateDB. The target represents the time scale (0.5 min to 7 days). Each protein (represented by its gene symbol) is placed according to its time of appearance within the corona. The colors symbolize the cluster membership. The grey lines represent the protein–protein interactions. Proteins that have a lot of interactions with other proteins are represented by a larger visual cue.

graphical representation based on four factors: proteins identified by mass spectrometry, time of appearance in the corona, cluster behavior membership, and links existing between proteins of the corona. Each protein appears in the corona at a given time, represented on a time scale. Because of its dynamics, each protein belongs to a specific cluster and is represented by a given color code. We then superimposed lines of interactions between proteins, independently from their cluster membership. This multiple analysis allows the deciphering of the chain of molecular events during corona growth.

• **Dynamic growth of the corona driven by the corona interactome.** Many physical interactions between proteins may occur in a complex environment such as blood. Our interactome analysis represented in Fig. 6 highlights first, in the center, the

proteins that are adsorbed from 30 seconds of contact with NPs. Strikingly these exhibit many possible direct interactions between each other. These proteins belong to either the first or the second cluster, *i.e.* some proteins tend to desorb while others continuously adsorb over time. At 30 seconds of contact, the proportion of the initial serum content constitutes 95% of the corona, whereas after 7 days, this percentage decreases to 90% (Table 2 in the ESI†). This indicates the profound modification of the composition of the corona in terms of the abundance and nature of proteins that occurs during the first 30 seconds. Therefore, we hypothesize that at the time of first contact between nanoparticles and proteins, the corona is a snapshot of the serum composition with the simultaneous adsorption of free and complexed proteins. Over time, the composition of the corona moves away from the initial serum

composition. In fact, the proteins displaying weak NP affinities are brought by proteins displaying high NP affinities, depicting an adsorption process governed by both selective NP–protein and non-selective protein–protein affinities. Until now the physicochemical parameters of proteins were suspected to be mainly responsible for their affinities for NPs. We believe that the protein–protein interactions play an equally important role. This may explain the difficulty in linking the physicochemical parameters of a protein with its extent of adsorption on NPs.

Therefore, some of the most abundant proteins in the serum, *i.e.* ALB (albumin) and APOA1 (apolipoprotein A1) exhibit a biological role of biocarriers, and are especially highly interactive. These proteins bind to many other proteins that may not necessarily have strong affinities with NPs (Fig. 6). Thus, all the proteins from the first and second clusters were adsorbed not sequentially but simultaneously. Once captured onto the NP surface, these proteins, either free or complexed, may undergo conformational changes by contact with the NP surface, leading to the exposure of new domains.^{13,49} According to Hirsh *et al.*, in multilayer protein coverage, some proteins could exchange their positions, exposing the first adsorbed proteins to the solution, resulting in desorption over time, which generates arrivals and departures in the corona.⁴⁴ These movements could induce a dissociation of protein complexes and a release from the corona of proteins displaying weak NP-affinity, due to a loosening of the conformation.

According to the model of Vilaseca *et al.*, when conformational changes occur, proteins may not necessarily only compete among themselves inside the corona but they also compete with other proteins in solution.⁴⁸ The formed protein corona provides new physicochemical and biological properties for these NPs and becomes an important mainspring of new interactions. This new visible “facet” of nanoparticles continuously interacts with the surrounding medium, which is in our case symbolized by the off-centered proteins of the interactome in Fig. 6. Most of these proteins are part of the “late enrichment” cluster 3. Their late appearance in the corona could be due to their direct interactions with proteins already in the corona and not necessarily with the NPs. In other words, some proteins were found within the corona while their presence was justified only by their functional interactions with other proteins already adsorbed and not by their direct affinities with NPs. This is the case for F9 (coagulation factor IX) for example, whose physical binding with SERPINC1 (antithrombin III) has been demonstrated by X-ray crystallography.⁵⁰

Finally, the interactome introduces a new parameter that has not been taken into account enough until now. Recently, O’Connell *et al.* have shown the importance of using protein interaction databases in the investigation of the corona around polystyrene nanoparticles by using a protein microarray.⁵¹ Thus, in the current study, we infer that NP–protein and protein–protein interactions are concomitant phenomena, driven by both physicochemical and biological properties. The

emerging science of networks now allows both types of influences to be taken into account.

• **Perspectives on developing new types of biocompatible nanocarriers with protein coverages.** The relative stoichiometry of proteins in the corona will influence pathway-specific bio-distribution and cellular uptake.³³ In addition, the formation of a corona around NPs upon the entry in the bloodstream greatly affects their durability. According to Saha *et al.*, the recognition and uptake of nanoparticles by macrophages is directly related to the amount of complement proteins on the surface.⁵² Thus, the design of nanoparticle coverage that is both stealthy and biocompatible is a major issue for the effectiveness of a nanocarrier. New formulations of nanoparticles for drug delivery include modifications of the surfaces of NPs. PEGylation, for instance, is known to reduce opsonization and enhance the blood circulation time of NPs by the escape of immune cell recognition.⁴⁹ PEG grafting reduces the adsorption of serum proteins and minimizes corona formation but this exogenous additive suffers several drawbacks. According to Walkey *et al.*, PEG can be oxidized in a physiological environment, but is not able to completely eliminate protein adsorption and macrophage uptake and PEGylated nanomaterials can induce the production of antibodies against it.⁵

An alternative strategy has emerged consisting of the use of peptides or proteins as a pre-coated corona for replacing classical functionalization such as PEG grafting or lipid bilayer covering.^{30,33,53,54} The feasibility of some pre-coatings of NPs was recently investigated. A recent work of Mirshafiee *et al.*, demonstrated that directing the corona composition by a pre-coating of silica NPs before cell exposure influences the future protein corona formation.³³ Especially a functionalization with human gamma-globulins designed for targeting cellular uptake by macrophages promoted the formation of a new corona enriched with opsonins such as complement factors. This IgG preformed corona lost its targeting capabilities because it was recovered by other serum proteins. Therefore, the choice of a pre-coating protein, whatever its intended use (targeting, stealth), is exquisitely delicate because, as we demonstrated in our study, the first protein layer around the nanoparticles interacts with the surrounding proteins, ruining the initial purpose.

Very recently clusterin was proposed as a pre-coating protein.^{9,54} Schöttler *et al.* showed that pre-coated NPs with CLU reduced the uptake by macrophages by 75.4%. Conversely, a pre-coating with HSA (human serum albumin) increased the internalization by 34%, although albumin is often described as a dysopsonin.^{9,55} According to innateDB, HSA is known to have more than 160 protein–protein interactions (PPI) including 37 interactions with extracellular proteins, whereas CLU presents only 89 known PPI including 14 interactions with extracellular proteins. The use of CLU as a NP pre-coating potentially reduces the possible recruitment of other proteins, and will probably increase the stealth effect compared to HSA by decreasing the macrophage uptake (Fig. 7). However, CLU is also known to interact with some complement components such as C7, C9 and C8B,⁵⁶ and

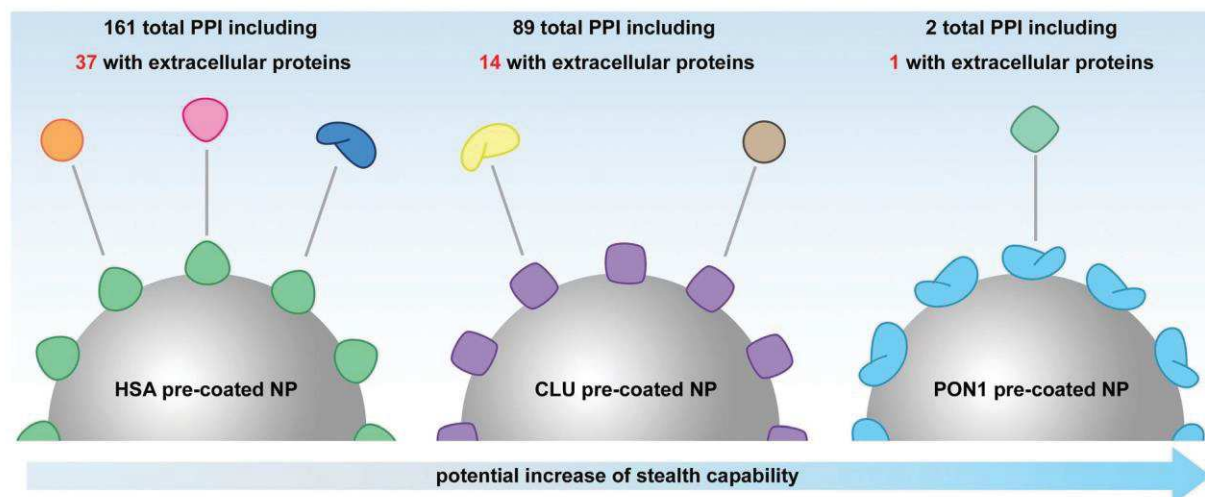


Fig. 7 Representation of three protein pre-coated NPs with human serum albumin, clusterin and paraoxonase 1 respectively. The number of potential protein–protein interactions (PPI) including those with extracellular proteins are extracted from the database innatDB.

consequently, this may not be the optimal choice for a pre-coating. In particular multiple CLU interactions with many factors of the complement cascade probably cause the induction of a short-lifespan of these NP/protein complexes. Thus, a protein pre-coating strategy requires a kinetic study of the corona interactome around the nanocarrier candidates, associated with the extensive use of databases to avoid the recruitment of proteins that may physically interact with the pre-coating.

In the current study, we highlighted paraoxonase 1 (PON1) that is enriched early in the corona (cluster 2) and presents no opsonin interactions (Fig. 7). PON1, whose function is to bind high density lipoprotein particles, and to be atheroprotective by decreasing lipid peroxidation in a variety of diseases,⁵⁷ is a good candidate to form a pre-coating on M-MSNs. It would be worth testing the functionalization of M-MSNs with PON1, which might provide the stealth characteristics which could increase the lifetime in the blood stream.

Conclusion

The development of future nanocarriers for medicine necessitates the improvement of our knowledge of corona formation because plasma proteins cannot be avoided when nanoparticles are administered intravenously to patients. Much remains to be achieved in the design of future vectors, as the influence of other environmental parameters for these new objects (interactions with other biomolecules such as lipids and sugars in blood, drug loading and release, biodistribution, impact of blood flow) and their potential toxicities will have to be determined. This timeline study, combining mass spectrometry and computational biology, highlighted the continuous growth of the corona over time and the occurrence of several different protein behaviors. For the first time, we have

introduced and discussed the role of the corona interactome as an important factor influencing corona composition and evolution. The corona interactome provides an original method to describe the dynamics of protein corona around nanoparticles and to visualize the possible interactions of this corona with a surrounding complex medium containing proteins. These NP/protein complexes are the ultimate biological entities that determine the physiological responses and induce their biological fates.

This method could be generalized to other types of nanocarrier candidates, as a strategy to reduce the non-specific interactions of additional proteins around NPs. Such a kinetic study of the corona interactome offers new insights into the design of nanocarriers by finding proteins for the pre-coating of NPs that confer on them novel advantageous biomedical properties. For a specific application, the binding of an adapted protein will elicit specific biological responses, such as receptor-mediated cell-specific targeted uptake or extended blood circulation time, while minimizing the potential cytotoxic effects of nanoparticles.

Abbreviations

NP	Nanoparticle
M-MSN	Magnetic mesoporous silica nanoparticle
MION	Magnetic iron oxide nanoparticle
HS	Human serum
FBS	Fetal bovine serum
BCA	Bicinchoninic acid
LDS	Lithium dodecyl sulfate
MS	Mass spectrometry
PPI	Protein–protein interaction
TEM	Transmission electronic microscopy
AFM	Atomic force microscopy;

Author contributions

J. A. and O. P. conceived and designed the experiments. C. P. and J.-C. G. carried out the experiments and, with J. A. and O. P., performed data analysis. M. O. carried out AFM imaging. J. L. N., C. C. and Y. G. synthesized and characterized the nanoparticles. J. C. and J.-M. D. coordinated the project. C. P. and O. P. wrote the manuscript and the ESI.†

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

This work was supported by the French National Research Agency (ANR) (Grant ANR-13-NANO-0007-03).

References

- 1 J. Xie, S. Lee and X. Chen, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2010, **62**, 1064–1079.
- 2 A. Baeza, M. Manzano, M. Colilla and M. Vallet-Regi, *Biomater. Sci.*, 2016, **4**, 803–813.
- 3 N. P. Mortensen, G. B. Hurst, W. Wang, C. M. Foster, P. D. Nallathamby and S. T. Retterer, *Nanoscale*, 2013, **5**, 6372–6380.
- 4 L. Zhou, J. Yuan and Y. Wei, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 2823–2840.
- 5 C. D. Walkey and W. C. Chan, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 2780–2799.
- 6 C. Gunawan, M. Lim, C. P. Marquis and R. Amal, *J. Mater. Chem. B*, 2014, **2**, 2060–2083.
- 7 E. Izak-Nau, M. Voetz, S. Eiden, A. Duschl and V. F. Puentes, *Part. Fibre Toxicol.*, 2013, **10**, 56.
- 8 M. P. Monopoli, D. Walczyk, A. Campbell, G. Elia, I. Lynch, F. B. Bombelli and K. A. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 2525–2534.
- 9 S. Schottler, G. Becker, S. Winzen, T. Steinbach, K. Mohr, K. Landfester, V. Mailander and F. R. Wurm, *Nat. Nanotechnol.*, 2016, **11**, 372–377.
- 10 S. Tenzer, D. Docter, S. Rosfa, A. Wlodarski, J. Kuharev, A. Rekik, S. K. Knauer, C. Bantz, T. Nawroth, C. Bier, J. Sirirattanapan, W. Mann, L. Treuel, R. Zellner, M. Maskos, H. Schild and R. H. Stauber, *ACS Nano*, 2011, **5**, 7155–7167.
- 11 U. Sakulkhu, M. Mahmoudi, L. Maurizi, J. Salaklang and H. Hofmann, *Sci. Rep.*, 2014, **4**, 5020.
- 12 V. Puddu and C. C. Perry, *ACS Nano*, 2012, **6**, 6356–6363.
- 13 A. E. Nel, L. Madler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova and M. Thompson, *Nat. Mater.*, 2009, **8**, 543–557.
- 14 C. Mathe, S. Devineau, J. C. Aude, G. Lagniel, S. Chedin, V. Legros, M. H. Mathon, J. P. Renault, S. Pin, Y. Boulard and J. Labarre, *PLoS One*, 2013, **8**, e81346.
- 15 D. Docter, S. Strieth, D. Westmeier, O. Hayden, M. Gao, S. K. Knauer and R. H. Stauber, *Nanomedicine*, 2015, **10**, 503–519.
- 16 S. Dib, M. Boufatit, S. Chelouaou, F. Sadi-Hassaine, J. Croissant, J. Long, L. Raehm, C. Charnay and J. O. Durand, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 24838–24841.
- 17 W.-Y. Rho, H.-M. Kim, S. Kyeong, Y.-L. Kang, D.-H. Kim, H. Kang, C. Jeong, D.-E. Kim, Y.-S. Lee and B.-H. Jun, *J. Ind. Eng. Chem.*, 2014, **20**, 2646–2649.
- 18 G. Clair, J. Armengaud and C. Duport, *Mol. Cell. Proteomics*, 2012, **11**, M111.013102.
- 19 G. Klein, C. Mathé, M. Biola-Clier, S. Devineau, E. Drouineau, E. Hatem, L. Marichal, B. Alonso, J.-C. Gaillard, G. Lagniel, J. Armengaud, M. Carrière, S. Chédin, Y. Boulard, S. Pin, J.-P. Renault, J.-C. Aude and J. Labarre, *Nanotoxicology*, 2016, 1–30, DOI: 10.1080/17435390.2016.1244299.
- 20 C. Pisani, J. C. Gaillard, V. Nouvel, M. Odorico, J. Armengaud and O. Prat, *BMC Genomics*, 2015, **16**, 315.
- 21 J. Xia, M. J. Benner and R. E. Hancock, *Nucleic Acids Res.*, 2014, **42**, W167–W174.
- 22 J. Xia, E. E. Gill and R. E. W. Hancock, *Nat. Protocols*, 2015, **10**, 823–844.
- 23 K. Breuer, A. K. Foroushani, M. R. Laird, C. Chen, A. Sribnaia, R. Lo, G. L. Winsor, R. E. Hancock, F. S. Brinkman and D. J. Lynn, *Nucleic Acids Res.*, 2013, **41**, D1228–D1233.
- 24 J. Nyalosaso, E. Rascol, C. Pisani, C. Dorandeu, X. Dumail, M. Maynadier, M. Gary-Bobo, J. Laikehim, P. Bron, M. Garcia, J.-M. Devoisselle, O. Prat, Y. Guari, C. Charnay and J. C. Chopineau, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 57275–57283.
- 25 Q. He and J. Shi, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 5845–5855.
- 26 Z. Li, J. C. Barnes, A. Bosoy, J. F. Stoddart and J. I. Zink, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 2590–2605.
- 27 D. Tarn, C. E. Ashley, M. Xue, E. C. Carnes, J. I. Zink and C. J. Brinker, *Acc. Chem. Res.*, 2013, **46**, 792–801.
- 28 J. L. Vivero-Escoto, I. I. Slowing, B. G. Trewyn and V. S. Lin, *Small*, 2010, **6**, 1952–1967.
- 29 S. Tenzer, D. Docter, J. Kuharev, A. Musyanovych, V. Fetz, R. Hecht, F. Schlenk, D. Fischer, K. Kiouptsi, C. Reinhardt, K. Landfester, H. Schild, M. Maskos, S. K. Knauer and R. H. Stauber, *Nat. Nanotechnol.*, 2013, **8**, 772–781.
- 30 C. Vogt, M. Pernemalm, P. Kohonen, S. Laurent, K. Hultenby, M. Vahter, J. Lehtio, M. S. Toprak and B. Fadeel, *PLoS One*, 2015, **10**, e0129008.
- 31 T. Cedervall, I. Lynch, S. Lindman, T. Berggård, E. Thulin, H. Nilsson, K. A. Dawson and S. Linse, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, **104**, 2050–2055.
- 32 L. Vroman and A. L. Adams, *Surf. Sci.*, 1969, **16**, 438–446.
- 33 V. Mirshafiee, R. Kim, S. Park, M. Mahmoudi and M. L. Kraft, *Biomaterials*, 2016, **75**, 295–304.

