



HAL
open science

Etude des réponses des macrophages aux nanoparticules d'oxydes métalliques par une combinaison d'approches protéomiques et ciblées

Bastien Dalzon

► To cite this version:

Bastien Dalzon. Etude des réponses des macrophages aux nanoparticules d'oxydes métalliques par une combinaison d'approches protéomiques et ciblées. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAV013 . tel-02906871

HAL Id: tel-02906871

<https://theses.hal.science/tel-02906871>

Submitted on 26 Jul 2020

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 DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biotechnologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Bastien DALZON

Thèse dirigée par **Catherine AUDE-GARCIA**, chercheur, CEA et
codirigée par **Thierry RABILLOUD**, DR1, CNRS

Préparée au sein du **Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux**
dans l'**École Doctorale de Chimie et Sciences du vivant**

Etude des réponses des macrophages aux nanoparticules d'oxydes métalliques par une combinaison d'approches protéomiques et ciblées

Thèse soutenue publiquement le **25 juin 2018**,
devant le jury composé de :

Dr. Catherine LADAVIERE

DR CNRS, CNRS Lyon, Rapporteur

Dr. Thierry ORSIERE

IR, Université Aix-Marseille, Rapporteur

Dr. Françoise GABERT

MC, Université Grenoble-Alpes, Membre

Dr. Bernard VERRIER

DRCE1 CNRS, CNRS Lyon, Président du jury

Dr. Catherine AUDE-GARCIA

Chercheur, CEA Grenoble, Directrice de thèse

Dr. Thierry RABILLOUD

DR1 CNRS, CNRS Grenoble, Directeur de thèse



A mes parents, *Michel Dalzon* et *Gabrielle Duc*

A Maxime Petit

Remerciements,

Je tiens à remercier tout particulièrement les deux personnes remarquables que sont mes directeurs de thèse *Catherine Aude-Garcia* et *Thierry Rabilloud*. Je ne peux qu'admirer ce qu'ils sont, tant pour leur savoir et leur gentillesse que leur passion. Ces quelques lignes ne permettront malheureusement pas de dire toute la gratitude que j'ai pour eux. Il y a tant de choses à dire alors que nous ne nous connaissons que depuis ces trois années de thèse. Leur investissement humain et leur préoccupation pour mon avenir professionnel m'ont également beaucoup touché.

Je remercie aussi l'ensemble de l'équipe ProMD pour sa sympathie. Il n'y a que des personnes aux caractères variés et bien trempés qu'on ne peut que souhaiter connaître. Merci à *Elisabeth Chartier-Garcia*, *Isabelle Testard*, *Véronique Collin-Faure*, *Cécile Lelong*, *Sylvie Luche*, *Serge Gandéias*, *Elise Eymard-Vernain* et *Anaëlle Torres*. Une pensée toute particulière à *Elise* (qui a obtenu sa thèse l'année dernière) pour les petits moments de confidences qu'on ne peut avoir qu'entre thésards. Un petit clin d'œil à *Anaëlle*, encore étudiante en Master 2 qui, du fait de son sérieux et de son talent en recherche, sera une doctorante extraordinaire ... j'en suis convaincu.

Un grand merci à *Stéphane Ménage*, directeur du laboratoire LCBM pour avoir accepté ma candidature de thèse et m'avoir accueilli dans son laboratoire. Merci d'avoir été sensible à mon avenir post-thèse.

Je ne peux oublier les différentes collaborations (la plateforme Optimal et les personnes de l'ESRF) sans qui le projet n'aurait sans doute ni existé, ni abouti. Merci aux personnes que j'ai le plus côtoyé : *Solveig Raymond*, *Mélanie Guidetti* et *Véronique Jossierand*.

Un grand merci à mes anciens maîtres de stages d'EPHE en sciences de la vie et de BTS Biotechnologies *Bernard Verrier* et *Jean-Jacques Diaz*. Je n'aurais jamais continué en thèse sans leur passion pour la recherche et sans leur soutien dans mes démarches après mes différents stages.

Merci aussi à *Ghislaine Bec* pour le financement accordé à ma thèse ainsi qu'à *Laure Sabatier* qui a permis de financer une partie de mon travail et donc sans qui mes résultats n'auraient pas été aussi aboutis.

Je remercie les différents membres du jury *Catherine Ladavière, Thierry Orsière, Françoise Gabert* et *Bernard Verrier* pour avoir accepté mon invitation et avoir bien voulu être rapporteurs ou examinateurs pour ma fin de thèse. Merci pour le temps consacré à mon travail.

Enfin...

Que dire concernant *ma famille* ? Bien qu'éloignée, elle a toujours été de bon soutien. Je suis heureux et fier de ma famille si hétéroclite qu'elle soit. En particulier à *Maxime*, merci pour ce que tu es et merci pour les concessions que tu as dû faire pendant ces trois années de thèse ; cela n'a pas été facile pour toi non plus. Un merci tout particulier aussi à ma grand-mère, *Anne-Marie Duc*, pour ses mots d'encouragements ainsi qu'à *Chantal Anzevui-Duc* pour m'avoir procuré l'un de mes précieux outils de travail de thèse qu'est le Ferinject®.

Sans oublier *mes parents* qui sont toujours présents en cas de besoin, je les aime.

« Et même si le sujet est complètement obscur et inexploré, le physiologiste ne devra pas craindre d'agir même un peu au hasard afin d'essayer, qu'on me permette cette expression vulgaire, de pêcher en eau trouble. Ce qui veut dire qu'il peut espérer, au milieu des perturbations fonctionnelles qu'il produira, voir surgir quelque phénomène imprévu qui lui donnera une idée sur la direction à imprimer à ses recherches. Ces sortes d'expériences de tâtonnement, qui sont extrêmement fréquents en physiologie, en pathologie et en thérapeutique, à cause de l'état complexe et arriéré de ces sciences, pourraient être appelées des expériences pour voir, parce qu'elles sont destinées à faire surgir une première observation imprévue et indéterminée d'avance, mais dont l'apparition pourra suggérer une idée expérimentale et ouvrir une voie de recherche. »

Claude Bernard

Introduction à l'étude de la médecine expérimentale

RESUME

De par leurs propriétés, les nanoparticules suscitent des sentiments très contrastés. Elles sont considérées comme prometteuses dans de nombreux champs d'application, notamment dans le domaine médical. Beaucoup d'approches thérapeutiques utilisent aujourd'hui des nanoparticules comme par exemple, pour soigner les cancers. Cependant, les nanoparticules sont également vues comme une source potentielle de danger pour la santé humaine, en particulier lorsque l'on considère les crises sanitaires historiques liées à l'inhalation répétée de particules de silice cristalline ou de fibres d'amiante qui provoque de graves maladies telles que la silicose et l'asbestose. Les macrophages alvéolaires sont aujourd'hui connus pour jouer un rôle central dans l'évolution de ces deux maladies. Nous nous sommes donc intéressés aux aspects à la fois positifs et négatifs des nanoparticules. Dans un premier projet, afin de répondre à un problème de santé publique, nous avons étudié l'effet de différents types de nanoparticules de silice amorphe sur la dérégulation des fonctionnalités principales des macrophages. Les principaux tests effectués ont montré un effet important sur les macrophages lorsque les nanoparticules de silice sont à des concentrations subtoxiques, en revanche nous avons seulement observé un léger effet lorsque les macrophages sont exposés à des doses journalières équivalentes aux normes d'exposition imposées. Dans un deuxième projet, nous avons développé une stratégie de cheval de Troie dans laquelle des macrophages différenciés in vitro servent à véhiculer une grande quantité de nanoparticules d'oxyde de fer photoactivables au niveau des sites tumoraux, cela afin d'améliorer les radiothérapies actuelles. Les premiers tests ont démontré que le Ferinject® était peu toxique pour les macrophages même à de fortes concentrations. Ensuite, les expérimentations pré-cliniques effectuées sur la souris ont validé notre concept puisque les macrophages injectés dans la circulation sanguine sont capables de migrer vers la tumeur.

ABSTRACT

Because of their properties, nanoparticles have generated opposed views. They are perceived as promising in many fields of application, particularly in medicine. Nanoparticles are currently used in many therapeutic approaches such as cancer therapy. However, in view of past health crises related to the repeated inhalation of crystalline silica particles and asbestos fibers, nanoparticles are also viewed as a source of potential risks for human health. Alveolar macrophages are now known to play a major role in the evolution of these two diseases. We thus chose to study both the positive and negative aspects of nanoparticles. In order to address a public health issue, our first project focused on the effect of different types of amorphous silica nanoparticles on the disruption of the main functionalities of macrophages. The main tests performed showed a significant effect on macrophages when amorphous silica nanoparticles were tested at subtoxic concentrations. However, we only observed minor effects when macrophages were exposed to a daily dose equivalent to the safety standards. For the second project we developed a Trojan horse strategy using macrophages to bring a significant quantity of photoactivatable nanoparticles to the tumor site so as to improve current radiotherapies. The first assays proved that Ferinject® was not toxic to macrophages even at high concentrations. Then, the pre-clinical experiments performed on mice validated our strategy because macrophages injected into the bloodstream were able to migrate toward the tumor.

Sommaire

SOMMAIRE	6
TABLE DES FIGURES	9
TABLE DES TABLEAUX	15
TABLE DES ABREVIATIONS.....	15
INTRODUCTION GENERALE	19
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	25
PARTIE 1 : LE SYSTEME IMMUNITAIRE	26
1. <i>Bref rappel historique</i>	26
2. <i>Généralités sur le système immunitaire</i>	26
3. <i>Le système immunitaire inné</i>	28
3.1. Les barrières physiques.....	28
3.2. Les substances chimiques.....	30
3.3. Descriptions des différents types cellulaires de l'immunité innée	33
3.4. Reconnaissance de l'agent infectieux par les cellules de l'immunité innée.....	34
3.5. Les différentes étapes de la réponse inflammatoire	36
3.5.1. L'hémostase	36
3.5.2. L'inflammation	37
3.5.3. La réparation tissulaire	39
4. <i>Le système immunitaire adaptatif</i>	40
5. <i>Le macrophage : une cellule polyvalente dans le système immunitaire inné</i>	43
5.1. Découverte des macrophages, origine et évolution.....	43
5.2. Les fonctions du macrophage chez l'homme.....	44
5.3. Les mécanismes de phagocytose	48
5.3.1. Le récepteur Fc (FcR)	51
5.3.2. Les récepteurs du complément (CR).....	52
5.3.3. Les récepteurs mannose (MR).....	53
5.3.4. Les récepteurs éboueurs / scavengers (SR).....	53
5.4. La réponse oxydante et l'inflammation.....	56
5.4.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)	57
5.4.2. Les espèces réactives à l'azote (RNS).....	57
5.4.3. Le contrôle intra cellulaire du « burst oxydatif »	58
6. <i>Les maladies associées aux macrophages</i>	62
6.1. Les cancers	62
6.2. Les maladies auto-immunes	63
6.3. Les maladies inflammatoires chroniques	65
6.4. Les inflammations stériles.....	68
PARTIE 2 : LES NANO-OBJETS ET LES SYSTEMES NANOPARTICULAIRES.....	70
1. <i>Définition des nanomatériaux</i>	70
2. <i>Bref rappel historique</i>	72
3. <i>Usages commerciaux des nanotechnologies</i>	74
4. <i>Aspects sociétaux liés aux nanotechnologies</i>	78
4.1. Les nanotechnologies et l'opinion publique	78
4.2. Les différents organismes influant sur la législation des NMx	80
5. <i>Toxicité des NPs : le « risque nano »</i>	85
5.1. Une discipline nouvelle : la nanotoxicologie.....	85
5.2. Les différents modes d'exposition aux NPs	86

5.2.1. Interactions entre les NPs et la peau	88
5.2.2. Interactions entre les NPs et l'intestin	89
5.2.3. Les interactions entre les nanoparticules et les poumons	92
6. <i>Les paramètres physico-chimiques influençant la toxicité des NPs</i>	96
6.1. La taille, la forme et le matériau qui compose les NPs.....	96
6.2. La charge de surface et solubilité.....	101
6.3. Les phénomènes d'agrégation ou d'agglomération.....	104
7. <i>Des nanoparticules utilisées en thérapeutique</i>	105
7.1. Description synthétique du potentiel des NPs en thérapie anti-cancéreuse	107
7.2. Recherches cliniques et autorisations de mise sur le marché.....	109
8. <i>Utilité du macrophage comme modèle d'étude</i>	110
RESULTATS.....	113
PROJET PRELIMINAIRE : EVALUATION DE L'INFLUENCE DES MILIEUX DE CULTURE SUR LA PHYSIOLOGIE DES MACROPHAGES J774 AINSI QUE SUR LEURS REPNSES SUITE A UNE EXPOSITION A DES NANOPARTICULES.	114
1. <i>Brève présentation du projet</i>	114
2. <i>Résultats publiés concernant l'effet du milieu de culture sur la réponse cellulaire</i>	132
3. <i>Conclusion</i>	132
PROJET 1 : EVALUATION DE LA TOXICITE DE DIFFERENTS TYPES DE NANOPARTICULES DE SILICES AMORPHES SUR LES MACROPHAGES	135
1. <i>Présentation du projet</i>	135
2. <i>Stratégie élaborée</i>	136
3. <i>Résultats publiés concernant les NP-SiO₂ (Ludox TMA®)</i>	138
4. <i>Résultats supplémentaires obtenus via l'évaluation de la toxicité des NP-SiO₂ précipitées (Ludox LS30®) et pyrogéniques (Fumed silica)</i>	164
4.1. Caractérisation des NPs et détermination de la dose de travail	164
4.2. Evaluation de l'effet des NPs-SiO ₂ (Ludox LS30® et fumée) sur les macrophages RAW 264.7	168
4.2.1. Evaluation de la capacité phagocytaire en fonction des différents modes d'exposition aux NP-SiO ₂	168
4.2.2. Evaluation de la réponse inflammatoire suite aux différents modes d'exposition aux NP-SiO ₂	171
4.2.3. Effet des NP-SiO ₂ (LS30 et fumée) sur les compartiments acides	173
4.3. Evaluation des effets des NP-SiO ₂ sur la fonctionnalité des macrophages primaires.....	175
5. <i>Conclusion</i>	177
PROJET 2 : EVALUATION DE L'EFFET DE L'ACCUMULATION DE NANOPARTICULES D'OXYDE DE FER SUR LES MACROPHAGES ET DE L'EFFICACITE D'UNE STRATEGIE ANTI TUMORALE VIA LA VECTORISATION DE CES PARTICULES PAR LES MACROPHAGES.	179
1. <i>Présentation du projet</i>	179
2. <i>Déroulement du projet</i>	181
3. <i>Résumé des résultats obtenus et article en cours de soumission</i>	186
3.1. Caractérisation des NP-Fe ₂ O ₃ choisies	186
3.2. Evaluation de la dose de travail	188
3.3. Evaluation de l'accumulation du fer à l'intérieur des macrophages J774 et tests fonctionnels.....	188
4. <i>Conclusion</i>	214
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	217
1. <i>Les études de toxicité des NPs</i>	218
2. <i>Utilisation des NPs à haut numéro atomique pour traiter les cancers résistants</i>	227
3. <i>Point de vue personnel sur ce travail de thèse</i>	228
MATERIEL ET METHODES.....	231

1. Mesure du glutathion réduit intracellulaire (GSH)	232
2. Détermination et localisation de l'élément fer intracellulaire apporté par les NPs via microscopie électronique à transmission couplée à la microanalyse EDX.	233
2.1. Préparation des échantillons	233
2.2. Microscopie S/TEM – EDX	234
2.2.1. La diffusion élastique	235
2.2.2. La diffusion inélastique	235
2.2.3. Les émissions de photons X.....	236
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	237
ANNEXES	251
ANNEXE 1 : RESULTATS SUPPLEMENTAIRES SUR L'IMAGERIE DU PETIT ANIMAL	252
1. Choix de la sonde servant au suivi des macrophages et de sa dose de travail.....	252
2. Tropisme et biodistribution des macrophages injectés après induction d'une zone inflammatoire sous-cutanée via injection de LPS.	256
3. Mode opératoire effectué pour l'imagerie du petit animal – Zone inflammatoire localisée.....	258
ANNEXE 2 : LES DIFFERENTS REGLAGES DU CYTOMETRE EN FLUX (FACSCALIBUR)	260
ANNEXE 3 : COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	262
1. Autres communications écrites publiées	262
2. Communications affichées.....	293
3. Communications orales	297

Table des figures

- Figure 1.** Cellules du système immunitaire inné et adaptatif. D'après Dranoff G. – Nature Reviews. Cancer. 2004. 27
- Figure 2.** Les différents épithéliums recouvrant la surface et les cavités de l'organisme. D'après Cummings B. – Addison Wesley Longman Inc. 2001..... 29
- Figure 3.** Aspect du mucus sécrété par les cellules caliciformes. A- Observation par microscopie électronique de bronches humaines (M= Mucus ; C = Cils). B- Cellules caliciformes contenant du mucus (M = Mucus contenu dans des granules ; L = Lumière ; C Cils ou microvilosités ; CG = Cellules à gobelet). C- Mucus (M) sécrété par les cellules caliciformes. D- Représentation schématique de la mucine formant un réseau de mucus. D'après Rogers R.F. – Respir Care. 2007. 30
- Figure 4.** Le complément et son rôle dans l'immunité innée. A- Le complément formant le complexe d'attaque membranaire. B- Rôle du complément dans l'activation des cellules immunitaires innées. C- Phénomène d'opsonisation favorisant la phagocytose des pathogènes par les cellules phagocytaires. D'après Dunkelberger J.R. – Cell Res. 2010. 32
- Figure 5.** Schéma simplifié de l'hématopoïèse. Adapté de Blank U. et Karlsson S. – Blood 2015 et Stuart H. – Cell 2008..... 34
- Figure 6.** Présentation non exhaustive des récepteurs de signaux de danger portés par les cellules du système immunitaire inné. D'après O'Farrelly et Doherty D.G. – A short Primer on Fundamental immunology - Liver immunology. 2007..... 35
- Figure 7.** Principaux acteurs de l'inflammation (de l'initiation par les neutrophiles à la résolution par les macrophages). D'après Landén N.X. et all – Cell. Mol. Life Sci. 2016. 39
- Figure 8.** Description du TCR. A-Réarrangement des gènes V-D-J codant pour les chaînes des récepteurs lymphocytaires. B- Schéma du TCR et reconnaissance antigénique. D'après O'Farrelly et Doherty D.G. – A short Primer on Fundamental immunology - Liver immunology. 2007. Et Elsevier Science / Garland publishing 1999. 41
- Figure 9.** Représentation simplifiée de l'activation du système immunitaire adaptatif. 42
- Figure 10.** Découverte des macrophages par E.Metchnikoff. A- Phagocytes essayant d'englober une épine de rose insérée dans une larve d'étoile de mer d'après Beck G. et Habitch G.S – Sci. Am. 1996. B- E. Metchnikoff et ses dessins de bactéries phagocytées par des macrophages et des microphages d'après Kaufman S.H.E. – Nat. Immunol. 2008. 44
- Figure 11.** Polarisation des Macrophages. A- Représentation simplifiée de l'activation des macrophages et des différentes possibilités de polarisation en fonction des stimuli reçus. M1, macrophage inflammatoire ; M2 (comprenant les M2a, M2b et les M2c), macrophages anti-inflammatoire. La sécrétion de cytokines pro- ou anti-inflammatoire par les macrophages varie ensuite en fonction de leur polarisation. B- Spectre de possibilités

d'activation des macrophages. D'après Mosser Navegantes K.C. J. – *Transl. Med.* 2017. Et Edwards J.P. – *Nat. Rev. Immunol.* 2008. 45

Figure 12. Les différents types de macrophages existants. A- Distribution des différents types de macrophages tissulaires ainsi que leurs principales fonctions. B- Marqueurs de surface des principaux macrophages résidents. D'après Mowat A.M. – *Nat. Med.* 2017..... 46

Figure 13. Déroulement de la phagocytose. L'internalisation d'une particule exogène résulte d'un ensemble de mécanismes de fusion et de fission des membranes plasmiques avec d'autres vésicules intracellulaires permettant l'acidification et la maturation du phagosome en phagolysosome. D'après Gordon S. – *Annu. Rev. Immunol.* 1999. 49

Figure 14. Les différents types de récepteurs Fc enrochés et les mécanismes de signalisation associés permettant d'initier la phagocytose. D'après Aderem A. et Underhill D.M. – *Annu. Rev. Immunol.* 1999..... 52

Figure 15. Les différents types de SR connus. D'après Canton J. – *Nat. Rev. Immunol.* 2013. 54

Figure 16. Polarisation des macrophages (M1 ou M2) orientée en fonction du type de SR et de co-récepteurs enrochés. D'après Canton J. *Nat. Rev. – Immunol.* 2013. 56

Figure 17. Toxicité induite par l'accumulation des ROS. Adapté de Fu P.P. – *J.F.D.A.* 2014..... 59

Figure 18. Principales réactions enzymatiques impliquées dans les défenses anti-oxydantes de l'organisme. 60

Figure 19. Effet anti-inflammatoire de Nrf2. Inhibition de la transcription des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires et en même temps, surexpression des gènes codant pour des protéines antioxydantes qui éliminent les ROS. D'après Kobayashi E.H. – *Nat. Commun.* 2016. 61

Figure 20. Rôle des macrophages (et des neutrophiles) dans les maladies auto-immunes. Les encadrés oranges montrent les conséquences de la suractivation des M1 dans le diabète de type 1 ainsi que les stratégies envisagées de régulation de l'inflammation via les M2. Les rectangles verts correspondent à la polyarthrite rhumatoïde. D'après Navegantes K.C. – *J. Transl. Med.* 2017. 65

Figure 21. Représentation de l'échelle micrométrique et nanométrique par comparaison avec les entités principales du monde vivant. Adapté de Laroui H. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2011. 70

Figure 22. Définition d'aggrégation et d'agglomération. D'après Eggersdorfer M.L. et Pratsinis S.E. – *Adv. Powder Technol.* 2014..... 72

Figure 23. Exemples et lieux d'utilisation des NPs entre l'Antiquité et la Renaissance. A- Coupe romaine de Lycurque datant du IV^{ème} siècle. B- Morceau de céramique datant du Moyen Age composé de NPs métalliques (argent) créant un effet d'iridescence (a) et observables en microscopie électronique à transmission (b). Le phénomène d'interférence optique est provoqué par deux couches superposées de NPs de différentes tailles (b) et (c). C- Evolution géographique des principax sites de production de céramiques et de l'utilisation des NPs dans les céramiques. D'après Heiligtag F.J. et Niederberger M. – *Mater. today.* 2013. Et Sciau P. – *InTech.* 2012. 74

Figure 24. Nombre total de produits contenant des NMx répertoriés entre 2005 et 2014. Adapté de Vance M.E. – Beilstein J. Nanotechnol. 2015.	75
Figure 25. Distribution des produits contenant des NMx. A- En fonction de leurs domaines d'application. B- A travers le monde. Adapté de Vance M.E. – Beilstein J. Nanotechnol. 2015.	76
Figure 26. Estimation de la quantité de NMx produits en europe (boîtes à moustaches grises) et dans le reste du monde (boîtes à moustaches blanches). D'après Piccinno F. – JNR. 2012.	77
Figure 27. Exemples de produits faisant références au nanotechnologies comme argument de vente en 2010. Comparaison avec les publicités des années 1940 promouvant les produits contenant du radium.	80
Figure 28. Nombre de publications relatives à la toxicité des NMx. A- Nombre de publications parues entre 1980 et 2010. B- Nombre de publications en fonction du type de NMx. D'après Sauer U.G. – Regul Toxicol Pharmacol. 2011. Et Boczkowski J. – Nanotoxicology. 2010.	86
Figure 29. Voies de pénétration des NPs dans l'organisme et risques associés pour la santé. D'après Buzea C. – Biointerphases. 2007.	87
Figure 30. Possibles voies de pénétration des NPs à travers la peau. L'épiderme est constitué de trois couches successives de cellules : le Stratum basale, le Stratum spinosum, le stratum granulosum. Les NPs sont capables de franchir l'épiderme de manière paracellulaire (a) et transcellulaire (b) (avec une faible capacité de pénétration). Elles peuvent aussi traverser la peau avec un plus fort risque de pénétration via les follicules pileux (c1), les pores sudoripaux (c2) et les glandes sébacées (c3). D'après Smijs T.G. – Nanotechnol Sci Appl. 2013.	89
Figure 31. Rôle du microbiote intestinal dans le maintien de l'homéostasie et de sa contribution dans certaines maladies lorsqu'il est déséquilibré. Le microbiote influe sur le stockage des graisses et la balance énergétique (a), les fonctions de la barrière intestinale (b), l'inflammation (c), la réactivité au stress (d), les comportement anxieux et dépressifs (e). Abréviations : GI, gastrointestinal ; CNS, système nerveux central ; ANS, système nerveux autonome ; ENS, système nerveux entérique. D'après Foster J.A. – Trends Neurosci. 2013.	92
Figure 32. Devenir des particules inhalées en fonction de leur taille au niveau des poumons. A- Influence de la taille des particules inhalées sur leur répartition pulmonaire. B- Possibilités d'élimination des particules en fonction de leur taille. D'après le rapport de l'INRS. Dossier nanomatériaux, nanoparticules. 2016. Et Van Rijt S.H. – Eur. Respir. J. 2014.	93
Figure 33. Effets possibles des NPs inhalées sur la santé. D'après le rapport de l'INRS. Dossier nanomatériaux, nanoparticules. 2016.	94
Figure 34. Mécanismes de toxicité des NPs de silice cristalline (focalisation sur les macrophages alvéolaires). Adapté de Hamilton R.F. Jr – Free Radic. Biol. Med. 2008.	96
Figure 35. Impact de la taille des NPs sur les possibilités d'internalisation. D'après Petros R.A. et DeSimone J.M. – Nat. Rev. Drug. Discov. 2010.	98

Figure 36. Augmentation de la réactivité de surface des particules en fonction de la taille pour un même volume occupé. Adapté de Koehler A.R. – <i>Toxicity of Engineered Nanomaterials</i> . 2015.....	99
Figure 37. Mécanismes de toxicité des NPs. A- Réactions générant des espèces réactives à l’oxygène. B- Possibles mécanismes par lesquels les NPs interagissent avec le milieu biologique D’après Fu P.P. – <i>J. Food. Drug. Anal.</i> 2014 et Nel. A. – <i>Science</i> . 2006.....	101
Figure 38. Effet de la charge de surface des NPs sur leur internalisation et leur toxicité. D’après Lin J. – <i>ACS-Nano</i> . 2010.....	103
Figure 39. Charge de surface et potentiel zeta. D’après Freire J.M. – <i>Eur. Biophys. J.</i> 2011.....	103
Figure 40. Possibilités de transport d’Ag via l’utilisation de NPs. Zaho L. – <i>Vaccine</i> . 2014.....	105
Figure 41. Zones d’expression du système immunitaire (expression d’IgA) en fonction de la voie utilisée pour administrer le vaccin. Utilisation de vaccins avec la toxine B du choléra. Le degré d’expression d’IgA est représenté en rouge : les organes qui expriment fortement les IgA sont fortement saturés en rouge et inversement, la faible expression d’IgA est représentée par une couleur rouge pâle. D’après Holmgren J. et Czerkinsky C. – <i>Nat. Med.</i> 2005.....	106
Figure 42. Spécificité de ciblage des NPs en thérapie anti-cancéreuse. Adapté de Wu H-C. – <i>J.Oncol.</i> 2010.	108
Figure 43. Production industrielle, usage et effets de la silice sur la santé.....	136
Figure 44. Stratégie mise en place pour évaluer l’effet des NP-SiO ₂ pyrogéniques et précipitées sur différents modèles cellulaires et différents modes d’exposition.	138
Figure 45. Caractérisation des NP-SiO ₂ (LS30 et fumée) sur une suspension à 1mg/mL. A- Observation des différentes NP-SiO ₂ en microscopie électronique à transmission. B- Détermination de la taille des NP-SiO ₂ en fonction du temps d’incubation et du milieu de culture via diffusion dynamique de la lumière. C- Diagramme présentant l’état de dispersité des NP-SiO ₂ en eau et en milieu de culture avec sérum.	165
Figure 46. Tests de capacité phagocytaire en fonction des différents modes d’exposition (aiguë, chronique et récupération) A- pourcentage de cellules encore phagocytaires après avoir été exposées 24h avec des NP-SiO ₂ (LS30 et fumée). B- Focalisation sur la population phagocytaire et estimation de leur capacité à accumuler les billes fluorescentes (latex 1µm).....	168
Figure 47. Visualisation du cytosquelette d’actine via la phalloïdine-atto 550. Les cellules RAW 264.7 sont mises en contact 24h avec plusieurs types de particules (NP-SiO ₂ et billes de latex de différentes tailles).	170
Figure 48. Dosage de médiateurs pro-inflammatoires en fonction des différents modes d’exposition aux NP-SiO ₂ . A- Dosage de la sécrétion de NO via le réactif de Griess. B- Dosage de l’IL-6 par cytométrie en flux. C- Dosage des TNF-α par cytométrie en flux.	171

Figure 49. Estimation du pH des compartiments cellulaires acides par cytométrie en flux (marquage via l'acridine orange 1µM). A- Expérience n°1 : comparaison de l'effet des NP-SiO₂ sur les compartiments acides avec des contrôles tels que la bafilomycine (inhibiteur des pompes H⁺ empêchant l'AO d'entrer dans les lysosomes) et des billes de latex de différentes tailles). B- Expérience n°2 : focalisation sur l'effet des NP-SiO₂. 174

Figure 50. Réponse des macrophages primaires lors d'expositions subtoxiques (DL20) à des NP-SiO₂ (LS30 et fumée). A- Evaluation de la capacité phagocytaire (diagramme du haut = pourcentage de cellules capables d'assurer les fonctions de phagocytose ; diagramme du bas = capacité phagocytaire des cellules compétentes). B- Evaluation de la réponse inflammatoire en fonction de la DL20 choisie (150 µg/mL pour la LS30 et 50 µg/mL pour la fumée). Diagramme du haut = dosage des NO ; diagramme du bas = dosage des cytokines pro- et anti-inflammatoires avec et sans stimulation au LPS. 175

Figure 51. Schéma récapitulatif des principaux résultats obtenus lors de l'étude de l'effet des NP-SiO₂ (TMA, LS30, fumée de silice) sur les macrophages. 178

Figure 52. Vectorisation des NP-Fe₂O₃ vers la tumeur via les macrophages. 181

Figure 53. Stratégie mise en place pour observer le tropisme des macrophages vers les zones inflammatoires induites ou vers les zones tumorales. 186

Figure 54. Caractérisation des deux types de NP-Fe₂O₃ choisies par Microscopie Electronique à Transmission (TEM). Barre d'échelle = 50 nm 187

Figure 55. Test de viabilité via coloration au iodure de propidium (IP). A- Détermination de la dose de travail en Ferinject® sur les macrophages primaires. B- Détermination de la dose de travail en NP-Fe₂O₃ (Sigma) sur les macrophages primaires. C- Test de viabilité sur les lignées cellulaires de macrophages J774 en fonction de la dose de travail choisie (1mg/mL) pour chaque type de NP-Fe₂O₃. 188

Figure 56. Validation de la présence de fer accumulé à l'intérieur des cellules J774 après incubation avec des NP-Fe₂O₃ (Sigma ou Ferinject®). A- Evaluation qualitative par coloration de Perls. B- Dosage quantitatif du fer intracellulaire via la bathophénanthroline..... 189

Figure 57. Validation de l'internalisation des différentes NP-Fe₂O₃ (Sigma et Ferinject®) par les macrophages J774. A- comparaison de la capacité d'accumulation des NP-Fe₂O₃ par les macrophages en fonction du temps d'incubation (1h30 ou 24h). Barre d'échelle images de droite = 2µm ; image de gauche = 200 nm. B- Validation par imagerie EDX que le fer emmagasiné par les macrophages J774 est bien associé à l'internalisation des NPs. Barre d'échelle 700 nm..... 190

Figure 58. Test de capacité phagocytaire. A- Estimation du pourcentage de cellules phagocytaires après avoir été en contact pendant 24h avec 1mg/mL de NP-Fe₂O₃ (Sigma ou Ferinject®). B- Evaluation de la capacité phagocytaire de la population cellulaire capable de phagocyter..... 191

Figure 59. Visualisation du cytosquelette d'actine des cellules J774 en présence ou en absence de NP-Fe₂O₃ (Sigma ou Ferinject®). 192

Figure 60. Dosage des médiateurs pro-inflammatoires après incubation avec des NP-Fe ₂ O ₃ (Sigma ou Ferinject®) A- Dosage de la sécrétion de NO en présence ou en absence de LPS. B- Dosage des cytokines pro-inflammatoires.	193
Figure 61. Les autres mécanismes intracellulaires affectés par les NP-Fe ₂ O ₃ (Sigma). A- Test du potentiel mitochondrial. B- Quantification du glutathion.	194
Figure 62. Schéma récapitulatif des principaux résultats obtenus lors de l'étude de l'effet des NP-Fe ₂ O ₃ (Sigma) à une concentration élevée de 1mg/mL.	214
Figure 63. Etude cytotoxique des NPs. En jaune : questions à prendre en compte lors de l'étude de cytotoxicité. En bleu : méthodes généralement envisagées. En rouge méthodes supplémentaires effectuées par le laboratoire ProMD et ses collaborateurs. Adapté de Kong B. – Nanomed. 2011.....	232
Figure 64. Schéma explicatif du fonctionnement du GSH.....	236
Figure 65. Emission d'un photon X suite à l'excitation d'un atome.....	236

Table des tableaux

Tableau 1. Principales molécules oxydantes endogènes. D'après Birben H. – World Allergy Organ. J. 2012. 57

Tableau 2. Principales enzymes et réactions chimiques associées ayant un rôle antioxydant. D'après Birben H. – World Allergy Organ. J. 2012. 59

Tableau 3. Principales NPs utilisées en tant qu'additifs alimentaires. D'après Casals E. – TrAC. 2008. 90

Tableau 4. Récapitulatif des doses effectives en NP-SiO₂ (LS30 et fumée) utilisées en fonction du type cellulaire testé et du mode d'exposition. 167

Tableau 5. Caractérisation des deux types de NP-Fe₂O₃ via la diffusion dynamique de la lumière (DLS)..... 187

Table des abréviations

µL	Microlitre
µM	Micromolaire
µm	Micromètre
ADN	Acide Désoxyribonucléique
Ac	Anticorps
Ag	Antigène
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ANSES	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail
AO	Acridine Orange
ATP	Adénosine Triphosphate
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
CAM	Complexe d'Attaque Membranaire
CAT	Catalase
CD	Cluster of Differentiation
CEA	Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives
CLEC	Lectine de type C
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CNDP	Commission Nationale de Débat Public
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CR	Complement Receptor
CSF-1	Colony Stimulating Factor 1
CSC	Cellule Souche Cancéreuse
DAMP	Damage-Associated Molecular Pattern
DGCCRF	Direction Générale de la concurrence, de la Consommation et de la répression des Fraudes
DL20	Dose létale 20
DLS	Dynamic Light Scattering
ECHA	European Chemicals Agency
EDX	Energy Dispersive X-Ray
EMAPII	Endothelial-Monocyte-activating Polypeptide II
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle Medium
E171	Additif alimentaire à base de titane
E551	Additif alimentaire à base de silice
EPR	Enhanced Permeability and Retention
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FcR	Fc Receptor
Fc	Fragment crystallizable
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast Growth Factor
g	Times gravity
GBM	Glioblastome
GIN	Grenoble Institut des Neurosciences
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

GSH	Glutathion
GSH-Px	Glutathion Peroxydase
GST	Glutathion Transférase
GTP	Guanosine Triphosphate
H ⁺	Ion Hydrogène
H ₂ O ₂	Peroxyde d'Hydrogène
HDL	High Density Lipoprotein
HNO	Nitroxyle
HOCl	Hypochlorous acid
HSP	Heat Shock Protein
HZE	High-Z element
IAB	Institut pour l'Avancée des Biosciences
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
INCO	Information du Consommateur
iNos	Inductible Nitric Oxide Synthase
INF	Interféron
IP	Iodure de Propidium
IPHC	Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien
ISO	International Organization for Standardization
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based activation motif
KeV	Mille electron-volt
LB	Lymphocyte B
LCBM	Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux
LDL	Low Density Lipoprotein
LH	Lymphome Hodgkinien
LPS	Lipopolysaccharides
LT	Lymphocyte T
LT H	Lymphocyte T Helper
LT reg	Lymphocyte T régulateur
Lymphocyte NK	Lymphocyte Natural Killer
M1	Macrophages inflammatoire
M2	Macrophages anti-inflammatoire
MAP Kinases	Mitogen-Activated Protein Kinase
MARCO	Macrophage Receptor with Collagenous structure
MCB	Monochlorobimane
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MEC	Matrice Extracellulaire
MERTK	Myeloïd-Epithelial-Reproductive Tyrosine Kinase
MET	Microscopie Electronique à Transmission
Mg	milligramme
MeV	Million d'électrons-volt
MICI	Maladie Inflammatoire chronique de l'Intestin
mL	Millilitre
MMP	Matrix Metalloproteinase
MR	Mannose Receptor
N ₂ O ₃	Trioxyde de diazote
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucleotide Phosphate
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B

NM	Nanomatériau
nm	Nanomètre
NO	Nitric Oxide
NO ₂	Nitrites
NP	Nanoparticule
NP-Ag	Nanoparticule d'Argent
NP-Al	Nanoparticule d'Aluminium
NP-Au	Nanoparticule d'or
NP-Fe ₂ O ₃	Nanoparticule d'oxyde de fer
NP-Gd	Nanoparticule de gadolinium
NP-Ni- Fe ₃ O ₄	Nanoparticule de ferrite de nickel
NP-SiO ₂	Nanoparticule d'oxyde de silicium
NP-TiO ₂	Nanoparticule d'oxyde de titane
NP-ZnO	Nanoparticules d'oxyde de Zinc
Nrf2	Nuclear factor-like 2
O ₂	Dioxygène
O ₂ ⁻	ion superoxide
OGM	Organisme Génétiquement Modifié
OH	Radical hydroxyle
ONOO ⁻	Peroxynitrite
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PEG	Polyéthylène Glycol
PEN	Project on Emerging Nanotechnologies
PFA	Paraformaldéhyde
Pg	Picogramme
pH	Potentiel Hydrogène
PHEM buffer	Pipes, Hepes, EGTA, Magnesium sulfate buffer
ProMD	Protéomique, Métaux et Différenciation
PRR	Pattern Recognition Receptor
REACH	Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals
RNS	Reactive Nitrogen Species
RPMI	Rockwell Park Memorial Institute Medium
ROS	Reactive Oxygen species
SOD	Superoxide Dismutase
SR	Scavenger Receptor
SRCR	Scavenger Receptor Cysteine-Rich
STEM	Scanning Transmission Electron Microscope
TAM	Tumor-associated Macrophage
TCR	T cell Receptor
TEM	Transmission Electron Microscopy
TGF	Transforming Growth Factor
TLR	Toll-Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
UV	Ultra Violet
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF-A	Vascular Endothelial Growth Factor A

INTRODUCTION GENERALE

Les nanomatériaux suscitent un intérêt croissant dans de nombreux domaines industriels grâce aux propriétés physico-chimiques qui leurs sont propres. Plusieurs centaines de milliers de tonnes de nanomatériaux sont produites chaque année dans le monde et sont utilisées dans un vaste choix d'applications. Les nanoparticules manufacturées sont par exemple présentes dans des composés électroniques, dans des produits cosmétiques et alimentaires et elles sont aussi de plus en plus utilisées en médecine, etc. Cette omniprésence leur confère donc un fort potentiel d'exposition pour les consommateurs mais surtout pour les travailleurs pour qui les risques d'exposition sont plus importants notamment par inhalation. Par conséquent, les nanoparticules suscitent aujourd'hui de réelles inquiétudes de santé publique.