- 34 S. Ritz, S. Schöttler, N. Kotman, G. Baier, A. Musyanovych, J. Kuharev, K. Landfester, H. Schild, O. Jahn, S. Tenzer and V. Mailänder, *Biomacromolecules*, 2015, **16**, 1311–1321.
- 35 M. M. Yallapu, N. Chauhan, S. F. Othman, V. Khalilzad-Sharghi, M. C. Ebeling, S. Khan, M. Jaggi and S. C. Chauhan, *Biomaterials*, 2015, **46**, 1–12.
- 36 J. Kreuter, D. Shamenkov, V. Petrov, P. Range, K. Cychutek, C. Koch-Brandt and R. Alyautdin, *J. Drug Targeting*, 2002, **10**, 317–325.
- 37 C. Corbo, R. Molinaro, A. Parodi, N. E. Toledano Furman, F. Salvatore and E. Tasciotti, *Nanomedicine*, 2015, **11**, 81–100.
- 38 W. Liu, J. Rose, S. Plantevin, M. Auffan, J. Y. Bottero and C. Vaudaud, *Nanoscale*, 2013, **5**, 1658–1668.
- 39 S. Milani, F. Baldelli Bombelli, A. S. Pitek, K. A. Dawson and J. Rädler, *ACS Nano*, 2012, **6**, 2532–2541.
- 40 C. Farrera and B. Fadeel, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2015, **95** (Part A), 3–12.
- 41 P. M. Kelly, C. Åberg, E. Polo, A. O'Connell, J. Cookman, J. Fallon, Ž. Krpetić and K. A. Dawson, *Nat. Nanotechnol.*, 2015, **10**, 472–479.
- 42 E. Casals, T. Pfaller, A. Duschl, G. J. Oostingh and V. Puentes, *ACS Nano*, 2010, **4**, 3623–3632.
- 43 D. Dell'Orco, M. Lundqvist, S. Linse and T. Cedervall, *Nanomedicine*, 2014, **9**, 851–858.
- 44 S. L. Hirsh, D. R. McKenzie, N. J. Nosworthy, J. A. Denman, O. U. Sezerman and M. M. M. Bilek, *Colloids Surf., B*, 2013, **103**, 395–404.
- 45 M. Lundqvist, J. Stigler, T. Cedervall, T. Berggård, M. B. Flanagan, I. Lynch, G. Elia and K. Dawson, *ACS Nano*, 2011, **5**, 7503–7509.
- 46 M. P. Monopoli, C. Åberg, A. Salvati and K. A. Dawson, *Nat. Nanotechnol.*, 2012, **7**, 779–786.
- 47 C. Rocker, M. Potzl, F. Zhang, W. J. Parak and G. U. Nienhaus, *Nat. Nanotechnol.*, 2009, **4**, 577–580.
- 48 P. Vilaseca, K. A. Dawson and G. Franzese, *Soft Matter*, 2013, **9**, 6978–6985.
- 49 R. M. Pearson, V. V. Juettner and S. Hong, *Front. Chem.*, 2014, **2**, 108.
- 50 D. J. Johnson, J. Langdown and J. A. Huntington, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, **107**, 645–650.
- 51 D. J. O'Connell, F. B. Bombelli, A. S. Pitek, M. P. Monopoli, D. J. Cahill and K. A. Dawson, *Nanoscale*, 2015, **7**, 15268–15276.
- 52 K. Saha, M. Rahimi, M. Yazdani, S. T. Kim, D. F. Moyano, S. Hou, R. Das, R. Mout, F. Rezaee, M. Mahmoudi and V. M. Rotello, *ACS Nano*, 2016, **10**, 4421–4430.
- 53 R. G. Digigow, D. Vanhecke, B. Rothen-Rutishauser, M. J. D. Clift and A. Petri-Fink, *Part. Part. Syst. Charact.*, 2015, **32**, 188–196.
- 54 D. Dutta, S. K. Sundaram, J. G. Teeguarden, B. J. Riley, L. S. Fifield, J. M. Jacobs, S. R. Addleman, G. A. Kaysen, B. M. Moudgil and T. J. Weber, *Toxicol. Sci.*, 2007, **100**, 303–315.
- 55 L. Thiele, J. E. Diederichs, R. Reszka, H. P. Merkle and E. Walter, *Biomaterials*, 2003, **24**, 1409–1418.
- 56 J. Tschopp, A. Chonn, S. Hertig and L. E. French, *J. Immunol.*, 1993, **151**, 2159–2165.
- 57 M. Mackness and B. Mackness, *Gene*, 2015, **567**, 12–21.

Article n°6

***Les étapes expérimentales de séparation influencent
la composition en protéines de la corona autour de
nanoparticules de silice***

Article n°6 : Les étapes expérimentales de séparation influence la composition en protéines de la corona autour de nanoparticules de silice

Dans un concept idéal de nanovecteurs, ceux-ci doivent avoir la capacité d'échapper à la clairance rapide induite par le système immunitaire après injection afin d'allonger le temps de circulation dans le sang. Cette circulation longue permettrait d'augmenter la probabilité d'atteindre une cible tissulaire, que ce soit par ciblage passif ou actif. La corona étant un acteur primordial dans le processus d'opsonisation, sa compréhension est un challenge fondamental en nanomédecine car elle permettrait justement d'en contrôler sa formation (voir article n°5).

A l'heure actuelle, il existe des variations, parfois importantes, entre différentes études de la corona qui pourtant ont été faites sur des NPs très similaires. Ces variations pourraient être dues aux différents paramètres physico-chimiques des NPs (taille, forme, composition, surface spécifique, porosité, charge de surface, *etc.*), mais pas seulement. Il existe des zones d'ombre autour de la formation de la corona, et pour répondre en partie à cela, nous avons focalisé notre attention, dans ce dernier article, sur l'influence du protocole expérimental sur la composition de la corona déterminée par spectrométrie de masse.

Nous nous sommes penchés sur une étape du protocole expérimental qui nous semble importante, la séparation avant analyse entre les NPs et le fluide biologique responsable de cette corona. Pour cela, nous avons réalisé une incubation des NPs dans du sérum humain et utilisé deux méthodes de séparation différentes : la centrifugation, qui est la plus communément utilisée dans la littérature, et l'aimantation, qui est permise uniquement par la présence du cœur de fer dans nos NPs.

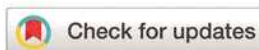
De ce fait, après 30 minutes d'immersion dans du sérum humain, la séparation (seul paramètre variable) s'effectue selon les conditions suivantes :

- Les NPs ont été lavées 3 fois et collectées par aimantation avec un aimant d'1,4 Tesla.
- Les NPs ont été lavées 3 fois et collectées par centrifugation à 5900g.

Après analyse en nano-LC MS/MS, les données ont été traitées avec différents outils informatiques développés sur R. Nous avons ainsi identifié 121 et 151 protéines au sein de la corona avec aimantation ou centrifugation. Il existe des similarités, qui ici sont représentées par un pool de protéines communes de 108 protéines, nommé core protéome. Le calcul du NSAF (%) a permis, comme dans les études précédentes, de visualiser l'abondance relative des protéines dans ces deux ensembles. Nous avons ainsi observé des différences nettes entre les deux coronas. L'exemple le plus marquant concerne l'albumine, qui représente $33 \pm 2\%$ de la corona après aimantation, alors qu'elle occupe seulement $6 \pm 2\%$ après centrifugation.

Ainsi, les étapes de centrifugation qui sont réalisées dans les études de corona pour beaucoup de NPs, parce qu'il n'existe pas d'alternatives, induisent probablement des forces qui réduisent la part des protéines qui ont des affinités faibles pour les NPs. Les forces appliquées par centrifugation sont forcément plus importantes que celles induites par l'aimantation. La centrifugation introduit donc un artefact qui modifie la composition initiale de la corona et ne retient probablement que les protéines qui ont des interactions fortes avec les NPs (interactions physico-chimiques), et avec la corona elle-même (interactions protéines-protéines, voir article n°5 sur l'intéractome). Cette perte protéique redistribue totalement le pourcentage des autres protéines en surface en remodelant la corona de manière forcée.

En conclusion, chaque protocole de séparation est en soi plus ou moins intrusif, la clé étant que la méthode réponde au besoin de l'expérience. C'est potentiellement une des raisons de la difficulté à comprendre la formation de la corona. Les méthodes de détection *in situ* pourront être une perspective permettant de caractériser la corona directement au sein d'un fluide biologique ou de cellules sans en compromettre sa composition.



Cite this: DOI: 10.1039/c7nr01654a

Received 7th March 2017,

Accepted 12th April 2017

DOI: 10.1039/c7nr01654a

rsc.li/nanoscale

Experimental separation steps influence the protein content of corona around mesoporous silica nanoparticles†

C. Pisani,^{a,b} J. C. Gaillard,^c C. Dorandeu,^a C. Charnay,^d Y. Guari,^d J. Chopineau,^{a,e} J. M. Devoisselle,^a J. Armengaud^c and O. Prat^b 

In order to direct nanocarriers to their targets efficiently, we have to understand the interactions occurring at the nano-bio interface between nanocarriers and human proteins, which forms the layer called the corona. However, experiments aiming to identify and quantify the proteins in the corona, especially critical steps in the separation of nanoparticles from biological media may affect the corona composition. Here, we used nano-LC MS/MS to compare the protein corona contents obtained after using two different separation methods. We showed that applying centrifugation versus magnetization to isolate nanoparticles surrounded by a corona resulted in protein loss and a reshuffling of their respective abundances.

Magnetic mesoporous silica nanocarriers (M-MSNs) are promising targeting tools for theranostics, enabling the application of both therapeutic and imaging functions in cancer diagnostics and therapy.¹ These nanoparticles (NPs) are good candidates for clinical applications because of their easily functionalizable surface and likely low toxicity.^{2,3}

The interactions of M-MSNs with numerous biomolecules, in particular with a large panel of proteins, have been studied over many years.⁴ Proteins compete for binding to the NP surface forming a layer known as the corona. Understanding the protein corona is at present a fundamental challenge in nanomedicine and should facilitate the capability to control its formation, and even to design it. In an ideal process of engineering nanocarriers, NPs must be able to escape the rapid clearance induced by the immune system after injection

and must be able to remain in the blood circulation for as long as necessary to reach the target organ(s). For this, nanocarriers must have a stealth capability to avoid the opsonization, a biochemical process of adsorption of immune protein components called opsonins, which governs the elimination of foreign bodies by phagocytosis.

However, despite the considerable amount of interest focused on the corona by the scientific community (Fig. 1), corona formation remains puzzling. Numerous physico-chemical and biological factors influence this process, such as attraction forces between NPs and proteins and functional interactions between proteins.⁵ Acquisition of more data on the corona composition and its formation over time is therefore essential for the future realization of effective, injectable nanocarriers.

In this context, numerous studies have been carried out to investigate the composition of the corona formed around many types of NPs.^{5–18} In most of these studies, tandem mass spectrometry and shotgun proteomics has proved to be a powerful and indispensable tool to obtain large datasets.

There are encouraging similarities in the results in the literature regarding the composition of the corona around silica NPs and many complementary theories have been proposed to explain the formation of this corona.^{7–10,15,19–24} However, there are still variations within the literature about the corona com-

^aInstitut Charles Gerhardt de Montpellier, MACS, UMR 5253 CNRS-ENSCM-UM, 1701, Place Eugène Bataillon, F-34095 Montpellier, France

^bCEA, Direction de la Recherche Fondamentale-BIAM, Site de Marcoule, F-30207 Bagnols-sur-Cèze, France. E-mail: odette.prat@cea.fr

^cCEA, Direction de la Recherche Fondamentale-IBITECS, Site de Marcoule, F-30207 Bagnols-sur-Cèze, France

^dInstitut Charles Gerhardt de Montpellier, IMNO, UMR 5253 CNRS-ENSCM-UM, 1701, Place Eugène Bataillon, F-34095 Montpellier, France

^eUniversité de Nîmes Rue Georges Salan, F-30000 Nîmes, France

†Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental section, Tables 1 and 2. See DOI: 10.1039/c7nr01654a

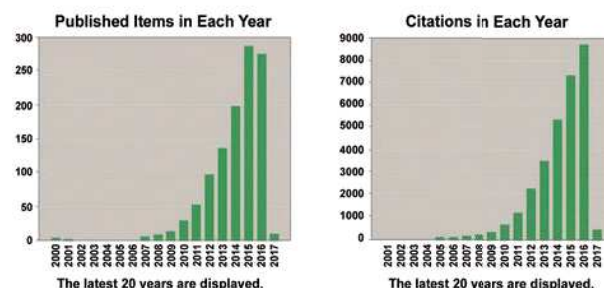


Fig. 1 Web of sciences publication and citation report for the latest 20 years with the topic "nanoparticle protein corona".

position, adding confusion and preventing the development of predictive tools. Here, we raised the question of the role of the different protocols used to isolate NPs once the corona has formed. The present study aimed to determine whether centrifugation, which is the most common method used to separate NPs from biological media, could induce a modification of the resulting protein corona. Due to the magnetic properties of the mesoporous silica NPs used and previously described,^{5,25} the separation step from human serum was performed either by magnetization or by centrifugation. Thus, we were able to evaluate the different protein contents of the M-MSNs coronas obtained with the two separation protocols.

After 30 minutes of immersion in human serum (HS), NPs were washed three times and collected, either by magnetization (1.4 Tesla magnets) or by centrifugation (5900g) (ESI Material and methods†). Nano-LC MS/MS identified 121 and 151 proteins within the NP corona after the magnetization or centrifugation steps, respectively (Fig. 2A). A rather good correlation was observed between these two types of experimental conditions, with a common core proteome of 108 proteins (Fig. 2B).

We calculated the relative proportion of each protein in a sample, by normalizing the spectral counts obtained for each protein by its molecular weight, *i.e.* Normalized Spectral Abundance Factor (NSAF).⁵ The top 10 most abundant proteins within the corona obtained after separation by magnetization and centrifugation are listed in Tables 1 and 2, respectively

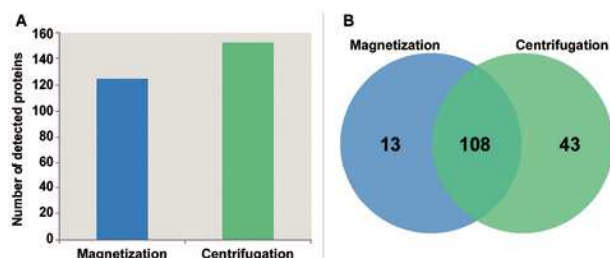


Fig. 2 Number of proteins detected within the corona after identification by nano-LC MS/MS (A) with separation steps by magnetization (blue) or centrifugation (green) (B) Venn diagram representing common or specific proteins by condition.

Table 1 Top 10 of the most abundant proteins (NSAF %) in the corona with experimental separation by magnetization

Description	Accession	Relative proportion (%)	Standard deviation
Serum albumin	P02768	33.407	2.309
Ig kappa chain C region	P01834	5.902	1.198
Ig gamma-1 chain C region	P01857	5.182	0.741
Apolipoprotein A-I	P02647	3.652	0.389
Serotransferrin	P02787	3.122	0.178
Ig lambda-2 chain C regions	P0CG05	2.688	1.056
Vitamin D-binding protein	P02774	2.222	0.313
Complement C3	P01024	2.212	0.133
Alpha-2-HS-glycoprotein	P02765	2.190	0.099
Hemopexin	P02790	2.144	0.136

Table 2 Top 10 of the most abundant proteins (NSAF %) in the corona with experimental separation by centrifugation

Description	Accession	Relative proportion (%)	Standard deviation
Apolipoprotein A-I	P02647	7.547	2.313
Serum albumin	P02768	5.990	1.844
Complement C3	P01024	4.481	0.243
Alpha-2-HS-glycoprotein	P02765	3.639	0.496
Apolipoprotein E	P02649	3.095	0.925
Ig kappa chain C region	P01834	2.897	0.753
Apolipoprotein A-IV	P06727	2.613	0.707
Ig lambda-2 chain C regions	P0CG05	2.310	0.587
Ig gamma-3 chain C region	P01860	2.242	0.941
Beta-2-glycoprotein 1	P02749	2.210	0.922

(complete lists in Tables ESI-1 and ESI-2†). The most obvious difference is the relative amount of albumin, which represented 33%(±2) of the corona after magnetization, *versus* 6%(±2) after centrifugation. Modification of the relative amounts of other common proteins was also observed, such as Ig kappa chain C region, apolipoprotein A-I and complement C3 (Tables 1 and 2) for instance.

Human serum albumin is the most abundant protein in human serum. In many studies, albumin is also the most abundant protein of the corona around silica NPs.^{6,15,26,27}

According to the literature, albumin is known to be part of the pool of proteins that have a weak affinity for silica NPs, as its abundance within the corona decreases over time, similarly to most of the immunoglobulins.^{5,15} The centrifugation separation steps necessary to collect the NP-corona complexes probably reduce the abundance of proteins that have weak affinities with NPs.⁶ The discrepancy in protein corona albumin abundance after separation by magnetization or centrifugation is mainly due to the drastic difference between the forces applied to the nanoparticles between both conditions. During centrifugation, these forces may also break existing weak interactions between proteins themselves, which compose, as we demonstrated it, an 'interactome' within the corona.⁵

The considerable difference in the abundance of albumin observed after magnetic or centrifugal separation is accompanied by a reshuffling in the relative abundance of the other proteins as shown in Fig. 3. Thus, the centrifugation separation process profoundly alters the composition of the corona.

These differences in protein content within the corona induced by experimental protocols add complexity to understand the process of its formation. The different protocols used depend on the particular characteristics of the NPs. The experimental requirements for separating NPs from biological media are intimately linked to their physico-chemical properties. In our case, the magnetic core of the mesoporous silica NPs enabled the protocol comparison. Clearly, our data highlighted the fact that the centrifugation step introduced an artifact that modified the initial composition of the corona. The centrifugation washing step allows getting rid of proteins

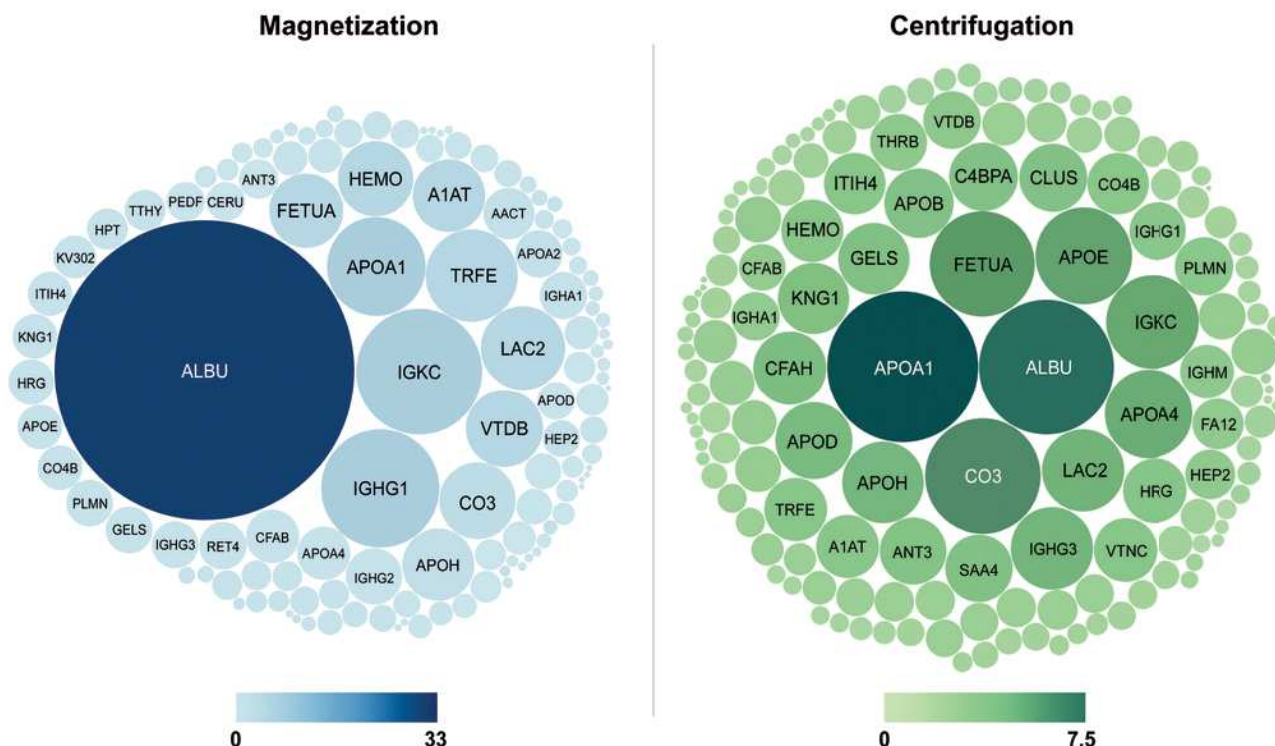


Fig. 3 Illustration of the corona according to experimental protocols, i.e. magnetization (blue) and centrifugation (green). Sizes and colours of human protein clues are proportional to their relative percentage within the corona. The 35 highest abundant proteins are labelled. The color scale unit is NSAF (%).

unbound to NPs. Centrifugation likely retains the sole proteins tightly bound to the NPs or to the NP/corona complex. Thereby, this step eliminates at the same time a large part of proteins that are only weakly bound to this complex.^{10,28} However, the proportion of each protein within the corona is critical, especially when in contact with cells.^{28,29} For instance, the size increase caused by corona formation may modify the pharmacokinetics of NPs.³⁰ Furthermore, Lara *et al.*,³¹ by using LDL and IgG as examples, have demonstrated that adsorbed proteins on SiO₂ NPs can present functional epitopes to allow the specific recognition of matching receptors. Thus NPs may be “mistaken” for endogenous biomolecules (e.g., lipoproteins). In our study, the relative abundance of these proteins in the corona is varying according to the mode of separation. As a result, the recognition of these proteins by specific cellular receptors may change in function of their abundance in the corona.

In addition, the protein corona may mitigate NP-induced toxicity: nanoparticles with a higher protein density displayed less toxicity than those with a lower protein density.³² Therefore the modification of the corona composition is an essential factor that may later interfere with NP binding to cell membranes, cellular uptake, potential release and biodistribution of carried drug. One has to accept that any separation mode may be in some way intrusive, but comparisons remain correct as far as separation protocols are the same. The key point is to choose a separation method that satisfies the

purpose of the experiment, rather than to seek to get an agreement between methods.³³ In order to eliminate this bias, it would be suitable in the future to characterize the corona *in situ*, directly in the cells or tissues of interest, as this now seems to be within sight.^{34,35}

Conclusions

We set out to examine the differences in the results of proteomics analyses carried out after separation of NPs from human serum using two different experimental methods, magnetization or centrifugation. We observed that the resulting corona contained different relative protein quantities depending on the separation method used. Forces applied to the NPs by centrifugation, which are drastically stronger than those applied by magnetization, potentially induce the breakage of weak bonds between NPs and proteins or even between proteins themselves. It is important to take into consideration the fact that experimental protocols could affect the composition of the corona and could introduce a bias in its qualification and quantification. To avoid this bias, new approaches will have to be developed to describe the corona in realistic environments. Since the comprehension of the corona role is of utmost importance in cellular fate of nanocarriers, such issues are important in the continuation of work for the improvement of nanomedicine and nanosafety.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

This work was supported by the French National Research Agency (ANR) (Grant ANR-13-NANO-0007-03).

References

- J. Xie, S. Lee and X. Chen, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2010, **62**, 1064–1079.
- A. Baeza, M. Manzano, M. Colilla and M. Vallet-Regi, *Biomater. Sci.*, 2016, **4**, 803–813.
- L. Zhou, J. Yuan and Y. Wei, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 2823–2840.
- C. D. Walkey and W. C. Chan, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 2780–2799.
- C. Pisani, J.-C. Gaillard, M. Odorico, J. L. Nyalosaso, C. Charnay, Y. Guari, J. Chopineau, J.-M. Devoisselle, J. Armengaud and O. Prat, *Nanoscale*, 2017, **9**, 1840–1851.
- T. Cedervall, I. Lynch, S. Lindman, T. Berggård, E. Thulin, H. Nilsson, K. A. Dawson and S. Linse, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, **104**, 2050–2055.
- P. M. Kelly, C. Åberg, E. Polo, A. O'Connell, J. Cookman, J. Fallon, K. Željka and K. A. Dawson, *Nat. Nanotechnol.*, 2015, **10**, 472–479.
- W. Liu, J. Rose, S. Plantevin, M. Auffan, J. Y. Bottero and C. Vidaud, *Nanoscale*, 2013, **5**, 1658–1668.
- M. Lundqvist, J. Stigler, T. Cedervall, T. Berggård, M. B. Flanagan, I. Lynch, G. Elia and K. Dawson, *ACS Nano*, 2011, **5**, 7503–7509.
- M. P. Monopoli, C. Åberg, A. Salvati and K. A. Dawson, *Nat. Nanotechnol.*, 2012, **7**, 779–786.
- M. P. Monopoli, A. S. Pitek, I. Lynch and K. A. Dawson, *Methods Mol. Biol.*, 2013, **1025**, 137–155.
- N. P. Mortensen, G. B. Hurst, W. Wang, C. M. Foster, P. D. Nallathamby and S. T. Retterer, *Nanoscale*, 2013, **5**, 6372–6380.
- D. J. O'Connell, F. B. Bombelli, A. S. Pitek, M. P. Monopoli, D. J. Cahill and K. A. Dawson, *Nanoscale*, 2015, **7**, 15268–15276.
- S. Schottler, G. Becker, S. Winzen, T. Steinbach, K. Mohr, K. Landfester, V. Mailander and F. R. Wurm, *Nat. Nanotechnol.*, 2016, **11**, 372–377.
- S. Tenzer, D. Docter, J. Kuharev, A. Musyanovych, V. Fetz, R. Hecht, F. Schlenk, D. Fischer, K. Kiouptsi, C. Reinhardt, K. Landfester, H. Schild, M. Maskos, S. K. Knauer and R. H. Stauber, *Nat. Nanotechnol.*, 2013, **8**, 772–781.
- S. Tenzer, D. Docter, S. Rosfa, A. Wlodarski, J. Kuharev, A. Rekik, S. K. Knauer, C. Bantz, T. Nawroth, C. Bier, J. Sirirattanapan, W. Mann, L. Treuel, R. Zellner, M. Maskos, H. Schild and R. H. Stauber, *ACS Nano*, 2011, **5**, 7155–7167.
- F. Wang, L. Yu, M. P. Monopoli, P. Sandin, E. Mahon, A. Salvati and K. A. Dawson, *Nanomedicine*, 2013, **9**, 1159–1168.
- M. M. Yallapu, N. Chauhan, S. F. Othman, V. Khalilzad-Sharghi, M. C. Ebeling, S. Khan, M. Jaggi and S. C. Chauhan, *Biomaterials*, 2015, **46**, 1–12.
- E. Casals, T. Pfaller, A. Duschl, G. J. Oostingh and V. Puentes, *ACS Nano*, 2010, **4**, 3623–3632.
- D. Dell'Orco, M. Lundqvist, S. Linse and T. Cedervall, *Nanomedicine*, 2014, **9**, 851–858.
- S. L. Hirsh, D. R. McKenzie, N. J. Nosworthy, J. A. Denman, O. U. Sezerman and M. M. M. Bilek, *Colloids Surf., B*, 2013, **103**, 395–404.
- C. Rocker, M. Potzl, F. Zhang, W. J. Parak and G. U. Nienhaus, *Nat. Nanotechnol.*, 2009, **4**, 577–580.
- P. Vilaseca, K. A. Dawson and G. Franzese, *Soft Matter*, 2013, **9**, 6978–6985.
- C. Vogt, M. Pernemalm, P. Kohonen, S. Laurent, K. Hultenby, M. Vahter, J. Lehtio, M. S. Toprak and B. Fadeel, *PLoS One*, 2015, **10**, e0129008.
- J. Nyalosaso, E. Rascol, C. Pisani, C. Dorandeu, X. Dumail, M. Maynadier, M. Gary-Bobo, J. Laikehim, P. Bron, M. Garcia, J.-M. Devoisselle, O. Prat, Y. Guari, C. Charnay and J. C. Chopineau, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 57275–57283.
- E. Izak-Nau, M. Voetz, S. Eiden, A. Duschl and V. F. Puentes, *Part. Fibre Toxicol.*, 2013, **10**, 56.
- S. Palchetti, L. Digiaco, D. Pozzi, G. Peruzzi, E. Micarelli, M. Mahmoudi and G. Caracciolo, *Nanoscale*, 2016, **8**, 12755–12763.
- V. Mirshafiee, R. Kim, S. Park, M. Mahmoudi and M. L. Kraft, *Biomaterials*, 2016, **75**, 295–304.
- J. A. Kim, A. Salvati, C. Åberg and K. A. Dawson, *Nanoscale*, 2014, **6**, 14180–14184.
- M. Lundqvist, J. Stigler, G. Elia, I. Lynch, T. Cedervall and K. A. Dawson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, **105**, 14265–14270.
- S. Lara, F. Alnasser, E. Polo, D. Garry, M. C. Lo Giudice, D. R. Hristov, L. Rocks, A. Salvati, Y. Yan and K. A. Dawson, *ACS Nano*, 2017, **11**, 1884–1893.
- C. Ge, J. Du, L. Zhao, L. Wang, Y. Liu, D. Li, Y. Yang, R. Zhou, Y. Zhao, Z. Chai and C. Chen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2011, **108**, 16968–16973.
- M. P. Monopoli, S. Wan, F. B. Bombelli, E. Mahon and K. A. Dawson, *Nano LIFE*, 2013, **03**, 1343004.
- S. Lara, F. Alnasser, E. Polo, D. Garry, M. C. Lo Giudice, D. R. Hristov, L. Rocks, A. Salvati, Y. Yan and K. A. Dawson, *ACS Nano*, 2017, **11**, 1884–1893.
- M. C. Lo Giudice, L. M. Herda, E. Polo and K. A. Dawson, *Nat. Commun.*, 2016, **7**, 13475.