La nouveauté des nanomatériaux et leur développement extrêmement rapide a rendu compliquée la mise en place de normes sanitaires par les instances gouvernementales. C'est pourquoi les études concernant la toxicité des nanoparticules sont de plus en plus nombreuses. Elles ont démontré que les interactions avec les systèmes biologiques sont très différentes d'une particule à l'autre, mettant ainsi en exergue que la toxicité intrinsèque des nanoparticules ne peut pas être généralisée à l'ensemble des composants nanoparticulaires. D'autres paramètres doivent être pris en compte tels que les matériaux qui les constituent, la dose d'exposition, la forme, la stabilité, etc. La possibilité d'être exposé aux nanoparticules par des voies diverses (cutanée, respiratoire et digestive) contribue aussi à complexifier l'évaluation des effets des NPs sur l'organisme. De plus, plusieurs études ont démontré qu'elles sont capables de franchir les différentes barrières épithéliales pour se répandre dans l'organisme et donc induire des effets sur d'autres organes. Les études de toxicité nécessitent donc de multiplier les modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo* afin de confronter l'ensemble

des recherches effectuées sur ce sujet. Malgré les divergences occasionnelles de résultats dans la littérature, la multiplication et la comparaison des données scientifiques sur la toxicité des nanoparticules améliorent les connaissances qui sont de plus en plus précises et qui sont nécessaires pour définir des réglementations.

Dans le cadre de ma thèse, le choix d'étudier l'effet intrinsèque des nanoparticules sur le système immunitaire et notamment sur les macrophages ne semble pas dénué de sens. En effet, les macrophages sont présents dans presque tous les tissus de l'organisme afin d'assurer une veille immunologique, en particulier dans les zones les plus susceptibles d'être en contact avec l'extérieur et par conséquent avec les NPs (peau et muqueuses). De plus, les macrophages sont des cellules phagocytaires professionnelles. Leurs fortes capacités endocytaire et phagocytaire leur permettent donc d'ingérer une grande quantité de particules. Cette caractéristique, de même que leur localisation, font d'eux des cellules qui interagissent de manière privilégiée avec les nanoparticules.

Enfin, les macrophages jouent un rôle central dans le bon fonctionnement du système immunitaire à la fois inné et adaptatif grâce à la production de médiateurs chimiques. Ils participent aux réponses inflammatoires par la sécrétion de molécules pro- ou anti-inflammatoires et influent sur le renouvellement tissulaire via l'élimination des débris cellulaires. Les macrophages sont par conséquent indispensables à la coordination des défenses immunitaires, de la réponse inflammatoire et de l'homéostasie tissulaire. Une modification de leurs fonctionnalités (par exemple causée par l'accumulation de nanoparticules) peut donc avoir des répercussions plus larges sur l'ensemble des tissus de l'organisme. Les effets immunotoxiques possibles sont l'immunosuppression ou au contraire

la stimulation inappropriée du système immunitaire (hypersensibilité, allergies et manifestations auto-immunes). C'est donc pour l'ensemble de ces raisons qu'il est important de connaître l'effet des nanoparticules sur les fonctionnalités des macrophages.

La première partie de ce manuscrit qui décrit le système immunitaire, se focalise sur le rôle central qu'occupent les macrophages dans le système immunitaire et l'importance des interactions qu'ils peuvent avoir avec leur environnement. Elle détaille ensuite les fonctions principales des macrophages : la capacité phagocytaire et la possibilité d'orienter la réponse inflammatoire via la sécrétion d'une multitude de médiateurs chimiques. Ces derniers sont par ailleurs eux-mêmes influencés par les récepteurs enrôlés lors de l'étape de phagocytose. Enfin, elle décrit de manière non exhaustive différents types de pathologies associées à la dérégulation des macrophages. La deuxième partie de la synthèse bibliographique s'intéresse aux nano-objets et aux systèmes nanoparticulaires. Elle décrit également l'impact de l'émergence des nanotechnologies dans notre société ainsi que les risques pour la santé humaine. Elle s'appuie sur des faits antérieurs tels que les crises sanitaires de l'amiante et de la silice cristalline qui ont causé des maladies inflammatoires pulmonaires pouvant évoluer vers certains types de cancers du poumon. Enfin, cette partie mentionne de manière succincte les avantages et les attentes que suscitent les nanoparticules dans de nombreuses thérapies dont les stratégies anticancéreuses.

Mes travaux de thèse se décomposent en deux principaux projets et un travail préliminaire. Ce dernier met en évidence l'influence du milieu de culture sur la réponse cellulaire et montre ainsi l'importance de multiplier les modèles expérimentaux lors des études de toxicité telles que celles liées aux nanoparticules. Ce travail a été valorisé par une publication en 2016 dans le journal *Proteomics*. (Dalzon et al., 2016)

Le premier projet s'appuie sur les données toxicologiques concernant la silice cristalline ainsi que sur des résultats en protéomique déjà obtenus. Nous nous sommes efforcés d'étudier les fonctionnalités des macrophages après avoir été en contact avec deux types de nanoparticules de silice amorphe (précipitée ou pyrogénique) largement utilisés en industrie et dont les risques pour la santé ne sont pas encore avérés. Ce projet a permis d'aboutir à une publication en 2017 dans le journal *Nanoscale*. (Dalzon et al., 2017)

Le deuxième travail de thèse consiste à étudier les effets des nanoparticules d'oxyde de fer sur les macrophages. Ce travail entre dans un contexte d'amélioration des stratégies thérapeutiques contre des cancers résistants aux traitements actuels tels que les glioblastomes. Il a pour objectif d'améliorer les radiothérapies actuelles par l'activation de métaux via des rayonnements X de faible intensité. Cette stratégie thérapeutique utilise les macrophages comme un cheval de Troie afin de vectoriser spécifiquement et en grande quantité des nanoparticules d'oxyde de fer au niveau des sites tumoraux. Un article est actuellement soumis auprès du journal *Nanoscale*.

L'ensemble des travaux ont été effectués sur différents types cellulaires de macrophages en comparant la réponse des lignées cellulaires facilement cultivables avec les macrophages primaires dont les caractéristiques sont plus proches des conditions réelles.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

Partie 1 : Le système immunitaire

1. Bref rappel historique

La notion d'immunité a été mise en évidence dès la Grèce antique pendant la guerre du Péloponnèse en 400 avant notre ère. A cette époque, l'historien et politicien Thucydide mit en évidence que seules les personnes ayant guéri spontanément de l'épidémie de fièvre typhoïde survenue pendant la guerre étaient capables de s'occuper des personnes atteintes par cette même maladie sans retomber malades. (Papagrigrakis et al., 2006; Retief and Cilliers, 1998) Ce phénomène démontra qu'il existait un moyen efficace mis en place par notre organisme dont le but est de se protéger contre la maladie. La notion d'immunité a progressivement permis de mettre en évidence la présence de micro-organismes pathogènes (Robert Koch et Louis Pasteur – XIXème siècle), de mettre en place dans un premier temps des techniques de variolisation (Théodore Tronchin – XVIIIème siècle) pour aboutir ensuite à des méthodes de vaccination efficaces qui ont considérablement amélioré la santé publique mondiale (Edward Jenner, Robert Koch et Louis Pasteur – XVIII et XIXème siècles).

2. Généralités sur le système immunitaire

Chaque jour, nous sommes exposés à des millions de microorganismes étrangers potentiellement pathogènes, que ce soit par contact, par ingestion ou par inhalation. Notre organisme doit donc mettre en place différentes stratégies, d'une part pour limiter l'entrée de ces pathogènes dans l'organisme, et, d'autre part pour pouvoir éliminer le plus rapidement et le plus efficacement possible l'agent étranger lorsque celui-ci a réussi à s'établir dans notre

organisme. Ces différents moyens de défense sont regroupés sous le nom de système immunitaire. Celui-ci n'a cessé de se complexifier au cours de l'évolution des espèces pour se diviser en deux sous-catégories appelées système immunitaire inné (non spécifique) et système immunitaire adaptatif (spécifique). (Bleyzac et al., 2005; Travis, 2009) Ces deux sous-catégories se distinguent aussi bien par leur champ d'action que par leur chronologie d'exécution. Elles doivent en revanche obligatoirement collaborer entre elles pour bien fonctionner (Figure 1).

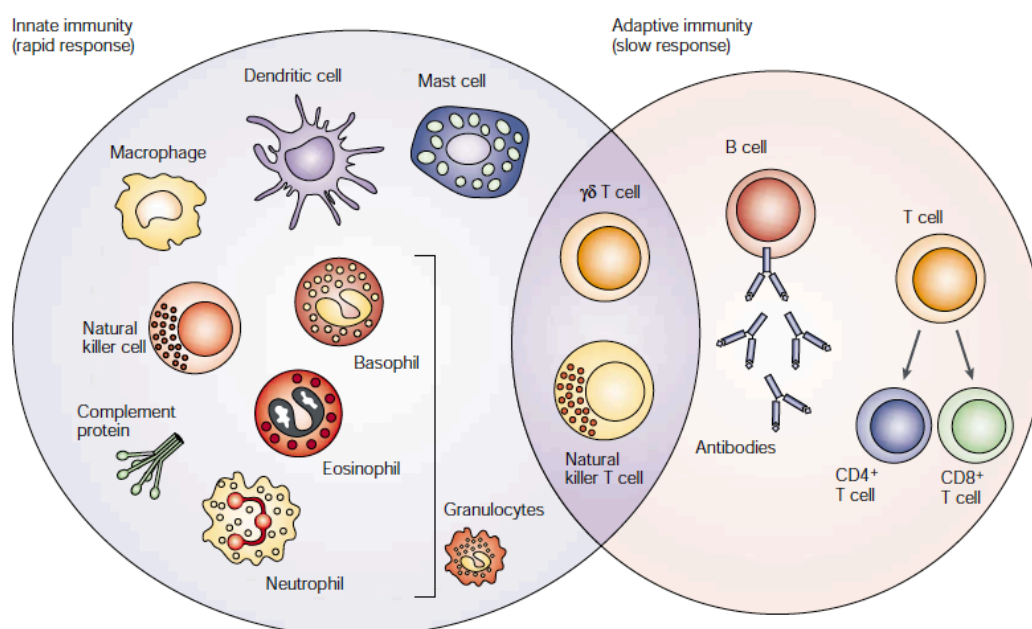


Figure 1. Cellules du système immunitaire inné et adaptatif. D'après Dranoff G. – Nature Reviews. Cancer. 2004.

Même si nous subissons de nombreuses agressions extérieures et sommes constamment en contact avec des pathogènes, ceux-ci réussissent rarement à créer un foyer infectieux. Les mécanismes de défense mis en place par l'organisme sont donc en règle générale très efficaces. Le système immunitaire inné constitue la première étape de défense. Dans un premier temps, ce sont les barrières physiques telles que la peau et les muqueuses

qui empêchent l'entrée du pathogène dans les tissus et sont capables de sécréter des molécules chimiques telles que des agents bactéricides. (Ganz, 2002) Dans un second temps, la présence de cellules immunitaires situées au sein de ces barrières assurent une veille immunologique aspécifique dans le but d'induire une réponse immunitaire locale, rapide et dirigée contre n'importe quel agent infectieux ayant réussi à pénétrer dans l'organisme. (Mowat et al., 2017; Santaolalla et al., 2011) Enfin, lorsque le système immunitaire inné ne suffit plus à contrer le pathogène, il est secondé par le système immunitaire adaptatif qui assure une réponse immunitaire de plus longue durée, généralisée à tout l'organisme et orientée plus spécifiquement contre l'agent infectieux.

3. Le système immunitaire inné

3.1. Les barrières physiques

La peau et les muqueuses qui la prolongent sont des parois qui séparent l'intérieur de l'organisme de l'extérieur. Elles sont par conséquent constamment en contact avec l'extérieur. La peau recouvre l'ensemble du corps alors que les muqueuses, peu visibles, tapissent les cavités internes de l'organisme telles que les tractus respiratoire, digestif, reproducteur et urinaire. La peau et les muqueuses sont les premières zones à être en contact avec des toxiques potentiels. Elles servent régulièrement de zones d'échanges entre l'extérieur et l'intérieur de l'organisme. C'est le cas des échanges gazeux au niveau des poumons ou de l'absorption des nutriments dans l'intestin. C'est pourquoi elles se doivent aussi d'assurer les premières défenses de l'organisme empêchant ainsi le toxique d'entrer à l'intérieur des tissus. La peau et les muqueuses sont d'abord constituées de cellules

épithéliales qui sont reliées entre elles par des jonctions serrées et qui reposent sur une lame basale, assurant le maintien et l'adhésion au tissu conjonctif (nommé aussi chorion) (Figure 2). Du fait de la présence de jonctions serrées entre les cellules épithéliales et dans certains cas, de la présence de couches successives de cellules, les muqueuses restent imperméables à la majorité des pathogènes.

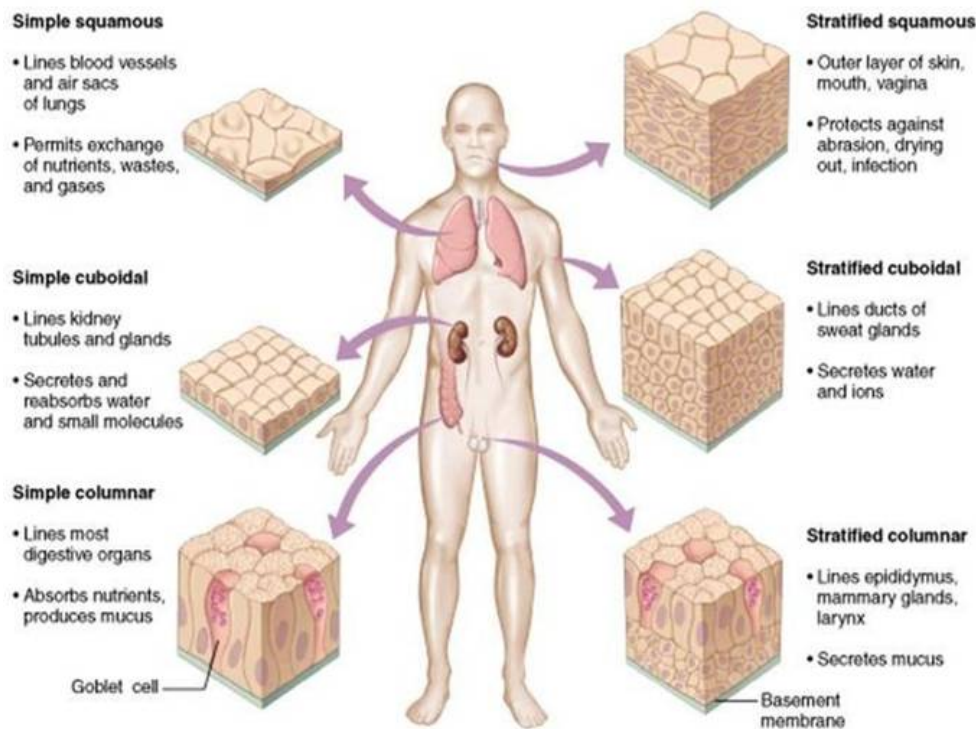


Figure 2. Les différents épithéliums recouvrant la surface et les cavités de l'organisme. D'après Cummings B. – Addison Wesley Longman Inc. 2001.

L'épithélium est lui-même parfois protégé grâce à la présence de mucus à sa surface apicale. Celui-ci est sécrété par exocytose via des cellules spécialisées présentes au niveau de l'épithélium qualifiées de « cellules caliciformes » (ou « cellules à gobelet ») (Figure 3). Le mucus est un gel viscoélastique qui se présente comme un film fin qui est composé de glycoprotéines telles que la mucine et forme ainsi un réseau capable de piéger les agents toxiques afin de faciliter leur expulsion à l'extérieur de l'organisme. Il remplit de nombreuses

fonctions protectrices contre les stress mécaniques et réduit considérablement la possibilité de contact entre l'épithélium et des agents toxiques qu'il s'agisse d'une simple poussière, de bactéries, de virus ou d'agents allergènes. (Rogers, 2007)

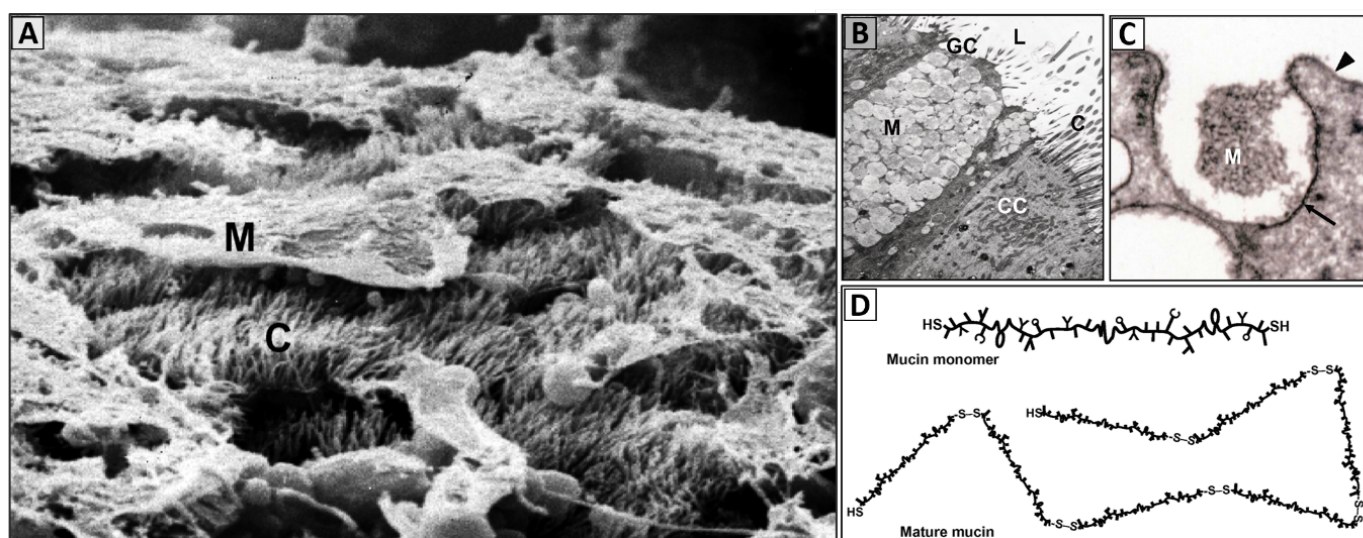


Figure 3. Aspect du mucus sécrété par les cellules caliciformes. A- Observation par microscopie électronique de bronches humaines (M= Mucus ; C = Cils). B- Cellules caliciformes contenant du mucus (M = Mucus contenu dans des granules ; L = Lumière ; C Cils ou microvilosités ; CG = Cellules à gobelet). C- Mucus (M) sécrété par les cellules caliciformes. D- Représentation schématique de la mucine formant un réseau de mucus. D'après Rogers R.F. – *Respir Care*. 2007.

3.2. Les substances chimiques

Comme vu précédemment, les muqueuses et la peau sont capables de sécréter des substances telles que le mucus et n'ont donc pas seulement un rôle de barrière physique. Elles jouent aussi un rôle actif pour neutraliser le pathogène en libérant de nombreuses substances toxiques. Ces sécrétions sont communément connues sous le nom de larmes, salive, sueur, sébum, sucs gastriques, sécrétions respiratoires etc. Elles jouent un rôle antibactérien soit par acidification du pH, soit par la présence d'acides gras (Nakatsuji et al., 2010) ou de lysozyme.

Les muqueuses sont également capables de sécréter des peptides antimicrobiens regroupés sous le nom de défensines. (Bals, 2000; Selsted and Ouellette, 2005) De plus, lorsque les cellules épithéliales sont endommagées, elles libèrent de l'interféron (INF) dont les rôles principaux sont d'augmenter les défenses anti-virales ou antibactériennes des cellules saines avoisinantes et de recruter des cellules immunitaires au niveau du lieu de l'infection.

La circulation sanguine possède aussi des effecteurs chimiques libres tels que le système du complément. Celui-ci est un facteur déterminant du système immunitaire non-spécifique. Il représente plus de trente protéines du plasma qui conduisent en cas de besoin à la formation de pores au niveau des membranes des pathogènes induisant ainsi leur lyse. Les pores résultent de la polymérisation des protéines C9, C5b, C6, C7 puis C8 du complément, l'ensemble est appelé complexe d'attaque membranaire (CAM). Le système du complément peut également générer de puissants médiateurs pro-inflammatoires via l'activation des cellules immunitaires et d'opsoniser des pathogènes (via par exemple la protéine C3b du complément) dans le but de favoriser leur phagocytose par les cellules phagocytaires (Figure 4). (Dunkelberger and Song, 2010)

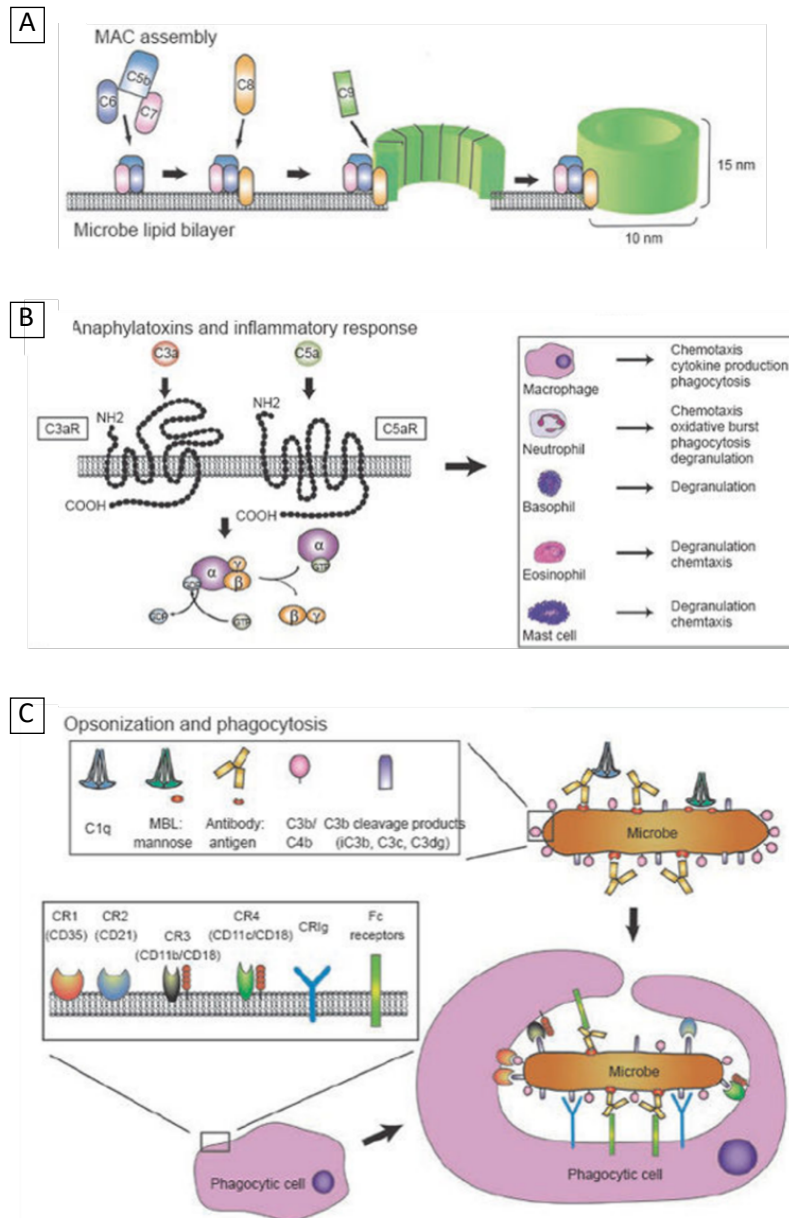


Figure 4. Le complément et son rôle dans l'immunité innée. A- Le complément formant le complexe d'attaque membranaire. B- Rôle du complément dans l'activation des cellules immunitaires innées. C- Phénomène d'opsonisation favorisant la phagocytose des pathogènes par les cellules phagocytaires. D'après Dunkelberger J.R. – Cell Res. 2010.

Les cellules de l'immunité innée et les médiateurs chimiques collaborent étroitement entre eux car de nombreux médiateurs chimiques ont un rôle dans le recrutement et l'activation des cellules immunitaires au niveau du site infectieux. Les cellules immunitaires sont quant à elles, capables de sécréter des agents bactéricides ainsi que de nombreuses

molécules pro- inflammatoires (cytokines) afin d'attirer un plus grand nombre de cellules immunitaires.

3.3. Descriptions des différents types cellulaires de l'immunité innée

Presque toutes les cellules immunitaires sont issues de cellules souches hématopoïétiques présentes dans la moelle osseuse. Les cellules de l'immunité innée proviennent principalement de la lignée myéloïde qui regroupe différents types cellulaires tels que les granulocytes (polynucléaires neutrophiles, basophiles et éosinophiles), les mastocytes, les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques. Les lymphocytes Natural Killer (NK) sont quant à eux issus de la lignée lymphoïde (Figure 5). Chacun de ces types cellulaires se distingue par sa morphologie mais surtout par son implication dans la lutte antimicrobienne. En effet, certaines cellules sont connues pour jouer préférentiellement un rôle antimicrobien soit en détruisant la cellule infectée soit par dégranulation de molécules microbicides dans le milieu extracellulaire (lymphocytes NK et polynucléaires éosinophiles). (Weller and Spencer, 2017) D'autres ont un rôle plus centré sur l'initiation et la régulation de l'inflammation (polynucléaires basophiles et mastocytes). (Devouassoux, 2000) Enfin, les cellules telles que les monocytes/macrophages et les polynucléaires neutrophiles, sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) capables de phagocyter l'agent infectieux pour ensuite présenter les peptides antigéniques à leur surface, cela afin de servir d'intermédiaires entre la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative. Ces cellules ont aussi un rôle essentiel dans la régulation de la réponse inflammatoire. (Gougerot-Pocidallo et al., 2006; Selders et al., 2017; Wright et al., 2010) Les cellules dendritiques sont principalement des CPA.

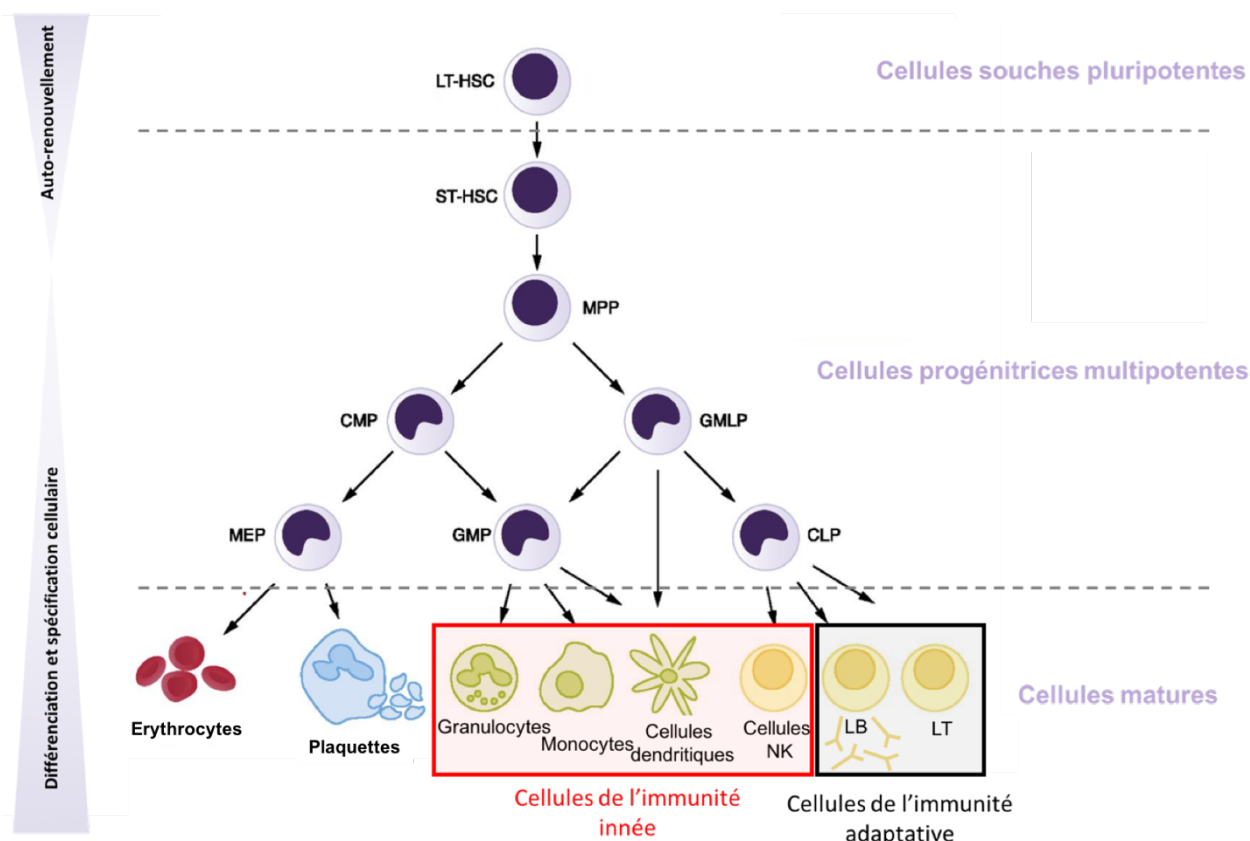


Figure 5. Schéma simplifié de l'hématopoïèse. Adapté de Blank U. et Karlsson S. – Blood 2015 et Stuart H. – Cell 2008.

3.4. Reconnaissance de l'agent infectieux par les cellules de l'immunité innée

Les cellules de l'immunité innée possèdent une diversité de récepteurs appelés « récepteurs de reconnaissance aux motifs moléculaires » (PRRs). Ils permettent aux cellules immunitaires de reconnaître un large spectre de motifs moléculaires associés à des signaux de danger. Les PRRs présents à la surface des cellules immunitaires sont soit des récepteurs aux sucres bactériens, soit des récepteurs de type Toll (TLRs). Les motifs reconnus comme dangereux sont regroupés sous le nom de « motifs moléculaires associés aux pathogènes » (PAMPs). Parmi ces PAMPs produits ou portés par des agents pathogènes on retrouve les lipopolysaccharides (LPS), les lipoprotéines, les glycolipides, les acides nucléiques viraux ou

bactériens, etc. La modification de la surface ou la sécrétion de produits libérés par des cellules altérées tels que par exemple les fragments d'ADN génomiques et mitochondriaux, les heat shock protéines (HSP), des composés de la matrice extracellulaire (MEC), des composés portés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I), etc. peuvent être également reconnues par les PRRs. Ces composés sont appelés DAMPs pour « motifs moléculaires associés aux dégâts » (Figure 6). (Rosin and Okusa, 2011; Schaefer, 2014; Srikrishna and Freeze, 2009) Après reconnaissance des divers signaux de danger, les cellules de l'immunité activent des mécanismes de phagocytose et/ou initient la réaction inflammatoire dans le but de neutraliser rapidement l'infection.