Conclusions et perspectives

Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'un projet de recherche financé (BioSiPharm) par l'ANR, P2N et par la collaboration entre des laboratoires de l'institut Charles Gerhardt de Montpellier (MACS et IMNO), de la direction de la recherche fondamentale du CEA et de la société NanoMedSyn.

Si le domaine des nanovecteurs de médicaments fait l'objet d'intenses recherches, tant au niveau de l'amélioration de l'efficacité thérapeutique des substances actives que d'innovations concernant leur structure, leur capacité d'encapsulation, et de ciblage vers des tissus spécifiques, peu d'études ont été consacrées à l'impact intrinsèque de ces nanovecteurs eux-mêmes ou munis de leurs multiples décorations.

C'est tout l'objet de cette thèse qui a pris pour exemple des nanovecteurs magnétiques de dernière génération de type cœur-coquille. Ces NPs de silice mésoporeuse (M-MSN) comportant un cœur unique de magnétite ont été étudiées à l'état natif, mais aussi recouvertes de PEG2000 ou d'une bicouche lipidique de DMPC. Après une caractérisation physico-chimique poussée, leur toxicité potentielle sur des cellules hépatiques HepaRG a fait l'objet d'investigations approfondies à l'aide de méthodes innovantes.

Cette thèse a démarré par l'installation et la mise en place de la technologie d'impédance cellulaire en temps réel au sein du laboratoire d'accueil. Cette technique est très prometteuse dans l'évaluation toxicologique et ses bénéfices dans l'étude des effets induits par les NPs ont été démontrés à travers les différents articles scientifiques publiés pendant la thèse. Concernant les puces d'expression génique, bien que la technologie ait été déjà bien établie au laboratoire, la robustesse des oligomicroarrays ainsi que les procédés d'analyse des puces sont en constante amélioration. Les premiers essais ont donc été réalisés avec des puces commerciales utilisées en routine, les « Whole human genome microarray » 4 x 44k (Agilent), comprenant 4 génomes de 44 000 sondes chacun sur un support unique.

Lors d'une étude préliminaire, nous avons utilisé des NPs de silice en tant que modèle afin d'élaborer une méthodologie d'analyse comparative de données massives basée sur des comparaisons de voies de signalisation canoniques (canonical pathway) ([article n°1](#)). Cette méthodologie consiste à focaliser directement sur les mécanismes de réponse cellulaire liés à l'exposition à une substance. Un mode de calcul spécifique consistant à quantifier le taux

d'implication d'une voie en réponse à une exposition a permis d'effectuer des études comparatives de données massives. Cette méthode (dite « pathway driven »), se distingue des méthodes consistant à comparer des listes gène à gène ou protéine à protéine (dite « molecule driven ») qui ne donne généralement pas de résultats satisfaisants. Cette approche nous a conduit à établir trois niveaux d'effets en fonction des doses, regroupant des ensembles de voies de signalisation canoniques et des mécanismes de toxicité spécifiques à ces NPs A200. Ces niveaux correspondent ainsi au déclenchement de la réponse cellulaire adaptée, qui est fortement dépendante de la dose appliquée et amplifiée dans le temps. La profondeur de champ de l'analyse permet également de naviguer des gènes aux grandes fonctions cellulaires et peut être un outil prédictif robuste et indispensable dans l'étude des effets de substances toxiques et des NPs. La même méthodologie a été appliquée aux M-MSNs sur un modèle hépatique innovant (HepaRG) mais avec des puces humaines de nouvelle génération (8x60k, Agilent) c.-à-d. comportant 8 génomes de 60 000 sondes chacun sur le support.

Dans cette même étude préliminaire, l'utilisation de la spectrométrie de masse s'est avérée délicate lors de l'analyse des sécrétomes de cellules, simplement parce que les protéines du SVF (sérum de veau fœtal) contenu dans les milieux de cultures pouvaient masquer certaines protéines humaines sécrétées en faibles quantités. Néanmoins lors de la première étude, les protéines détectées comme sécrétées ont pu être associées avec les résultats transcriptomiques dans une étude intégrative permettant d'appuyer les voies de signalisation identifiées dans la réponse cellulaire aux NPs.

Le premier objectif de la thèse était d'appliquer ces techniques et méthodologies aux M-MSNs natives, recouvertes de PEG ou d'une bicouche DMPC. Cependant, une optimisation du protocole de synthèse des NPs fut nécessaire car les échantillons de M-MSNs contenaient environ 30% de particules résiduelles de silice sans cœur magnétique et de particules à plusieurs cœurs. Ces NPs étant à visée médicale, elles devaient satisfaire à des critères de qualité élevés définis en début de projet. Ainsi cette optimisation a permis d'obtenir 95% de M-MSNs stables comportant un cœur de Fe_3O_4 unique par particule. L'innocuité de ces dernières s'est avérée meilleure envers les cellules hépatiques HepG2 ([article n°2](#)).

La toxicité des M-MSNs diversement décorées a donc été analysée de manière approfondie ([article n°3](#)). Les études de viabilité ont été réalisées avec un test MTT et par mesure de l'impédance cellulaire en temps réel. L'internalisation cellulaire des NPs a été observée par TEM et les réponses cellulaires ont été étudiées par puces d'expression génique avec la méthodologie « pathway driven ». Les NPs natives et fonctionnalisées ne déclenchent pas de toxicité à la dose de 1.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et induisent une légère toxicité parfaitement réversible à la dose de 16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Ce qui nous permet de définir cette dernière valeur comme un seuil de biocompatibilité avec les cellules HepaRG. La différence majeure entre les trois types de M-MSNs est le ralentissement de l'internalisation et un décalage temporel des effets transcriptomiques lorsque les M-MSNs sont recouvertes de PEG. Néanmoins, nous avons montré qu'une dose de 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) déclenche l'enchaînement des événements de l'AOP (Adverse Outcome Pathway) de la cholestase hépatique, et ce pour les trois types de M-MSNs.

Le deuxième objectif concernait le sujet des interactions NPs/protéines sériques par l'influence de la corona sur le devenir cellulaire des NPs. La corona formée autour des M-MSNs natives influence la réponse cellulaire, les différences entre une corona humaine et une corona bovine produisant des effets significativement distincts ([article n°4](#)). La compréhension de la corona est un axe primordial de recherche, mais soulève également des questions dans le domaine de la toxicologie *in vitro* et *in vivo*. Les résultats obtenus en impédance cellulaire posent la problématique d'une potentielle surestimation de la toxicité des NPs lors d'essais *in vitro* dans les milieux classiquement utilisés contenant du sérum de veau. Nous pensons que dans le cas d'évaluation toxicologiques *in vitro*, l'incubation des NPs dans un milieu biologique plus proche de la composition des fluides rencontrés sur la route d'exposition des NPs doit être une voie à explorer.

De plus, comprendre la corona c'est la possibilité de pouvoir la prédire, voire de la contrôler. Nous avons donc étudié la formation chronologique de la corona autour des M-MSNs, par utilisation de la spectrométrie de masse en tandem ([article n°5](#)). Nous avons ainsi pu mettre en évidence l'implication importante des interactions protéines-protéines dans la formation de la corona à travers la représentation de l'interactome de protéines. L'interactome laisse présager des perspectives novatrices dans l'élaboration de nanovecteurs furtifs biocompatibles. Nous avons enfin mis en évidence de manière simple que le protocole

expérimental affecte les résultats de la composition de la corona et que la centrifugation redistribue quantitativement les protéines. C'est une des raisons possibles de la difficulté de compréhension de sa formation ([article n°6](#)).

Par ailleurs, nous avons pu observer que le modèle HepaRG est plus résistant que les cellules HepG2 vis-à-vis des NPs, probablement parce que l'ensemble de ses fonctions hépatiques sont activées mais aussi en raison d'une structure organotypique plus évoluée, en particulier la formation de canalicules biliaires. Cela laisse présager que d'autres modèles, comme les modèles cellulaires 3D, plus proches de l'*in vivo*, pourraient être plus résistants vis-à-vis des NPs. Ces modèles 3D ont un potentiel important pour la toxicologie de demain. Même si une dose élevée de M-MSNs, natives ou fonctionnalisées, provoque *in vitro* une perturbation des fonctions hépatiques (AOP de la cholestase hépatique), et que l'accumulation hépatique soit avérée pour les M-MSNs, il est certain que les fonctions de l'organisme dans sa totalité font défaut *in vitro* (flux sanguin, système immunitaire, clairance hépatique et rénale par exemple).

Une perspective à court terme est l'analyse par spectrométrie de masse des corona humaines et bovines autour de M-MSNs recouvertes de PEG ou de DMPC. Nous avons récemment effectué avec succès des essais dont les données protéomiques viennent d'être acquises.

Une autre perspective, plus large, pourrait être la mise en relation entre la toxicité des M-MSNs et la composition de la corona. Il existe vraisemblablement un lien entre les protéines contenues autour des NPs et les récepteurs membranaires des cellules, influençant fortement leur devenir cellulaire. Etablir un lien entre des données analytiques protéomiques décrivant la corona et des données transcriptomiques rendant compte de la réponse cellulaire, pourrait être un axe novateur dans la compréhension de la corona.

Enfin, l'analyse protéomique des sécrétomes cellulaires est un autre axe possible pour compléter l'étude transcriptomique et réaliser une étude intégrative globale des effets. Néanmoins comme observé dans l'étude préliminaire, le SVF présent dans les cultures cellulaires, indispensable au bon fonctionnement des cellules durant la phase de culture, est un obstacle important à l'analyse protéomique. Auparavant, la mise au point de milieux de culture plus adaptés à l'étude des NPs est également indispensable.

Par ailleurs, les données protéomiques ont pu être étudiées rapidement à travers les différents outils d'analyses que j'ai développés en langage R (R-project) durant la thèse. Cette boîte à outils permet notamment l'analyse des séquences protéiques, le calcul des NSAF (%) et bien d'autres traitements, à travers une interface graphique.

Dans le contexte du projet, les techniques utilisées, en particulier l'impédance cellulaire en temps réel, les puces d'expression génique et la spectrométrie de masse, pourraient faire partie de futurs standards d'évaluation de la sécurité biologique des nanovecteurs. La précision d'acquisition des données des techniques omics et la robustesse statistique apportée par les données massives recueillies correspondent aux prérequis nécessaires à l'élaboration de ces standards. Les méthodologies d'analyses associées peuvent répondre aux besoins de compréhension des mécanismes réactionnels pour la toxicologie prédictive de demain.

Annexes

Liste des publications scientifiques parues et soumises dans des revues internationales à comité de lecture

- High-throughput, quantitative assessment of the effects of low-dose silica nanoparticles on lung cells: grasping complex toxicity with a great depth of field.
[C Pisani](#), JC Gaillard, V Nouvel, M Odorico, J Armengaud, O Prat. **BMC Genomics**. 2015 Apr 18;16 :315. DOI: 10.1186/s12864-015-1521-5.
- Synthesis, decoration, and cellular effects of magnetic mesoporous silica nanoparticles.
JL Nyalosaso, E Rascol, [C Pisani](#), C Dorandeu, X Dumail, M Maynadier, M Gary-Bobo, J Laikeehim, P Bron, M Garcia, JM Devoisselle, O Prat, Y Guari, C Charnay, J Chopineau. **RSC Advances**. 2016, 6, 57275-57283. DOI:10.2039/C6RA09017F.
- The timeline of corona formation around silica nanocarriers highlights the role of the protein interactome.
[C Pisani](#), JC Gaillard, M Odorico, JL Nyalosaso, C Charnay, Y Guari, J Chopineau, JM Devoisselle, J Armengaud, O Prat. **Nanoscale**. 2017, 9, 1840-1851. DOI: 10.1039/C6NR04765C.
- Experimental separation steps influence the protein content of corona around mesoporous silica nanoparticles.
[C Pisani](#), JC Gaillard, C Dorandeu, C Charnay, Y Guari, J Chopineau, JM Devoisselle, J Armengaud, O Prat. **Nanoscale**. 2017. DOI : 10.1039/C7NR01654A.
- The species origin of the serum in the culture medium influences the in vitro toxicity of silica nanoparticles to HepG2 cells.
[C Pisani](#), E Rascol, C Dorandeu, JC Gaillard, C Charnay, Y Guari, J Chopineau, J Armengaud, JM Devoisselle, O Prat. **PlosOne**. 2017, 12(8):e0182906.
- Biocompatibility assessment of fonctionnalized magnetic mesoporous silica nanocarriers in hepatic human HepaRG cells.
[C Pisani](#), E Rascol, C Dorandeu, C Charnay, Y Guari, J Chopineau, JM Devoisselle, O Prat. **Nanotoxicology**. 2017, DOI :10.1080/17435390.2017.1378749.

Liste des formations

- **Auto entrepreneur** (3 heures) – Collège doctoral Languedoc-Roussillon.
- **Les ONG, Associations, Comment les aborder ?** (3 heures) – Collège doctoral Languedoc-Roussillon
- **Anglais cadre professionnel** (25 heures) – GoFluent SAS
- **Gestion de l'information scientifique et technique** (18 heures) – CNAM Bagnols-sur-Cèze
- **Bien commencer avec R** (16 heures) – Collège doctoral Languedoc-Roussillon

Communication orale en congrès international

- **Fifth NANOSAFE International Conference 2016 – Health and safety issues related to nanomaterials.** 7-10 November, 2016. Grenoble. France. Titre: Corona Interactome: A key for deciphering protein adsorption on silica nanocarriers.

Présentation Poster en congrès international avec parution dans un journal international

EUROTOX 2015 (Porto, Portugal)

- High-throughput, quantitative assessment of the effects of low-dose silica nanoparticles on lung cells: Grasping complex toxicity with a great depth of field. **C Pisani**, JC Gaillard, V Nouvel, M Odorico, J Armengaud, O Prat. Toxicology Letters 238(2) 16Oct2015 pS229. DOI : 10.1016/j.toxlet.2015.08.678

EUROTOX 2016 (Seville, Espagne)

- Corona interactome: A key for deciphering protein adsorption kinetics on silica nanocarriers surface. **C Pisani**, JC Gaillard, M Odorico, JL Nyalosaso, C Charnay, Y Guari, J Chopineau, JM Devoisselle, J Armengaud, O Prat. Toxicology letters 258(1) 16Sept2016 pS281. DOI: 10.1016/j.toxlet.2016.06.1980

Présentation Poster dans un congrès international

- **ICONAN – International Conference on Nanomedicine and Nanobiotechnology – 2016.** Corona interactome: A key for deciphering protein adsorption kinetics on silica nanocarriers surface

Publication scientifique parue hors thématique de thèse

Dans cette publication issue de mon travail précédent en tant qu'ingénieur de recherche, nous avons étudié la toxicité de substances chimiques phytopharmaceutiques sur un modèle *ex-vivo* de la spermatogénèse. Bien qu'elle soit hors du champ de cette thèse, la finalisation de ce travail qui a eu lieu pendant ma thèse m'a permis d'affiner la méthode d'étude des données massiques provenant des techniques omics, dit « pathway driven ».