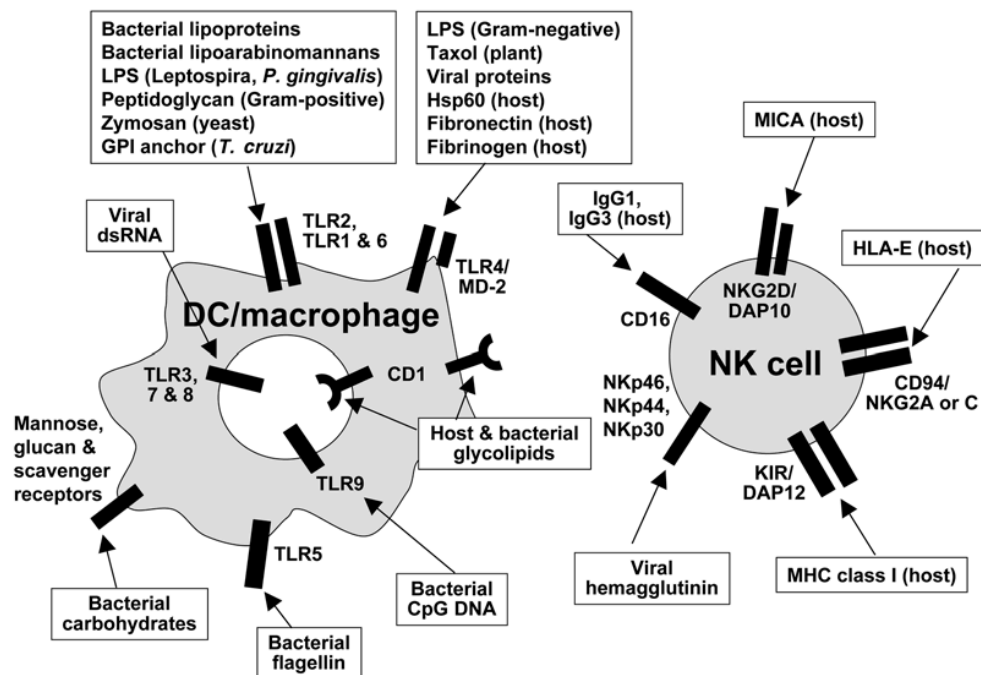


Figure 6. Présentation non exhaustive des récepteurs de signaux de danger portés par les cellules du système immunitaire inné. D'après O'Farrelly et Doherty D.G. – A short Primer on Fundamental immunology - Liver immunology. 2007.

3.5. Les différentes étapes de la réponse inflammatoire

Toute blessure engendrée par des infections, des plaies, des allergies ou des brûlures induit une inflammation. Ce phénomène observé et vécu par chacun de nous a été décrit pour la première fois il y a environ 2000 ans par le médecin Aulus Cornelius Celsus qui a identifié quatre signes cardinaux de l'inflammation : rougeur, gonflement, douleur et chaleur. Un siècle plus tard le médecin Claude Galien ajouta la notion de « perte de fonctions » (Rather, 1971). Ce n'est qu'en 1846 et 1867 que les médecins Augustus Volney Waller (Jarcho, 1971) et Julius Friedrich Cohnheim (Heidland et al., 2009) apportèrent des descriptions supplémentaires sur le déroulement de l'inflammation. Ils décrivirent grâce à la microscopie une dilatation des vaisseaux sanguins, un afflux de sang augmenté et un recrutement de leucocytes plus important au niveau des zones lésées. Aujourd'hui, bien que tous les mécanismes de l'inflammation demeurent complexes et difficiles à élucider, de nombreuses découvertes ont apporté des connaissances supplémentaires quant au déroulement de la réaction inflammatoire. Généralement, celle-ci est organisée en trois grandes étapes faisant intervenir des médiateurs chimiques et cellulaires précis. Les différentes étapes qui suivent l'apparition d'une lésion sont les suivantes : l'hémostase, les phases inflammatoires précoces et tardives et la phase de réparation tissulaire. (Eming et al., 2014)

3.5.1. L'hémostase

De 0 à quelques heures après l'apparition d'une plaie, les premiers acteurs de la réaction inflammatoire autres que les cellules lésées sont les plaquettes. (Ali et al., 2015; Rondina et al., 2013) Ces dernières s'agglomèrent autour des protéines libres de la matrice extracellulaire

(ex : collagène) pour colmater la plaie et réduire ainsi le flux sanguin. Les risques d'hémorragie et d'infection sont alors réduits. Par la suite, les plaquettes libèrent des « granules » riches en histamine, en sérotonine, en facteurs de croissance et en cytokines, etc. Ces molécules participent aux phénomènes inflammatoires comme la vasodilatation, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et l'angiogenèse. Ces médiateurs ont un effet chimio-attractif et activent les cellules immunitaires circulantes du sang vers le site lésé. Éveillée par la présence de PAMPs et de DAMPs, la faible portion de cellules immunitaires résidentes comme les mastocytes et les macrophages activent des voies de signalisation intracellulaires telles que les facteurs de transcription NF- κ B et MAP kinases. Ces signaux sont nécessaires à l'expression d'un large nombre de gènes produisant de nombreuses cytokines et chimiokines pro-inflammatoires ainsi que divers peptides antimicrobiens.

3.5.2. L'inflammation

L'étape d'inflammation se déroule approximativement entre 1 et 5 jours post-lésion. Les premières cellules immunitaires circulantes à infiltrer la plaie sont les polynucléaires neutrophiles. Pour ce faire, ils adhèrent aux cellules endothéliales grâce à l'expression de molécules d'adhésion (ICAM, VCAM et les e-sélectines) à leur surface. Les neutrophiles peuvent ainsi traverser la barrière endothéliale et sortir des vaisseaux sanguins par extravasation et migrer dans le tissu jusqu'au site lésé. Les chimioattractants relargués à la fois par les cellules lésées, les plaquettes et les cellules immunitaires résidentes orientent les neutrophiles jusqu'à la lésion. Les neutrophiles représentent 60% des leucocytes du sang et occupent une place particulièrement importante dans l'étape précoce de l'inflammation (1 à 3 jours post-lésion). Les neutrophiles participent au maintien et à l'amplification de

l'inflammation en produisant des cytokines telles que le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-12 etc. En revanche, leur fonction principale est d'éliminer la majorité des particules et microorganismes présents sur le site inflammatoire via des mécanismes de phagocytose qui consistent à ingérer et digérer les microorganismes dans des vésicules riches en hydrolases et en métabolites oxygénés. L'élimination des pathogènes se fait aussi via la libération de radicaux libres oxygénés toxiques (tels que les ROS, le NO, l'H₂O₂, etc.) à l'extérieur de la cellule. Ceci crée cependant des dommages additionnels au niveau des tissus qui compliquent la réparation tissulaire ultérieure. A cette étape de l'inflammation, du fait de leur courte durée de vie (environ 24h), les neutrophiles s'accumulent en grand nombre au niveau de la lésion. Les monocytes circulants différenciés en macrophages au niveau des tissus atteignent la plaie environ 3 jours post-lésion. Ils ont un rôle essentiel dans le maintien du processus inflammatoire (macrophages de type M1 sécrétant de TNF- α , d'IL-1 β , d'IL-6, d'IL-12, etc.) et comme les neutrophiles, les macrophages inhibent l'infection via les mécanismes de phagocytose et via la sécrétion de radicaux libres oxygénés dans le milieu extracellulaire. Cependant, contrairement aux neutrophiles, les macrophages interviennent aussi dans la phase tardive de l'inflammation en initiant l'arrêt du processus inflammatoire et en participant à l'élimination de l'excès de neutrophiles. En effet, les macrophages sont capables d'induire l'apoptose des neutrophiles et de les éliminer par phagocytose. (Koh and DiPietro, 2011; Landén et al., 2016) Ce phénomène appelé efferocytose semble orienter la polarisation des macrophages en macrophages « anti-inflammatoires » de type M2 sécrétant de cytokines tels que l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13, et le TGF- β afin d'initier un processus de réparation tissulaire (Figure 7).

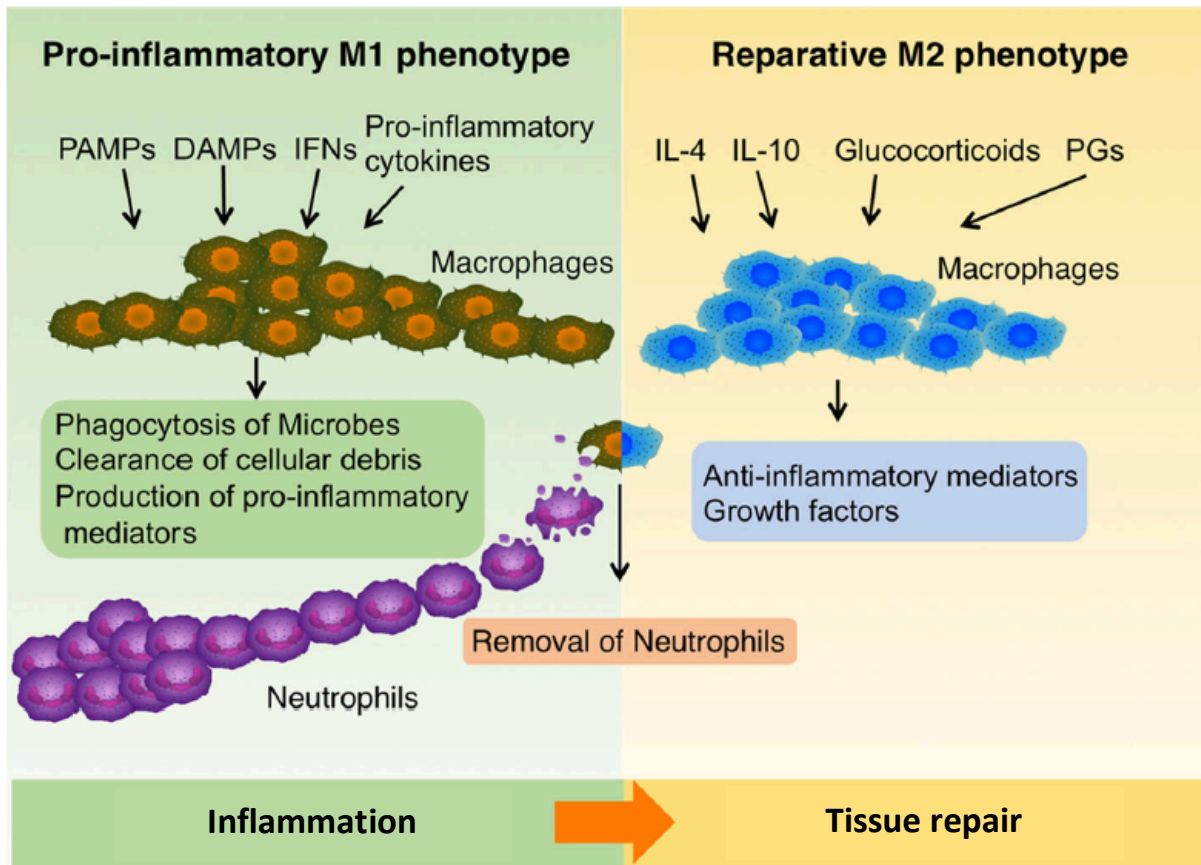


Figure 7. Principaux acteurs de l'inflammation (de l'initiation par les neutrophiles à la résolution par les macrophages). D'après Landén N.X. et al – Cell. Mol. Life Sci. 2016.

3.5.3. La réparation tissulaire

Cette étape s'étale sur une période d'environ deux semaines après l'inflammation et elle est caractérisée par une élimination de l'ensemble des débris résiduels. Les débris comprennent les tissus morts, les corps apoptotiques, les pathogènes neutralisés, le sang coagulé, etc. Cette étape nommée détersion est essentielle à la cicatrisation et est principalement effectuée par les macrophages. Il s'ensuit une ré-épithélialisation de la plaie grâce à la migration et à la prolifération des cellules constituant le tissu lésé (ex : les kératinocytes pour la peau). Ce phénomène est principalement dû à la levée de l'inhibition de contact entre les cellules et aux multiples signaux tels que des cytokines et des facteurs de

croissance. En parallèle, les composants de la matrice extracellulaire (collagène, fibrine et fibronectine) vont être à nouveau synthétisés par différents types cellulaires tels que les fibroblastes. La mise en place d'un nouveau système vasculaire est également observée.

4. Le système immunitaire adaptatif

L'étape d'inflammation initiée par le système immunitaire inné s'accompagne de l'activation des cellules de l'immunité adaptative. Ces dernières vont apporter une réponse plus ciblée et spécifique à l'antigène reconnu ainsi qu'une réponse mémoire qui facilitera l'élimination de l'agent infectieux lorsque celui-ci sera à nouveau en contact avec l'organisme. Par conséquent, les cellules de l'immunité adaptative jouent un rôle essentiel et complémentaire à celles de l'immunité innée. L'activation de l'immunité adaptative débute avec les CPA (cellules dendritiques, macrophages et neutrophiles) qui présentent les antigènes (Ag) par l'intermédiaire du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) aux lymphocytes T (LT). Les LT sont les premières cellules de l'immunité adaptative à être activées par le complexe CMH-peptide antigénique. Celui-ci est reconnu spécifiquement par les récepteurs de surface nommés « récepteurs des cellules T » (TCR). Dans 95% des cas, ceux-ci sont constitués de deux chaînes peptidiques de type α et β et dans les 5% des cas restant, de chaînes de type γ et δ . Chacune de ces chaînes comporte un domaine variable reconnaissant l'Ag présenté par les CPA et un domaine constant rattaché à la membrane plasmique par une partie transmembranaire. Le domaine variable présente une grande diversité grâce à la recombinaison des gènes V (variable), D (diversité) et J (jonction) pour les chaînes β et δ et des gènes V et D pour les chaînes α et γ . Le gène C (constant) code pour les domaines constants du TCR. La multitude de gènes V,D et J et les réarrangements qui ont lieu au cours

de la maturation des chaînes peptidiques augmentent considérablement la spécificité et la diversité du répertoire de reconnaissance des antigènes présentés par le CMH (Figure 8). Cette diversité de combinaison pourrait théoriquement atteindre jusqu'à 10^{15} de types de TCR. (Davis and Bjorkman, 1988) Cependant la taille réelle mesurée du répertoire atteint plutôt 10^8 récepteurs différents. (Arstila, 1999)

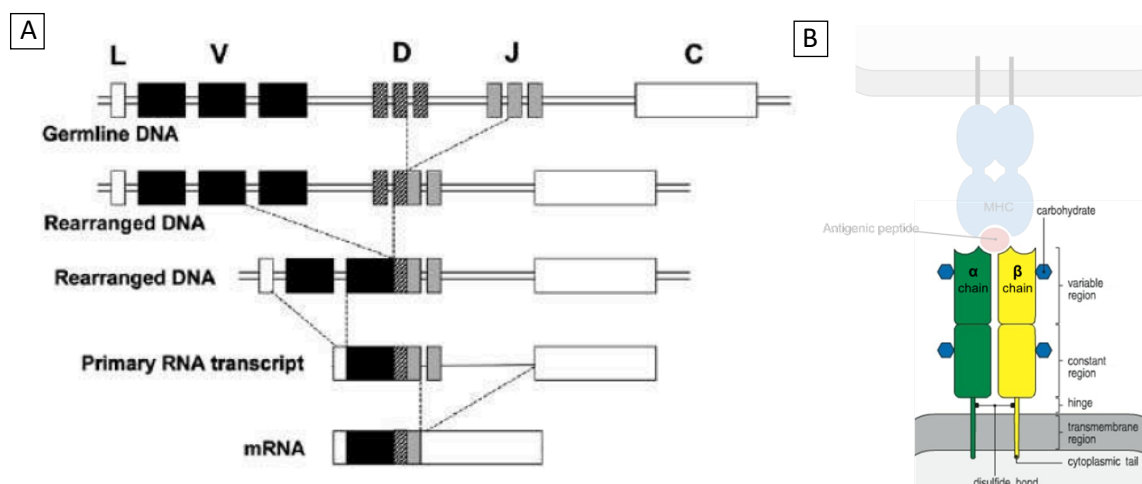


Figure 8. Description du TCR. A-Réarrangement des gènes V-D-J codant pour les chaînes des récepteurs lymphocytaires. B- Schéma du TCR et reconnaissance antigénique. D'après O'Farrelly et Doherty D.G. – *A short Primer on Fundamental immunology - Liver immunology*. 2007. Et Elsevier Science / Garland publishing 1999.

Les CPA présentent les peptides antigéniques via le CMH de type II reconnu par les LT CD4 naïfs. Cette reconnaissance ainsi que la présence de signaux de stimulation complémentaires créent une synapse immunologique entre ces deux cellules qui est nécessaire à la stimulation des LT CD4. Les LT CD4 se différencient ensuite de manière distincte en fonction des cytokines sécrétées par les CPA. L'IL-12, L'INF- γ et les TNF- β induisent une différenciation en lymphocytes T auxiliaires 1 (LT H1) nécessaires à l'activation de l'immunité à médiation cellulaire gérée par les lymphocytes T cytotoxiques (LT CD8) qui, eux même doivent être également activés par les peptides antigéniques issus du CMH de type 1. En revanche, L'IL-4 induit la différenciation des LT CD4 en LT H2 qui jouent un rôle dans

l'activation des lymphocytes B (LB) capables de sécréter des immunoglobulines (Ig) plus connues sous le nom d'anticorps (Ac) et qui sont responsables de l'immunité à médiation humorale (Figure 9).

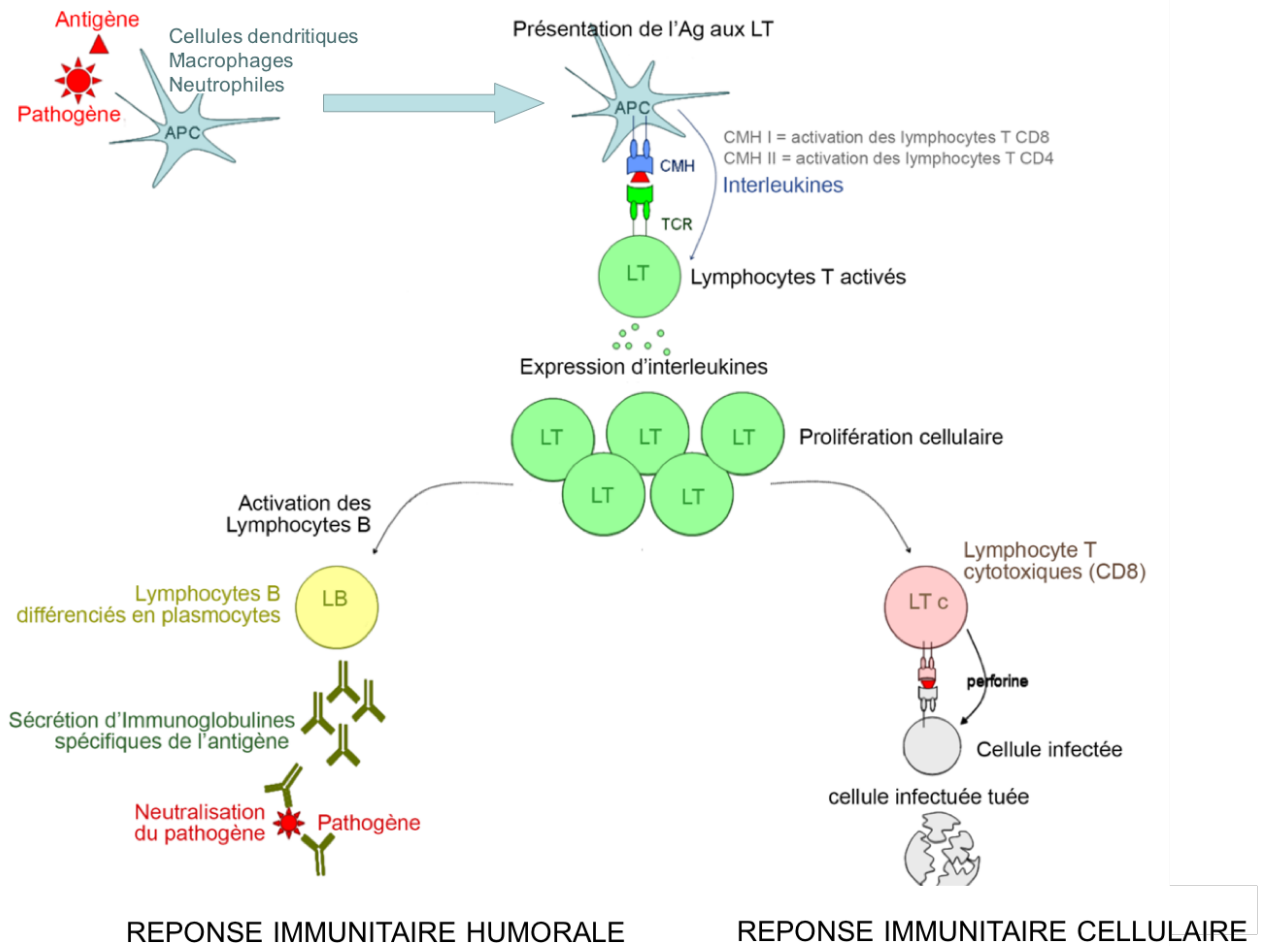


Figure 9. Représentation simplifiée de l'activation du système immunitaire adaptatif.

5. Le macrophage : une cellule polyvalente dans le système immunitaire inné

5.1. Découverte des macrophages, origine et évolution

La notion de cellules phagocytaires a été mise en évidence en 1866 par le zoologiste et pathologiste Elie Metchnikoff. Au cours de sa carrière, ses travaux menés sur les vers marins turbellariés ont permis de mettre en évidence l'existence de cellules individuelles capables d'ingérer et de stocker des nutriments à l'intérieur de la cellule. En revanche, ce n'est qu'à partir de 1883 via ses travaux sur des larves d'étoiles de mer transparentes que Metchnikoff valide la présence de cellules motiles programmées pour lutter contre des agressions extérieures. Ces cellules sont capables de se regrouper vers les éléments étrangers afin de les ingérer. Mettant ainsi en lumière la notion de cellule phagocytaire ou de phagocyte du grec « *phagein* », manger et « *kutos* », cellule (Figure 10A). Enfin, c'est entre les années 1884 et 1887 que ses études sur les vertébrés lui permirent de montrer la présence de « macrophages » et de « microphages » dans l'organisme capables de lutter contre des bactéries pathogènes via des mécanismes de phagocytose (Figure 10B). (Beck and Habicht, 1996; Kaufmann, 2008) L'ensemble de ces découvertes lui valurent un prix Nobel de médecine en 1908 partagé avec Paul Ehrlich dont les recherches portaient davantage sur le système immunitaire adaptatif.

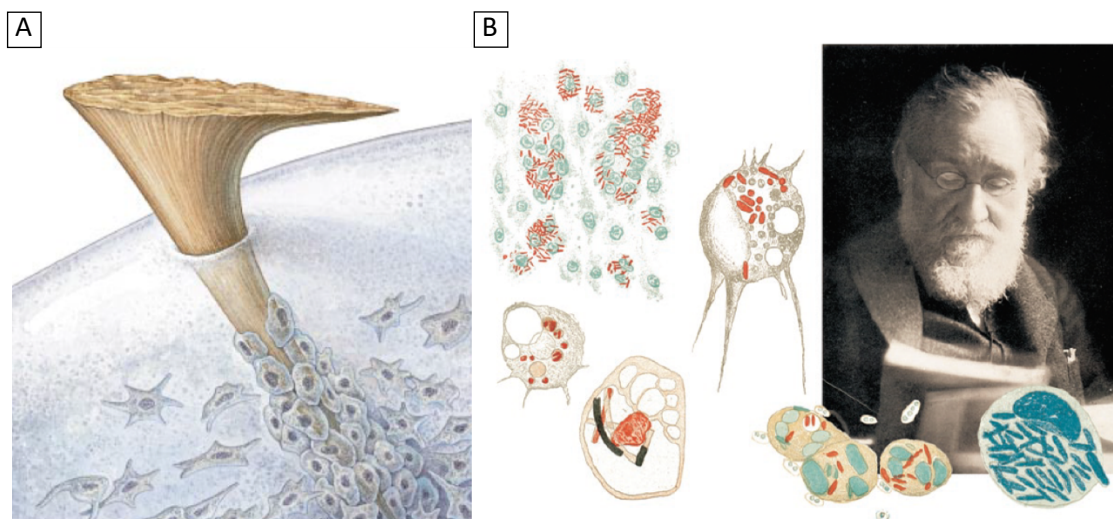


Figure 10. Découverte des macrophages par E. Metchnikoff. A- Phagocytes essayant d'englober une épine de rose insérée dans une larve d'étoile de mer. D'après Beck G. et Habitch G.S – *Sci. Am.* 1996. B- E. Metchnikoff et ses dessins de bactéries phagocytées par des macrophages et des microphages d'après Kaufman S.H.E. – *Nat. Immunol.* 2008.

5.2. Les fonctions du macrophage chez l'homme

Les recherches récentes menées sur la compréhension du système immunitaire ont permis de mettre en valeur le rôle central des macrophages issus des monocytes circulants du sang dans le bon fonctionnement des systèmes immunitaires inné et adaptatif ainsi que leur rôle essentiel dans l'homéostasie tissulaire. La sensibilité des macrophages aux divers signaux émis par leur environnement leur permet de se polariser suivant une large gamme de possibilités en fonction des besoins de l'organisme. Dans le cadre d'une infection et suite aux stimulations par les PAMPs (comme par exemple le LPS), par l'INF- γ et le TNF- α , ils peuvent se différencier en macrophages de type M1 dits « inflammatoires ». Les M1 ont un rôle primordial dans la lutte anti-microbienne, l'initiation et l'amplification de la réponse inflammatoire. Dans le cas de stimuli autres que ceux mentionnés précédemment, les macrophages se polarisent préférentiellement vers la voie M2 dite « alternative ». Celle-ci est partagée en trois sous-catégories : la polarisation en macrophages de type M2a via l'Il-4 et l'Il-

13, de type M2b via les ligands TLR, les complexes immuns et l'IL-1R, et de type M2c via l'IL-10 et le TGF- β . (Mosser and Edwards, 2008) La voie alternative permet de moduler une réponse de type réparatrice ou anti-inflammatoire (Figure 11A). Enfin, bien que les macrophages soient classés en deux états distincts voire opposés, la polarisation M1-M2 doit être imaginée comme un continuum d'états fonctionnels rarement figés (Figure 11B). (Mosser and Edwards, 2008)

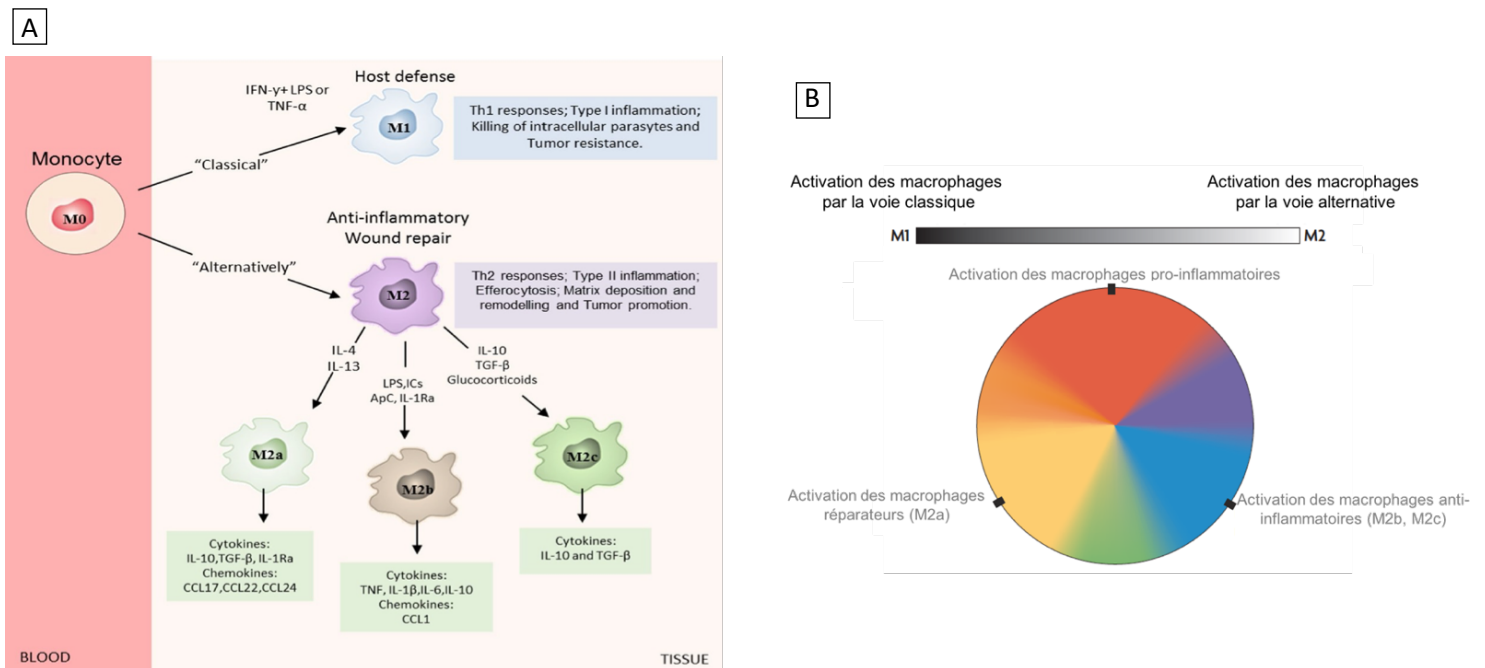


Figure 11. Polarisation des Macrophages. A- Représentation simplifiée de l'activation des macrophages et des différentes possibilités de polarisation en fonction des stimuli reçus. M1, macrophage inflammatoire ; M2 (comprenant les M2a, M2b et les M2c), macrophages anti-inflammatoire. La sécrétion de cytokines pro- ou anti-inflammatoire par les macrophages varie ensuite en fonction de leur polarisation. B- Spectre de possibilités d'activation des macrophages. D'après Mosser Navegantes K.C. J. – *Transl. Med.* 2017. Et Edwards J.P. – *Nat. Rev. Immunol.* 2008.

Sans infection évidente, les macrophages sont présents naturellement dans presque tous les tissus de l'organisme (Figure 12A). Ils sont donc qualifiés de « macrophages résidents » et assurent une veille immunologique en particulier au niveau des organes constamment en contact avec les éléments extérieurs comme la peau, l'intestin, les poumons,

le foie, etc.). (Murray and Wynn, 2011) Ces populations de macrophages logées dans les différents organes ne sont pas identiques et ne proviennent pas uniquement des monocytes circulants du sang. En effet, les macrophages résidents sont issus de trois origines distinctes en lien avec le stade de développement embryonnaire : le sac vitellin, les organes tels que la rate et le foie fœtal, et enfin la moelle osseuse lorsque cette dernière commence à se développer. (Gomez Perdiguero et al., 2014) Les macrophages résidents peuvent séjourner pendant toute notre vie dans les tissus et jouent de nombreux rôles spécifiquement adaptés aux tissus ou aux organes dans lesquels ils se situent. (Ginhoux and Guilliams, 2016) Le profil des populations de macrophages est influencé par les fonctions physiologiques et les variations du microbiote ainsi que par les besoins différents en nutriments et métabolites de chaque organe. Chaque profil est identifiable selon les phénotypes (marqueurs) de surface exprimés (Figure 12B). (Mowat et al., 2017)

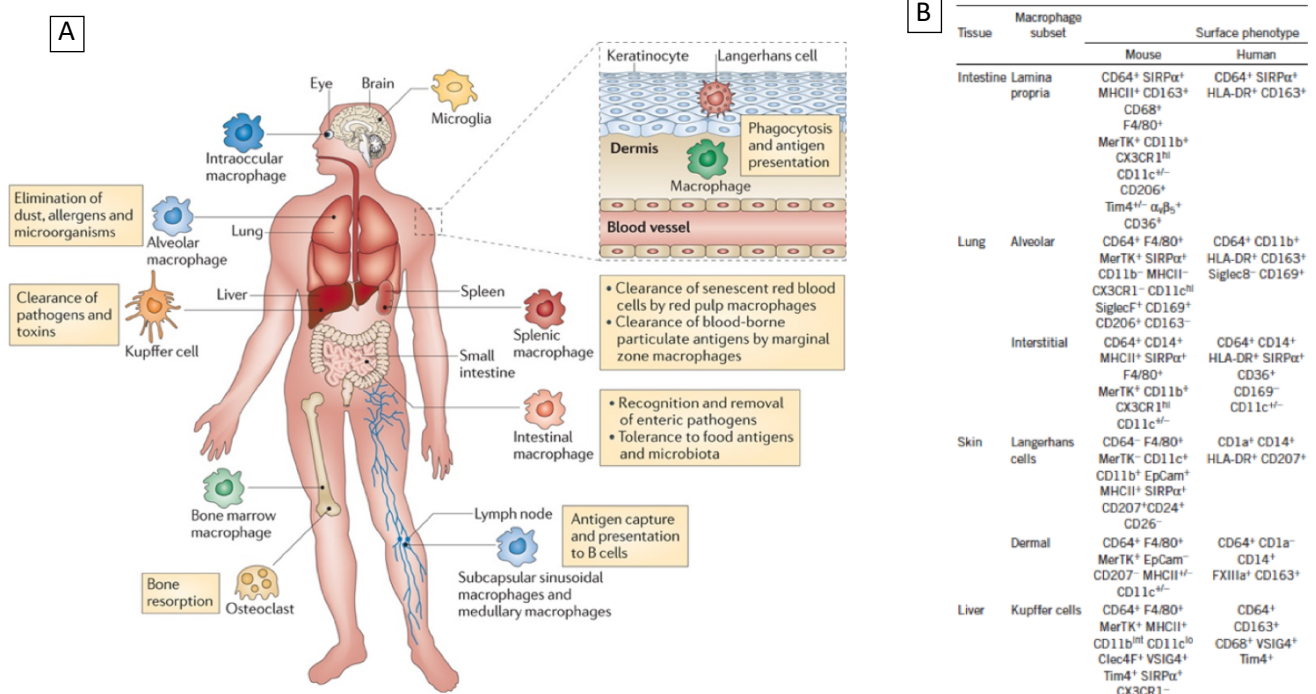


Figure 12. Les différents types de macrophages existants. A- Distribution des différents types de macrophages tissulaires ainsi que leurs principales fonctions. B- Marqueurs de surface des principaux macrophages résidents. D'après Mowat A.M. – Nat. Med. 2017.