Ex vivo assessment of testicular toxicity induced by Carbendazim and Iprodione, Alone or in a Mixture.

[C Pisani](#), S Voisin, K Arafah, P Durand, MH Perrard, MR Guichaoua, P Bulet, O Prat. ALTEX. 2016;33(4):393-413. doi: 10.14573/altex.1601253.

Références

Abed N, Couvreur P (2014) Nanocarriers for antibiotics: A promising solution to treat intracellular bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* 43: 485-496

Aebersold R, Bader GD, Edwards AM, van Eyk JE, Kussmann M, Qin J, Omenn GS (2013) The Biology/Disease-driven Human Proteome Project (B/D-HPP): Enabling Protein Research for the Life Sciences Community. *Journal of proteome research* 12: 23-27

Aebersold R, Mann M (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422: 198-207

Akiyama Y, Mori T, Katayama Y, Niidome T (2009) The effects of PEG grafting level and injection dose on gold nanorod biodistribution in the tumor-bearing mice. *Journal of Controlled Release* 139: 81-84

Alexander JW (2009) History of the Medical Use of Silver. *Surgical Infections* 10: 289-292

Alibolandi M, Mohammadi M, Taghdisi SM, Ramezani M, Abnous K (2017) Fabrication of aptamer decorated dextran coated nano-graphene oxide for targeted drug delivery. *Carbohydrate Polymers* 155: 218-229

Allémann E, Gurny R, Doelker E, Skinner FS, Schütz H (1994) Distribution, kinetics and elimination of radioactivity after intravenous and intramuscular injection of ¹⁴C-savoxepine loaded poly(D,L-lactic acid) nanospheres to rats. *Journal of Controlled Release* 29: 97-104

Allen TM (2002) Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2: 750-763

Ames BN, Gold LS (2000) Paracelsus to parascience: the environmental cancer distraction. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 447: 3-13

Antherieu S, Chesne C, Li R, Camus S, Lahoz A, Picazo L, Turpeinen M, Tolonen A, Uusitalo J, Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A (2009) Stable Expression, Activity And Inductibility of Cytochromes P450 in Differentiated HepaRG Cells. *Drug Metabolism and Disposition*

Anthérieu S, Garat A, Beauval N, Soyez M, Allorge D, Garçon G, Lo-Guidice J-M (2017) Comparison of cellular and transcriptomic effects between electronic cigarette vapor and cigarette smoke in human bronchial epithelial cells. *Toxicology in Vitro*

Atienza JM, Zhu J, Wang X, Xu X, Abassi Y (2005) Dynamic Monitoring of Cell Adhesion and Spreading on Microelectronic Sensor Arrays. *Journal of Biomolecular Screening* 10: 795-805

Baeza A, Guisasola E, Ruiz-Hernández E, Vallet-Regí M (2012) Magnetically Triggered Multidrug Release by Hybrid Mesoporous Silica Nanoparticles. *Chemistry of Materials* 24: 517-524

Bajak E, Fabbri M, Ponti J, Gioria S, Ojea-Jiménez I, Collotta A, Mariani V, Gilliland D, Rossi F, Gribaldo L (2015) Changes in Caco-2 cells transcriptome profiles upon exposure to gold nanoparticles. *Toxicology Letters* 233: 187-199

Barenholz Y (2012) Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *Journal of Controlled Release* 160: 117-134

Barraud L, Merle P, Soma E, Lefrançois L, Guerret S, Chevallier M, Dubernet C, Couvreur P, Trépo C, Vitvitski L (2005) Increase of doxorubicin sensitivity by doxorubicin-loading into nanoparticles for hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *Journal of Hepatology* 42: 736-743

Barrow M, Taylor A, Murray P, Rosseinsky MJ, Adams DJ (2015) Design considerations for the synthesis of polymer coated iron oxide nanoparticles for stem cell labelling and tracking using MRI. *Chemical Society reviews* 44: 6733-6748

Bazile DV, Ropert C, Huve P, Verrecchia T, Mariard M, Frydman A, Veillard M, Spenlehauer G (1992) Body distribution of fully biodegradable [14C]-poly(lactic acid) nanoparticles coated with albumin after parenteral administration to rats. *Biomaterials* 13: 1093-1102

Beduneau A, Ma Z, Grotepas CB, Kabanov A, Rabinow BE, Gong N, Mosley RL, Dou H, Boska MD, Gendelman HE (2009) Facilitated Monocyte-Macrophage Uptake and Tissue Distribution of Superparamagnetic Iron-Oxide Nanoparticles. *PLOS ONE* 4: e4343

Biswas N (2017) Modified mesoporous silica nanoparticles for enhancing oral bioavailability and antihypertensive activity of poorly water soluble valsartan. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 99: 152-160

Boissenot T, Bordat A, Fattal E, Tsapis N (2016) Ultrasound-triggered drug delivery for cancer treatment using drug delivery systems: From theoretical considerations to practical applications. *Journal of Controlled Release* 241: 144-163

Borm PJA, Kreyling W (2004) Toxicological Hazards of Inhaled Nanoparticles; Potential Implications for Drug Delivery. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 4: 521-531

Briley-Saebo K, Bjørnerud A, Grant D, Ahlstrom H, Berg T, Kindberg GM (2004) Hepatic cellular distribution and degradation of iron oxide nanoparticles following single intravenous injection in rats: implications for magnetic resonance imaging. *Cell and Tissue Research* 316: 315-323

Browne P, Judson RS, Casey WM, Kleinstreuer NC, Thomas RS (2015) Screening Chemicals for Estrogen Receptor Bioactivity Using a Computational Model. *Environmental Science & Technology* 49: 8804-8814

Burns AA, Vider J, Ow H, Herz E, Penate-Medina O, Baumgart M, Larson SM, Wiesner U, Bradbury M (2009) Fluorescent Silica Nanoparticles with Efficient Urinary Excretion for Nanomedicine. *Nano Letters* 9: 442-448

Busquet F, Palopoli M, Hartung T (2014) Regulatory Toxicology: Progress in Law. In *Science and the Law: Analytical Data in Support of Regulation in Health, Food, and the Environment*, pp 51-69. American Chemical Society

Caltagirone C, Bettoschi A, Garau A, Montis R (2015) Silica-based nanoparticles: a versatile tool for the development of efficient imaging agents. *Chemical Society reviews* 44: 4645-4671

Casals E, Pfaller T, Duschl A, Oostingh GJ, Puntès V (2010) Time Evolution of the Nanoparticle Protein Corona. *ACS Nano* 4: 3623-3632

Cedervall T, Lynch I, Lindman S, Berggård T, Thulin E, Nilsson H, Dawson KA, Linse S (2007) Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 2050-2055

Chan WCW (2017) Nanomedicine 2.0. *Accounts of Chemical Research* 50: 627-632

- Chang B, Sha X, Guo J, Jiao Y, Wang C, Yang W (2011) Thermo and pH dual responsive, polymer shell coated, magnetic mesoporous silica nanoparticles for controlled drug release. *Journal of Materials Chemistry* 21: 9239-9247
- Chen X, Sun H, Hu J, Han X, Liu H, Hu Y (2017) Transferrin gated mesoporous silica nanoparticles for redox-responsive and targeted drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 152: 77-84
- Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Sung J, Luther G, Gu FX, Levy-Nissenbaum E, Radovic-Moreno AF, Langer R, Farokhzad OC (2007) Formulation of functionalized PLGA–PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials* 28: 869-876
- Cheung VG, Morley M, Aguilar F, Massimi A, Kucherlapati R, Childs G (1999) Making and reading microarrays. *Nat Genet* 21: 15-9
- Chiannilkulchai N, Driouch Z, Benoit JP, Parodi AL, Couvreur P (1989) Doxorubicin-Loaded Nanoparticles: Increased Efficiency in Murine Hepatic Metastases. *Selective Cancer Therapeutics* 5: 1-11
- Cho K, Wang X, Kim G, Gjyzezi A, Giannakakou P, Nie S, Chen Z, Shin D (2007) Investigation of taxol-resistance using folate-targeted ternary therapeutic nanoparticle. *Cancer Research* 67: 2311-2311
- Cho K, Wang X, Nie S, Chen Z, Shin DM (2008) Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. *Clinical Cancer Research* 14: 1310-1316
- Cho M, Cho W-S, Choi M, Kim SJ, Han BS, Kim SH, Kim HO, Sheen YY, Jeong J (2009) The impact of size on tissue distribution and elimination by single intravenous injection of silica nanoparticles. *Toxicology Letters* 189: 177-183
- Cottrell JS, London U (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20: 3551-3567
- Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Pr  at V (2012) PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release* 161: 505-522
- Dave SR, Gao X (2009) Monodisperse magnetic nanoparticles for biodetection, imaging, and drug delivery: a versatile and evolving technology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 1: 583-609
- Derksen JTP, Morselt HWM, Kalicharan D, Hulstaert CE, Scherphof GL (1987) Interaction of immunoglobulin-coupled liposomes with rat liver macrophages in vitro. *Experimental Cell Research* 168: 105-115
- des Rieux A, Fievez V, Garinot M, Schneider Y-J, Pr  at V (2006) Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *Journal of Controlled Release* 116: 1-27
- Djouina M, Esquerre N, Desreumaux P, Vignal C, Body-Malapel M (2016) Toxicological consequences of experimental exposure to aluminum in human intestinal epithelial cells. *Food and Chemical Toxicology* 91: 108-116
- Durfee PN, Lin Y-S, Dunphy DR, Mu  iz AJ, Butler KS, Humphrey KR, Lokke AJ, Agola JO, Chou SS, Chen IM, Wharton W, Townson JL, Willman CL, Brinker CJ (2016) Mesoporous Silica Nanoparticle-

Supported Lipid Bilayers (Protocells) for Active Targeting and Delivery to Individual Leukemia Cells. *ACS Nano* 10: 8325-8345

Dykman LA, Khlebtsov NG (2011) Gold Nanoparticles in Biology and Medicine: Recent Advances and Prospects. *Acta Naturae* 3: 34-55

Ehmann F, Sakai-Kato K, Duncan R, Pérez de la Ossa DH, Pita R, Vidal J-M, Kohli A, Tothfalusi L, Sanh A, Tinton S, Robert J-L, Silva Lima B, Amati MP (2013) Next-generation nanomedicines and nanosimilars: EU regulators' initiatives relating to the development and evaluation of nanomedicines. *Nanomedicine* 8: 849-856

Elder A, Gelein R, Silva V, Feikert T, Opanashuk L, Carter J, Potter R, Maynard A, Ito Y, Finkelstein J, Oberd, xf, rster G, xfc, nter (2006) Translocation of Inhaled Ultrafine Manganese Oxide Particles to the Central Nervous System. *Environmental Health Perspectives* 114: 1172-1178

Elzoghby AO, Samy WM, Elgindy NA (2012) Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* 157: 168-182

Estelrich J, Escribano E, Queralto J, Busquets M (2015) Iron Oxide Nanoparticles for Magnetically-Guided and Magnetically-Responsive Drug Delivery. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 8070

Evans WE, Relling MV (1999) Pharmacogenomics: Translating Functional Genomics into Rational Therapeutics. *Science* 286: 487-491

Fang J, Nakamura H, Maeda H (2011) The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63: 136-151

Fang J, Sawa T, Maeda H (2003) Factors and Mechanism of "EPR" Effect and the Enhanced Antitumor Effects of Macromolecular Drugs Including SMANCS. In *Polymer Drugs in the Clinical Stage: Advantages and Prospects*, Maeda H, Kabanov A, Kataoka K, Okano T (eds) pp 29-49. Boston, MA: Springer US

Farokhzad OC, Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Jon S, Kantoff PW, Richie JP, Langer R (2006) Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 6315-6320

Farokhzad OC, Jon S, Khademhosseini A, Tran T-NT, LaVan DA, Langer R (2004) Nanoparticle-Aptamer Bioconjugates. A New Approach for Targeting Prostate Cancer Cells 64: 7668-7672

Fleischer CC, Payne CK (2014) Secondary Structure of Corona Proteins Determines the Cell Surface Receptors Used by Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B* 118: 14017-14026

Foundation ES (2005) Nanomedicine: An ESF-European Medical Research Councils (EMRC) Forward Look report. ESF,

Freestone I, Meeks N, Sax M, Higgitt C (2007) The Lycurgus Cup — A Roman nanotechnology. *Gold Bulletin* 40: 270-277

Fretland AJ, Omiecinski CJ (2000) Epoxide hydrolases: biochemistry and molecular biology. *Chemico-Biological Interactions* 129: 41-59

Fu C, Liu T, Li L, Liu H, Chen D, Tang F (2013) The absorption, distribution, excretion and toxicity of mesoporous silica nanoparticles in mice following different exposure routes. *Biomaterials* 34: 2565-2575

Furumoto K, Ogawara K-i, Yoshida M, Takakura Y, Hashida M, Higaki K, Kimura T (2001) Biliary excretion of polystyrene microspheres depends on the type of receptor-mediated uptake in rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1526: 221-226

Gamage N, Barnett A, Hempel N, Duggleby RG, Windmill KF, Martin JL, McManus ME (2006) Human Sulfotransferases and Their Role in Chemical Metabolism. *Toxicological Sciences* 90: 5-22

Gentile F, Ferrari M, Decuzzi P (2008) The Transport of Nanoparticles in Blood Vessels: The Effect of Vessel Permeability and Blood Rheology. *Annals of Biomedical Engineering* 36: 254-261

Gerets HHJ, Hanon E, Cornet M, Dhalluin S, Depelchin O, Canning M, Atienzar FA (2009) Selection of cytotoxicity markers for the screening of new chemical entities in a pharmaceutical context: A preliminary study using a multiplexing approach. *Toxicology in Vitro* 23: 319-332

Gerets HHJ, Tilmant K, Gerin B, Chanteux H, Depelchin BO, Dhalluin S, Atienzar FA (2012) Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biology and Toxicology* 28: 69-87

Goren D, Horowitz AT, Tzemach D, Tarshish M, Zalipsky S, Gabizon A (2000) Nuclear Delivery of Doxorubicin via Folate-targeted Liposomes with Bypass of Multidrug-resistance Efflux Pump. *Clinical Cancer Research* 6: 1949-1957

Gottmann E, Kramer S, Pfahringer B, Helma C (2001) Data quality in predictive toxicology: reproducibility of rodent carcinogenicity experiments. *Environmental Health Perspectives* 109: 509-514

Graham T (1861) Liquid Diffusion Applied to Analysis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 151: 183-224

Gref R, Domb A, Quellec P, Blunk T, Müller RH, Verbavatz JM, Langer R (1995) The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Advanced Drug Delivery Reviews* 16: 215-233

Gref R, Lück M, Quellec P, Marchand M, Dellacherie E, Harnisch S, Blunk T, Müller RH (2000) 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 18: 301-313

Gref R, Minamitake Y, Peracchia M, Trubetskoy V, Torchilin V, Langer R (1994) Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* 263: 1600-1603

Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaize D, Canine I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C, Guguen-Guillouzo C (2002) Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 15655-60

Grzincic EM, Yang JA, Drnevich J, Falagan-Lotsch P, Murphy CJ (2015) Global transcriptomic analysis of model human cell lines exposed to surface-modified gold nanoparticles: the effect of surface chemistry. *Nanoscale* 7: 1349-1362

Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, Glaise D, Morel F, Guguen-Guillouzo C (2007) The human hepatoma HepaRG cells: A highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chemico-Biological Interactions* 168: 66-73

Hagens WI, Oomen AG, de Jong WH, Cassee FR, Sips AJAM (2007) What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 49: 217-229

Hamad I, Al-Hanbali O, Hunter AC, Rutt KJ, Andresen TL, Moghimi SM (2010) Distinct Polymer Architecture Mediates Switching of Complement Activation Pathways at the Nanosphere–Serum Interface: Implications for Stealth Nanoparticle Engineering. *ACS Nano* 4: 6629-6638