Les macrophages résidents jouent davantage un rôle de tolérance (activité régulatrice ou anti-inflammatoire) vis-à-vis de l'extérieur (notamment en ce qui concerne le microbiote). Ils privilégient l'intégrité du tissu via l'élimination des cellules mortes et via la stimulation du processus de remodelage tissulaire afin d'éviter le développement d'inflammations chroniques endommageant les fonctions physiologiques de l'organe. (Mowat et al., 2017)

Dans le cas de l'intestin et des alvéoles, les macrophages résidents ne répondent que modérément aux stimuli initiés par les PRR. Par conséquent, ils sécrètent peu de molécules inflammatoires (oxyde nitrique, espèce réactive à l'oxygène et cytokines pro-inflammatoires). Ils participent activement à l'élimination des pathogènes principalement par phagocytose et par l'activation du système immunitaire adaptatif via les lymphocytes T (LT CD4+, LT reg, etc.). Ils sécrètent de l'IL-10 afin de favoriser un environnement faiblement inflammatoire et jouent un rôle dans les renouvellements tissulaires fréquents. En cas d'infection plus prononcée, les macrophages résidents recrutent des macrophages M1 provenant des monocytes circulants enclenchant ainsi une réponse inflammatoire plus importante. Au niveau des poumons, il existe plusieurs populations de macrophages. Les premiers, les macrophages alvéolaires sont connus pour modérer la production de surfactant qui recouvre les alvéoles et limiter la réactivité des cellules épithéliales vis-à-vis de l'extérieur. Les seconds sont situés dans l'espace interstitiel et participent à la régulation de la prolifération des fibroblastes. Dans la peau, les macrophages sont également partagés en deux sous-populations. Au niveau de l'épiderme, les cellules de Langerhans participent à la tolérance vis-à-vis du microbiote et leurs caractéristiques sont proches de celles des cellules dendritiques (migration et présentation des antigènes au niveau des ganglions lymphatiques). Les macrophages du derme ont quant à eux des caractéristiques phénotypiques très variées. Enfin, au niveau du foie, les cellules de Kupffer ont une plasticité très importante puisqu'elles doivent moduler leur réponse entre la

tolérance vis-à-vis du microbiote, des nutriments apportés par le sang (rôle immunosuppresseur) et leur capacité à réagir rapidement contre la propagation de pathogènes pour éviter une dissémination systémique. Ces macrophages sécrètent préférentiellement de l'IL-10 et du TGF- β mais ils jouent un rôle actif dans la réponse antimicrobienne en répondant rapidement aux stimuli des PRR et en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-1 β et le TNF. Les cellules de Kupffer participent aussi activement au recyclage des érythrocytes ainsi qu'au métabolisme du fer nécessaire à notre organisme. La gestion du fer leur confère des propriétés immunologiques particulières puisqu'elles jouent aussi un rôle important contre les pathogènes dépendant du fer en les privant de cet élément. De plus, la rétention du fer par les macrophages faciliterait leur polarisation en macrophages de type M1 pro-inflammatoire. ([Zanganeh et al., 2016](#))

5.3. Les mécanismes de phagocytose

La phagocytose définit les phénomènes d'ingestion par les cellules de particules de grande taille allant d'une taille supérieure ou égale à 500nm jusqu'à plusieurs dizaines de micromètres. Pour ce faire, les mécanismes mis en place sont similaires à ceux de l'endocytose et de la pinocytose qui permettent la capture de particules de plus petite taille, de macromolécules, de virus, de fluides, etc. Cependant, contrairement aux autres mécanismes, la phagocytose dépend uniquement du remodelage du cytosquelette d'actine. ([Gordon, 2016](#))

D'une manière générale, la phagocytose se déroule en trois grandes étapes : la phase d'adhésion de la particule, la phase d'internalisation et la phase de digestion. La première étape consiste en la reconnaissance de la particule via la présence d'une multitude de récepteurs spécifiques des ligands. Cette reconnaissance induit une modification de la

conformation du cytosquelette afin d'engager la seconde étape d'internalisation via un processus d'invagination pour aboutir à la formation d'une vacuole appelée phagosome. Celui-ci fusionne avec d'autres vésicules comme les endosomes, les lysosomes, les produits issus du réticulum endoplasmique et/ou de l'appareil de Golgi dans le but de former un phagosome secondaire, de pH acide et riche en enzymes digestives (hydrolases) appelé phagolysosome. Cette troisième et dernière étape est nécessaire à la dégradation de la particule et à la présentation antigénique (Figure 13).

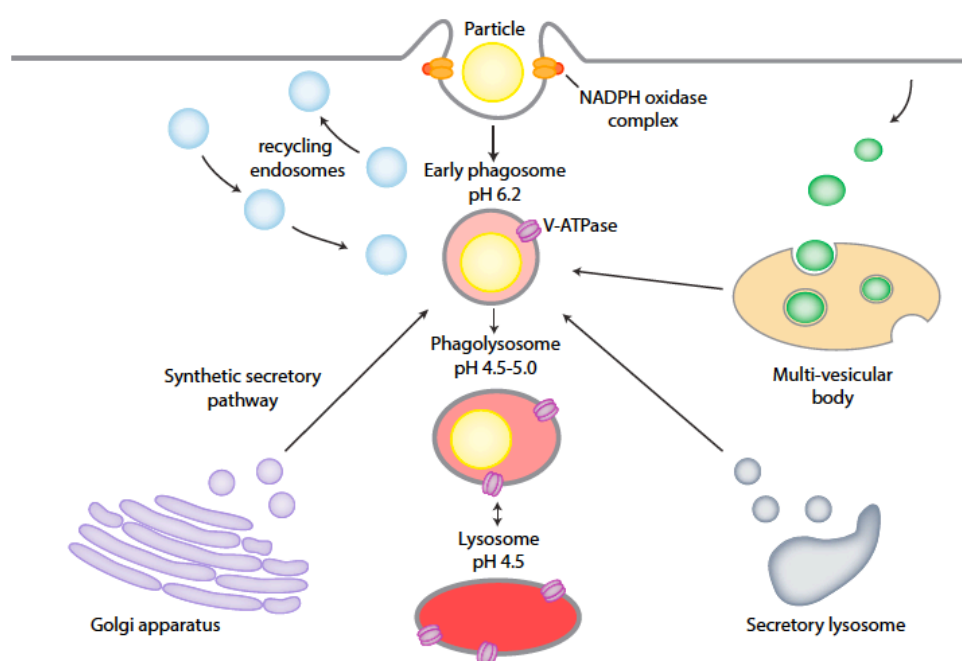


Figure 13. Déroulement de la phagocytose. L'internalisation d'une particule exogène résulte d'un ensemble de mécanismes de fusion et de fission des membranes plasmiques avec d'autres vésicules intracellulaires permettant l'acidification et la maturation du phagosome en phagolysosome. D'après Gordon S. – *Annu. Rev. Immunol.* 1999.

Chez les organismes primitifs, la phagocytose est davantage associée à la recherche de nutriments alors que chez les organismes plus évolués, comme la plupart des métazoaires, la phagocytose est nécessaire à l'élimination des pathogènes, ainsi qu'au maintien de l'homéostasie tissulaire via l'efferocytose. Les macrophages, les cellules dendritiques et les

neutrophiles sont considérés comme des phagocytes « professionnels » même si d'autres cellules dites « non-professionnelles » sont aussi capables de phagocyter en plus d'assurer leurs fonctions principales. Il s'agit des cellules épithéliales et des fibroblastes (les cellules épithéliales de la vessie et de la thyroïde sont par exemple connues pour être capables de phagocyter les érythrocytes). (Aderem and Underhill, 1999; Rabinovitch, 1995) Cette distinction entre les phagocytes « professionnels » et « non-professionnels » a été mise en évidence dans les années 1970 par Michel Rabinovitch à la suite d'expériences prouvant que seuls les phagocytes professionnels étaient capables de reconnaître des particules opsonisées par des Ig grâce à leurs récepteurs membranaires Fc. (Rabinovitch, 1995) Cette reconnaissance, leur confère une capacité phagocytaire plus efficace dirigée contre un plus large panel de particules. De plus, contrairement aux phagocytes « non-professionnels », ils sont capables d'initier une réponse antibactérienne en sécrétant des molécules microbicides (ROS, NO) produites à la suite du processus de phagocytose.

Chez les macrophages, la phagocytose mise en place est donc le premier moyen d'élimination des pathogènes ou des cellules sénescents. Ce mécanisme associe de nombreux types de récepteurs membranaires ayant des effets antagonistes, additifs ou synergiques pour ensuite, selon les récepteurs activés, orienter sur le caractère inflammatoire ou non-inflammatoire. Les récepteurs les plus connus enrôlés dans le processus de phagocytose sont les récepteurs des fragments Fc des Ig (FcR), les récepteurs du complément (RC) et les lectines qui comprennent notamment les récepteurs mannose et nombreux récepteurs éboueurs. (Aderem and Underhill, 1999)

5.3.1. Le récepteur Fc (FcR)

Les FcR reconnaissent les fragments Fc des Ig. Les Ig sont importantes dans l'opsonisation des pathogènes ou d'autres particules. Le fragment Fc fait partie de la région constante des Ig, il possède des sites de fixation aux molécules du complément et est responsable de la fixation des Ig sur la membrane des LB et des phagocytes tels que les macrophages. La reconnaissance des fragments Fc via les trois principaux FcR (Fc γ -RI, les Fc γ -RIIA et les Fc γ -RIIIA) initie des mécanismes de phagocytose. Le récepteur Fc γ -RIIA est composé d'une seule chaîne protéique possédant un domaine extracellulaire (tête) capable de se fixer aux fragments Fc, un domaine transmembranaire (centre), et une partie intracytoplasmique (queue). Cette dernière partie possède deux motifs d'activation des récepteurs immuns basé sur la tyrosine (ITAMs). En revanche, les deux autres récepteurs n'ont pas d'ITAM et doivent donc se lier avec d'autres protéines transmembranaires possédant des ITAMs afin d'induire la cascade de signalisation nécessaire au bon déroulement de la phagocytose. Le contact entre les FcR et les Ig induit la phosphorylation des ITAMs via des tyrosines kinases de la famille SRC et SYK. Cette phosphorylation permet grâce aux Pi-3-Kinase, aux GTPases Rho et à d'autres protéines kinases (PKC), d'activer des voies de signalisation permettant le réarrangement du cytosquelette d'actine nécessaire à la formation du phagosome et au relargage de médiateurs inflammatoires (Figure 14).

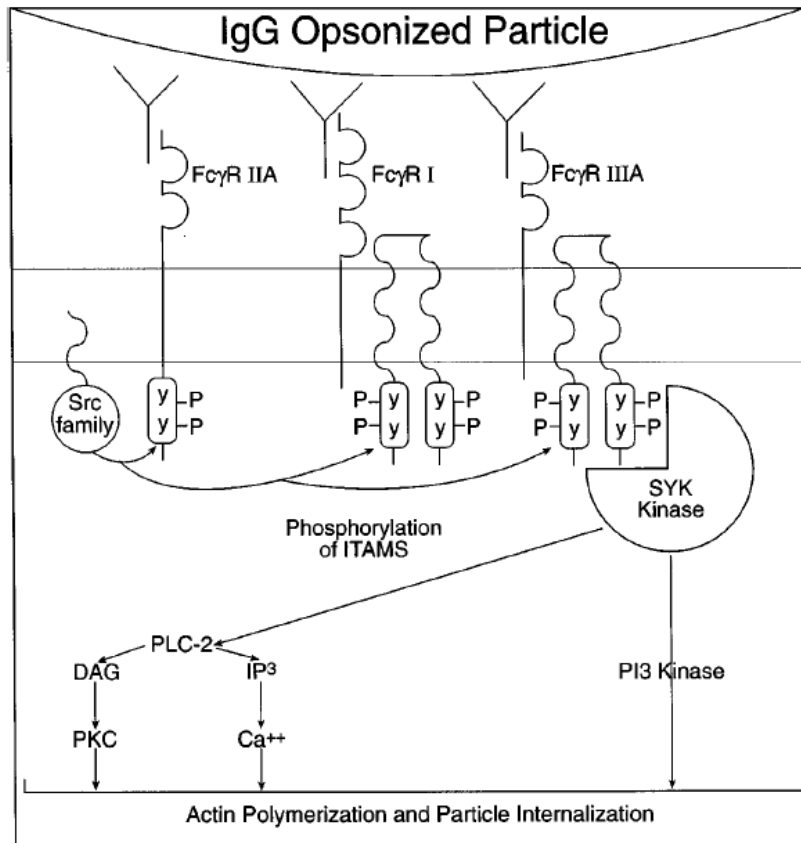


Figure 14. Les différents types de récepteurs Fc enrôlés et les mécanismes de signalisation associés permettant d'initier la phagocytose. D'après Aderem A. et Underhill D.M. – Annu. Rev. Immunol. 1999.

5.3.2. Les récepteurs du complément (CR)

Le complément est un ensemble de protéines du sérum dont plusieurs des éléments servent à l'opsonisation de l'agent infectieux. Ils sont reconnus par différents CR qui ont des fonctions variées au sein des mécanismes de phagocytose. En effet, le CR1 reconnaît principalement les protéines C3b, C4b et C3bi et participe davantage à la fixation de la particule opsonisée sur la surface du macrophage. Les récepteurs CR3 et CR4 de la famille des intégrines se fixent préférentiellement au C3bi et sont généralement enrôlés lors de l'étape d'internalisation. Contrairement aux récepteurs Fc, les CR ont besoins de stimuli additionnels comprenant, le TNF- α , le GM-CSF ou la présence de protéines de la matrice extracellulaire

(telles que par exemple la laminine et la fibronectine) pour enclencher l'étape d'internalisation. Enfin, de la même manière que pour les récepteurs Fc, les protéines SYK et les PKC ont un rôle important dans les mécanismes de phagocytose.

5.3.3. Les récepteurs mannose (MR)

Les macrophages possèdent plusieurs types de récepteurs lectines qui sont capables de fixer des motifs osidiques tels que le mannose, le fucose et le N-acetylglucosamine présents en grande quantité au niveau des glycoprotéines de surface chez de nombreux pathogènes. Les MR sont capables de reconnaître les motifs fucose et mannose grâce à deux domaines extracellulaires incluant un domaine de reconnaissance aux glucides (CRD) et un domaine riche en cystéines (CysMR). Leur activation mobilise le cytosquelette d'actine autour du phagosome naissant via des cascades de signalisation complexes faisant intervenir d'autres protéines comme la taline, les PKC, les MARKS et la myosine. Contrairement aux récepteurs FcR et CR, la vinculine et la paxilline ne sont pas recrutées. Ces différences renforcent ainsi la notion que tous les récepteurs n'induisent pas les mêmes mécanismes de phagocytose. Les MR induisent un signal pro-inflammatoire qui génère la sécrétion de cytokines telles que l'IL-1 β , l'IL-6, le GM-CSF, le TNF α et l'IL-12. Les FcR induisent aussi préférentiellement un processus pro-inflammatoire ce qui n'est pas le cas pour les CR.

5.3.4. Les récepteurs éboueurs / scavengers (SR)

Les SR ont été mis en évidence pour la première fois dans les années 1970 par [Goldstein et al., 1979](#) dans des études faisant le lien entre les macrophages et l'athérosclérose.

Actuellement, Les SR représentent une grande famille de glycoprotéines membranaires séparée en 10 groupes principaux nommés SR-A, SR-B, [...], SR-J selon leurs rôles fonctionnels et leurs conformations qui sont très hétérogènes. (Zani et al., 2015) Les récepteurs éboueurs de classe A (SR-A1, MARCO, SRCL, etc.) ont par exemple la particularité de posséder des domaines de type collagène ainsi que des zones riches en cystéine (SRCR) ou en lectines de type C (CLEC). Les SR-B possèdent des domaines CD-36, etc. (Figure 15). Chacun de ces motifs est un site de reconnaissance à un large panel de ligands polyanioniques endogènes comme le collagène, les lipoprotéines (LDL et HDL), les corps apoptotiques, etc. ou exogènes qui n'ont pas été opsonisés comme les bactéries, les particules de poussières, l'amiante, etc. (Canton et al., 2013; Peiser and Gordon, 2001) Suivant le ligand détecté, le récepteur enrôlé n'est donc pas le même et induit des mécanismes d'internalisation et de signalisation intracellulaire différents qui influent ensuite sur la réponse cellulaire (Figure 15). (Zani et al., 2015)

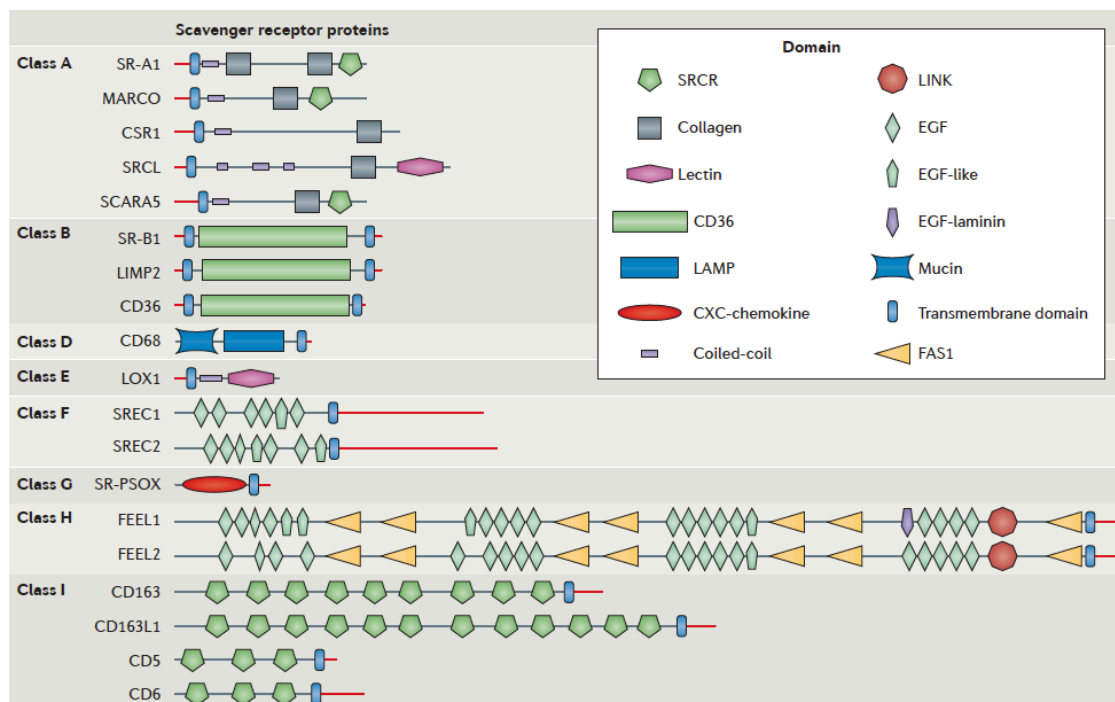


Figure 15. Les différents types de SR connus. D'après Canton J. – Nat. Rev. Immunol. 2013.

On a longtemps cantonné les SR à deux rôles principaux : le premier dans les mécanismes de clairance par phagocytose et le second dans la régulation (inhibition) de l'inflammation. Conformément à ce que plusieurs expériences avaient montré, les SR minimiseraient la capacité inflammatoire des macrophages activés par le LPS. (Peiser and Gordon, 2001) Actuellement, les SR sont au contraire connus pour avoir d'autres fonctions très variées tels que l'adhésion cellulaire, l'initiation de l'apoptose, la présentation antigénique, l'initiation de l'inflammation, etc. De plus, les SR ne sont généralement pas enrôlés seuls et leurs fonctions sont très influencées par leurs co-récepteurs. En effet, lorsque SR-A1 est associé au récepteur à activité tyrosine kinase (MERTK), il assure la clairance des cellules apoptotiques et exerce une activité anti-inflammatoire. Les auteurs Canton et al., 2013; Yu et al., 2012 ont en revanche montré que lorsqu'il est associé aux TLR4, SR-A1 semble augmenter la réponse inflammatoire. SR-B (CD36) est quant à lui souvent impliqué dans la réponse pro-inflammatoire lorsqu'il est associé aux TLR2 et TLR6. Cependant dans d'autres conditions CD36 n'induit pas obligatoirement d'inflammation (Figure 16). (Erdman et al., 2009)

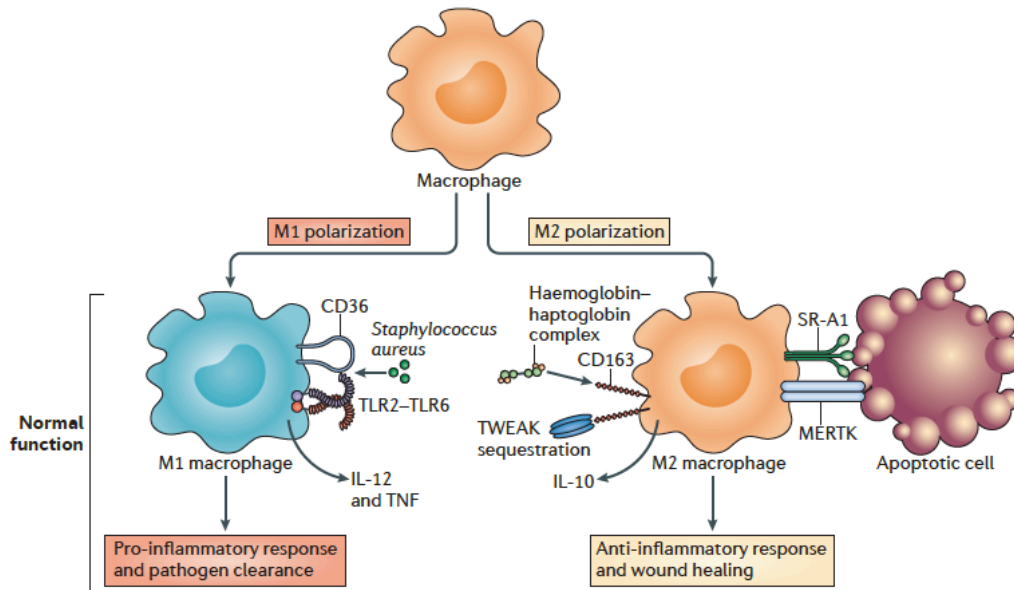


Figure 16. Polarisation des macrophages (M1 ou M2) orientée en fonction du type de SR et de co-récepteurs enrolés. D'après Canton J. *Nat. Rev. – Immunol.* 2013.

Le rôle des SR est donc très complexe à élucider. La variété des récepteurs, le large panel de ligands identifiés ainsi que la présence de nombreux corécepteurs permet aux SR d'induire une grande flexibilité de réponses cellulaires.

5.4. La réponse oxydante et l'inflammation

La phagocytose d'un pathogène déclenche deux puissants mécanismes antimicrobiens qui sont d'une part, la génération d'une multitude d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) produites via une augmentation de la consommation en oxygène nommé « burst oxydatif » et d'autre part la production d'espèces réactives à l'azote (RNS). L'ensemble de ces molécules sont libérées à l'intérieur du phagosome afin de neutraliser puis de digérer le pathogène après un apport supplémentaire en protéase. Suivant la polarisation du macrophage, ce phénomène peut s'accompagner de la libération de cytokines pro-inflammatoires.

5.4.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les premières ROS produites et activées par les mécanismes de phagocytose sont les ions superoxydes ($O_2^{\bullet-}$) qui sont générés après réduction de l'oxygène via les complexes NADPH oxydases de phagocytose (phox) présents au niveau de la membrane du phagosome. (Fang, 2004; Vignais, 2002) L'ion superoxyde est ensuite converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui peut à son tour réagir avec des ions intracellulaires pour produire d'autres composés antimicrobiens tels que des acides hypochlorogènes (comme par exemple l' $HOCl$ en réaction avec les ions chlorure) ou conduire à la production d'espèces radicalaires qui sont également très toxiques dont l' OH^{\bullet} , l'espèce la plus délétère (tableau 1). (Birben et al., 2012; Migdal and Serres, 2011)

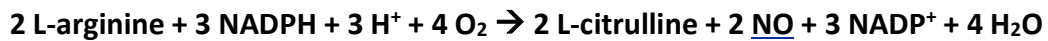
Oxidant	Formula	Reaction Equation
Superoxide anion	$O_2^{\bullet-}$	$NADPH + 2O_2 \leftrightarrow NADP^+ + 2O_2^{\bullet-} + H^+$ $2O_2^{\bullet-} + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$
Hydrogen peroxide	H_2O_2	$Hypoxanthine + H_2O + O_2 \rightleftharpoons xanthine + H_2O_2$ $Xanthine + H_2O + O_2 \rightleftharpoons uric\ acid + H_2O_2$
Hydroxyl radical	$\bullet OH$	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \bullet OH$
Hypochlorous acid	$HOCl$	$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl + H_2O$
Peroxyl radicals	ROO^{\bullet}	$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet}$
Hydroperoxyl radical	HOO^{\bullet}	$O_2^{\bullet-} + H_2O \rightleftharpoons HOO^{\bullet} + OH^-$

Tableau 1. Principales molécules oxydantes endogènes. D'après Birben H. – World Allergy Organ. J. 2012.

5.4.2. Les espèces réactives à l'azote (RNS)

Bien que les mécanismes de « burst oxydatif » soient connus depuis les années 1950, (Sbarra and Karnovsky, 1959) l'importance des RNS dans la défense anti-microbienne a été élucidée qu'à partir des années 1980. (Hibbs Jr., 2002) L'oxyde nitrique (NO) est issu de la

dégradation de l'arginine par l'enzyme oxyde nitrique synthase (iNOS) selon la réaction suivante :



Le NO joue divers rôles biologiques comme celui de signal de transduction, de régulateur de certaines fonctions des protéines, de neurotransmetteur, etc. (Stamler et al., 2001) Il est donc peu toxique. Cependant il se lie facilement avec des composés radicalaires issus du « burst oxydatif » pour former des espèces beaucoup plus nocives telles que le peroxydinitrite (ONOO⁻), le trioxyde de diazote (N₂O₃), le nitroxyde (HNO), les nitrites (NO₂), etc. (Fang, 2004)

5.4.3. Le contrôle intra cellulaire du « burst oxydatif »

L'accumulation des ROS déclenchée par la phagocytose ainsi que leurs sécrétions dans le milieu extracellulaire sont nocives pour l'organisme lui-même. En effet, les ROS induisent des dommages à l'ADN, des dysfonctionnements mitochondriaux, une déstabilisation des bicouches lipidiques des membranes plasmiques (peroxydation des lipides), une dégradation de protéines (Figure 17) ainsi qu'une activation de la production des cytokines pro-inflammatoires via les facteurs de transcription NF-κB.

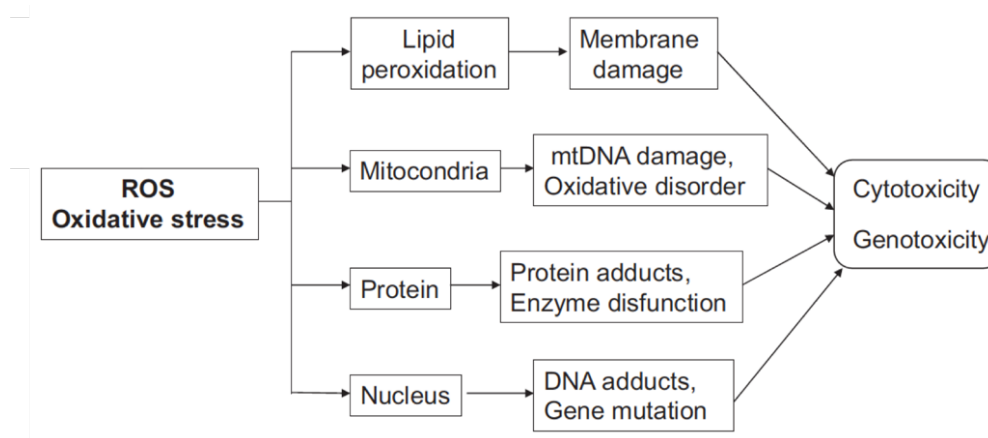


Figure 17. Toxicité induite par l'accumulation des ROS. Adapté de Fu P.P. – J.F.D.A. 2014.

Ces facteurs de transcription induisent l'activation d'un grand nombre de gènes codants pour des enzymes anti-oxydantes permettant de contrebalancer l'effet oxydant. (Morgan and Liu, 2011) Ces enzymes sont les superoxydes dismutases (SOD) qui transforment les ions superoxydes en dioxygène (O₂), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GSH-Px) qui dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau. Elles ont en revanche régulièrement besoin de co-facteurs comme la NADPH pour fonctionner. Grâce à leurs groupements thiols, d'autres enzymes comme la thiorédoxine, les peroxyrédoxines et la Glutathion Transferase (GST) assurent des rôles de détoxification des ROS (Tableau 2 et Figure 18). (Birben et al., 2012)

TABLE 2. Enzymatic Scavenger of Antioxidant Defense

Name of Scavenger	Acronym	Catalyzed Reaction
Superoxide dismutase	SOD	$M^{(n+1)+}\text{-SOD} + O_2^- \rightarrow M^{n+}\text{-SOD} + O_2$
Catalase	CAT	$M^{n+}\text{-SOD} + O_2^- + 2H^+ \rightarrow M^{(n+1)+}\text{-SOD} + H_2O_2$ $2 H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2 H_2O$ $H_2O_2 + Fe(III)\text{-E} \rightarrow H_2O + O = Fe(IV)\text{-E}(.)$ $H_2O_2 + O = Fe(IV)\text{-E}(.) \rightarrow H_2O + Fe(III)\text{-E} + O_2$
Glutathione peroxidase	GTPx	$2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$ $2GSH + ROOH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$
Thioredoxin	TRX	Adenosine monophosphate + sulfite + thioredoxin disulfide = 5'-adenylyl sulfate + thioredoxin Adenosine 3',5'-bisphosphate + sulfite + thioredoxin disulfide = 3'-phosphoadenylyl sulfate + thioredoxin
Peroxyredoxin	PRX	$2 R'\text{-SH} + ROOH = R'\text{-S-S-R}' + H_2O + ROH$
Glutathione transferase	GST	$RX + GSH = HX + R\text{-S-GSH}$

Tableau 2. Principales enzymes et réactions chimiques associées ayant un rôle antioxydant. D'après Birben H. – World Allergy Organ. J. 2012.

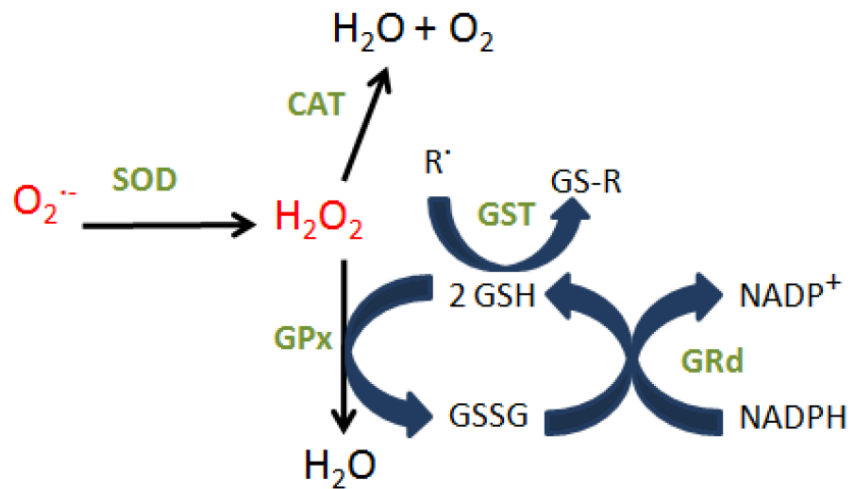


Figure 18. Principales réactions enzymatiques impliquées dans les défenses anti-oxydantes de l'organisme.

En parallèle, les macrophages peuvent aussi réduire le stress oxydatif via l'activation du facteur de transcription Nrf2 capable à la fois d'activer des protéines antioxydantes (Mittal et al., 2014) et d'inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL-1 β . (Kobayashi et al., 2016) Après la résolution de l'infection, l'ensemble des mécanismes de régulation du stress oxydant décrits précédemment permet aux cellules de revenir à un juste équilibre ROS/antioxydant dans le but de résoudre l'inflammation, d'éviter un stress oxydatif néfaste pour les tissus et d'induire un processus de réparation tissulaire (Figure 19).

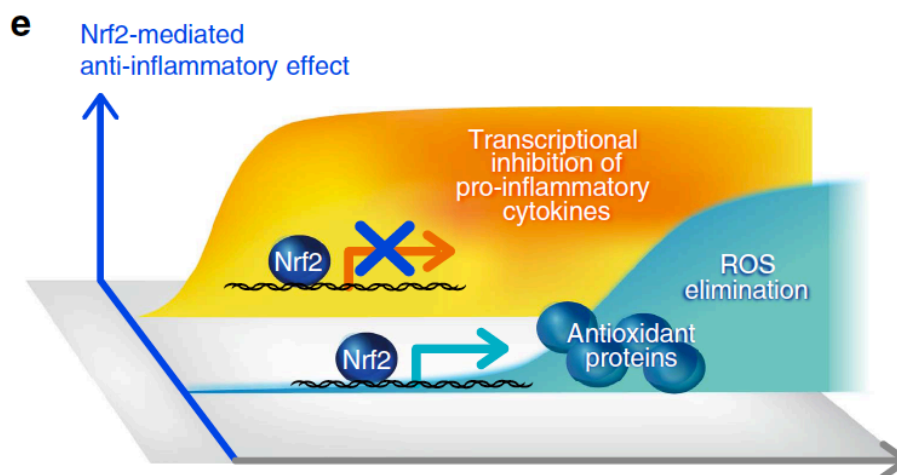


Figure 19. Effet anti-inflammatoire de Nrf2. Inhibition de la transcription des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires et en même temps, surexpression des gènes codant pour des protéines antioxydantes qui éliminent les ROS. D'après Kobayashi E.H. – *Nat. Commun.* 2016.

Avec la phagocytose, la réponse oxydante et l'inflammation sont donc les principaux moyens de l'immunité innée mise en place contre toutes les attaques extérieures. Par conséquent, ces moyens sont essentiels à notre survie mais ils doivent être maîtrisés par différents mécanismes « garde-fous » dans le but d'assurer une réponse immunitaire proportionnée à l'agression. Une suractivation de l'immunité innée est en cause dans de nombreuses pathologies comme les maladies inflammatoires chroniques, les maladies auto-immunes, les cancers, etc. En revanche, une déficience dans les processus inflammatoires, induit une sensibilité plus accrue aux infections et crée un environnement favorable au développement tumoral.

6. Les maladies associées aux macrophages

6.1. Les cancers

Lorsqu'ils sont suractivés, les macrophages de type M1 sécrètent des molécules qui endommagent l'ADN. Par conséquent, une inflammation répétée (chronique) et non maîtrisée peut favoriser l'apparition de cancers. Le site tumoral, du fait de son caractère inflammatoire, recrute de nombreux macrophages de par la présence de cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF- α et la protéine 1 chimiotactique des monocytes (MCP-1). D'autres molécules chimioattractantes comme le facteur 1 de stimulation des colonies (CSF-1) et le polypeptide II, qui active les monocytes endothéliaux (EMAPII), favorisent l'accumulation des macrophages sur le site tumoral. C'est en raison de ce phénomène que ces macrophages sont qualifiés de « macrophages associés aux tumeurs » (TAM). En revanche, ils changent de phénotype pour devenir des macrophages de type M2 anti-inflammatoires en réponse, d'une part, à un environnement hypoxique ([Chanmee et al., 2014](#)) et, d'autre part, au phénomène d'efferoctose provoqué par un grand nombre de cellules apoptotiques au sein de la tumeur. ([Vaught et al., 2015](#)) L'accumulation de TAM est en général un signe de mauvais pronostic. En effet, dans un premier temps, les TAM sécrètent un large éventail de molécules pro-angiogéniques dont les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF) et de l'endothélium vasculaire (VEGF-A), la thymidine phosphorylase, l'adrénomédulline, etc. L'angiogenèse est un processus primordial dans la croissance des tumeurs malignes et pour le développement des métastases. Les TAM sont également impliqués dans le processus métastatique dans la mesure où ils modulent le microenvironnement de la tumeur. En effet, les TAM sécrètent des protéases telles que la cathepsine, certaines protéases à sérine et des métalloprotéinases

capables de dégrader la matrice extracellulaire entourant la tumeur. Cela permet aux cellules cancéreuses de franchir plus facilement les barrières physiques pour rejoindre la circulation sanguine et coloniser d'autres sites. Enfin, Les tumeurs échappent à l'immunosurveillance via deux phénomènes médiés par les TAM. Ceux-ci ont une faible capacité de présentation antigénique et sécrètent de nombreux facteurs immunosuppresseurs dont des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- β et des ligands de mort cellulaire (PD-L-1) qui induisent une diminution de la réponse LT cytotoxique (Chanmee et al., 2014).

Un déséquilibre inflammatoire (M1) / anti-inflammatoire (M2) en faveur d'un environnement immunosuppresseur et d'un remodelage tissulaire facilite le développement tumoral et la dissémination du cancer à travers l'organisme. En temps normal, lorsque ces mécanismes sont bien régulés, ils servent avant tout à protéger et réparer les tissus lésés.

6.2. Les maladies auto-immunes

La réponse immunitaire adaptative (notamment humorale) a longtemps été mise en cause dans les maladies auto-immunes. Cependant, bien que les causes exactes des désordres auto-immuns n'aient pas encore été identifiées avec certitude, de nombreuses études ont montré que les causes initiales de la maladie résultaient d'un déséquilibre entre les réponses inflammatoires et réparatrices mises en place par les macrophages et les neutrophiles. De plus, ces cellules activent anormalement le système immunitaire adaptatif. Les macrophages jouent donc un rôle capital dans l'initiation et la persévérance de ces maladies. En effet, une disproportion du nombre de M1 par rapport aux M2 induit une sécrétion excessive de cytokines pro-inflammatoires ainsi qu'une sécrétion de ROS. Ces sécrétions altèrent le tissu

qui, étant donnée l'absence de M2, n'est ensuite pas réparé. Une maladie auto-immune comme le diabète de type 1 est caractérisée par une hyperglycémie induite par une destruction massive des cellules β des îlots de Langerhans présents dans le pancréas. Ceux-ci sont anormalement détruits en raison de la présence d'une grande quantité de ROS, de NO mais également par le système immunitaire adaptatif (humoral = LB sécréteurs d'anticorps et cellulaire = LT CD8⁺ cytotoxiques). Or, celui-ci est activé à la fois par les M1 en raison de leur forte capacité de présentation antigénique et par l'activation préalable des Lymphocytes TH1. (Navegantes et al., 2017) Dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde, la quantité importante de macrophages M1 dans le tissu synovial (30 à 40% des cellules qui le constituent) promeut aussi l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T. Les macrophages sont également capables de promouvoir l'angiogenèse, ce qui permet le recrutement d'autres macrophages. Ces derniers sont associés à l'érosion des os et des cartilages du fait, d'une part, de leur capacité à sécréter des ROS, des cytokines pro-inflammatoires et des protéases, et, d'autre part, de leur capacité à se différencier en ostéoclastes spécialisés dans la résorption des os. De plus, un haut niveau de cytokines et de chimiokines inflammatoires a également été observé de même qu'une diminution de la quantité d'IL-10 ce qui explique pourquoi le retour à l'équilibre M1/M2 grâce à la déplétion des M1 et à la réactivation des M2 semble être une stratégie intéressante pour prévenir et atténuer la maladie (Figure 20). (Navegantes et al., 2017)

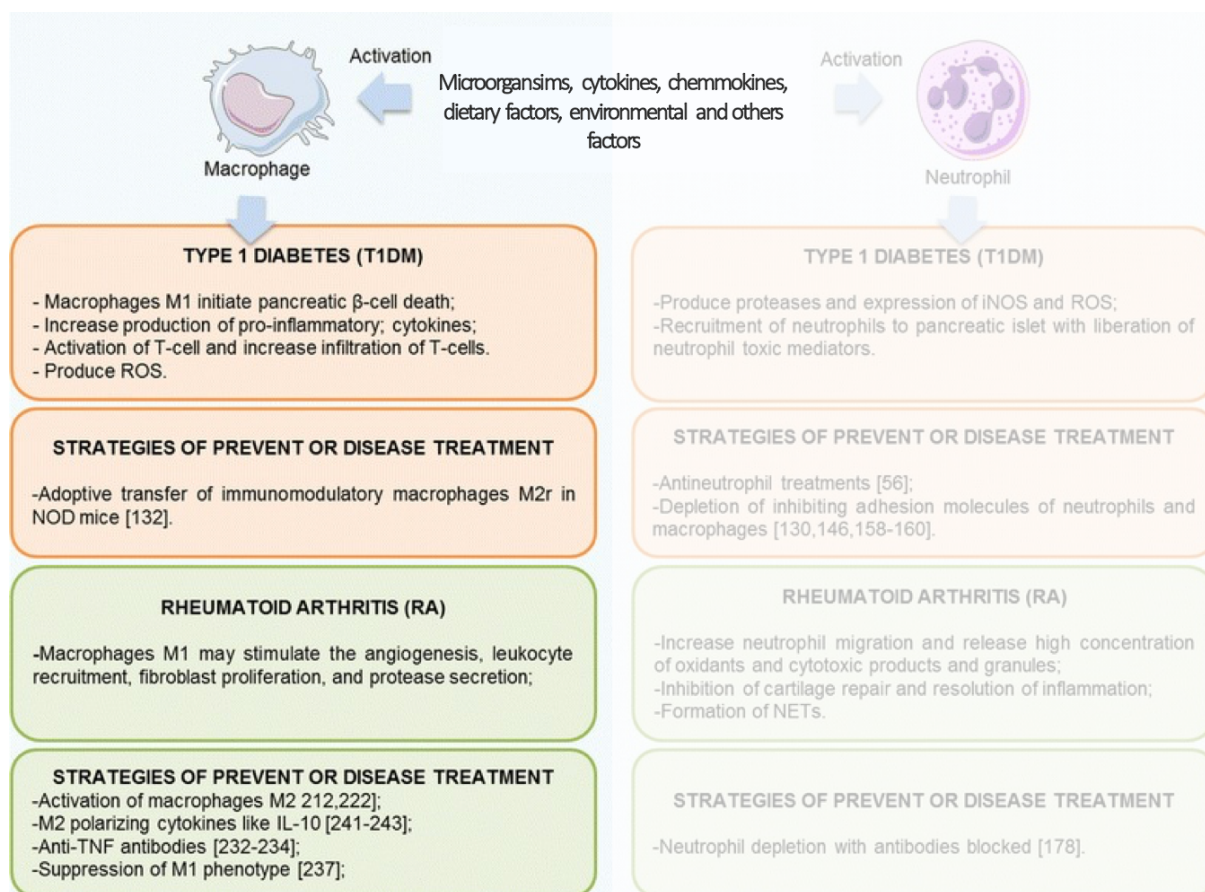


Figure 20. Rôle des macrophages (et des neutrophiles) dans les maladies auto-immunes. Les encadrés oranges montrent les conséquences de la suractivation des M1 dans le diabète de type 1 ainsi que les stratégies envisagées de régulation de l'inflammation via les M2. Les rectangles verts correspondent à la polyarthrite rhumatoïde. D'après Navegantes K.C. – J. Transl. Med. 2017.

6.3. Les maladies inflammatoires chroniques

Les inflammations chroniques correspondent à une inflammation qui n'a aucune tendance à guérir spontanément et évolue pendant plusieurs mois voire plusieurs années tout en persistant ou en s'aggravant. Il existe de nombreuses maladies inflammatoires chroniques, comme les formes chroniques de pneumonies et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) telles que la maladie de Crohn. Ces affections résultent d'un déséquilibre entre les différentes populations de macrophages situées juste en-dessous des épithéliums.

Des études ont prouvé l'existence d'un lien entre l'inflammation chronique, qui engendre une modification de la diversité des macrophages, et la survenue de fibroses, qui est caractérisée par une augmentation des constituants fibrillaires de la matrice extra cellulaire (MEC). (Wynn and Vannella, 2016) Dans des conditions physiologiques normales, les macrophages résidents sont très tolérogènes. Ils contribuent au maintien de l'homéostasie en éliminant les pathogènes au moyen des mécanismes de phagocytose et du relargage de molécules microbicides tout en limitant un phénomène inflammatoire. Les macrophages intestinaux ont par exemple un rôle double qui consiste, d'une part, en la protection de l'hôte contre les pathogènes ayant réussi à franchir l'épithélium et, d'autre part, en la régulation de cette réponse via un phénomène de tolérance envers les bactéries commensales. La sécrétion de TGF- β par les cellules du microenvironnement telles que les macrophages résidents et les cellules stromales (mesenchymateuses) de la lamina propria diminue l'expression des récepteurs pro-inflammatoires des phagocytes et ainsi, induit un environnement anergique. Les macrophages résidents sont préférentiellement polarisés M2 et la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires (IL-10) facilite le recrutement et l'expansion des LT régulateurs. Cependant, lors de MICI, la rupture de la barrière intestinale favorise l'entrée des contenants de la lumière intestinale (pathogènes, microbiote, déchets, etc.). Cette modification du microenvironnement induit un déséquilibre M1/M2 résultant du recrutement abondant de monocytes circulants différenciés en M1. (Lissner et al., 2015) La zone enflammée facilite l'extravasation des monocytes par une augmentation des sélectines P et des protéines d'adhésion cellulaire VCAM et ICAM. Les macrophages infiltrants arrivés massivement sur le site expriment davantage les récepteurs de surfaces de type PRR (TLR2, TLR4, TLR5 et récepteurs lectines) sensibles aux motifs bactériens et augmentent ainsi leur sensibilité vis-à-vis du microbiote. (Hausmann et al., 2002; Kühl et al., 2015) Ils expriment également plus

fortement le facteur de transcription NF- κ B ce qui a pour effet d'augmenter la production de cytokines, de chimiokines pro-inflammatoires (CCL2, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-23, IL-1B et INF- γ) et de ROS. (Kühl et al., 2015) L'état inflammatoire contribue aussi à la sécrétion, par les macrophages, de métalloprotéinases matricielles (MMP) qui dégradent la matrice extracellulaire, fragilisant ainsi davantage les fonctions de barrière intestinale. (Wynn and Vannella, 2016) A ce premier phénomène inflammatoire, s'ajoute ensuite la présence de souches bactériennes persistantes comme E.coli, ce qui rend plus difficile l'étape de réparation et de résolution de l'inflammation. (Dogan et al., 2013) Lors des maladies inflammatoires chroniques, on observe une déficience dans le processus de réparation médié par les macrophages anti-inflammatoires. Cela est dû à un faible contrôle des facteurs de croissance ainsi qu'à un « échec » de communication entre les différentes populations de macrophages et les autres cellules du microenvironnement. Cela entraîne généralement des processus de réparation tissulaire aberrants qui contribuent aussi à la persistance inflammatoire et à la formation de fibres réparatrices anormales (fibroses). Ces dernières sont issues d'un déséquilibre entre la présence de cellules du microenvironnement (les cellules mésenchymateuses, les fibroblastes ou les myofibroblastes) sécrétrices de constituants de la MEC et la présence de M1 sécréteurs d'inhibiteurs de MMP et de protéases (les élastases, les collagénases, les MMP, la cathepsine etc.) qui détruisent la matrice extracellulaire et jouent un rôle important dans le degré d'endommagement des parois intestinales durant l'inflammation. Même si la phase inflammatoire n'aboutit pas, le nettoyage des corps apoptotiques par efferocytose induit la polarisation de populations de macrophages vers un phénotype de type M2 sécréteurs de facteurs anti-inflammatoires comme l'INF- γ et le TGF- β qui favorisent, d'une part, l'expression de fibronectine et de collagène et, d'autre part, réduisent la migration des myofibroblastes tout en maintenant leur capacité proliférative. Il

en découle une distribution incomplète de ces cellules au niveau de la zone lésée ce qui a pour effet de favoriser la production et la déposition de MEC de manière non homogène créant ainsi la fibrose. (Rieder et al., 2007)

6.4. Les inflammations stériles

La plupart des mécanismes inflammatoires (sécrétions de ROS et cytokines pro-inflammatoires) observés en réponse à des agressions médiées par des pathogènes, peuvent également se produire en l'absence de pathogènes. Ce phénomène est ainsi nommé « inflammation stérile ». (Chen and Nuñez, 2010) L'inflammation stérile est marquée par le recrutement de cellules immunitaires au niveau du site endommagé par la présence de DAMPs et par l'accumulation de composés endogènes ou exogènes difficilement éliminables. Ces composés étant mal gérés par les cellules immunitaires dont les macrophages, ils induisent des inflammations chroniques pouvant conduire à des dommages tissulaires. Plusieurs exemples de pathologies associées aux inflammations stériles sont connus. Dans le cas de l'athérosclérose où le dépôt de graisses modifiées (comprenant les LDL oxydés) sur les artères induit un environnement pro-inflammatoire en attirant de nombreux monocytes qui se différencient *in situ* en macrophages. Suite, à la phagocytose de LDL oxydés difficilement éliminables, les macrophages les accumulent sous forme de cristaux de cholestérol. Cette accumulation induit d'une part, la différenciation des macrophages en cellules spumeuses et d'autre part, la mort cellulaire de ces dernières causée par la rupture de leurs lysosomes. Ces deux phénomènes contribuent à l'évolution de la maladie par l'accroissement et la fragilisation de la plaque d'athérosclérose aboutissant à la formation de caillots qui sont des causes potentielles d'infarctus du myocarde ou d'accident vasculaires cérébraux. (Moore et

al., 2013; Parisi et al., 2018) Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, l'accumulation de plaques β -amyloïdes dans le cerveau active les cellules microgliales qui induisent une inflammation chronique propice à la neurodégénérescence. (Rubio-Perez and Morillas-Ruiz, 2012) Enfin, il va sans dire que l'accumulation de particules (notamment les nanoparticules) manufacturées ayant pu pénétrer dans l'organisme peut aussi favoriser l'émergence de nouvelles formes d'inflammations stériles.

Partie 2 : Les nano-objets et les systèmes nanoparticulaires

1. Définition des nanomatériaux

Jusqu'en 2008, il était difficile de définir les nanomatériaux (NMx). C'est la raison pour laquelle l'Organisation Internationale pour la Standardisation (ISO) a proposé une définition arbitraire dans le but de différencier les nanostructures des autres structures, de réguler et de réglementer la production des nano-objets. L'ISO 2008 a donc défini un nano-objet comme un matériau avec au moins une dimension externe à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire comprise entre 1 et 100 nm (Figure 21). Les nanofeuillets ont une seule dimension dans l'espace sous forme nanométrique. Les nanofibres, elles, en possèdent deux. Quant aux nanoparticules, elles en possèdent trois.

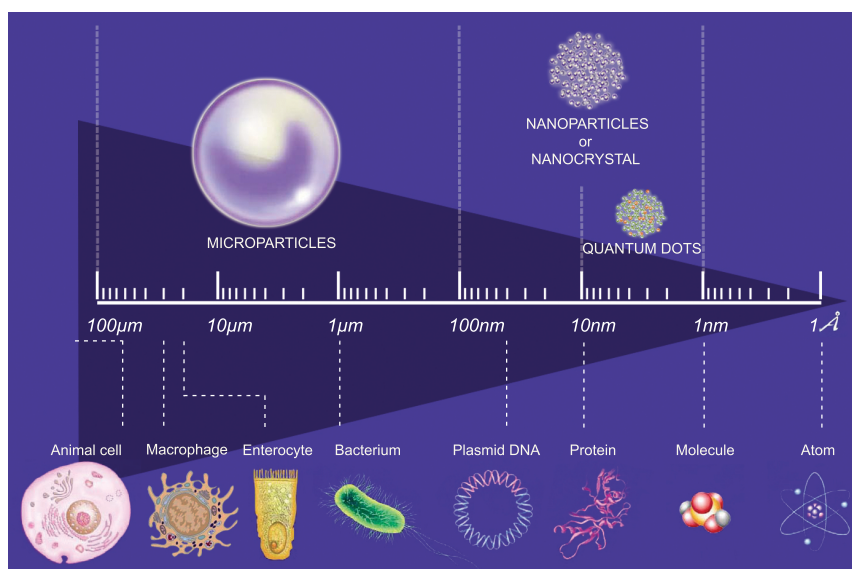


Figure 21. Représentation de l'échelle micrométrique et nanométrique par comparaison avec les entités principales du monde vivant. Adapté de Laroui H. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2011.

En 2011, la Commission Européenne a ajouté quelques notions supplémentaires à l'ISO 2008 (ISO/TS 80004) en précisant que « l'on entend par NMx un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50% des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1nm et 100nm. » Néanmoins, la Commission Européenne a maintenu un certain flou dans cette définition puisqu'elle a précisé que « dans des cas spécifiques, lorsque cela se justifie pour des raisons tenant à la protection de l'environnement, à la santé publique, à la sécurité ou à la compétitivité, le seuil de 50% fixé pour la répartition numérique par taille peut être remplacé par un seuil compris entre 1% et 50%. » Dans des cas très particuliers, comme les fullerènes, les flocons de graphène et les nanotubes de carbone, la définition tolère même jusqu'à des dimensions inférieures au nanomètre. Même si ces définitions restent évasives, elles permettent de dissocier les deux grandes familles de NMx que sont les nano-objets et les matériaux nanostructurés. La famille des matériaux nanostructurés comprend les agrégats et les agglomérats de nano-objets, les nanocomposites (matériaux composés entièrement ou partiellement de nano-objets afin d'améliorer ou d'obtenir des propriétés spécifiques liées à l'échelle nanométrique) et les matériaux nanoporeux.

Comme précisé dans le paragraphe précédent, les NPs sont capables de s'assembler entre elles pour former des amas dont l'état est plus ou moins stable ou réversible. Les agrégats se forment par des interactions chimiques fortes et irréversibles (comme par exemple des liaisons covalentes) et constituent ainsi des entités à part entière contrairement aux agglomérats dont les particules individuelles sont liées par des interactions physiques faibles de type électrostatiques, Van der Waals, etc. (Figure 22). Elles peuvent donc se

dissocier en fonction de l'environnement dans lequel elles se situent. (Eggersdorfer and Pratsinis, 2014; Sokolov et al., 2015)

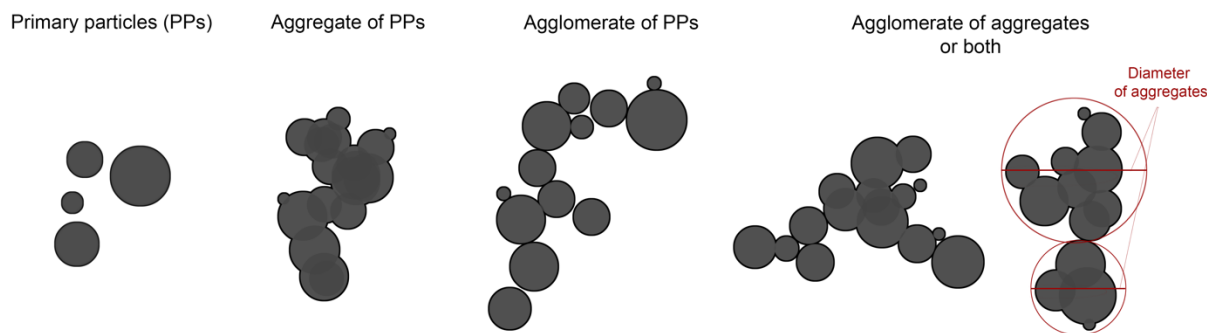


Figure 22. Définition d'agrégation et d'agglomération. D'après Eggersdorfer M.L. et Pratsinis S.E. – Adv. Powder Technol. 2014.

2. Bref rappel historique

Contrairement à ce que l'on peut croire, les nanoparticules, qu'elles soient organiques ou inorganiques, n'ont pas toujours été le résultat de recherches scientifiques complexes et modernes. Elles ont toujours été produites naturellement à travers le monde ou dans l'espace par l'intermédiaire de différents phénomènes naturels tels que les vents cosmiques, l'activité volcanique, les tempêtes de sable dans le désert, l'érosion des sols, les processus microbiens, les virus, etc. (Buzea et al., 2007; Strambeanu et al., 2015; Yan et al., 2012) Grâce à leurs propriétés physico-chimiques particulières, les NMx ont ensuite commencé à être utilisés par l'homme il y a plus de 4500 ans. En effet, dans l'Antiquité, les artisans consolidaient leurs céramiques avec des nanofibres d'amiante naturelles. Au IV^{ème} siècle, les Romains mélangeaient des NPs métalliques (telles que l'or) au verre afin d'obtenir des propriétés optiques particulières dans un but esthétique. L'exemple le plus célèbre est sans doute la coupe de Lycurgue qui paraît verte lorsqu'elle est éclairée de face et rouge lorsqu'elle est

éclairée par derrière (Figure 23A). (Heiligtag and Niederberger, 2013) Au IX^{ème} siècle, les NPs métalliques (comme le cuivre et l'argent) furent également utilisées en Mésopotamie pour leurs propriétés optiques afin de créer un effet de scintillement ou d'iridescence à la surface des céramiques (Figure 23B et 23C). (Heiligtag and Niederberger, 2013; Sciau, 2012) Cette méthode d'émaillage qui consiste à ajouter des NPs en strates s'est ensuite répandue pendant le Moyen Âge dans d'autres pays. Ce n'est qu'après la publication des travaux de Michael Faraday sur les propriétés de l'or colloïdal (Faraday, 1857) que les nanoparticules ont suscité un engouement industriel. Par la suite, l'étude de l'importance des propriétés physico-chimiques sur le fonctionnement des NPs s'est développée pour donner naissance à ce qu'il est aujourd'hui courant d'appeler les « nanosciences ».

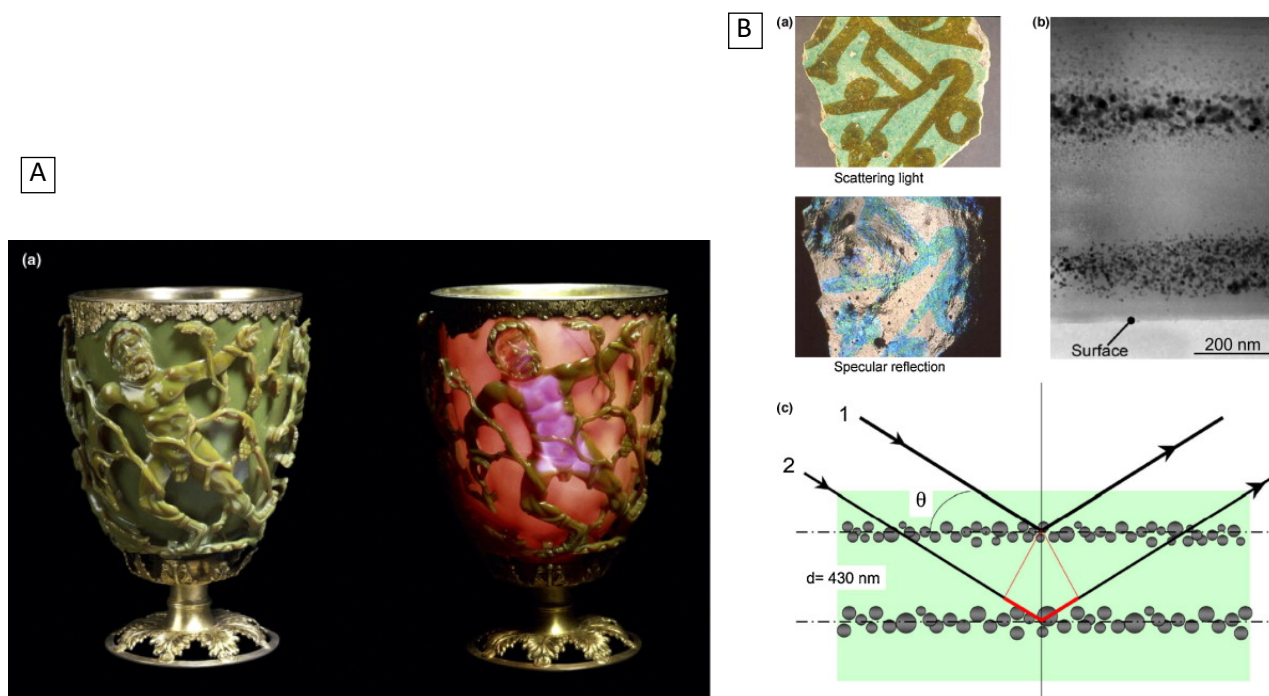




Figure 23. Exemples et lieux d'utilisation des NPs entre l'Antiquité et la Renaissance. A- Coupe romaine de Lycurgue datant du IV^{ème} siècle. B- Morceau de céramique datant du Moyen Age composé de NPs métalliques (argent) créant un effet d'irridescence (a) et observables en microscopie électronique à transmission (b). Le phénomène d'interférence optique est provoqué par deux couches superposées de NPs de différentes tailles (b) et (c). C- Evolution géographique des principaux sites de production de céramiques et de l'utilisation des NPs dans les céramiques. D'après Heiligtag F.J. et Niederberger M. – *Mater. today*. 2013. Et Sciau P. – *InTech*. 2012.

3. Usages commerciaux des nanotechnologies

Depuis une dizaine d'années, nous assistons à un développement sans précédent des NPs manufacturées. Cet engouement industriel s'explique par les propriétés physiques, chimiques et mécaniques des nanoparticules. En effet, un matériau à une échelle supérieure ne possède pas les mêmes propriétés que le même matériau à l'échelle nanoparticulaire. Cette spécificité répond à de nombreux enjeux sociétaux du XXI^{ème} siècle tels que le développement durable, l'électronique, l'agriculture, la santé, etc. En mars 2005, on répertoriait seulement 54 produits de consommation courante contenant des NPs dans le monde contre 1814 en mars 2015. (Vance et al., 2015) Le nombre de produits possédant des NPs a donc été multiplié par 30 en seulement 10 ans. Si cette tendance se poursuit, en 2025 ce nombre pourrait s'élever à plus de 4800 produits (Figure 24). Cette mission d'inventaire a été effectuée par The Project on Emerging Nanotechnologies (PEN), une organisation

américaine se décrivant comme indépendante et dont l'objectif affiché est d'aborder les questions sociales, politiques et sanitaires liées aux nanotechnologies en identifiant des lacunes dans la recherche et la législation en matière de nanotechnologies pour ensuite développer des stratégies visant à remédier à ces manques.

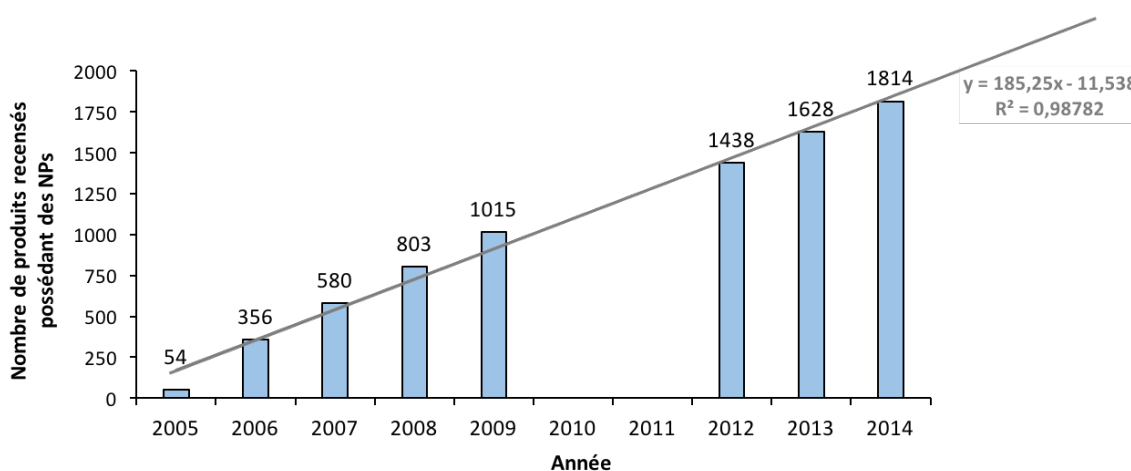


Figure 24. Nombre total de produits contenant des NMx répertoriés entre 2005 et 2014.
Adapté de Vance M.E. – Beilstein J. Nanotechnol. 2015.

Du fait de la grande diversité des secteurs industriels concernés par l'utilisation des NMx, ceux-ci ont aujourd'hui un impact important sur l'emploi et l'économie mondiale. En effet, le marché mondial est estimé entre 150 et 200 milliards d'euros. (Laux et al., 2018) Actuellement, les principaux secteurs concernés sont ceux de la santé et du bien-être. De nombreux produits médicaux utilisent des NPs comme les comprimés, qui contiennent des NPs de titane ou de silice utilisées comme agent d'enrobage, les agents de contrastes qui sont composés des NPs d'oxyde de fer ou de gadolinium, ou encore les équipements chirurgicaux et les pansements qui peuvent contenir des NPs d'argent au rôle antibactérien. Les cosmétiques comme les crèmes solaires contiennent des NPs de titane servant d'agents anti-UV. (Singh and Nanda, 2014) De même les produits de maquillage sont enrichis en NPs de silice antiagglomérantes. On trouve également des NPs de silice et de titane dans d'autres

produits de consommation courante tels que les dentifrices. Certains textiles peuvent également contenir des NPs d'argent, là encore en raison de leurs propriétés antibactériennes. Les NPs sont aussi utilisées dans une moindre mesure dans d'autres champs d'application tels que l'alimentation, (He and Hwang, 2016) l'automobile, l'électronique, etc. (Figure 25A). La commercialisation de produits contenant des NMx est en revanche très inégale selon les pays. En effet, sur les 1814 produits contenant des nanoparticules recensés en mars 2015, la majorité des produits proviennent des Etats-Unis (773) puis d'Europe et d'Asie avec respectivement 628 et 308 produits répertoriés (Figure 25B). (Vance et al., 2015)

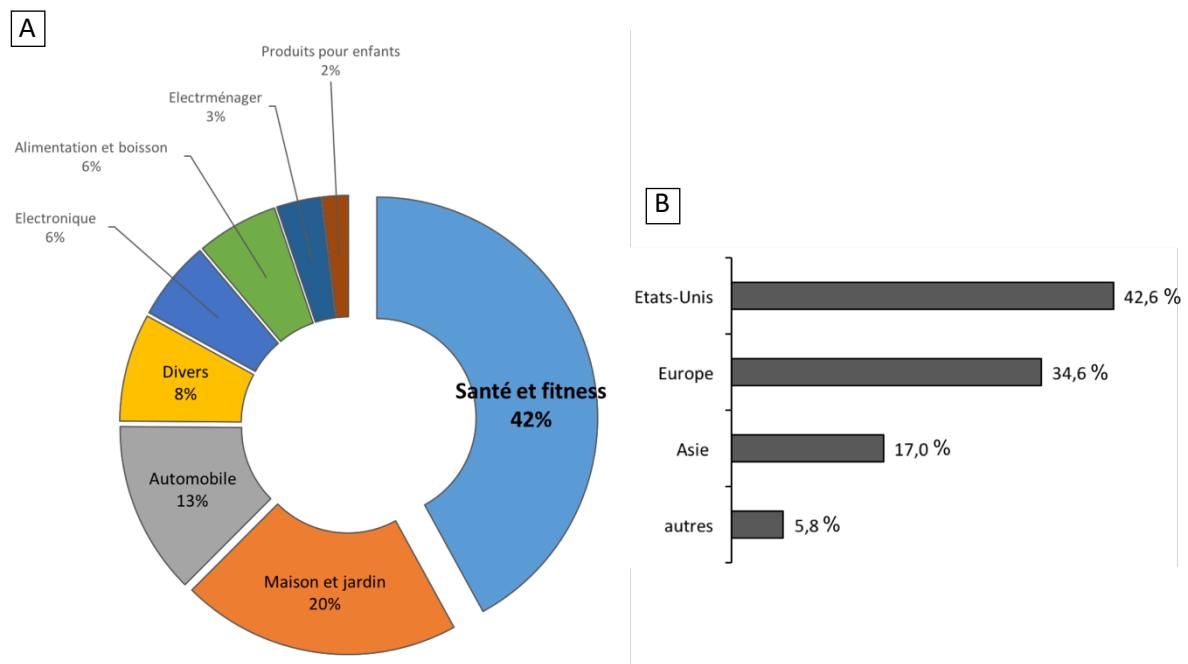


Figure 25. Distribution des produits contenant des NMx. A- En fonction de leurs domaines d'application. B- A travers le monde. Adapté de Vance M.E. – Beilstein J. Nanotechnol. 2015.

Suivant le secteur ciblé et la capacité de production (qui prend en compte le prix, la rareté et l'utilité du matériau) les nanoparticules ne sont pas toutes produites en quantités égales dans le monde. De plus, l'évaluation quantitative de la production de NMx à l'échelle mondiale s'avère très compliquée à mettre en place puisqu'elle se base sur des sondages

effectués directement auprès des industriels. Or, du fait des inquiétudes actuelles que les nanoparticules suscitent auprès de l'opinion publique et de leurs risques sur la santé, la plupart des entreprises sondées, même si elles répondent au sondage sous couvert d'anonymat, sont réticentes à fournir leurs données. A cette difficulté d'exactitude liée à la méthode utilisée, s'ajoute le problème de la définition des NMx qui n'est pas identique dans tous les pays et n'est pas toujours totalement claire. Par exemple, la forme pyrogénique agrégée des nanoparticules de silice est très répandue mais n'est pas systématiquement reconnue comme nanoparticulaire. C'est pourquoi les variations concernant l'estimation de la production annuelle de nanoparticules de silice sont très grandes. Les résultats obtenus montrent que les NMx les plus produits à travers le monde sont ceux à base de titane avec plus de 10 000 tonnes par an (valeur médiane). Viennent ensuite les NMx composés de silice, d'oxyde de zinc et d'oxyde de fer (Figure 26). (Piccinno et al., 2012)

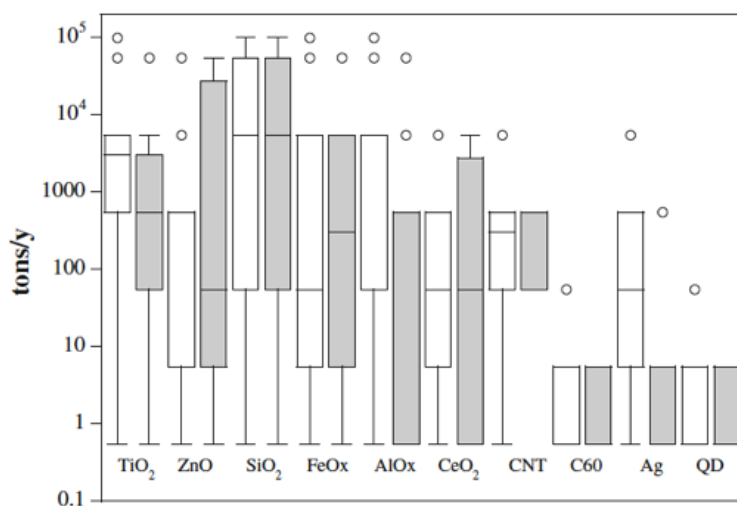


Figure 26. Estimation de la quantité de NMx produits en Europe (boîtes à moustaches grises) et dans le reste du monde (boîtes à moustaches blanches). D'après Piccinno F. – JNR. 2012.