Hardman JG, Limbird L (2001) Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th. In USA: McGraw-Hill Companies, Inc

Hartung T (2009) Toxicology for the twenty-first century. *Nature* 460: 208-12

Hartung T (2010) Food for thought... on alternative methods for nanoparticle safety testing. *Altex* 27: 87-95

Hartung T (2017a) Evolution of toxicological science: the need for change. *International Journal of Risk Assessment and Management* 20: 21-45

Hartung T (2017b) Opinion versus evidence for the need to move away from animal testing. *Altex* 34: 193-200

Hartung T (2017c) Utility of the adverse outcome pathway concept in drug development. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 13: 1-3

He X, Nie H, Wang K, Tan W, Wu X, Zhang P (2008) In Vivo Study of Biodistribution and Urinary Excretion of Surface-Modified Silica Nanoparticles. *Analytical Chemistry* 80: 9597-9603

Hicke BJ, Stephens AW, Gould T, Chang YF, Lynott CK, Heil J, Borkowski S, Hilger CS, Cook G, Warren S, Schmidt PG (2006) Tumor targeting by an aptamer. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 47: 668-78

Hobson DW (2016) Nanotoxicology. *International Journal of Toxicology* 35: 3-4

Huang X, Brazel CS (2001) On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* 73: 121-136

Huang X, El-Sayed IH, Qian W, El-Sayed MA (2006) Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. *Journal of the American Chemical Society* 128: 2115-2120

Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA (2007) Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers in Medical Science* 23: 217

- Irfan A, Cauchi M, Edmands W, Gooderham NJ, Njuguna J, Zhu H (2014) Assessment of Temporal Dose-Toxicity Relationship of Fumed Silica Nanoparticle in Human Lung A549 Cells by Conventional Cytotoxicity and ¹H-NMR-Based Extracellular Metabonomic Assays. *Toxicological Sciences* 138: 354-364
- Ishida T, Kiwada H (2008) Accelerated blood clearance (ABC) phenomenon upon repeated injection of PEGylated liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 354: 56-62
- Ivens IA, Achanzar W, Baumann A, Brändli-Baiocco A, Cavagnaro J, Dempster M, Depelchin BO, Irizarry Rovira AR, Dill-Morton L, Lane JH, Reipert BM, Salcedo T, Schweighardt B, Tsuruda LS, Turecek PL, Sims J (2015) PEGylated Biopharmaceuticals. *Toxicologic Pathology* 43: 959-983
- Iyer AK, Khaled G, Fang J, Maeda H (2006) Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discovery Today* 11: 812-818
- Jain A, Jain SK (2008) In vitro and cell uptake studies for targeting of ligand anchored nanoparticles for colon tumors. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 35: 404-416
- Jain PK, Huang X, El-Sayed IH, El-Sayed MA (2008) Noble Metals on the Nanoscale: Optical and Photothermal Properties and Some Applications in Imaging, Sensing, Biology, and Medicine. *Accounts of Chemical Research* 41: 1578-1586
- Jain RA (2000) The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 21: 2475-2490
- Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E (2010) Phase II Drug Metabolizing Enzymes. *Biomedical papers* 154: 103-116
- Jin Z, Lv Y, Cao H, Yao J, Zhou J, He W, Yin L (2016) Core-shell nanocarriers with high paclitaxel loading for passive and active targeting. *Scientific reports* 6: 27559
- Kagan VE, Bayir H, Shvedova AA (2005) Nanomedicine and nanotoxicology: two sides of the same coin. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 1: 313-316
- Kandasamy G, Maity D (2015) Recent advances in superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) for in vitro and in vivo cancer nanotheranostics. *International Journal of Pharmaceutics* 496: 191-218
- Khanna SC, Jecklin T, Speiser P (1970) Bead polymerization technique for sustained-release dosage form. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 59: 614-618
- Khanna SC, Speiser P (1969) Epoxy resin beads as a pharmaceutical dosage form I: Method of preparation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 58: 1114-1117
- Kim HR, Andrieux K, Delomenie C, Chacun H, Appel M, Desmaële D, Taran F, Georgin D, Couvreur P, Taverna M (2007) Analysis of plasma protein adsorption onto PEGylated nanoparticles by complementary methods: 2-DE, CE and Protein Lab-on-chip® system. *Electrophoresis* 28: 2252-2261
- Kim J, Kim HS, Lee N, Kim T, Kim H, Yu T, Song IC, Moon WK, Hyeon T (2008) Multifunctional Uniform Nanoparticles Composed of a Magnetite Nanocrystal Core and a Mesoporous Silica Shell for Magnetic Resonance and Fluorescence Imaging and for Drug Delivery. *Angewandte Chemie International Edition* 47: 8438-8441

Kim J, Lee JE, Lee J, Yu JH, Kim BC, An K, Hwang Y, Shin C-H, Park J-G, Kim J, Hyeon T (2006) Magnetic Fluorescent Delivery Vehicle Using Uniform Mesoporous Silica Spheres Embedded with Monodisperse Magnetic and Semiconductor Nanocrystals. *Journal of the American Chemical Society* 128: 688-689

Kim JA, Salvati A, Aberg C, Dawson KA (2014) Suppression of nanoparticle cytotoxicity approaching in vivo serum concentrations: limitations of in vitro testing for nanosafety. *Nanoscale* 6: 14180-14184

Kim R-O, Choi JS, Kim B-C, Kim W-K (2017) Comparative Analysis of Transcriptional Profile Changes in Larval Zebrafish Exposed to Zinc Oxide Nanoparticles and Zinc Sulfate. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 98: 183-189

Kim T, Momin E, Choi J, Yuan K, Zaidi H, Kim J, Park M, Lee N, McMahon MT, Quinones-Hinojosa A, Bulte JWM, Hyeon T, Gilad AA (2011) Mesoporous Silica-Coated Hollow Manganese Oxide Nanoparticles as Positive T1 Contrast Agents for Labeling and MRI Tracking of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Journal of the American Chemical Society* 133: 2955-2961

Klibanov AL, Maruyama K, Beckerleg AM, Torchilin VP, Huang L (1991) Activity of amphipathic poly(ethylene glycol) 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and is unfavorable for immunoliposome binding to target. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1062: 142-148

Knezevic NZ, Ruiz-Hernandez E, Hennink WE, Vallet-Regi M (2013) Magnetic mesoporous silica-based core/shell nanoparticles for biomedical applications. *RSC Advances* 3: 9584-9593

Knop K, Hoogenboom R, Fischer D, Schubert US (2010) Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *Angewandte Chemie International Edition* 49: 6288-6308

Kodama RH (1999) Magnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 200: 359-372

Kohane DS, Langer R (2010) Biocompatibility and drug delivery systems. *Chemical Science* 1: 441-446

Kreuter J (2007) Nanoparticles—a historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics* 331: 1-10

Kreuter J, Täuber U, Illi V (1979) Distribution and elimination of poly(methyl-2-¹⁴C-methacrylate) nanoparticle radioactivity after injection in rats and mice. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 68: 1443-1447

Krishnan KM, Pakhomov AB, Bao Y, Blomqvist P, Chun Y, Gonzales M, Griffin K, Ji X, Roberts BK (2006) Nanomagnetism and spin electronics: materials, microstructure and novel properties. *Journal of Materials Science* 41: 793-815

Krukemeyer M, Krenn V, Huebner F, Wagner W, Resch R (2015) History and Possible Uses of Nanomedicine Based on Nanoparticles and Nanotechnological Progress. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology* 6: 1

Kunzmann A, Andersson B, Thurnherr T, Krug H, Scheynius A, Fadeel B (2011) Toxicology of engineered nanomaterials: focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochim Biophys Acta* 1810: 361-73

Laakso T, Artursson P, Sjöholm I (1986) Biodegradable microspheres IV: Factors affecting the distribution and degradation of polyacryl starch microparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 75: 962-967

Labouta HI, Schneider M (2013) Interaction of inorganic nanoparticles with the skin barrier: current status and critical review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 9: 39-54

Lai SK, Wang Y-Y, Hanes J (2009) Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61: 158-171

Lambert CB, Spire C, Claude N, Guillouzo A (2009) Dose- and time-dependent effects of phenobarbital on gene expression profiling in human hepatoma HepaRG cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 234: 345-360

Lammers T, Kiessling F, Hennink WE, Storm G (2012) Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *Journal of Controlled Release* 161: 175-187

Lamprecht A, Schäfer U, Lehr C-M (2001) Size-Dependent Bioadhesion of Micro- and Nanoparticulate Carriers to the Inflamed Colonic Mucosa. *Pharmaceutical Research* 18: 788-793

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921

Larese Filon F, Mauro M, Adami G, Bovenzi M, Crosera M (2015) Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 72: 310-322

Le Ray AM, Vert M, Gautier JC, Benoît JP (1994) Fate of [14C]poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles after intravenous and oral administration to mice. *International Journal of Pharmaceutics* 106: 201-211

Leamon CP, Reddy JA (2004) Folate-targeted chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56: 1127-1141

Lee HA, Leavens TL, Mason SE, Monteiro-Riviere NA, Riviere JE (2009) Comparison of Quantum Dot Biodistribution with a Blood-Flow-Limited Physiologically Based Pharmacokinetic Model. *Nano Letters* 9: 794-799

Lee HJ, Yeo SY, Jeong SH (2003) Antibacterial effect of nanosized silver colloidal solution on textile fabrics. *Journal of Materials Science* 38: 2199-2204

Leist M, Hasiwa N, Rovida C, Daneshian M, Basketter D, Kimber I, Clewell H, Gocht T, Goldberg A, Busquet F (2014) Consensus report on the future of animal-free systemic toxicity testing.

Lesniak A, Fenaroli F, Monopoli MP, Åberg C, Dawson KA, Salvati A (2012) Effects of the Presence or Absence of a Protein Corona on Silica Nanoparticle Uptake and Impact on Cells. *ACS Nano* 6: 5845-5857

Lesniak A, Salvati A, Santos-Martinez MJ, Radomski MW, Dawson KA, Åberg C (2013) Nanoparticle Adhesion to the Cell Membrane and Its Effect on Nanoparticle Uptake Efficiency. *Journal of the American Chemical Society* 135: 1438-1444

- Li M, Al-Jamal KT, Kostarelos K, Reineke J (2010) Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Nanoparticles. *ACS Nano* 4: 6303-6317
- Li Z, Barnes JC, Bosoy A, Stoddart JF, Zink JI (2012) Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications. *Chemical Society reviews* 41: 2590-2605
- Liang H-F, Chen C-T, Chen S-C, Kulkarni AR, Chiu Y-L, Chen M-C, Sung H-W (2006) Paclitaxel-loaded poly(γ -glutamic acid)-poly(lactide) nanoparticles as a targeted drug delivery system for the treatment of liver cancer. *Biomaterials* 27: 2051-2059
- Liu J, Detrembleur C, De Pauw-Gillet M-C, Mornet S, Elst LV, Laurent S, Jerome C, Duguet E (2014) Heat-triggered drug release systems based on mesoporous silica nanoparticles filled with a maghemite core and phase-change molecules as gatekeepers. *Journal of Materials Chemistry B* 2: 59-70
- Liu J, Wei T, Zhao J, Huang Y, Deng H, Kumar A, Wang C, Liang Z, Ma X, Liang X-J (2016) Multifunctional aptamer-based nanoparticles for targeted drug delivery to circumvent cancer resistance. *Biomaterials* 91: 44-56
- Liu J, Xu J, Zhou J, Zhang Y, Guo D, Wang Z (2017a) Fe₃O₄-based PLGA nanoparticles as MR contrast agents for the detection of thrombosis. *International journal of nanomedicine* 12: 1113-1126
- Liu T, Li L, Teng X, Huang X, Liu H, Chen D, Ren J, He J, Tang F (2011a) Single and repeated dose toxicity of mesoporous hollow silica nanoparticles in intravenously exposed mice. *Biomaterials* 32: 1657-68
- Liu W, Worms IAM, Herlin-Boime N, Truffier-Boutry D, Michaud-Soret I, Mintz E, Vidaud C, Rollin-Genetet F (2017b) Interaction of silver nanoparticles with metallothionein and ceruloplasmin: impact on metal substitution by Ag(i), corona formation and enzymatic activity. *Nanoscale* 9: 6581-6594
- Liu Y, Chen Z, Liu C, Yu D, Lu Z, Zhang N (2011b) Gadolinium-loaded polymeric nanoparticles modified with Anti-VEGF as multifunctional MRI contrast agents for the diagnosis of liver cancer. *Biomaterials* 32: 5167-5176
- Liu Z, Tang S, Xu Z, Wang Y, Zhu X, Li L-c, Hong W, Wang X (2015) Preparation and in vitro evaluation of a multifunctional iron silicate@ liposome nanohybrid for pH-sensitive doxorubicin delivery and photoacoustic imaging. *Journal of Nanomaterials* 16: 44
- Longmire M, Choyke PL, Kobayashi H (2008) Clearance Properties of Nano-sized Particles and Molecules as Imaging Agents: Considerations and Caveats. *Nanomedicine (London, England)* 3: 703-717
- Lu J, Liong M, Li Z, Zink JI, Tamanoi F (2010) Biocompatibility, Biodistribution, and Drug-Delivery Efficiency of Mesoporous Silica Nanoparticles for Cancer Therapy in Animals. *Small* 6: 1794-1805
- Luechtefeld T, Maertens A, Russo DP, Rovida C, Zhu H, Hartung T (2016a) Analysis of Draize eye irritation testing and its prediction by mining publicly available 2008-2014 REACH data. *Alternatives to Animal Experimentation: ALTEX* 33: 123-134

Luechtefeld T, Maertens A, Russo DP, Rovida C, Zhu H, Hartung T (2016b) Analysis of publically available skin sensitization data from REACH registrations 2008-2014. *Alternatives to Animal Experimentation: ALTEX* 33: 135-148

Lundberg BB, Griffiths G, Hansen HJ (2004) Cellular association and cytotoxicity of anti-CD74-targeted lipid drug-carriers in B lymphoma cells. *Journal of Controlled Release* 94: 155-161

Lundqvist M, Stigler J, Cedervall T, Berggård T, Flanagan MB, Lynch I, Elia G, Dawson K (2011) The Evolution of the Protein Corona around Nanoparticles: A Test Study. *ACS Nano* 5: 7503-7509

Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA (2008) Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 14265-14270

Lunov O, Syrovets T, Loos C, Beil J, Delacher M, Tron K, Nienhaus GU, Musyanovych A, Mailänder V, Landfester K, Simmet T (2011) Differential Uptake of Functionalized Polystyrene Nanoparticles by Human Macrophages and a Monocytic Cell Line. *ACS Nano* 5: 1657-1669

MacDonald JS, Robertson RT (2009) Toxicity testing in the 21st century: a view from the pharmaceutical industry. *Toxicological sciences* 110: 40-46

Maeda H (2001) The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Advances in Enzyme Regulation* 41: 189-207

Maeda H, Bharate GY, Daruwalla J (2009) Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 71: 409-419

Maincent P, Thouvenot P, Amicabile C, Hoffman M, Kreuter J, Couvreur P, Devissaguet JP (1992) Lymphatic Targeting of Polymeric Nanoparticles After Intraperitoneal Administration in Rats. *Pharmaceutical Research* 9: 1534-1539

Malam Y, Loizidou M, Seifalian AM (2009) Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends in Pharmacological Sciences* 30: 592-599

Mamaeva V, Sahlgren C, Lindén M (2013) Mesoporous silica nanoparticles in medicine—Recent advances. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65: 689-702

Marie H, Lemaire L, Franconi F, Lajnef S, Frapart Y-M, Nicolas V, Frébourg G, Trichet M, Ménager C, Lesieur S (2015) Superparamagnetic Liposomes for MRI Monitoring and External Magnetic Field-Induced Selective Targeting of Malignant Brain Tumors. *Advanced Functional Materials* 25: 1258-1269