4. Aspects sociétaux liés aux nanotechnologies

4.1. Les nanotechnologies et l'opinion publique

Les nanotechnologies provoquent des réactions très contrastées dans l'opinion publique. Elles suscitent dans un premier temps un engouement fort puisqu'elles sont perçues comme un symbole de modernité, de nouveauté et d'efficacité qui permet de répondre à des problématiques non résolues jusqu'à présent. Certains industriels et publicitaires n'hésitent donc pas à profiter de cette image et utilisent volontairement la notion « nano » pour promouvoir des produits de consommation (Figure 27). Un phénomène similaire a déjà été observé entre les années 1930 et 1940 avec les produits radioactifs. (Lefebvre and Raynal, 2002) En effet, certains industriels profitaient de récentes découvertes sur la radioactivité pour promouvoir des produits de consommation courant enrichis en éléments radioactifs comme le radium. Les termes « radio », « atomique » et « radium » étaient inscrits sur les emballages et les affiches publicitaires comme arguments de vente (Figure 27). Aujourd'hui, le radium est interdit à la consommation puisqu'il est considéré comme dangereux pour la santé, *a fortiori* lorsque nous y sommes exposés à des doses répétées.

Cependant, les nanotechnologies provoquent aussi de fortes réactions d'opposition et d'inquiétude. Face à une technologie fantasmée et à des souvenirs de scandales sanitaires tels que ceux de l'amiante dans les années 1990 et des OGMs au début du XXI^{ème} siècle, la population redoute « un infiniment petit » disséminé et indétectable mais surtout dangereux s'il est mal maîtrisé. Par souci de canaliser les peurs et d'assurer une meilleure communication sur l'utilité des nanotechnologies à répondre aux enjeux sociétaux, des rencontres entre

militants écologistes, industriels et chercheurs sont régulièrement organisés ([Giles, 2003](#)) y compris à Grenoble où la Commission Nationale de Débat Public a organisé des débats (CNDP nano) en 2009. Même s'il reste compliqué d'ouvrir un dialogue raisonné entre les différents groupes pro- et anti-nanotechnologies, ces débats permettent d'apporter une réflexion autour des bénéfices et des risques des nanotechnologies pour la santé et l'environnement. En 2010, 41% des Européens étaient favorables aux nanotechnologies. La volonté d'acheter des produits contenant des nanoparticules varie en fonction du domaine d'application. En effet, 70 % des personnes interrogées accepteraient d'acheter des revêtements de surface et des soins à base de NPs alors que 30% seraient prêtes à acheter des cosmétiques contenant des NPs et seulement 20% accepteraient d'acheter des produits alimentaires contenant des NPs. ([Laux et al., 2018](#))


	Années 2010	Années 1940
Cosmétiques (crèmes de soin)		
Produits liés à l'hygiène (brosses à dents, dentifrices, savon)		
Produits d'entretien ménager (cires, torchons)		
Technologies (i-pod, voiture, réveils, tondeuse)		
Textiles Vêtement de sport, sous-vêtements)		
Nourriture et boissons (eau, boissons énergisantes, chocolat)		

Figure 27. Exemples de produits faisant références aux nanotechnologies comme argument de vente en 2010. Comparaison avec les publicités des années 1940 promouvant les produits contenant du radium.

4.2. Les différents organismes influant sur la législation des NMx

Si l'encadrement juridique des nanoparticules a progressé au cours des dernières décennies, les instances gouvernementales et européennes peinent à suivre le rythme rapide du développement et de l'utilisation massive des nanotechnologies. Cette lenteur s'explique par plusieurs facteurs incluant la nouveauté des nanomatériaux et donc la nécessité de créer une législation nouvelle, les incertitudes liées aux risques potentiels des nanomatériaux et la

volonté politique et économique de ne pas brider le développement d'une industrie à la fois rentable et prometteuse. (Cambou and Proy, 2011; Ponce Del Castillo, 2010)

L'exemple du 6^e programme-cadre de 2002 à 2006 de la Commission européenne est à ce titre révélateur. En effet, c'est ce programme-cadre qui a marqué l'essor de la politique européenne en matière de nanotechnologies. La Commission n'a néanmoins pas mis en place de cadre législatif pour les nanotechnologies et s'est contentée de formuler des recommandations. Ce n'est ensuite qu'avec le règlement REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) entré en vigueur en 2007 que les nanomatériaux ont commencé à faire l'objet d'un encadrement au niveau européen. Bien que les nanomatériaux ne soient pas explicitement mentionnés dans le règlement ils n'en restent pas moins considérés comme des produits chimiques qui tombent sous le coup de la régulation REACH. Cependant, les produits chimiques ne font l'objet d'un enregistrement auprès de l'Agence Européenne des Produits Chimiques (ECHA) seulement pour des quantités produites ou importées supérieures à 1 tonne. Il est donc vraisemblable que certains nanomatériaux produits ou importés en quantités inférieures soient susceptibles d'échapper à cette contrainte. L'ECHA a néanmoins formulé des recommandations sur la toxicologie et la sécurité concernant les nanomatériaux.

Progressivement, la Commission a également imposé des recommandations et des règles spécifiques sur certains types de produits et de NPs. Ainsi, l'autorisation des produits biocides et des produits cosmétiques est soumise à des tests ciblant spécifiquement les nanorisques (CE n°1223/2009 et UE n°528/2012). Le règlement sur les cosmétiques est notable en ce qu'il constitue le premier outil de législation européen contenant des dispositions

spécifiques aux nanomatériaux. ([Ponce Del Castillo, 2010](#)) Il prévoit par exemple que tous les produits cosmétiques contenant des NPs doivent faire l'objet d'une notification auprès de la Commission. Enfin, les règlements n°1223/2009 relatifs aux produits cosmétiques, n°528/2012 relatifs aux produits biocides et n°1169/2011 concernant l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires (dit *INCO*) imposent que la présence de NMx dans des produits de consommation soit soumise à une obligation d'étiquetage (depuis juillet 2013 pour les produits cosmétiques, depuis septembre 2013 pour les produits biocides et depuis décembre 2014 concernant les denrées alimentaires) ([Journal Officiel de l'Union Européenne](#)).

Même si ces premiers pas vers une régulation des NMx ont été salués, ils sont malgré tout encore jugés insuffisants par certains auteurs qui regrettent par exemple les définitions trop floues ou trop larges des NMx, ([Ponce Del Castillo, 2010](#)) ainsi que l'absence de régulations des nanoparticules dans les textiles et les produits ménagers. ([Laux et al., 2018](#)) De même, si l'obligation d'étiquetage permet une meilleure information des consommateurs, la question de savoir si tous les consommateurs en tiendront compte reste ouverte.

Afin de répondre aux inquiétudes liées à l'impact des NPs sur la santé, l'environnement et les risques au travail mais aussi de pallier certaines insuffisances de la législation européenne, divers états européens se sont efforcés de légiférer davantage sur les NPs. C'est par exemple le cas de la France qui a été un des premiers états membres de l'Union Européenne à instaurer des régulations en matière de nanotechnologies. En effet, l'article 42 de la loi Grenelle I (août 2009) puis l'article 185 de la loi Grenelle II (juillet 2010) ont inscrit dans le code de l'environnement la déclaration obligatoire de NMx conformément à

l'Engagement n°159 du Grenelle de l'Environnement de novembre 2007. La loi entrée en vigueur à compter de janvier 2013 prévoit que les fabricants, les importateurs et les distributeurs de produits contenant des NPs doivent régulièrement déclarer auprès de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES) « l'identité, les quantités et les usages de ces substances, ainsi que l'identité des utilisateurs professionnels à qui elles les ont cédées ». Elle impose également la mise à la disposition de l'ANSES de toutes les informations disponibles relatives aux dangers des substances en question. (Légifrance, 2009, 2010) Le but affiché de cette mesure pionnière en Europe et dans le monde est la mise en place de mesures de traçabilité, d'information des consommateurs et de recensement des produits. En effet, les produits ainsi déclarés sont inscrits au registre dit R-Nano dont le bilan est publié annuellement sur internet. D'autres pays européens ont suivi cette démarche avec par exemple la promulgation de lois similaires au Danemark en 2012 et en Belgique en 2014 ainsi que d'autres projets de lois envisagés dans d'autres pays. (veillenanos, 2012) Les mesures restent cependant critiquées par les associations écologistes et les associations de consommateurs qui déplorent le trop faible montant de l'amende en cas de non-respect de la loi et du recours possible à une clause de confidentialité. Elles demandent également un plus grand contrôle des produits à base de NPs avant leur mise sur le marché, des seuils plus restrictifs, une définition moins large des NMx et un contrôle accru des déclarations des industriels. (Bolis A., 2012a)

Notons enfin que l'obligation légale de signalement sur l'emballage n'est pas systématiquement respectée, le consommateur peut donc être encore trompé quant à la présence ou à l'absence de NPs dans les produits achetés. En novembre 2017, le Ministère de l'Economie a révélé les premiers résultats d'une enquête menée par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF), qui effectue

des opérations de contrôle depuis 2016 pour s'assurer que la réglementation européenne est respectée. L'enquête a montré une omniprésence des NPs dans les produits cosmétiques (35 produits sur 40) et une présence importante dans les produits alimentaires (29 produits sur 74) pour un étiquetage minimal puisque seulement un produit mentionnait la présence de tous les nanomatériaux identifiés. ([Ministère de l'Economie, 2018](#)) En janvier 2018, l'association de consommateurs UFC-Que Choisir a déposé neuf plaintes contre des fabricants de produits alimentaires et cosmétiques pour non-respect de cette mesure.

Concernant, les travailleurs susceptibles d'être exposés aux NMx, la réglementation en matière de prévention du risque chimique prévue par le code du travail (article L.4121-2), s'applique aussi aux NMx. elle permet d'appréhender les risques liés aux NMx et de distinguer des mesures spécifiques lorsque certains NMx présentent des risques cancérigènes, mutagènes et de toxicité pour la reproduction (catégorie 1A et 1B). L'ANSES a par exemple soumis une proposition de classer les NP-TiO₂ en catégorie 1B mais la commission de l'ECHA n'a pas reconnu cette proposition et a conclu que les NP-TiO₂ pouvaient être classifiées en niveau 2 (potentiellement cancérigène par inhalation). ([ANSES, 2017](#)) Bien que les réglementations françaises et européennes n'ont pas encore défini de limites d'expositions professionnelles globales pour les NMx, des organismes nationaux comme le National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) aux Etats-unis ou l'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS) en France ont établi plusieurs valeurs limites d'exposition pour certains types de NMx. En France, les limites quotidiennes d'expositions professionnelles pour les NP-TiO₂ sont par exemple de 0,3mg/m³ et de 1µg/m³ d'air respiré pour les nanotubes de carbones. ([INRS, 2013, 2018](#)) En France, Le code du travail, a fixé les limites d'exposition concernant les NP-SiO₂ cristallines (substances classées 1, cancérigène ([IARC, OMS, 2012](#)))

entre $50\mu\text{g}/\text{m}^3$ et $100\mu\text{g}/\text{m}^3$ et à $10\text{mg}/\text{m}^3$ pour les NP-SiO₂ amorphes. (INRS, 1997; Ricaud M., 2007) Ces limites sont en revanche variables d'un pays à l'autre.

5. Toxicité des NPs : le « risque nano »

5.1. Une discipline nouvelle : la nanotoxicologie

Dans un souci de répondre aux craintes soulevées par l'utilisation des NMx dans de nombreux domaines, une nouvelle discipline s'est développée en parallèle aux nanotechnologies : la nanotoxicologie. Cette science qui a pour but d'étudier les risques éventuels des nanomatériaux sur l'environnement et la santé a pris de l'importance à partir des années 2000 avec un nombre de publications qui n'a cessé d'augmenter (Sauer et al., 2011) (Figure 28A). L'intérêt croissant des scientifiques pour la nanotoxicologie permet, d'une part, de diversifier les modèles d'études comme les types de NMx étudiés (Figure 28B), le modèle cellulaire, le mode d'exposition, etc. dans l'objectif d'améliorer la compréhension des mécanismes de toxicité et de répondre le plus adéquatement possible aux inquiétudes du grand public (Boczkowski and Hoet, 2010), et, d'autre part, de confronter les travaux effectués afin d'améliorer les outils et les études menées actuellement. (Kroll et al., 2009)

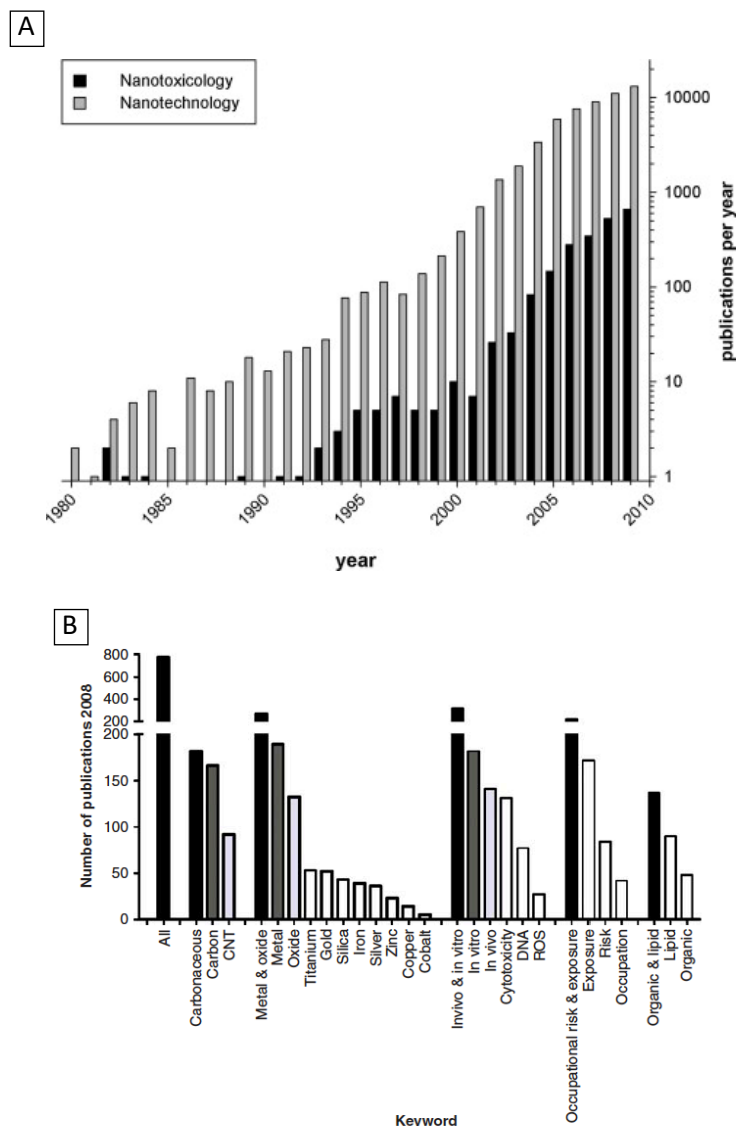


Figure 28. Nombre de publications relatives à la toxicité des NMx. A- Nombre de publications parues entre 1980 et 2010. B- Nombre de publications en fonction du type de NMx. D'après Sauer U.G. – *Regul Toxicol Pharmacol.* 2011. Et Boczowski J. – *Nanotoxicology.* 2010.

5.2. Les différents modes d'exposition aux NPs

La toxicité des NPs manufacturées dépend de multiples paramètres physico-chimiques comme la composition, la taille, la forme et la stabilité (phénomènes de dissolution ou d'agrégation). Chaque NM possède donc un profil toxicologique qui lui est propre. De plus, les voies de pénétration dans l'organisme influent grandement sur la toxicité des NPs. En effet,

nous pouvons y être exposés de différentes manières, soit par simple contact avec la peau, soit par ingestion ou inhalation (Figure 29). La peau, l'appareil pulmonaire et gastro-intestinal y sont très exposés puisqu'ils sont en permanence en relation avec l'extérieur (Cf. partie 1. Le système immunitaire). Les modes d'exposition peuvent être plus ou moins dangereux. Ainsi, un consommateur est surtout exposé aux NPs par contact (cosmétiques, tatouages, etc.) ou ingestion (additifs alimentaires) alors que certains travailleurs y sont fortement exposés par inhalation (industrie, travaux publics). Dans des cas plus rares, certaines applications médicales nécessitent d'injecter des NPs directement dans la circulation sanguine (traitement contre l'anémie, produits de contrastes). Par conséquent, un même type de NM peut induire des pathologies différentes selon les organes qui y sont exposés. (Buzea et al., 2007; Oberdörster et al., 2005)

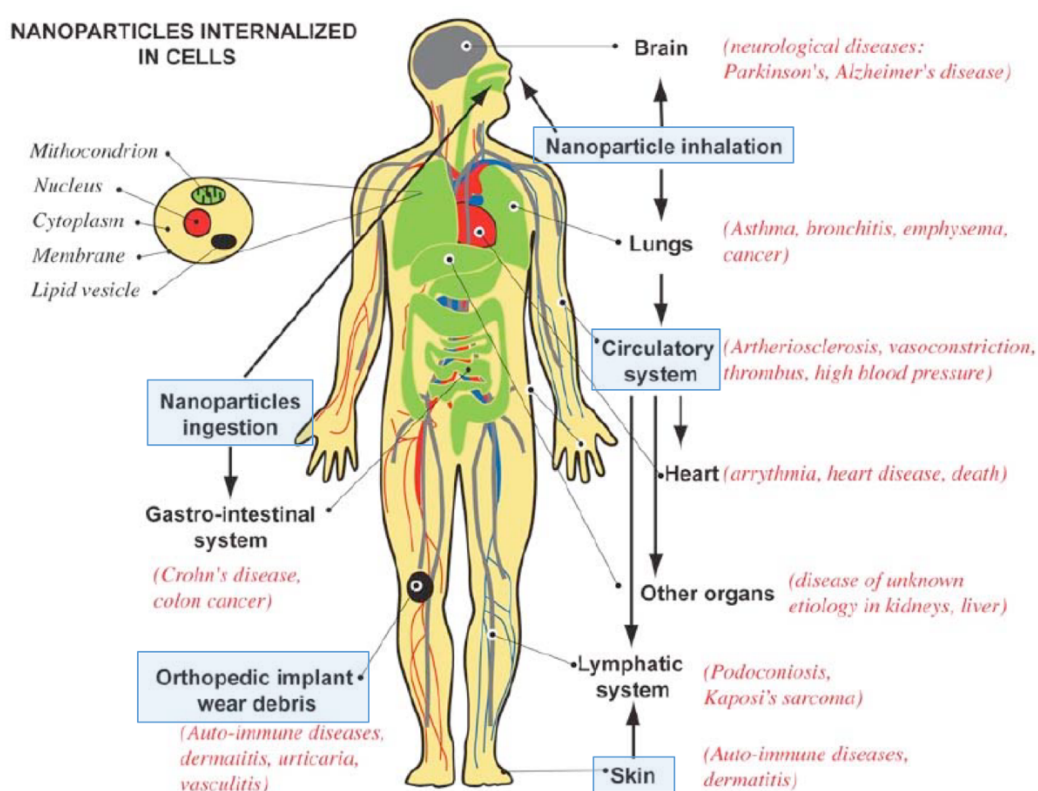


Figure 29. Voies de pénétration des NPs dans l'organisme et risques associés pour la santé. D'après Buzea C. – Biointerphases. 2007.

5.2.1. Interactions entre les NPs et la peau

La question de la capacité des NPs à traverser la peau reste controversée. En effet, bien que plusieurs études aient révélé la capacité des NPs à traverser l'épiderme via les follicules pileux, les glandes sébacées et les glandes sudoripares (Figure 30), suscitant ainsi des inquiétudes concernant les crèmes solaires à base de NPs de zinc et de titane, (Hoet et al., 2004; Smijs and Pavel, 2011; Tinkle et al., 2003; Wu et al., 2009) d'autres études ont confirmé l'incapacité des NPs présentes dans les cosmétiques à franchir le stratum corneum (couche la plus superficielle de la peau composée d'un empilement de cellules mortes), lorsque la peau est saine. (Zvyagin et al., 2008) En revanche, des préoccupations plus sérieuses demeurent lorsque la peau présente des microcoupures ou des brûlures telles que les coups de soleil qui facilitent la pénétration des NPs dans le derme. (Labouta et al., 2011; Monteiro-Riviere et al., 2011) Par le biais des capillaires sanguins et des cellules phagocytaires (macrophages et cellules de Langerhans), les NPs peuvent ainsi s'insinuer dans le sang et les ganglions lymphatiques. Ce phénomène a surtout été observé lorsque des personnes se font tatouer. L'encre utilisée est injectée directement entre le derme et l'épiderme. Elle contient des NPs qui peuvent ensuite être redistribuées de manière systémique. (Schreiver et al., 2017; Sepehri et al., 2017)

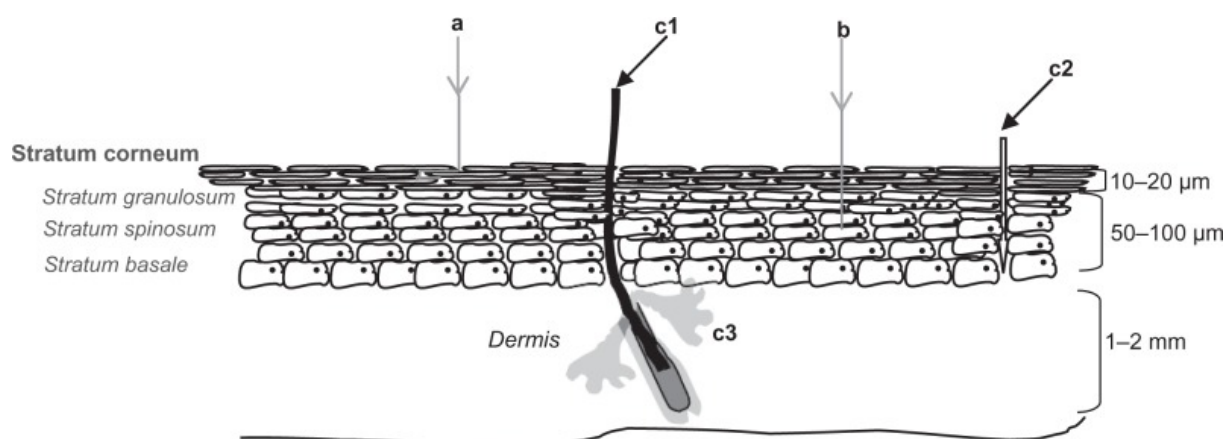


Figure 30. Possibles voies de pénétration des NPs à travers la peau. L'épiderme est constitué de trois couches successives de cellules : le Stratum basale, le stratum spinosum, le Stratum granulosum. Les NPs sont capables de franchir l'épiderme de manière paracellulaire (a) et transcellulaire (b) (avec une faible capacité de pénétration). Elles peuvent aussi traverser la peau avec un plus fort risque de pénétration via les follicules pileux (c1), les pores sudoripaux (c2) et les glandes sébacées (c3). *D'après Smijs T.G. – Nanotechnol Sci Appl. 2013.*

5.2.2. Interactions entre les NPs et l'intestin

Les NPs servant d'additif ou de colorants sont présentes dans de nombreux aliments et boissons (Tableau 3). (Casals et al., 2008) Chez l'homme, l'ingestion quotidienne de NPs estimée est donc conséquente. En effet, plusieurs études (dont la revue de Fröhlich and Fröhlich, 2016) rendent compte des quantités moyennes de NPs de silice (NP-SiO₂), de titane (NP-TiO₂), de zinc (NP-ZnO) et d'argent (NP-Ag) ingérées. Elles sont estimées à plusieurs dizaines voire centaines de milligrammes par jour et par personne. Il va sans dire que les quantités ingérées varient selon l'âge, le sexe, la corpulence et le mode de vie de chaque individu. Ces résultats servent cependant à nous donner une idée de l'omniprésence des NPs dans nos assiettes. La possibilité de leur implication dans certaines pathologies gastro-intestinales chroniques émergentes (maladie de Crohn) ne semble donc pas dépourvue de sens.

Table 1. The use of nanoparticles as food additives

	Substance	Food Additives
E-171	Ultrafine Titanium Dioxide Power	<ul style="list-style-type: none"> • Tables and Capsules • Cottage and Mozzarella cheses • horseradish cream • sauces, lemon curt and sweets
E-172	Iron oxides and Dioxides	<ul style="list-style-type: none"> • Cake, dessert mixes • Meat paste, salmon and shrimp paste
E-173	Aluminium	<ul style="list-style-type: none"> • External decoration in cakes • Antacid treatments • Tap watter drinking supply
E-174	Silver	<ul style="list-style-type: none"> • External Decoration
E-175	Gold	<ul style="list-style-type: none"> • External Decoration

Tableau 3. Principales NPs utilisées en tant qu'additifs alimentaires. D'après Casals E. – TrAC. 2008.

Avec ses 200m² de surface de contact avec l'extérieur, l'épithélium intestinal possède un fort potentiel d'interaction avec les NPs présentes lors du transit qui dure entre 20 et 30 heures. Bien que les NPs soient majoritairement éliminées par les fèces, la présence de cellules spécialisées (cellules microfold et dendritiques) facilite leur transport à travers l'épithélium. (des Rieux et al., 2007) Plusieurs études ont démontré les possibles effets toxiques des NP-Ag, des NP-TiO₂, NP-SiO₂ et des NP-ZnO sur les cellules intestinales. Leur accumulation induit principalement des dommages à l'ADN et favorise la production de ROS et de cytokines inflammatoires (Il-8) (De Angelis et al., 2013; Dorier et al., 2015, 2017). Il a également été démontré que les NP-TiO₂ déstabilisent les microvillosités et les jonctions serrées des cellules épithéliales de l'intestin, altérant ainsi la capacité d'absorption des nutriments et les fonctions de barrière de l'épithélium intestinal. (Koeneman et al., 2010) Outre les effets directs des NPs sur les cellules, les NP-Ag sont susceptibles de déséquilibrer le microbiote (dysbiose) via leurs propriétés antibactériennes. (Chen et al., 2017; Lu et al., 2013) Or, le microbiote assure de multiples fonctions nécessaires à l'hôte comme la dégradation de composants non-digérés, la

synthèse de vitamines (vitamines B et K), (Conly et al., 1994) la résistance aux micro-organismes pathogènes ainsi que la régulation du système immunitaire. (Belkaid and Hand, 2014) (Figure 31). Les NPs ingérées de manière répétée sont donc susceptibles de perturber durablement les fonctions de l'intestin, soit en agissant directement au niveau des cellules épithéliales soit indirectement en modifiant le microbiote (Guarner and Malagelada, 2003) et la réponse immunitaire. Plusieurs études se sont également intéressées aux effets systémiques liés à l'ingestion de NPs. Cet intérêt est dû d'une part, à la présence de réseaux lymphatiques et vasculaires situés juste en-dessous de l'épithélium et qui ajoutent des risques de diffusion des NPs à travers l'ensemble de l'organisme, et, d'autre part, au fait que l'altération du microbiote n'influe pas seulement les fonctions intestinales mais intervient dans d'autres affections telles que l'anxiété et la dépression. (Foster and McVey Neufeld, 2013) Certains auteurs ont ainsi cherché à démontrer un lien entre l'ingestion de NP-Ag, la perturbation du microbiote et les troubles anxieux. (Javurek et al., 2017)

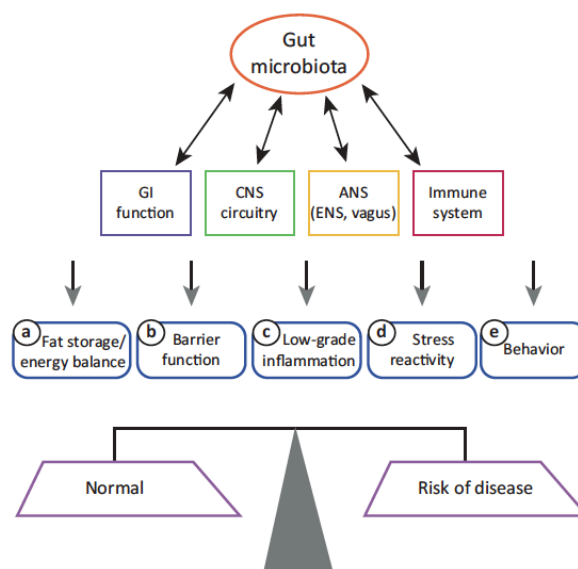


Figure 31. Rôle du microbiote intestinal dans le maintien de l'homéostasie et de sa contribution dans certaines maladies lorsqu'il est déséquilibré. Le microbiote influence le stockage des graisses et la balance énergétique (a), les fonctions de la barrière intestinale (b), l'inflammation (c), la réactivité au stress (d), les comportements anxieux et dépressifs (e). Abréviations : GI, gastro-intestinal ; CNS, système nerveux central ; ANS, système nerveux autonome ; ENS, système nerveux entérique. D'après Foster J.A. – *Trends Neurosci.* 2013.

5.2.3. Les interactions entre les nanoparticules et les poumons

L'entrée par inhalation des NPs dans notre organisme est la voie d'exposition qui semble susciter le plus d'intérêt et est étudiée très attentivement pour de multiples raisons. Tout d'abord, les maladies pulmonaires professionnelles (pneumoconioses et cancers) liées à l'inhalation de fibres d'amiante (Wagner et al., 1960) ou de silice cristalline (Peretz et al., 2006) sont largement connues et ont causé plusieurs scandales sanitaires ayant marqué les esprits. Il s'avère donc important de ne pas reproduire les erreurs d'autrefois. De plus, bien que les travailleurs soient les plus concernés par les risques d'inhalation de NPs manufacturées, l'opinion publique est sensibilisée depuis longtemps aux questions liées à la pollution de l'air par les particules fines, ultrafines, etc. Enfin, le poumon étant un organe très vascularisé pour permettre les échanges gazeux, le risque que les NPs entrent dans la circulation sanguine est

avéré. (Nemmar, 2002) Elles sont en effet susceptibles d'induire des pathologies nouvelles (plus ou moins généralisées) autres que celles liées aux poumons.

Une fois inhalées, les particules peuvent soit être exhalées soit se déposer et/ou s'accumuler dans les différentes parties des voies respiratoires. Selon leur taille, les particules n'ont pas le même devenir. En effet les particules micrométriques sont davantage retrouvées dans les voies supérieures (fosse nasale, bouche, pharynx, larynx) alors que les nanoparticules pénètrent les couches plus profondes des voies respiratoires puisqu'elles sont retrouvées majoritairement dans les alvéoles pulmonaires ainsi que, dans une moindre mesure dans la zone trachéo-bronchique (Figure 32A). (Carvalho et al., 2011) De plus, les particules de grande taille supérieures à $5\mu\text{m}$ sont plus facilement éliminées par exhalation alors que les particules de plus petite taille et les NPs sont phagocytées par les macrophages (Figure 32B). (van Rijt et al., 2014)

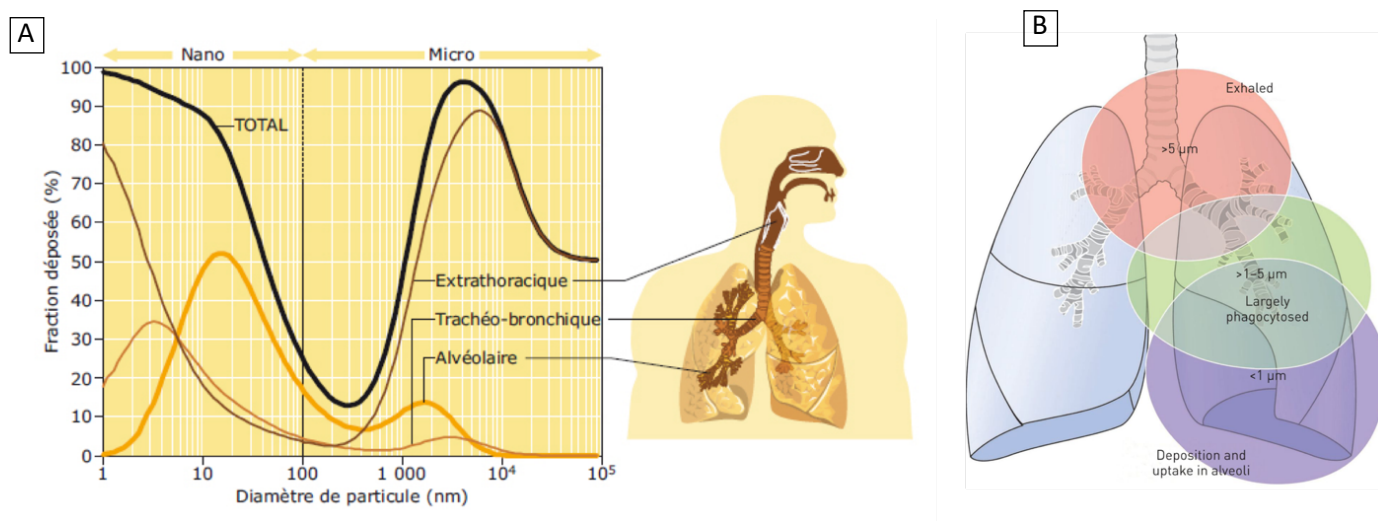


Figure 32. Devenir des particules inhalées en fonction de leur taille au niveau des poumons. A- Influence de la taille des particules inhalées sur leur répartition pulmonaire. B- Possibilités d'élimination des particules en fonction de leur taille. D'après le rapport de l'INRS. Dossier nanomatériaux, nanoparticules. 2016. Et Van Rijt S.H. – Eur. Respir. J. 2014.

Certains NMx ne sont cependant pas éliminés efficacement par phagocytose. Ils peuvent d'une part, s'accumuler dans les alvéoles causant ainsi des inflammations persistantes et d'autre part, traverser la paroi alvéolaire, rejoindre les structures ganglionnaires ainsi que les systèmes lymphatique et sanguin afin d'atteindre d'autres organes (Figure 33). (Misericocchi et al., 2008; Nakane, 2012)

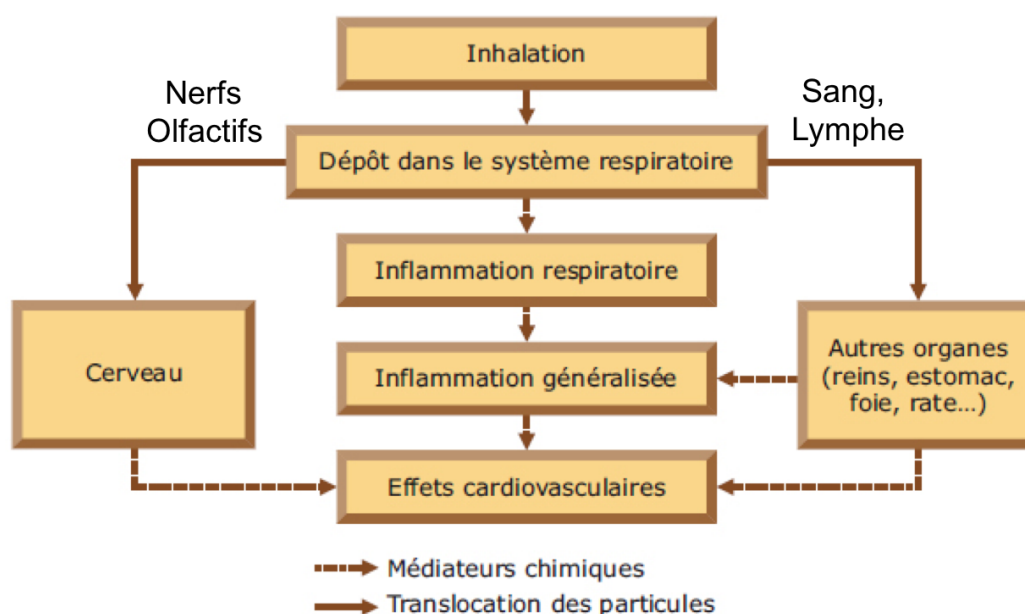


Figure 33. Effets possibles des NPs inhalées sur la santé. D'après le rapport de l'INRS. Dossier nanomatériaux, nanoparticules. 2016.