Martín-Saavedra FM, Ruíz-Hernández E, Boré A, Arcos D, Vallet-Regí M, Vilaboa N (2010) Magnetic mesoporous silica spheres for hyperthermia therapy. *Acta Biomaterialia* 6: 4522-4531

Martina M-S, Fortin J-P, Fournier L, Ménager C, Gazeau F, Clément O, Lesieur S (2007) Magnetic Targeting of Rhodamine-Labeled Superparamagnetic Liposomes to Solid Tumors: In Vivo Tracking by Fibered Confocal Fluorescence Microscopy. *Molecular Imaging* 6: 7290.2007.00004

Mathe C, Devineau S, Aude JC, Lagniel G, Chedin S, Legros V, Mathon MH, Renault JP, Pin S, Boulard Y, Labarre J (2013) Structural determinants for protein adsorption/non-adsorption to silica surface. *PLoS One* 8: e81346

Matsumura Y, Maeda H (1986) A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Research* 46: 6387-6392

Maynard AD, Aitken RJ, Butz T, Colvin V, Donaldson K, Oberdorster G, Philbert MA, Ryan J, Seaton A, Stone V, Tinkle SS, Tran L, Walker NJ, Warheit DB (2006) Safe handling of nanotechnology. *Nature* 444: 267-269

McDonald RJ, McDonald JS, Kallmes DF, Jentoft ME, Murray DL, Thielen KR, Williamson EE, Eckel LJ (2015) Intracranial Gadolinium Deposition after Contrast-enhanced MR Imaging. *Radiology* 275: 772-782

McQuillan JS, Shaw AM (2014) Differential gene regulation in the Ag nanoparticle and Ag⁺-induced silver stress response in *Escherichia coli*: A full transcriptomic profile. *Nanotoxicology* 8: 177-184

Meng H, Xia T, George S, Nel AE (2009) A Predictive Toxicological Paradigm for the Safety Assessment of Nanomaterials. *ACS Nano* 3: 1620-1627

Miller MB, Tang Y-W (2009) Basic Concepts of Microarrays and Potential Applications in Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 22: 611-633

Mirshafiee V, Kim R, Park S, Mahmoudi M, Kraft ML (2016) Impact of protein pre-coating on the protein corona composition and nanoparticle cellular uptake. *Biomaterials* 75: 295-304

Mirshafiee V, Mahmoudi M, Lou K, Cheng J, Kraft ML (2013) Protein corona significantly reduces active targeting yield. *Chemical communications* 49: 2557-2559

Moghimi SM (2003) Modulation of lymphatic distribution of subcutaneously injected poloxamer 407-coated nanospheres: the effect of the ethylene oxide chain configuration. *FEBS Letters* 540: 241-244

Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC (2001) Long-Circulating and Target-Specific Nanoparticles: Theory to Practice. *Pharmacological Reviews* 53: 283-318

Monopoli MP, Aberg C, Salvati A, Dawson KA (2012) Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat Nano* 7: 779-786

Monopoli MP, Walczyk D, Campbell A, Elia G, Lynch I, Bombelli FB, Dawson KA (2011) Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles. *J Am Chem Soc* 133: 2525-34

Mosafer J, Abnous K, Tafaghodi M, Jafarzadeh H, Ramezani M (2017) Preparation and characterization of uniform-sized PLGA nanospheres encapsulated with oleic acid-coated magnetic-Fe₃O₄ nanoparticles for simultaneous diagnostic and therapeutic applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 514: 146-154

Mu Q, Zhai S, Yan B (2010) Real-time monitoring of cellular responses to carbon nanotubes. *Methods Mol Biol* 625: 85-94

Mura S, Nicolas J, Couvreur P (2013) Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nature materials* 12: 991-1003

Nag M, Gajbhiye V, Kesharwani P, Jain NK (2016) Transferrin functionalized chitosan-PEG nanoparticles for targeted delivery of paclitaxel to cancer cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 148: 363-370

Napierska D, Thomassen LC, Lison D, Martens JA, Hoet PH (2010) The nanosilica hazard: another variable entity. *Particle and Fibre Toxicology* 7: 39

Nel AE, Madler L, Velegol D, Xia T, Hoek EMV, Somasundaran P, Klaessig F, Castranova V, Thompson M (2009) Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature materials* 8: 543-557

Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, Maltais LJ, Wain HM, Nebert DW (2004) Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics and Genomics* 14: 1-18

Nelson LJ, Morgan K, Treskes P, Samuel K, Henderson CJ, LeBled C, Homer N, Grant MH, Hayes PC, Plevris JN (2017) Human Hepatic HepaRG Cells Maintain an Organotypic Phenotype with High Intrinsic CYP450 Activity/Metabolism and Significantly Outperform Standard HepG2/C3A Cells for Pharmaceutical and Therapeutic Applications. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 120: 30-37

Nishioka Y, Yoshino H (2001) Lymphatic targeting with nanoparticulate system. *Advanced Drug Delivery Reviews* 47: 55-64

Nyström AM, Fadeel B (2012) Safety assessment of nanomaterials: Implications for nanomedicine. *Journal of Controlled Release* 161: 403-408

Oberdörster G (2010) Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *Journal of Internal Medicine* 267: 89-105

Oberdörster G, Stone V, Donaldson K (2007) Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicology* 1: 2-25

Oberdörster Günter OE, Oberdörster Jan (2005) Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environmental Health Perspectives* 113: 823-839

Orts-Gil G, Natte K, Drescher D, Bresch H, Manton A, Kneipp J, Österle W (2011) Characterisation of silica nanoparticles prior to in vitro studies: from primary particles to agglomerates. *Journal of Nanoparticle Research* 13: 1593-1604

Owens Iii DE, Peppas NA (2006) Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 307: 93-102

Paik Y-K, Jeong S-K, Omenn GS, Uhlen M, Hanash S, Cho SY, Lee H-J, Na K, Choi E-Y, Yan F, Zhang F, Zhang Y, Snyder M, Cheng Y, Chen R, Marko-Varga G, Deutsch EW, Kim H, Kwon J-Y, Aebersold R *et al.* (2012) The Chromosome-Centric Human Proteome Project for cataloging proteins encoded in the genome. *Nat Biotech* 30: 221-223

Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R (2007) Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nano* 2: 751-760

- Peracchia MT, Harnisch S, Pinto-Alphandary H, Gulik A, Dedieu JC, Desmaële D, d'Angelo J, Müller RH, Couvreur P (1999) Visualization of in vitro protein-rejecting properties of PEGylated stealth® polycyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials* 20: 1269-1275
- Perrault SD, Walkey C, Jennings T, Fischer HC, Chan WCW (2009) Mediating Tumor Targeting Efficiency of Nanoparticles Through Design. *Nano Letters* 9: 1909-1915
- Perry JL, Reuter KG, Kai MP, Herlihy KP, Jones SW, Luft JC, Napier M, Bear JE, DeSimone JM (2012) PEGylated PRINT Nanoparticles: The Impact of PEG Density on Protein Binding, Macrophage Association, Biodistribution, and Pharmacokinetics. *Nano Letters* 12: 5304-5310
- Pisani C, Gaillard JC, Nouvel V, Odorico M, Armengaud J, Prat O (2015) High-throughput, quantitative assessment of the effects of low-dose silica nanoparticles on lung cells: Grasping complex toxicity with a great depth of field. *Toxicology Letters* 238: S229
- Powell MF, Newman MJ, Burdman JR (1995) Vaccine design: the subunit and adjuvant approach [].
- Pozzi D, Colapicchioni V, Caracciolo G, Piovesana S, Capriotti AL, Palchetti S, De Grossi S, Riccioli A, Amenitsch H, Lagana A (2014) Effect of polyethyleneglycol (PEG) chain length on the bio-nano-interactions between PEGylated lipid nanoparticles and biological fluids: from nanostructure to uptake in cancer cells. *Nanoscale* 6: 2782-2792
- Pradhan P, Banerjee R, Bahadur D, Koch C, Mykhaylyk O, Plank C (2017) Targeted Magnetic Liposomes Loaded with Doxorubicin. In *Liposomes: Methods and Protocols*, D'Souza GGM (ed) pp 257-272. New York, NY: Springer New York
- Puddu V, Perry CC (2012) Peptide adsorption on silica nanoparticles: evidence of hydrophobic interactions. *ACS Nano* 6: 6356-63
- Qiu Y, Liu Y, Wang L, Xu L, Bai R, Ji Y, Wu X, Zhao Y, Li Y, Chen C (2010) Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. *Biomaterials* 31: 7606-7619
- R. Nogueira-Librelotto D, F. Codevilla C, Farooqi A, M. B. Rolim C (2017) Transferrin-Conjugated Nanocarriers as Active-Targeted Drug Delivery Platforms for Cancer Therapy. *Current Pharmaceutical Design* 23: 454-466
- Ramezanli T, Zhang Z, Michniak-Kohn BB (2017) Development and characterization of polymeric nanoparticle-based formulation of adapalene for topical acne therapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 13: 143-152
- Raymond SHY, Chang LW, Jui-Pin W, Ming-Hsien T, Hsiu-Jen W, Yu-Chun K, Teng-Kuang Y, Chung Shi Y, Pinpin L (2007) Persistent Tissue Kinetics and Redistribution of Nanoparticles, Quantum Dot 705, in Mice: ICP-MS Quantitative Assessment. *Environmental Health Perspectives* 115: 1339-1343
- Reibold M, Pätzke N, Levin AA, Kochmann W, Shakhverdova IP, Paufler P, Meyer DC (2009) Structure of several historic blades at nanoscale. *Crystal Research and Technology* 44: 1139-1146
- Reuzel PGJ, Bruijntjes JP, Feron VJ, Woutersen RA (1991) Subchronic inhalation toxicity of amorphous silicas and quartz dust in rats. *Food and Chemical Toxicology* 29: 341-354

Riley RS, Day ES (2017) Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: applications and opportunities for multimodal cancer treatment. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology: n/a-n/a

Rojas JM, Gavilán H, del Dedo V, Lorente-Sorolla E, Sanz-Ortega L, da Silva GB, Costo R, Perez-Yagüe S, Talelli M, Marciello M, Morales MP, Barber DF, Gutiérrez L (2017) Time-course assessment of the aggregation and metabolization of magnetic nanoparticles. *Acta Biomaterialia*

Ross JF, Chaudhuri PK, Ratnam M (1994) Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues in vivo and in established cell lines. Physiologic and clinical implications. *Cancer* 73: 2432-43

Rothen-Rutishauser BM, Schürch S, Haenni B, Kapp N, Gehr P (2006) Interaction of Fine Particles and Nanoparticles with Red Blood Cells Visualized with Advanced Microscopic Techniques. *Environmental Science & Technology* 40: 4353-4359

Ruiz-Hernández E, Baeza A, Vallet-Regí M (2011) Smart Drug Delivery through DNA/Magnetic Nanoparticle Gates. *ACS Nano* 5: 1259-1266

Rushmore TH, Tony Kong A (2002) Pharmacogenomics, Regulation and Signaling Pathways of Phase I and II Drug Metabolizing Enzymes. *Current Drug Metabolism* 3: 481-490

Russell WMS, Burch RL (1959) *The Principles of Humane Experimental Technique*. . Methuen & Co., Ltd., London, U.K.

saba n, Wang X, Tighiouart M, Muller S, Cho K, Chen Z, Yang L, Khuri F, Nie S, Shin D (2007) Examining expression of folate receptors in squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) as a target for a novel nanotherapeutic drug. *Cancer Research* 67: LB-174-LB-174

Sakulkhu U, Mahmoudi M, Maurizi L, Salaklang J, Hofmann H (2014) Protein corona composition of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with various physico-chemical properties and coatings. *Scientific reports* 4: 5020

Sassa S, Sugita O, Galbraith RA, Kappas A (1987) Drug metabolism by the human hepatoma cell, Hep G2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 143: 52-57

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-70

Schütz CA, Juillerat-Jeanneret L, Mueller H, Lynch I, Riediker M (2013) Therapeutic nanoparticles in clinics and under clinical evaluation. *Nanomedicine* 8: 449-467

Seki T, Fang J, Maeda H (2009) Tumor-Targeted Macromolecular Drug Delivery Based on the Enhanced Permeability and Retention Effect in Solid Tumor. In *Pharmaceutical Perspectives of Cancer Therapeutics*, Lu Y, Mahato RI (eds) pp 93-120. New York, NY: Springer US

Semete B, Booysen L, Lemmer Y, Kalombo L, Katata L, Verschoor J, Swai HS (2010) In vivo evaluation of the biodistribution and safety of PLGA nanoparticles as drug delivery systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 6: 662-671

Serda RE, Gu J, Bhavane RC, Liu X, Chiappini C, Decuzzi P, Ferrari M (2009) The association of silicon microparticles with endothelial cells in drug delivery to the vasculature. *Biomaterials* 30: 2440-2448

Shah SA, Aslam Khan MU, Arshad M, Awan SU, Hashmi MU, Ahmad N (2016) Doxorubicin-loaded photosensitive magnetic liposomes for multi-modal cancer therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 148: 157-164

Shalon D, Smith SJ, Brown PO (1996) A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res* 6: 639-45

Shim W, Paik MJ, Nguyen DT, Lee JK, Lee Y, Kim JH, Shin EH, Kang JS, Jung HS, Choi S, Park S, Shim JS, Lee G (2012) Analysis of changes in gene expression and metabolic profiles induced by silica-coated magnetic nanoparticles. *ACS Nano* 6: 7665-80

Shubayev VI, Pisanic II TR, Jin S (2009) Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61: 467-477

Singh N, Karambelkar A, Gu L, Lin K, Miller JS, Chen CS, Sailor MJ, Bhatia SN (2011) Bioresponsive Mesoporous Silica Nanoparticles for Triggered Drug Release. *Journal of the American Chemical Society* 133: 19582-19585

Singh R, Norret M, House MJ, Galabura Y, Bradshaw M, Ho D, Woodward RC, Pierre TGS, Luzinov I, Smith NM, Lim LY, Iyer KS (2016) Dose-Dependent Therapeutic Distinction between Active and Passive Targeting Revealed Using Transferrin-Coated PGMA Nanoparticles. *Small* 12: 351-359

Singhal SS, Singh SP, Singhal P, Horne D, Singhal J, Awasthi S (2015) Antioxidant role of glutathione S-transferases: 4-Hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling. *Toxicology and Applied Pharmacology* 289: 361-370

Sivakumar B, Aswathy RG, Romero-Aburto R, Mitcham T, Mitchel KA, Nagaoka Y, Bouchard RR, Ajayan PM, Maekawa T, Sakthikumar DN (2017) Highly versatile SPION encapsulated PLGA nanoparticles as photothermal ablaters of cancer cells and as multimodal imaging agents. *Biomaterials Science* 5: 432-443

Slanina H, König A, Claus H, Frosch M, Schubert-Unkmeir A (2011) Real-time impedance analysis of host cell response to meningococcal infection. *Journal of Microbiological Methods* 84: 101-108

Soo Choi H, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Itty Ipe B, Bawendi MG, Frangioni JV (2007) Renal clearance of quantum dots. *Nat Biotech* 25: 1165-1170

Steen H, Mann M (2004) The abc's (and xyz's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 699-711

Stella B, Arpicco S, Rocco F, Marsaud V, Renoir J-M, Cattel L, Couvreur P (2007) Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanoacrylate nanospheres and nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics* 344: 71-77

Stolwijk JA, Matrougui K, Renken CW, Trebak M (2015) Impedance analysis of GPCR-mediated changes in endothelial barrier function: overview and fundamental considerations for stable and reproducible measurements. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 467: 2193-2218

Stone V, Nowack B, Baun A, van den Brink N, von der Kammer F, Dusinska M, Handy R, Hankin S, Hassellöv M, Joner E, Fernandes TF (2010) Nanomaterials for environmental studies: Classification,

reference material issues, and strategies for physico-chemical characterisation. *Science of The Total Environment* 408: 1745-1754