L'accumulation et l'élimination des particules (ou fibres) dans les poumons sont des facteurs déterminants dans l'évolution de l'inflammation chronique pulmonaire liée à l'amiante (asbestose) et à la silice cristalline (silicose). (Davis, 1989) Etant donné les graves conséquences sur la santé des travailleurs qui y ont été exposés, les mécanismes mis en jeu dans ces maladies ont largement été étudiés (Davis, 1986; Hamilton et al., 2008) et servent de point de départ (ou de comparaison) dans les études de toxicité actuelles concernant les NPs manufacturées. En effet, dans ces deux affections pulmonaires, il s'est avéré que la production

de ROS endommageant les cellules pulmonaires et la sur-activation continue des macrophages résidents semblent être à l'origine d'un déséquilibre au court-long terme de l'homéostasie tissulaire causant la maladie. Dans un premier temps, les radicaux libres oxygénés sont issus de la réactivité de surface de certaines variétés d'amiante (crocidolite, amosite, actinolite) à cause de la présence d'éléments métalliques tels que le fer. (Kamp et al., 1992; Lund and Aust, 1991) Dans le cas de la silice cristalline, cela est dû à des clivages des liaisons covalentes silice-oxygène (Fubini et al., 1987) et à leurs réactions avec l'eau et le peroxyde d'hydrogène. (Fubini and Hubbard, 2003) Dans un deuxième temps, la production de ROS résulte d'un « burst oxydatif » à la suite de l'internalisation de l'amiante et de la silice par les macrophages. L'accumulation des ROS induit des mécanismes de mort cellulaire ainsi que des dommages à l'ADN au niveau des cellules épithéliales qui sont responsables de lésions au niveau du poumon. L'activation des macrophages alvéolaires favorise aussi le recrutement d'autres macrophages et de cellules immunitaires comme les mastocytes, les neutrophiles, et les lymphocytes.

Dans le cas particulier de la silice cristalline, son internalisation par les macrophages peut également conduire à leur mort à cause de différents mécanismes tels que la rupture des membranes lysosomales, (Thibodeau et al., 2004) la perturbation du potentiel mitochondrial (Thibodeau, 2003) et l'activation de divers signaux apoptotiques notamment via l'intermédiaire de récepteurs éboueurs (SR) de type MARCO. (Hamilton et al., 2008) La présence de corps apoptotiques chargés en silice cristalline non digérée favorise ainsi le recrutement d'autres macrophages qui subiront eux-mêmes les effets de la silice. La silicose doit donc être vue comme un ensemble de phénomènes d'amplification de l'inflammation dans lesquels les macrophages jouent un rôle central (Figure 34). (Hamilton et al., 2008)

L'inflammation chronique a lieu en même temps que des mécanismes de réparation tissulaire médiés par les macrophages M2. La sécrétion de TGF- β contribue à l'accumulation de constituants de la matrice extracellulaire (collagène) nécessaires à la formation des fibroses (Branton and Kopp, 1999; Mossman and Churg, 1998) pouvant évoluer à long terme vers certains cancers du poumon.

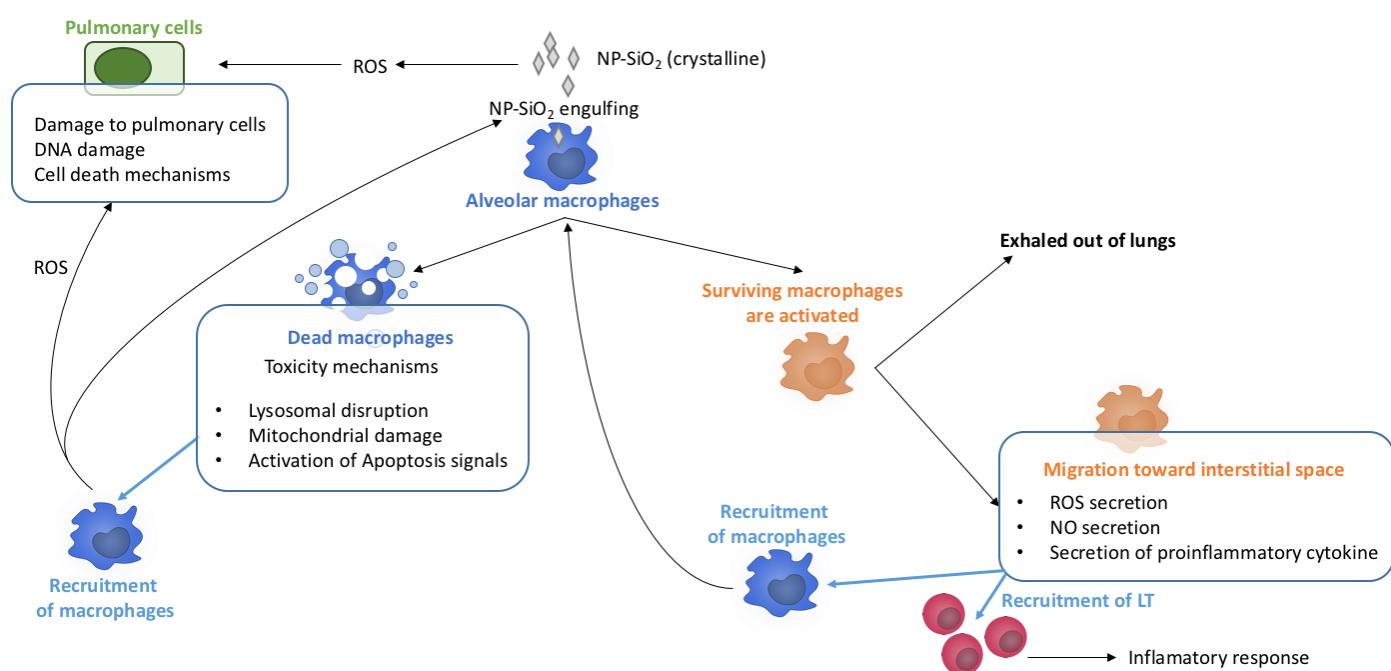


Figure 34. Mécanismes de toxicité des NPs de silice cristalline (focalisation sur les macrophages alvéolaires). Adapté de Hamilton R.F. Jr – Free Radic. Biol. Med. 2008.

6. Les paramètres physico-chimiques influençant la toxicité des NPs

6.1. La taille, la forme et le matériau qui compose les NPs

La taille des NPs influe principalement sur la profondeur de pénétration dans l'organisme. En effet, plus les particules sont de petite taille et plus elles risquent de

progresser facilement à l'intérieur d'un organe (comme par exemple le poumon). (Carvalho et al., 2011) Les nanoparticules de petites tailles semblent traverser plus facilement les barrières biologiques mises en places par l'organisme tels que le mucus de l'intestin (Lamprecht et al., 2001) ou le stratum corneum de la peau. Enfin, la translocation des particules vers les systèmes lymphatique et vasculaire est également influencée par la taille des particules.

La taille détermine également les moyens mis en place par la cellule pour capturer les particules. Elle influe à la fois sur la cinétique d'internalisation et sur le trafic intracellulaire des NPs. La phagocytose favorise l'internalisation des particules de grande taille comprises entre 1 μ m et une dizaine de micromètres. L'endocytose sert principalement à capturer des particules inférieures à 200nm dont les variations, à la fois de taille et de chimie de surface (comme par exemple la présence ou l'absence de ligands) influent sur les possibilités d'endocytose qui peuvent être soit clathrine- ou cavéoline- dépendantes soit clathrine- ou cavéoline-indépendantes. La pinocytose et la macropinocytose servent à capturer de manière non-spécifique, respectivement, des solutés ou des particules supérieures à 1 μ m (Figure 35). (Jiang et al., 2008b; Petros and DeSimone, 2010; Rejman et al., 2004)

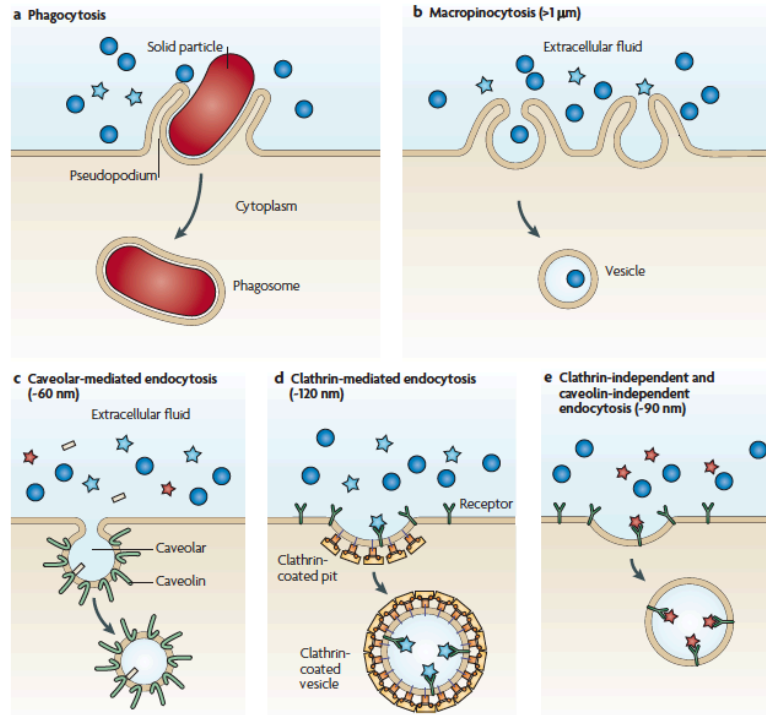


Figure 35. Impact de la taille des NPs sur les possibilités d'internalisation. D'après Petros R.A. et DeSimone J.M. – *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2010.

Pour un même matériau, plus la particule est petite et plus sa surface spécifique devient grande. En d'autres termes, pour un même volume occupé, les particules à l'échelle nanométrique auront davantage de surfaces exposées au milieu extérieur que les microparticules (Figure 36). (Koehler, 2015) Ce phénomène augmente ainsi les possibilités d'interactions avec les différents composants du milieu qui entoure les nanoparticules.

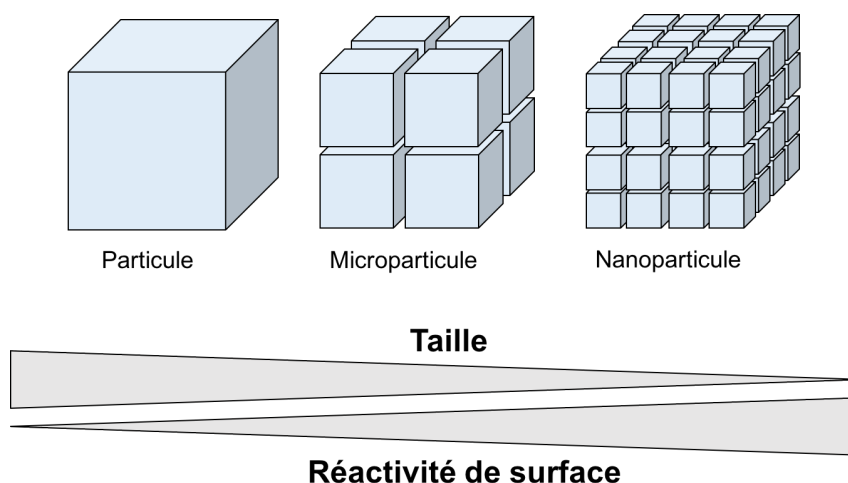


Figure 36. Augmentation de la réactivité de surface des particules en fonction de la taille pour un même volume occupé. Adapté de Koehler A.R. – Toxicity of Engineered Nanomaterials. 2015.

Cependant, les études menées par [Satzler et al., 2016](#) ont montré que des protéines (myoglobine et albumine) libres avaient davantage la capacité de s'adsorber sur les particules de grande taille. De plus, il s'avère que les protéines adsorbées à la surface de particules dont le diamètre est supérieur à 150 nm présentent des changements conformationnels qui ne sont pas observés dans le cas des particules de plus petites taille. Les auteurs n'ont pas encore déterminé si toutes les protéines en contact avec les particules se comportaient de la même manière mais ils soulèvent des questionnements sur les modifications de réactivité des protéines qui constituent la corona (ensemble des biomolécules adsorbées à la surface des NPs) ainsi que sur l'influence de ces modifications sur la toxicité des particules. La taille des particules modifie aussi la composition en protéines de la corona lorsqu'elles se situent dans un milieu biologique. Or ces protéines peuvent servir de ligand à différents types de récepteurs cellulaires. La manière dont la taille des particules influe sur leur toxicité dépend donc aussi de la composition en protéines adsorbées. ([Lundqvist et al., 2008](#))

La forme influe également sur l'internalisation des particules. Certains auteurs ([Champion et al., 2007](#); [Champion and Mitragotri, 2006](#)) ont par exemple mis en évidence que les formes régulières telles que les sphères sont internalisées de manière rapide et homogène par les macrophages alors que les formes elliptiques sont phagocytées plus ou moins lentement en fonction de la surface présentée (un contact avec le plus grand axe favorisera l'internalisation contrairement à la surface plane ou au plus petit axe). Des études ont montré que la forme des particules peut influencer le degré de toxicité (inflammatoire) des NPs métalliques telles que les NP-ZnO et les NP-TiO₂. Pour ces dernières, les nanosphères semblent moins toxiques pour les cellules épithéliales pulmonaires que les nanofibres. ([Gatoo et al., 2014](#); [Hsiao and Huang, 2011](#))

Cela va sans dire, un des principaux facteurs modulant la toxicité des NPs est le matériau qui les compose. ([Gatoo et al., 2014](#)) En effet, le matériau peut avoir plusieurs conséquences quant au devenir des NPs. Il peut jouer sur la capacité de dissolution. Ainsi, certains métaux comme le nickel ou le zinc se dissolvent facilement et les ions libérés augmentent l'effet cytotoxique. ([Griffitt et al., 2008](#); [Triboulet et al., 2014](#); [Wang et al., 2014](#)) La réactivité de surface de certaines NPs métalliques (par opposition aux nanoparticules organiques) peut aussi apporter une toxicité supplémentaire en produisant des radicaux libres (ROS) et des ions superoxydes O^{2•-}. ([Fu et al., 2014](#); [Nel, 2006](#)) Ces réactions peuvent survenir en présence de lumière (UV), de peroxyde d'hydrogène et de dioxygène (Figures 37A et 37B). Ainsi de nombreuses applications médicales à base de NPs comme par exemple l'imagerie, utilisent des molécules biocompatibles comme agent d'enrobage dans le but de rendre les NPs plus inertes vis-à-vis des milieux biologiques. ([Jurašin et al., 2016](#))

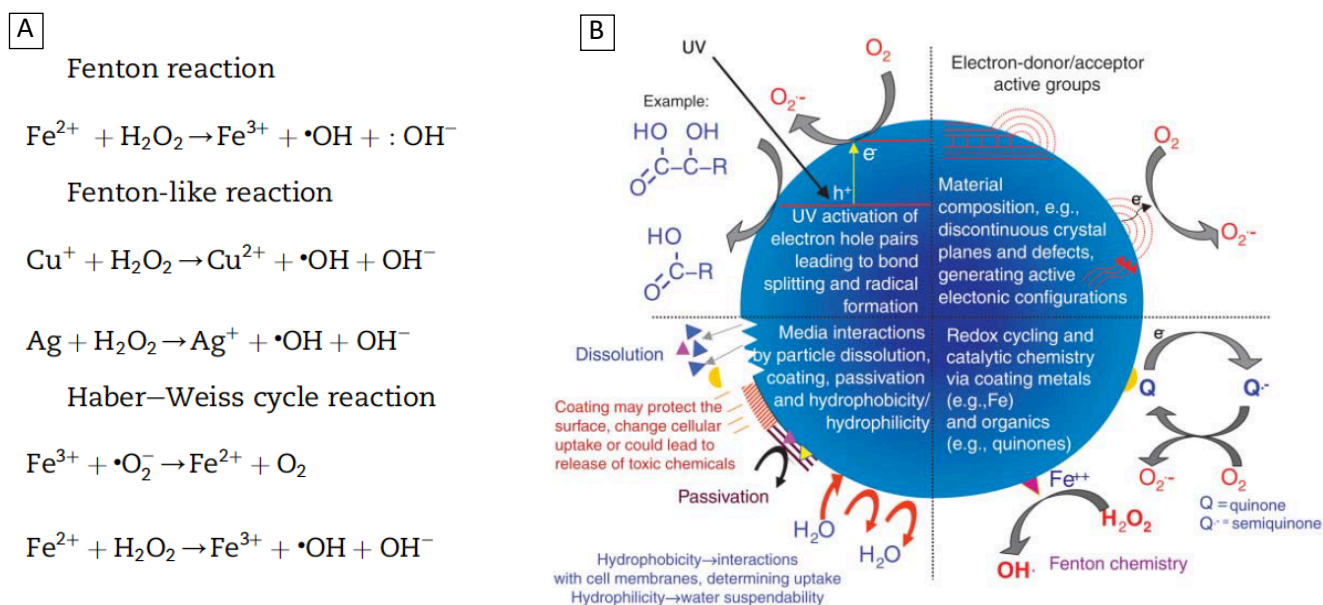


Figure 37. Mécanismes de toxicité des NPs. A- Réactions générant des espèces réactives à l'oxygène. B- Possibles mécanismes par lesquels les NPs interagissent avec le milieu biologique. D'après Fu P.P. – *J. Food. Drug. Anal.* 2014 et Nel. A. – *Science.* 2006.

A noter que, la structure atomique d'un même matériau qui compose les NPs (forme cristalline ou amorphe) influe aussi sur les propriétés physico-chimiques de ces dernières, incluant la formation de ROS et leur capacité à endommager l'ADN. Cela a été observé pour les NP-TiO₂ rutilés, anatases et amorphes. (Dorrier et al., 2015; Gurr et al., 2005; Jiang et al., 2008) Dans le cas de la silice, de nombreuses études de toxicité effectuées sur des modèles *in vivo* et *in vitro* ont montré des différences très importantes de toxicité intrinsèques entre la forme cristalline et la silice amorphe. (Mossman and Churg, 1998; Uboldi et al., 2012; Warheit et al., 1995)

6.2. La charge de surface et solubilité

En lien avec les matériaux, l'effet de l'état de charge sur le devenir des NPs a également suscité beaucoup d'intérêt. En effet, la charge de surface des NPs influe sur les interactions

avec les protéines du milieu, la capacité d'internalisation, le trafic intracellulaire (Yue et al., 2011) ainsi que sur l'effet cytotoxique que peuvent engendrer les NPs. En règle générale, plus les charges de surface sont élevées et plus les interactions entre les NPs et le milieu environnant sont importantes. Contrairement aux NPs neutres, les NPs chargées positivement adhèrent par exemple plus facilement au mucus. Ainsi, elles ne peuvent plus le franchir ce qui limite les contacts avec les cellules épithéliales. (Lieleg and Ribbeck, 2011) Les NPs chargées positivement sont en revanche plus toxiques et plus facilement internalisées par les cellules via la présence de résidus négatifs tels que les acides sialiques situés au niveau des membranes cellulaires. (Bhattacharjee et al., 2010; Goodman et al., 2004; He et al., 2010; Verma and Stellacci, 2010) De plus, les études menées sur des NP-Au (Lin et al., 2010) ont montré que le pouvoir de pénétration des NPs à travers la membrane plasmique des cellules ainsi que leur toxicité médiée par une déstabilisation des bicouches lipidiques est proportionnelle aux charges de surface positives des NPs. Ce phénomène s'avère intéressant dans le cadre de stratégies thérapeutiques pour augmenter la capacité d'internalisation des NPs par des cellules cibles (Figure 38). En revanche, bien que les NPs soient moins bien internalisées, d'autres stratégies thérapeutiques cherchent au contraire à augmenter la furtivité des NPs en favorisant une charge globale neutre (comme par exemple les NPs constituées ou enrobées de polyéthylène glycol PEG) leur permettant d'être moins réactives vis-à-vis du milieu environnant et limitant ainsi les interactions non spécifiques ainsi que leur toxicité.

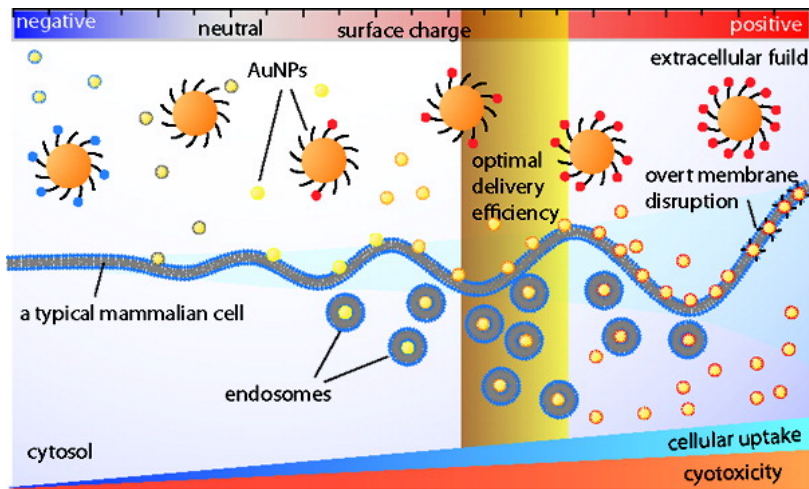


Figure 38. Effet de la charge de surface des NPs sur leur internalisation et leur toxicité. D'après Lin J. – ACS-Nano. 2010.

L'état de charge des particules en suspension est déterminé par la mesure du potentiel zeta (mV) qui prend en compte la charge intrinsèque des particules ainsi que les « nuages » d'ions qui les entourent (Figure 39). (Freire et al., 2011) Le potentiel zeta influence également sur la capacité de dispersion des NPs ou sur les phénomènes d'agglomération et d'agrégation.

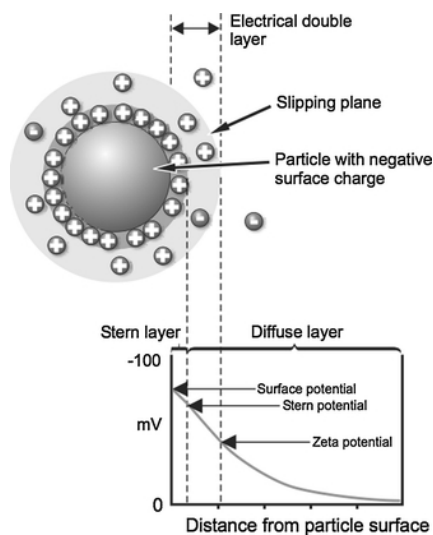


Figure 39. Charge de surface et potentiel zeta. D'après Freire J.M. – Eur. Biophys. J. 2011.

Enfin, le caractère hydrophile/hydrophobe est encore très controversé et n'est pas en soi un facteur déterminant dans le caractère cytotoxique des NPs. En effet, il est surtout relié à d'autres facteurs comme la taille, la dissolution, le matériau et l'agent d'enrobage qui constituent la particule, etc. Les NPs de ferrite de nickel (NP-Ni-Fe₂O₄) rendues hydrophobes sont par exemple plus toxiques que lorsqu'elles sont hydrophiles. (Yin et al., 2005) En revanche, les NP-TiO₂ semblent davantage toxiques ou inflammatoires lorsqu'elles sont hydrophiles. (Brunner et al., 2006; Oberdörster, 2001)

6.3. Les phénomènes d'agrégation ou d'agglomération

Comme précisé dans le paragraphe 1 (Définition des nanomatériaux), les NPs peuvent former des agrégats ou des agglomérats de formes et tailles différentes. Ces phénomènes sont principalement influencés par la solubilité et l'état de charge des particules qui influent sur leur devenir dans l'organisme, notamment via des modifications diverses de leur réactivité biologique. L'augmentation de la taille et des irrégularités de forme modifie par exemple la capacité d'internalisation ainsi que les voies d'internalisation. (Albanese and Chan, 2011) La toxicité des NPs agglomérées ou agrégées par rapport aux NPs libres est très variable selon le type de NPs et le type cellulaire utilisé pour l'étude. De plus les états d'agglomération et d'agrégation peuvent aussi conduire à des phénomènes de sédimentation créant des interférences dans les études de toxicité.

7. Des nanoparticules utilisées en thérapeutique

Les nanoparticules organiques (comme les liposomes et les polymères) ou inorganiques (comme les métaux) suscitent un intérêt très fort en médecine. Dans un premier temps, elles semblent prometteuses dans les domaines de l'imagerie médicale. En effet, les NPs d'or (NP-Au), d'oxyde de fer (NP-Fe₂O₃) et de gadolinium (NP-Gd) sont déjà utilisées en tant qu'agents de contraste en imagerie à résonance magnétique (IRM) ou en imagerie par rayon X (scanners). Les points quantiques possèdent quant à eux des propriétés innovantes en imagerie basée sur la fluorescence. (Busquets et al., 2015) Dans les domaines de la vaccination, les NPs peuvent être utilisées comme systèmes de délivrance d'Ag. Elles peuvent par exemple véhiculer l'Ag à leur surface via des mécanismes de conjugaison ou d'adsorption, ou alors protéger l'Ag du milieu biologique en l'encapsulant à l'intérieur de la particule (Figure 40). (Zhao et al., 2014)

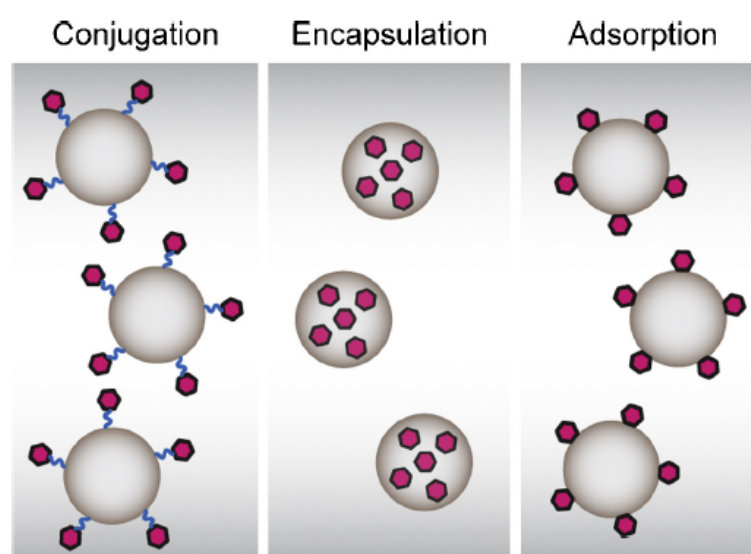


Figure 40. Possibilités de transport d'Ag via l'utilisation de NPs. D'après Zaho L. – Vaccine. 2014.

Par conséquent, l'utilisation de NPs permettrait aussi d'optimiser l'immunisation en multipliant les voies d'administration qui induisent des immunités différentes (Figure 41).

(Holmgren and Czerkinsky, 2005)

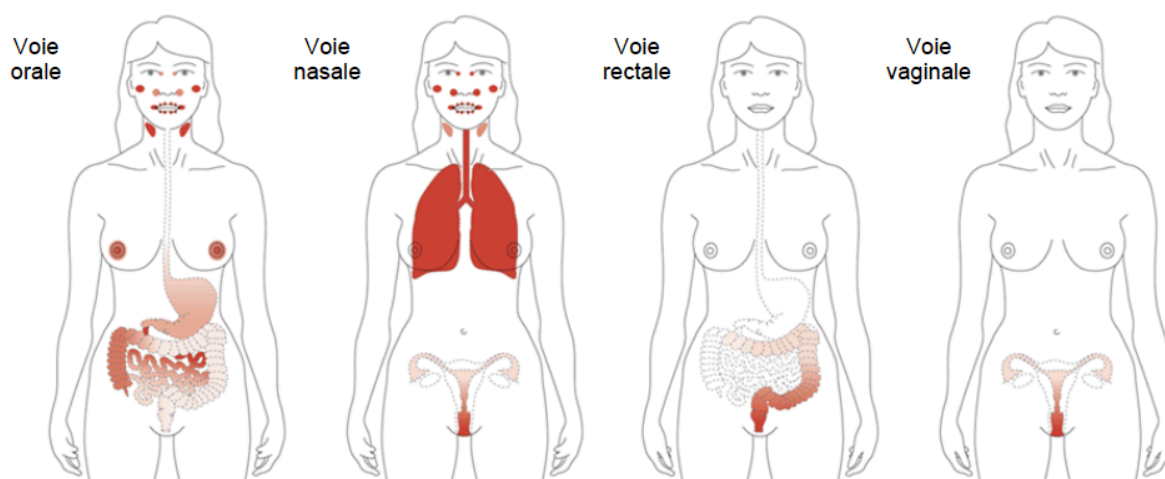


Figure 41. Zones d'expression du système immunitaire (expression d'IgA) en fonction de la voie utilisée pour administrer le vaccin. Utilisation de vaccins avec la toxine B du choléra. Le degré d'expression d'IgA est représenté en rouge : les organes qui expriment fortement les IgA sont fortement saturés en rouge et inversement, la faible expression d'IgA est représentée par une couleur rouge pâle. D'après Holmgren J. et Czerkinsky C. – Nat. Med. 2005.

Enfin, les NPs sont largement utilisées dans l'élaboration de stratégies anti-cancéreuses. Ces dernières peuvent se dérouler de la même manière que les stratégies vaccinales en délivrant des chimiothérapies, ou dans le cas particulier des NPs métalliques, en utilisant leurs propriétés physico-chimiques (génération de chaleur ou de photoélectrons) qui favorisent l'apoptose des cellules tumorales. Les différentes stratégies anti-cancéreuses sont détaillées dans le paragraphe ci-dessous.

7.1. Description synthétique du potentiel des NPs en thérapie anti-cancéreuse

L'utilisation des NPs en thérapeutique nécessite d'évaluer leurs interactions avec les cellules et les milieux biologiques ainsi que les phénomènes de détoxification et de clairance mis en place par l'organisme. Ces études permettent de s'assurer de l'absence de toxicité des NPs mais aussi de leur stabilité, ce qui est nécessaire à l'efficacité thérapeutique. En effet, une dégradation trop précoce ou une agglomération des NPs est susceptible d'empêcher l'acheminement de ces particules dans l'organe ciblé. Dans de nombreuses stratégies anti-tumorale, l'utilisation de NPs biodégradables injectées dans la circulation sanguine permet la libération des chimiothérapies préférentiellement au niveau du site tumoral et éviterait la propagation des médicaments dans tout l'organisme responsables des effets secondaires qui leur sont imputés. En effet, l'utilisation de NPs permet un ciblage tumoral dit « passif » via une vascularisation accrue assortie d'un faible drainage lymphatique au niveau des tumeurs. Ce phénomène est ainsi appelé effet de perméabilité et de rétention (EPR) (Figure 42). (Maeda et al., 2000; Petros and DeSimone, 2010) A savoir, de nombreuses études essaient d'améliorer la capacité et la spécificité de rétention grâce à un ciblage « actif » des NPs médié par la présence de ligands situés à la surface des NPs. Après internalisation des NPs, la libération du principe actif enfermé dans les NPs peut ensuite s'effectuer grâce à de multiples stimuli intracellulaires pH- et enzymes-dépendants (Figure 42). (Wu and Chang, 2010) Néanmoins, l'efficacité de l'accumulation des NPs via un ciblage « passif » et l'utilité de leur fonctionnalisation restent encore très controversées lorsque l'on considère les études *in vivo*. En effet, de nombreux résultats suggèrent que seulement 2% des NPs injectées dans la circulation sanguine rejoignent la tumeur. (Bae and Park, 2011)

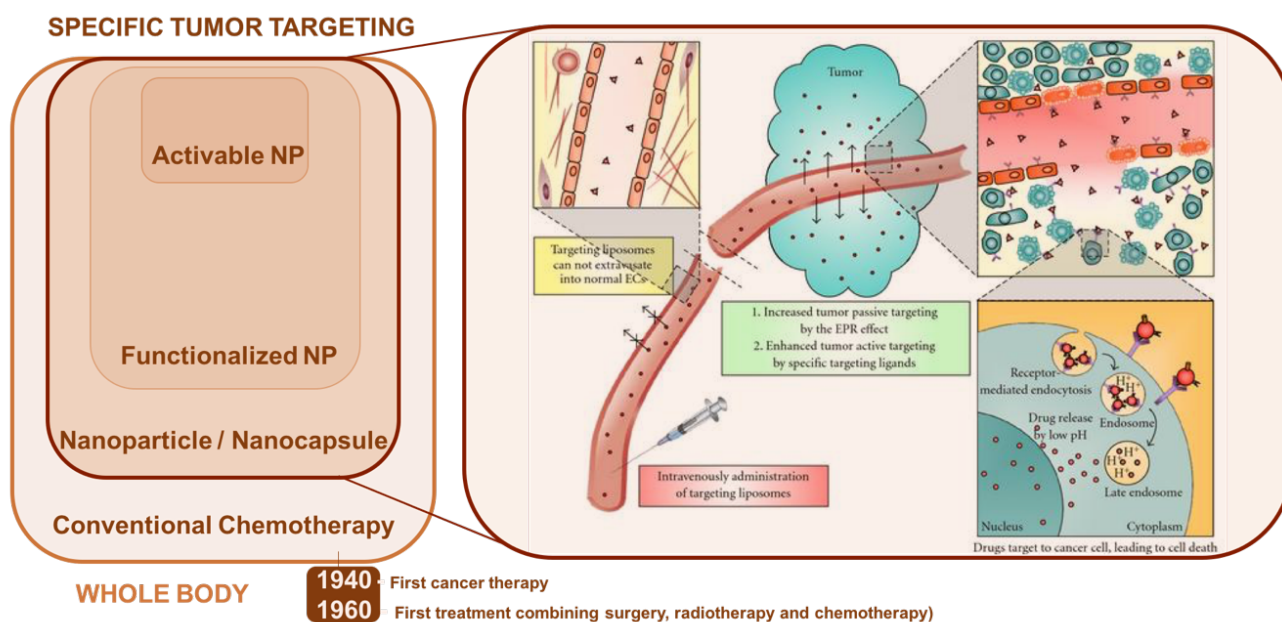


Figure 42. Spécificité de ciblage des NPs en thérapie anti-cancéreuse. Adapté de Wu H-C. – J.Oncol. 2010.