Strebhardt K, Ullrich A (2008) Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat Rev Cancer* 8: 473-480

Stubbs M, McSheehy PMJ, Griffiths JR, Bashford CL (2000) Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Molecular Medicine Today* 6: 15-19

Szleifer I (1997) Protein Adsorption on Surfaces with Grafted Polymers. *Biophysical Journal* 72: 595-612

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007) Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131: 861-872

Teeguarden JG, Hinderliter PM, Orr G, Thrall BD, Pounds JG (2007) Particokinetics in vitro: dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments. *Toxicological Sciences* 95: 300-312

Tenzer S, Docter D, Kuharev J, Musyanovych A, Fetz V, Hecht R, Schlenk F, Fischer D, Kiouptsi K, Reinhardt C, Landfester K, Schild H, Maskos M, Knauer SK, Stauber RH (2013) Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat Nano* 8: 772-781

Tenzer S, Docter D, Rosfa S, Wlodarski A, Kuharev J, Rekik A, Knauer SK, Bantz C, Nawroth T, Bier C, Sirirattanapan J, Mann W, Treuel L, Zellner R, Maskos M, Schild H, Stauber RH (2011) Nanoparticle size is a critical physicochemical determinant of the human blood plasma corona: a comprehensive quantitative proteomic analysis. *ACS Nano* 5: 7155-67

Thomassen LCJ, Aerts A, Rabolli V, Lison D, Gonzalez L, Kirsch-Volders M, Napierska D, Hoet PH, Kirschhock CEA, Martens JA (2010) Synthesis and Characterization of Stable Monodisperse Silica Nanoparticle Sols for in Vitro Cytotoxicity Testing. *Langmuir* 26: 328-335

Tsoi KM, MacParland SA, Ma X-Z, Spetzler VN, Echeverri J, Ouyang B, Fadel SM, Sykes EA, Goldaracena N, Kathis JM, Conneely JB, Alman BA, Selzner M, Ostrowski MA, Adeyi OA, Zilman A, McGilvray ID, Chan WCW (2016) Mechanism of hard-nanomaterial clearance by the liver. *Nature materials* 15: 1212-1221

Tukey RH, Strassburg CP (2000) Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annual review of pharmacology and toxicology* 40: 581-616

Unsworth LD, Sheardown H, Brash JL (2008) Protein-Resistant Poly(ethylene oxide)-Grafted Surfaces: Chain Density-Dependent Multiple Mechanisms of Action. *Langmuir* 24: 1924-1929

Uz M, Bulmus V, Alsoy Altinkaya S (2016) Effect of PEG Grafting Density and Hydrodynamic Volume on Gold Nanoparticle–Cell Interactions: An Investigation on Cell Cycle, Apoptosis, and DNA Damage. *Langmuir*

van Bladeren PJ (2000) Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chemico-Biological Interactions* 129: 61-76

Van Pham P, Nguyen NT, Nguyen HM, Khuat LT, Le PM, Pham VQ, Nguyen ST, Phan NK (2014) A simple in vitro method for evaluating dendritic cell-based vaccinations. *OncoTargets & Therapy* 7

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M *et al.* (2001) The Sequence of the Human Genome. *Science* 291: 1304-1351

Videira MA, Botelho MF, Santos AC, Gouveia LF, Pedroso de Lima JJ, Almeida AJ (2002) Lymphatic Uptake of Pulmonary Delivered Radiolabelled Solid Lipid Nanoparticles. *Journal of Drug Targeting* 10: 607-613

Vinken M (2013) The adverse outcome pathway concept: A pragmatic tool in toxicology. *Toxicology* 312: 158-165

Vinken M, Landesmann B, Goumenou M, Vinken S, Shah I, Jaeschke H, Willett C, Whelan M, Rogiers V (2013) Development of an Adverse Outcome Pathway From Drug-Mediated Bile Salt Export Pump Inhibition to Cholestatic Liver Injury. *Toxicological Sciences* 136: 97-106

Wahajuddin, Arora S (2012) Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. *International journal of nanomedicine* 7: 3445-3471

Walczyk D, Bombelli FB, Monopoli MP, Lynch I, Dawson KA (2010) What the Cell “Sees” in Bionanoscience. *Journal of the American Chemical Society* 132: 5761-5768

Walkey CD, Chan WC (2012) Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chemical Society reviews* 41: 2780-99

Wang Y, Gu H (2015) Core–Shell-Type Magnetic Mesoporous Silica Nanocomposites for Bioimaging and Therapeutic Agent Delivery. *Advanced Materials* 27: 576-585

Wang Y, Zhao Q, Han N, Bai L, Li J, Liu J, Che E, Hu L, Zhang Q, Jiang T, Wang S (2015) Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 11: 313-327

Waters MD, Fostel JM (2004) Toxicogenomics and systems toxicology: aims and prospects. *Nat Rev Genet* 5: 936-948

Westerink WMA, Schoonen WGEJ (2007) Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicology in Vitro* 21: 1592-1602

Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, Rau B, Gellermann J, Riess H, Felix R, Schlag PM (2002) Hyperthermia in combined treatment of cancer. *The Lancet Oncology* 3: 487-497

Xi B, Wang T, Li N, Ouyang W, Zhang W, Wu J, Xu X, Wang X, Abassi YA (2011) Functional Cardiotoxicity Profiling and Screening Using the xCELLigence RTCA Cardio System. *JALA: Journal of the Association for Laboratory Automation* 16: 415-421

Xi Z, Khare S, Cheung A, Huang B, Pan T, Zhang W, Ibrahim F, Jin C, Gabos S (2014) Mode of action classification of chemicals using multi-concentration time-dependent cellular response profiles. *Computational Biology and Chemistry* 49: 23-35

Xie X, Li F, Zhang H, Lu Y, Lian S, Lin H, Gao Y, Jia L (2016) EpCAM aptamer-functionalized mesoporous silica nanoparticles for efficient colon cancer cell-targeted drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 83: 28-35

Xu JJ, Diaz D, O'Brien PJ (2004) Applications of cytotoxicity assays and pre-lethal mechanistic assays for assessment of human hepatotoxicity potential. *Chemico-Biological Interactions* 150: 115-128

Yang H, Chen Y, Chen Z, Geng Y, Xie X, Shen X, Li T, Li S, Wu C, Liu Y (2017) Chemo-photodynamic combined gene therapy and dual-modal cancer imaging achieved by pH-responsive alginate/chitosan multilayer-modified magnetic mesoporous silica nanocomposites. *Biomaterials Science* 5: 1001-1013

Yang H, Zhuang Y, Sun Y, Dai A, Shi X, Wu D, Li F, Hu H, Yang S (2011) Targeted dual-contrast T1- and T2-weighted magnetic resonance imaging of tumors using multifunctional gadolinium-labeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* 32: 4584-4593

Yang L, Cui F, Cun D, Tao A, Shi K, Lin W (2007) Preparation, characterization and biodistribution of the lactone form of 10-hydroxycamptothecin (HCPT)-loaded bovine serum albumin (BSA) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 340: 163-172

Yang W, Peters JI, Williams RO (2008) Inhaled nanoparticles—A current review. *International Journal of Pharmaceutics* 356: 239-247

Yim YS, Choi J-s, Jang SB, Kim GT, Park K, Kim CH, Cheon J, Kim DG (2009) Pharmacokinetic properties and tissue storage of FITC conjugated SA-MnMEIO nanoparticles in mice. *Current Applied Physics* 9: e304-e307

Zanger UM, Schwab M (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics* 138: 103-141

Zhang J, Li X, Rosenholm JM, Gu H-c (2011) Synthesis and characterization of pore size-tunable magnetic mesoporous silica nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science* 361: 16-24

Zhang J, Sun W, Bergman L, Rosenholm JM, Lindén M, Wu G, Xu H, Gu H-c (2012) Magnetic mesoporous silica nanospheres as DNA/drug carrier. *Materials Letters* 67: 379-382

Zhang L, Gao H, Chen L, Wu B, Zheng Y, Liao R, Jiang Y, He F (2008) Tumor targeting of vincristine by mBAFF-modified PEG liposomes in B lymphoma cells. *Cancer Letters* 269: 26-36

Zhao X, Chen Q, Liu W, Li Y, Tang H, Liu X, Yang X (2015) Codelivery of doxorubicin and curcumin with lipid nanoparticles results in improved efficacy of chemotherapy in liver cancer. *International journal of nanomedicine* 10: 257-70

Zhu Y, Li W, Li Q, Li Y, Li Y, Zhang X, Huang Q (2009) Effects of serum proteins on intracellular uptake and cytotoxicity of carbon nanoparticles. *Carbon* 47: 1351-1358

Zhu Z-J, Posati T, Moyano DF, Tang R, Yan B, Vachet RW, Rotello VM (2012) The Interplay of Monolayer Structure and Serum Protein Interactions on the Cellular Uptake of Gold Nanoparticles. *Small* 8: 2659-2663

Abstract

Toxicogenomic study of mesoporous silica nanocarriers: relationship between decoration and toxicity

Nanoparticles (NPs) capable of transporting and releasing therapeutic agents to target tissues constitute one of the most exciting areas in nanomedicine, especially magnetic mesoporous silica nanoparticles (M-MSN). M-MSNs may be addressed to tumors thanks to their magnetism and can act as drug carriers thanks to their high specific surface area. Nevertheless, the safety of these NPs with decorations, conferring them specific properties, must be assessed in order to avoid harmful effects on healthy tissues, in particular on the liver, the organ of xenobiotics metabolism.

The goal of this thesis was therefore to evaluate the potential toxicity of M-MSN either pristine, or coated with polyethylene glycol (PEG), or surrounded by a lipid bilayer of 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-Phosphocholine (DMPC). To this end, the human hepatic cell model HepaRG was chosen to realize *in vitro* toxicity testing and to elucidate the intracellular mode of action of these various NPs.

The physico-chemical properties of pristine and covered M-MSNs were measured using different techniques such as dynamic light scattering (DLS), transmission electron microscopy (TEM) and atomic force microscopy (AFM). NPs toxicity was first evaluated by viability testing and real-time cell impedance analysis (xCELLigence).

Gene expression profiles were then performed through very high density oligo microarrays (8x60k, Agilent) to evaluate, in a dose- and time-dependent manner, the toxicity of these NPs. In addition, the use of an original methodology for comparative analysis of large biological data allowed us to demonstrate the molecular mechanisms triggered by the NPs in the hepatocytes. We were able to determine the dose not triggering any toxicity as well as the dose inducing a slight transient toxicity after 24h. We thus defined this latter value as a threshold of biocompatibility with HepaRG cells. We also showed by TEM a slower uptake of PEGylated NPs by cells as well as their delayed effects on the transcriptome compared to the pristine and DMPC NPs. Nevertheless, a dose of 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of pristine or covered M-MSNs triggers the chain of events of the hepatic cholestasis AOP (Adverse Outcome Pathway). This result demonstrates that this methodology is suitable for predictive toxicology by analysis of cellular biological responses after exposure to exogenous substances.

Furthermore, NPs tend to be covered with proteins in the presence of serum (corona). Cell impedance analysis shows that M-MSNs surrounded by human or bovine serum proteins coronas do not trigger the same toxicity on human cells. This result raises the problem of a potential overestimation of NPs toxicity to human cells in *in vitro* testing by using fetal bovine serum in culture media.

We undertook a dynamic analysis (between 30 s and 7 days) of the corona formation by tandem mass spectrometry has highlighted three groups of protein with distinct behaviors. The first cluster contains some abundant proteins that desorb over time, the second cluster comprises some protein families such as apolipoproteins, and the third cluster contains late enrichment proteins attracted by other proteins already present in the corona. A dynamic network of protein-protein interactions inside the corona, namely the interactome, was built from the data. This work opens the way to a possible control of the corona in order to provide the nanocarriers with stealth properties allowing them to reach target organs without being opsonized.

These techniques used during this thesis and based on analyses of biological big data might be part of the future standards on nanosafety evaluation.

Résumé

Etude toxicogénomique de nanovecteurs de silice mésoporeuse : relation entre décoration et toxicité

Les nanoparticules (NPs) concentrent beaucoup d'espoir en nanomédecine, en particulier les nanoparticules magnétiques de silice mésoporeuse (M-MSN) qui pourraient permettre des avancées en théranostique. Néanmoins l'innocuité de ces NPs recouvertes de décorations leur conférant des propriétés spécifiques, doit être démontrée afin d'éviter des effets néfastes sur les tissus sains, notamment sur le foie, l'organe de transformation des xénobiotiques.

L'objectif de cette thèse était donc d'évaluer la toxicité potentielle de M-MSN soit natives, soit recouvertes de polyéthylène glycol (PEG), soit entourées d'une bicouche lipidique de 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC). Pour ce faire un modèle de cellules humaines hépatiques (HepaRG) a été choisi pour effectuer des tests de toxicité *in vitro* et pour élucider le mode d'action intracellulaire de ces différentes NPs.

Les caractéristiques physico-chimiques des M-MSNs natives et décorées ont été mesurées par différentes techniques comme la diffusion dynamique de la lumière (DLS), la microscopie électronique à transmission (TEM) et la microscopie à force atomique (AFM). La toxicité des NPs a été évaluée tout d'abord par des tests de viabilité et par impédance cellulaire en temps réel (xCELLigence).

L'étude des profils d'expression génique sur des oligo microarrays à très haute densité (8x60k sondes, Agilent) a ensuite permis d'évaluer, de façon dose- et temps-dépendante, la toxicité de ces NPs. De plus l'utilisation d'une méthodologie originale d'analyse comparative de données massives nous a permis de mettre en évidence les mécanismes moléculaires déclenchés par les NPs dans les hépatocytes. Nous avons déterminé des doses n'induisant aucune toxicité ou une légère toxicité transitoire après 24h, soit une valeur seuil de biocompatibilité avec les cellules HepaRG. Nous avons également montré par TEM le ralentissement de l'internalisation des NPs lorsqu'elles sont PEGylées ainsi que leurs effets transcriptomiques différés par rapport aux NPs natives et lipidiques. Néanmoins, une dose de 80 µg/cm² de M-MSNs, natives ou décorées, déclenche l'enchaînement des événements de l'AOP (Adverse Outcome Pathway) de la cholestase hépatique. Ce résultat démontre que cette méthodologie est adaptée à la toxicologie prédictive par analyse des réponses biologiques cellulaires après exposition à des substances exogènes.

Par ailleurs, les NPs ont tendance à se recouvrir de protéines (corona) en présence de sérum humain. L'analyse par impédance cellulaire montre que des M-MSNs entourées d'une corona de protéines sériques humaines ou bovines ne provoquent pas la même toxicité sur des cellules humaines. Ce résultat pose la problématique d'une potentielle surestimation de la toxicité des nanoparticules lors d'essais *in vitro*, utilisant classiquement du sérum de veau dans les milieux de cultures.

Nous avons entrepris l'étude de la dynamique de la corona (entre 30s et 7 jours) par spectrométrie de masse en tandem. Cette analyse a mis en lumière trois types de comportements protéiques. Le premier cluster contient des protéines abondantes qui se désorbent au cours du temps, le second cluster est composé de protéines qui s'enrichissent progressivement et issues de mêmes familles protéiques comme les apolipoprotéines, et le troisième cluster contient des protéines à enrichissement tardif dans la corona, attirées par leur affinité pour des protéines déjà présentes. Un réseau dynamique d'interactions protéines-protéines, ou interactome, a pu être cartographié au sein de la corona.

Ces travaux posent les bases d'un possible contrôle des protéines de la corona afin de conférer aux nanovecteurs des propriétés de furtivité leur permettant d'atteindre des organes cibles sans être opsonisés. Les techniques utilisées au cours de ce travail, basées sur les analyses de quantités massives de données biologiques, pourraient faire partie de futurs standards d'évaluation de la nanosécurité.