Concernant les NPs métalliques des études ont montré que les NPs accumulées dans la tumeur ont la capacité d'être stimulées via des sources extérieures telles que des irradiations infrarouge (NIR) ou des champs magnétiques induisant une hyperthermie rapide, létale et localisée uniquement au niveau de la tumeur. Les NPs à haut numéro atomique (HZE) telles que les NP-Au, les NP-TiO₂, les NP-Gd, les NP-Fe₂O₃, etc. sont quant à elles des candidates intéressantes pour améliorer l'efficacité des radiothérapies actuelles. En effet, les radiothérapies nécessitent des radiations répétées et à de fortes intensités (exprimées en MeV) lésant les tissus sains avoisinants. Dans certains cas (comme celui des glioblastomes), il s'avère donc impossible d'effectuer des radiothérapies efficaces sans induire de dommages invalidant le patient. La stimulation des NPs par des rayonnements X de faible intensité (KeV) permet donc de libérer de manière très localisée des photoélectrons toxiques pour la tumeur épargnant ainsi les tissus sains avoisinants. (Arvizo et al., 2012)

7.2. Recherches cliniques et autorisations de mise sur le marché

Dans le secteur médical de nombreuses NPs organiques et inorganiques sont utilisées en phase de recherche clinique avancée ou ont obtenu des autorisations de mise sur le marché. Aux Etats-Unis, ces autorisations se font via la Food and Drugs Administration (FDA) qui valide à la fois l'efficacité et la sûreté du médicament. Actuellement, 77 produits sont utilisés dans des essais cliniques et 51 ont déjà été approuvés par la FDA. (Bobo et al., 2016)

Les premiers médicaments à base de NPs à avoir été autorisés à la commercialisation sont des formulations contenant des micelles capables de renfermer des molécules lipophiles. S'est ensuivi, à partir des années 1990 de la commercialisation de liposomes comme le Doxil® (des laboratoires Janssen, 1995) qui permettent de renfermer des composés anti-cancéreux à la fois hydrophiles et lipophiles. (Barenholz, 2012; Petros and DeSimone, 2010) Ces nouvelles formulations améliorent la biodisponibilité des médicaments et limitent aussi leur toxicité.

L'amélioration des connaissances en nanomédecine a progressivement permis de commercialiser d'autres types de NPs organiques et/ou inorganiques plus complexes (comme les NPs métalliques, les NPs composées de protéines ou de polymères, etc.) servant de thérapies à de multiples pathologies. A titre d'exemples, nous pouvons citer Injectafer®/Ferinject® (des laboratoires Vifor Pharma, 2013) contenant des NPs de carboxymaltose ferrique et qui est utilisé pour traiter l'anémie. Le Plegridy® (des laboratoires Biogen, 2014) est composé de protéines immunomodulatrices conjuguées à des NPs de polymère (PEG) et est utilisé dans le traitement de la sclérose en plaque. L'Adynovate® (des laboratoires Baxalta, 2015) est composé de protéines reliées à des NPs de PEG et sert à traiter l'hémophilie. Un large choix de NPs permet aussi de renforcer les possibilités de stratégies anti-cancéreuses. L'Onivyde® (des laboratoires Merrimack, 2015) est composé de NPs sous

forme de liposomes refermant de l'Irinotécan, une molécule anti cancéreuse. Ce traitement est utilisé contre le cancer du pancréas. Le Nanotherm® (des laboratoires MAgForce, 2010) est composé de NPs-Fe₂O₃ et sert à traiter les glioblastomes via thermothérapie.

Les NPs les plus approuvées jusqu'à présent par la FDA sont principalement celles à base de liposomes et de polymères qui ont dominé les nanomédicaments dans les 1990. Si elles sont toujours d'actualité, elles sont cependant concurrencées par les NPs micellaires, métalliques et protéiques, dont beaucoup sont encore au stade d'essais cliniques. De plus, la combinaison de différents types de matériaux ne s'exclut pas puisque la plupart des NPs micellaires et des liposomes incorporent des polymères, de même que certaines des NPs à base de protéines. (Bobo et al., 2016)

8. Utilité du macrophage comme modèle d'étude.

Comme précisé dans le paragraphe 6 (Les paramètres physico-chimiques influençant la toxicité des NPs) les NPs, qu'elles aient ou non un but thérapeutique possèdent de nombreuses caractéristiques physico-chimiques qui influent sur leur comportement dans un milieu biologique. Etudier l'impact des NPs sur les macrophages n'est pas dépourvu de sens puisqu'ils jouent un rôle capital dans l'élimination ou au contraire dans la tolérance des NPs présentes dans l'organisme. Dans un premier temps, il s'avère utile de s'assurer si elles demeurent furtives ou si au contraire, elles sont facilement reconnues par les macrophages. En effet, la discrétion des NPs vis-à-vis du système immunitaire peut s'avérer être un critère important afin d'augmenter la demi-vie du principe actif ou faciliter leur accumulation dans un site précis tels que les tumeurs. (Bobo et al., 2016; Petros and DeSimone, 2010) En

revanche, une mauvaise élimination des NPs est imputée à plusieurs maladies telles que l'athérosclérose, l'asbestose et la silicose.

Dans un second temps, la détection des NPs par les macrophages induit un nombre de possibilités très variées de réponses cellulaires qui dépendent du type de récepteurs cellulaires et des voies de signalisations intracellulaires mis en jeu ainsi que des divers stimuli envoyés par le microenvironnement. Ces divers mécanismes sont à la base du caractère inflammatoire ou non-inflammatoire des NPs internalisées c'est-à-dire de la polarisation des macrophages en M1 inflammatoires ou M2 non-inflammatoires. Enfin, les macrophages jouant un rôle central dans le maintien de l'homéostasie et l'initiation de la réponse immunitaire, l'effet intrinsèque des NPs sur les macrophages peut avoir des répercussions indirectes sur l'organisme. Une réaction exacerbée des macrophages est susceptible de conduire à des altérations tissulaires alors qu'une diminution de leurs fonctionnalités pourrait avoir des répercussions sur les capacités de régénération tissulaire et de lutte contre les agents infectieux.

De plus, du fait de leur présence dans l'ensemble des tissus et de leur forte capacité phagocytaire assurant ainsi une veille immunologique, les macrophages sont bien plus susceptibles que d'autres types cellulaires d'être en contact avec les NPs et de subir leurs possibles effets. Bien que les études de l'effet des NPs sur les macrophages s'avèrent pertinentes, ces recherches doivent cependant être comparées avec d'autres recherches menées sur des modèles cellulaires différents et complétées par des études *in vivo*. En effet, les cellules qui composent un tissu interagissent les unes avec les autres. Elles sont donc toutes susceptibles d'influer sur le caractère toxique ou bénin d'un type de NPs.

Concernant les stratégies thérapeutiques anticancéreuses, l'utilisation de macrophages véhiculant de grandes quantités de NPs dans la tumeur semble être une stratégie intéressante. Les expériences utilisant ce type de stratégies effectuées *in vitro* par [Choi et al., 2007](#) et celles menées *in vivo* par [Lee et al., 2017](#) ont déjà donné des résultats prometteurs. L'utilisation des macrophages dans une stratégie de cheval de Troie est intéressante pour diverses raisons : 1) Leur capacité à ingérer une grande quantité de NPs. 2) Leur capacité à migrer au niveau des zones inflammatoires telles que les tumeurs (la présence de TAM prouve que les macrophages sont capables d'être présents en grand nombre sur un site tumoral). 3) La capacité des monocytes/macrophages à franchir plusieurs types de barrières physiques comme les parois des vaisseaux sanguins ou la barrière hématoencéphalique. ([Corraliza, 2014](#); [Hickey, 1999](#)) L'utilité des macrophages serait donc d'améliorer le rendement et la spécificité de ciblage des tumeurs difficilement atteignables par les NPs libres. Cette stratégie peut également minimiser les risques de diffusion des particules hors de la tumeur.

RESULTATS

Projet préliminaire : Evaluation de l'influence des milieux de culture sur la physiologie des macrophages J774 ainsi que sur leurs réponses suite à une exposition à des nanoparticules

1. Brève présentation du projet

Les études *in vitro* offrent la possibilité de travailler sur de multiples types cellulaires différents et ainsi, d'évaluer les effets de diverses molécules sur un large choix de cellules. En thérapeutique comme dans des études de toxicité, cette première approche est essentielle avant de poursuivre sur des modèles expérimentaux *in vivo* qui sont beaucoup plus contraignants. En revanche, la principale critique apportée à l'encontre des études menées *in vitro* est leur éloignement des conditions biologiques réelles. En effet, les milieux de culture utilisés ont une composition généralement très éloignée des conditions physiologiques d'un tissu ou d'un organe. De plus, chaque type cellulaire n'étant pas situé dans les mêmes zones de l'organisme, il n'a normalement pas les mêmes besoins nutritionnels et ne répond pas forcément aux mêmes signaux apportés par le microenvironnement. Par conséquent, bien que les cellules puissent être entretenues dans un milieu de culture vendu par défaut (non spécifique à chaque type cellulaire), il n'est donc pas déraisonnable de penser que le milieu de culture puisse modifier la réponse cellulaire et la sensibilité des cellules lors d'ajouts de stimuli exogènes tels que des NPs. De plus, ces dernières peuvent être influencées par le milieu de culture via la présence d'une corona spécifique aux composants présents dans le milieu utilisé. Ce phénomène peut donc également jouer un rôle dans la variabilité des réponses cellulaires face à l'ajout de NPs.

Dans ce travail, effectué pendant la première année de thèse et dont les résultats ont abouti à une publication, (Dalzon et al., 2016) nous avons utilisé des lignées cellulaires de macrophages J774 qui ont la particularité d'être cultivables dans deux milieux de culture différents et classiquement utilisés en laboratoire. Il s'agit du milieu RPMI (Rockwell Park Memorial Institute Medium) et du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). Cela a permis de comparer la physiologie des cellules cultivées dans ces deux milieux ainsi que leurs réponses face à l'exposition à des NPs métalliques d'oxyde de cuivre (NP-CuO). Les études fonctionnelles et ciblées ont été effectuées (tests de phagocytose, d'inflammation, etc.) en parallèle aux résultats de protéomique menés par Thierry Rabilloud et dans la continuité des travaux menés par Sarah Triboulet (thèse obtenue en 2013), dans lesquels elle a évalué la toxicité des nanoparticules d'oxyde de cuivre sur les macrophages. (Triboulet et al., 2013, 2015)

2. Résultats publiés concernant l'effet du milieu de culture sur la réponse cellulaire

RESEARCH ARTICLE

Culture medium associated changes in the core proteome of macrophages and in their responses to copper oxide nanoparticles

Bastien Dalzon^{1,2,3}, Hélène Diemer^{4,5}, Véronique Collin-Faure^{1,2,3}, Sarah Cianf erani^{4,5}, Thierry Rabilloud^{1,2,3} and Catherine Aude-Garcia^{1,2,3*}

¹ Laboratory of Chemistry and Biology of Metals, BIG/CBM, CEA Grenoble, Grenoble, France

² Laboratory of Chemistry and Biology of Metals, University of Grenoble Alpes, Grenoble, France

³ Laboratory of Chemistry and Biology of Metals, CNRS UMR5249, Grenoble, France

⁴ BioOrganic Mass Spectrometry Laboratory (LSMBO), IPHC, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

⁵ BioOrganic Mass Spectrometry Laboratory (LSMBO), CNRS UMR7178, Strasbourg, France

The physiology of cells cultured in vitro depends obviously on the external conditions, including the nutrients present in the culture medium. In order to test the influence of this parameter, J774 macrophages grown either in RPMI or in DMEM were compared by a combination of targeted analyses and a proteomic approach. The two media differ in their glucose, amino acids, and vitamins concentrations, but there were no significant differences in the cell cycle or in the percentage of phagocytic cells in both media, although the phagocytic capacity (i.e. the number of phagocytized particles) was higher in DMEM. Conversely, we found that J774 cells grown in RPMI produced more nitric oxide in response to lipopolysaccharide. The proteomic study highlighted differences affecting the central metabolism and nucleotide metabolism, cytoskeleton, protein degradation, and cell signaling. Furthermore, proteomics showed that J774 cells grown in RPMI or in DMEM and exposed to copper oxide nanoparticles respond rather differently, with only a few proteins similarly modulated between cells grown in both media. Taken together, our results show that the basal state of cells grown in two different media is different, and this may affect the way they respond to an external stimulus or stress.

Received: April 25, 2016
Revised: September 15, 2016
Accepted: October 6, 2016

Keywords:

Cell biology / Copper oxide / Culture medium / Nanoparticles



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

1 Introduction

Proteomic approaches have been used since the very dawn of the field to investigate cellular responses in vitro to various conditions, such as proliferation [1, 2], cell signaling [3–5], differentiation [6, 7], or cell resistance to antitumor drugs

[8–10], just to quote a few papers in this area published before 2000. This area of research has considerably expanded over time, as shown by the hundreds of papers cited in a recent review about proteomics in toxicology [11].

All the papers in this subfield, however, are made on the same structure, that is, comparing control cells to the treated ones in a given medium, and this poses the problem of the influence of the medium itself on the state of the cells and thus on their responsiveness to stimuli. Culture media are

Correspondence: Dr. Thierry Rabilloud, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, UMR CNRS-CEA-UJF 5249, BIG/CBM, CEA Grenoble, 17 rue des martyrs, F-38054 Grenoble, Cedex 9, France
E-mail: thierry.rabilloud@cea.fr

Abbreviations: cGMP, cyclic Guanosine monophosphate; LPS, lipopolysaccharide; NADH, nicotinamide adenine dinucleotide, reduced; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced; NO, nitric oxide

The authors would like to dedicate this paper to Dr. Michael J. Dunn, a lifelong supporter of proteomics, for his dedication to the proteomics community as Editor-in-Chief of Proteomics and his combination of wisdom and energy in developing the journal. Working with him has been both a pleasure and an honor.

*Additional corresponding author: Dr. Catherine Aude-Garcia
E-mail: catherine.aude-garcia@cea.fr

Significance of the study

The present study uses a combination of targeted and proteomics approaches to investigate an often-overlooked question, which is the dependence of cellular physiology on the composition of the culture medium. Although classical tests do not show strong differences, proteomics shows a number of differences in the core proteome, which reflect in the cell physiology. More importantly, the responses of cells

grown in different media to a common stress are also appreciably different. By extension, these results suggest that the responses observed *in vitro* may be altered by subtle differences in the culture protocols, for example, choice of starting medium, but also medium consumption induced by different inoculum concentrations and pretreatment time.

optimized for both cell growth and convenience. For example, several classical media include rather high amino acids and glucose concentration to let cells consume these nutrients without needing to refeed cell cultures every day. This increases the possibility that the nutrient concentrations may orient the metabolism of the cells and in turn their proteome, thereby altering their responses to the stimuli of interest.

This parameter is however quite difficult to investigate because cells usually grow well in one culture medium and in limited variations of this “canonical” medium. Thus, if the influence of the culture medium is to be investigated, there are two caveats. In the first case, the different media are selected to keep the cells in similar states and usually the media differ very little, so that very limited changes can be expected. In the second, opposite case, the media are made very different, but then the cell growth is so altered in the suboptimal medium that the comparison makes little sense.

One happy exception to this situation is represented by some differentiated blood cell lines, such as the mouse plasmacytoma or macrophage cell lines, which grow equally well in RPMI1640 and DMEM media. These two media differ by a number of parameters [12]: the high-glucose DMEM medium contains twice more glucose than the RPMI medium, and is also richer in many amino acids (e.g. histidine, lysine, hydrophobic amino acids), and vitamins (e.g. folate, nicotinamide, pantothenate) and in some ions (e.g. calcium and magnesium). It also contains pyruvate, which RPMI does not contain. RPMI contains asparagine, aspartate, and glutamate (not present in DMEM) and is richer than DMEM in arginine, inositol, and phosphate. The two media are therefore different enough to be expected to alter the physiology of the cells and thus their proteome. If the physiology of the same cell line becomes slightly different, it can then be expected that their responses to a stimulus may also be different.

In order to test these two levels of responses, that is, the response intrinsic to the medium itself and the variations in the responses induced by the same stimulus in the two different media, we used the mouse macrophage cell line J774, grown in high-glucose DMEM or in RPMI, and copper oxide nanoparticles as the stimulus, as we already have investigated the proteome changes induced by these particles in RPMI-grown J774 cells [13].

2 Materials and methods

2.1 Nanoparticles

Copper oxide (catalog #544868, from Sigma) was resuspended and coated with PVP 40 (purchased from Sigma) as previously described [14]. The characterization of the nanoparticles and their aggregates in culture medium has been described previously [13,14]. We also verified previously that PVP alone had no effects on the cells [13].

2.2 Cell culture

The mouse macrophage cell line J774A1 was purchased from the European Cell Culture Collection (Salisbury, UK). The cells were cultured in DMEM (containing 1 mM pyruvate) + 10% FBS or in RPMI1640 + 10% FBS. Cells were seeded every 2 days at 200 000 cells/mL and harvested at 1 000 000 cells/mL. For treatment with nanoparticles, the following scheme was used: cells were first seeded at 500 000 cells/mL in T175 flasks (50 mL per flask). They were exposed to nanoparticles on the following day and harvested after a further 24 h in culture. Cell viability was measured by trypan blue exclusion.

Under these culture conditions, the LD₂₀ for copper oxide nanoparticles was determined to be 10 µg/mL, and this concentration was used in further experiments. All experiments involving cells were carried out on independent biological triplicates.

2.3 Cell cycle

After harvesting, the cell pellet (from 2 mL of culture) was fixed by addition of 0.5 mL of cold (4°C) ethanol (70%) and resuspension by pipetting. After fixation at room temperature for 30 min, 5 mL of PBS was added to the cell suspension, and the cells were collected by centrifugation. The cell pellet was then resuspended in 0.3 mL of PBS containing 0.01 mg/mL ribonuclease A (RNase A) and 0.01 mg/mL propidium iodide. The cells were incubated for 20 min at room temperature and then analyzed on a FACSCalibur instrument (Beckton

Dickinson) operated with an excitation at 488 nm and an emission wavelength of 600 nm. The percentage of cells in the different phases of the cycle was then determined with the Cellquest software.

2.4 Phagocytosis activity measurement

The phagocytic activity was measured using fluorescent latex beads (1 μm diameter, green labeled, catalog number L4655 from Sigma) and flow cytometry, essentially as described in [14, 15].

2.5 Mitochondrial transmembrane potential assessment

The mitochondrial transmembrane potential was assessed by rhodamine 123 uptake at nonquenching concentrations in order to obtain valid indications of the transmembrane potential [16]. Briefly, cells were treated with 40 nM rhodamine 123 in complete culture medium for 30 min at 37°C. Cells were then harvested, rinsed twice in PBS + 0.1% glucose, and analyzed by flow cytometry on a FACSCalibur instrument (Beckton Dickinson), using 488 nm excitation and 515 nm emission filters.

2.6 NO production

The cells were grown to confluence in a 6-well plate. Then half of the wells were treated with 30 or 100 ng/mL LPS (from salmonella), and arginine monohydrochloride was added to all the wells (5 mM final concentration) to give a high concentration of substrate for the nitric oxide (NO) synthases. After 18 h of incubation, the cell culture medium was recovered, centrifuged at 10 000 $\times g$ for 10 min to remove cells and debris, and the nitrite concentration in the supernatants was read at 540 nm after addition of an equal volume of Griess reagent and incubation at room temperature for 30 min.

2.7 Enzyme assays

The enzymes were assayed according to published procedures. Lactate and malate dehydrogenase were assayed by a coupled assay using Nitro blue tetrazolium as the final acceptor and phenazine methosulfate as a relay [17]. Biliverdin reductase was assayed directly for the NADPH-dependent conversion of biliverdin into bilirubin, followed at 450 nm [18]. Pyruvate kinase was assayed by decrease of NADH at 340 nm in a lactate dehydrogenase-coupled assay [19]. Transaldolase was assayed in a coupled assay [20].

The cell extracts for enzyme assays were prepared by lysing the cells for 20 min at 0°C in HEPES, 20 mM (pH 7.5); MgCl_2 , 2 mM; KCl, 50 mM; EGTA, 1 mM;

3-(tetradecyl-dimethylammonio)-propane-1-sulfonate (0.15% w/v) followed by centrifugation at 15 000 $\times g$ for 15 min to clear the extract. The protein concentration was determined by a dye-binding assay.

2.8 F-actin staining

This experiment was performed essentially as described previously [21]. Cells were cultured on coverslips placed in 6-well plates and exposed to NPs for 24 h at 37°C. At the end of the exposure time, cells were washed twice for 5 min at 4°C in PBS, fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min at room temperature. After two washes (5 min/4°C in PBS), they were permeabilized in 0.1% Triton X-100 for 5 min at room temperature. After two more washes in PBS, 500 nM Phalloidin-Atto 550 (Sigma) was added to the cells and stored for 20 min at room temperature in the dark. Coverslip-attached cells were washed, placed on microscope slides (Thermo Scientific) using a Vectashield mounting medium containing DAPI (Eurobio), and imaged using a Leica TCS SP2 SE confocal microscope. The images were processed using the Leica confocal software.

2.9 Proteomics

The 2D gel-based proteomic experiments were carried out on independent biological triplicates for all comparisons, essentially as previously described [14, 21]. However, detailed materials and methods are provided next.

2.10 Sample preparation

The cells were collected by scraping and then washed three times in PBS. The cells were then washed once in TSE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.25 M sucrose, and 1 mM EDTA), and the volume of the cell pellet was estimated. The pellet was resuspended in its own volume of TSE buffer. Then four volumes (relative to the cell suspension just prepared) of concentrated lysis buffer (8.75 M urea, 2.5 M thiourea, 5% w/v CHAPS, 6.25 mM TCEP-HCl, and 12.5 mM spermine base) was added and the solution was extracted at room temperature for 1 h. The nucleic acids were then pelleted by ultracentrifugation (270 000 $\times g$ at room temperature for 1 h), and the protein concentration in the supernatant was determined by a dye-binding assay [22]. Carrier ampholytes (Pharmalytes, pH 3–10) were added to the final concentration of 0.4% w/v, and the samples were kept frozen at -20°C until use.

2.11 IEF

Homemade 160-mm-long 4–8 linear pH gradient gels [23] were cast according to the published procedures [24].

Four-millimeter-wide strips were cut, and rehydrated overnight with the sample, diluted in a final volume of 0.6 mL of rehydration solution (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 0.4% carrier ampholytes (Pharmalytes, pH 3–10), and 100 mM dithiodiethanol) [25, 26].

The strips were then placed in a Multiphor plate (GE Healthcare) and IEF was carried out with the following electrical parameters: 100 V for 1 h, then 300 V for 3 h, 1000 V for 1 h, then 3400 V up to 60–70 kVh. After IEF, the gels were equilibrated for 20 min in 125 mM Tris, 100 mM HCl, 2.5% SDS, 30% glycerol, and 6 M urea [27]. They were then transferred on top of the SDS gels and sealed in place with 1% agarose dissolved in 125 mM Tris, 100 mM HCl, 0.4% SDS, and 0.005% w/v bromophenol blue.

2.12 SDS electrophoresis and protein detection

Ten percent of gels (160 × 200 × 1.5 mm) were used for protein separation. The Tris-Taurine buffer system [28] was used and operated at an ionic strength of 0.1 and a pH of 7.9. The final gel composition is thus Tris 180 mM, HCl 100 mM, acrylamide 10% w/v, bisacrylamide 0.27%. The upper electrode buffer is Tris 50 mM, Taurine 200 mM, SDS 0.1%. The lower electrode buffer is 50 mM Tris, 200 mM glycine, and 0.1% SDS. The gels were run at 25 V for 1 h, then at 12.5 W per gel, until the dye front reached the bottom of the gel. Detection was carried out by a tetrathionate silver staining [29].

2.13 Image analysis

The gels were scanned after silver staining on a flatbed scanner (Epson perfection V750), using a 16-bit grayscale image acquisition. The gel images were then analyzed using the Delta 2D software (v 3.6). Spots that were never expressed above 100 ppm of the total spots were first filtered out. Then, significantly varying spots were selected on the basis of their Student's *t*-test *p*-value between the treated and control groups. Spots showing a *p*-value less than 0.05 were selected. In order to estimate the proportion of false positives, which is always a problem in multiple testing experiments, the Storey–Tibshirani approach was used [30].

2.14 Protein identification and mass spectrometry

For protein identification, either analytical gels loaded at 200 µg/gel and stained with tetrathionate silver staining or preparative gels loaded at 500 µg/gel and stained with a “de-rated” silver stain [31] were used. The spots selected for identification were excised from silver-stained gels and destained with ferricyanide/thiosulfate on the same day as silver staining in order to improve the efficiency of the identification process [32, 33]. In-gel digestion was performed with an au-

tomated protein digestion system, MassPrep Station (Waters Corporation, Milford, CT, USA). The gel plugs were washed twice with 50 µL of 25 mM ammonium hydrogen carbonate (NH₄HCO₃) and 50 µL of ACN. The cysteine residues were reduced by 50 µL of 10 mM DTT at 57°C and alkylated by 50 µL of 55 mM iodoacetamide. After dehydration with ACN, the proteins were cleaved in gel with 10 µL of 12.5 ng/µL of modified porcine trypsin (Promega, Madison, WI, USA) in 25 mM NH₄HCO₃. The digestion was performed overnight at room temperature. The generated peptides were extracted with 30 µL of 60% ACN in 0.1% formic acid. ACN was evaporated under vacuum before nano-LC-MS/MS analysis.

Nano-LC-MS/MS analysis was performed using a nano-ACQUITY Ultra-Performance-LC (Waters Corporation) coupled to the Synapt™ High Definition Mass Spectrometer™ (Waters Corporation). The system was fully controlled by MassLynx 4.1 SCN639 (Waters Corporation).

The nano-LC system was composed of ACQUITY UPLC® CSH130 C18 column (250 mm × 75 µm with a 1.7 µm particle size; Waters Corporation) and a Symmetry C18 precolumn (20 mm × 180 µm with a 5 µm particle size; Waters Corporation). The solvent system consisted of 0.1% formic acid in water (solvent A) and 0.1% formic acid in ACN (solvent B). Four microliters of sample was loaded into the enrichment column during 3 min at 5 µL/min with 99% of solvent A and 1% of solvent B. Elution of the peptides was performed at a flow rate of 300 nL/min with 8–35% linear gradient of solvent B in 9 min.

The tandem mass spectrometer was equipped with a Z-spray ion source and a lock mass system. The capillary voltage was set at 2.8 kV and the cone voltage at 35 V. Mass calibration of the TOF was achieved using fragment ions from Glu-fibrino-peptide B on the [50;2000] *m/z* range. On-line correction of this calibration was performed with Glu-fibrino-peptide B as the lock-mass. The ion (M+2H)²⁺ at *m/z* 785.8426 was used to calibrate MS data and the fragment ion (M+H)⁺ at *m/z* 684.3469 was used to calibrate MS/MS data during the analysis.

For tandem MS experiments, the system was operated with automatic switching between MS (0.5 s/scan on *m/z* range [150;1700]) and MS/MS modes (0.5 s/scan on *m/z* range [50;2000]). The two most abundant peptides (intensity threshold 20 counts/s), preferably doubly and triply charged ions, were selected on each MS spectrum for further isolation and CID fragmentation using collision energy profile. Fragmentation was performed using argon as the collision gas.

Mass data collected during analysis were processed and converted into .pkl files using ProteinLynx Global Server 2.3 (Waters Corporation). Normal background subtraction type was used for both MS and MS/MS with 5% threshold and polynomial correction of order 5. Smoothing was performed on MS/MS spectra (Savitsky-Golay, two iterations, window of three channels). Deisotoping was applied for MS (medium deisotoping) and MS/MS (fast deisotoping).

For protein identification, the MS/MS data were interpreted using a local MASCOT server with MASCOT 2.4.1

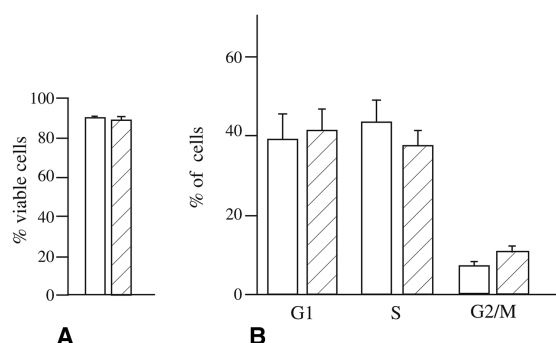


Figure 1. Cell viability and cell cycle. In panel (A), the viability of the cells cultured in RPMI (white bars) or DMEM (hatched bars) is indicated showing no difference in cell death in both media. In panel (B), the proportion of the cells in the three phases of the cell cycle is indicated. White bars, cells growing in RPMI; hatched bars, cells growing in DMEM.

algorithm (Matrix Science, London, UK) against UniProt-KB/Swiss-Prot (version 2014_11, 547 085 sequences). The research was carried out in all species. Spectra were searched with a mass tolerance of 15 ppm for MS and 0.05 Da for MS/MS data, allowing a maximum of one trypsin missed cleavage. Carbamidomethylation of cysteine residues and oxidation of methionine residues were specified as variable modifications. Protein identifications were validated with at least two peptides with MASCOT ion score above 30.

3 Results

In order to check that cell cultures in RPMI or DMEM were reasonably comparable, we first examined their growth characteristics. The fact that they gave the same culture yield (fivefold multiplication in the cell numbers in 48 h of culture) was the first indication. We however investigated the cell cycle in more detail, and the results are shown in Fig. 1. The proportion of cells in the various phases of the cycle (G1, S, and G2/M) was not significantly different between cells cultured in RPMI or in DMEM. A minor increase in cells in the G2/M phase can be noted for cells growing in DMEM, at the expense of cells in the S phase. However, the consequence is unnoticeable in terms of cells yield (cell counts are multiplied by 5 over 2 days in both media).

We then investigated the differentiated functions of the cells, that is, their phagocytic capacity and their LPS-dependent NO production. As shown in Fig. 2A, the NO production upon LPS stimulation was greater for cells cultured in RPMI than for cells cultured in DMEM, as described previously [34]. The effect was more pronounced for lower doses of LPS used as a stimulus, and as the concentration of tryptophan is three times higher in DMEM than in RPMI, this was consistent with the proposed inhibition of NO production in DMEM through the stimulation of the aryl hydrocarbon

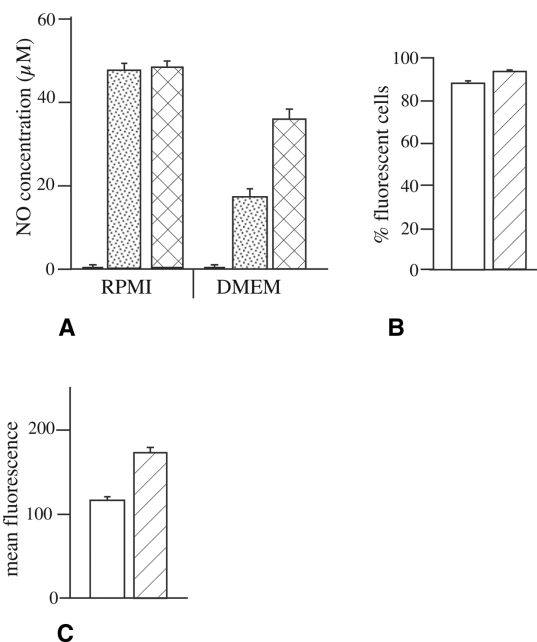


Figure 2. NO production in response to LPS and phagocytosis. In panel (A), the NO production after LPS stimulation for 24 h is described. Black bars: no LPS stimulation; dotted bars: stimulation with 30 ng/mL LPS; crossed bars: stimulation with 100 ng/mL LPS. In panel (B), the proportion of phagocytic cells (i.e. cells able to ingest at least one bead in 2 h) is indicated. White bars: cells grown in RPMI; hatched bars: cells grown in DMEM. In panel (C), the mean fluorescence index (MFI, i.e. the average fluorescence for the cells having ingested one or more beads) is indicated. White bars: cells grown in RPMI; hatched bars: cells grown in DMEM.

receptor (AHR) by tryptophan-derived products [35]. This inhibition was however partially levied by higher doses of LPS, as shown in Fig. 2A.

Regarding the phagocytic activity, the percentage of phagocytic cells is similar in both media, as shown in Fig. 2B. However, the mean fluorescence index (Fig. 2C), which is an index of the average number of beads internalized by the cells, is 1.5 times higher in DMEM than in RPMI, showing that in this medium, the J774 cells are able to phagocytize more beads than in RPMI. These subtle differences in cellular functions suggested that the change in the culture medium may have a more global impact of the cells, which we investigated in more details via a 2D gel based proteomic analysis.

The results, displayed in Fig. 3 and Table 1, show that the gels were globally similar. Several significant differences were however found between cells grown in RPMI and cells grown in DMEM, affecting several cellular pathways, and the *t*-test distribution diagram (Supporting Information Fig. 1) suggested that most of these differences should be true positives.

Of course metabolic pathways were strongly represented (central metabolism, nucleotide metabolism, and

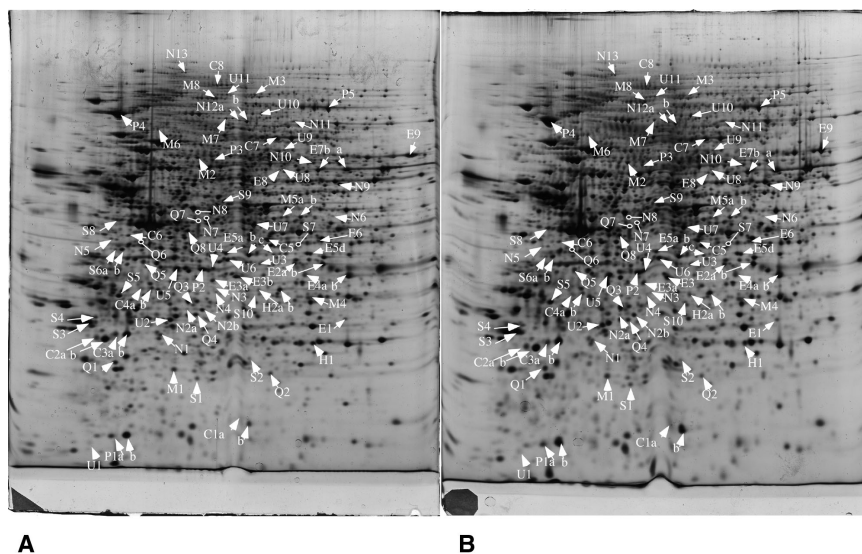


Figure 3. Proteomic analysis of total cell extracts by 2DE: effect of culture medium. Total cell extracts of J774A1 cells were separated by 2DE. The first dimensions covered a 4–8 pH range and the second dimension a 15–200 kDa range. Total cellular proteins (150 µg) were loaded on the first-dimension gel. (A) Gel obtained from cells grown in RPMI and (B) gel obtained from cells grown in DMEM. The arrows point to spots that show reproducible and statistically significant changes between the control and nanoparticles-treated cells and to the control neighbor spots in some cases. Spot numbering is according to Table 1.

mitochondrion) but other functions or structural assemblies such as the cytoskeleton, proteasome, or proteins implied in cell signaling were also modulated from one culture medium to the other. In order to validate some of these findings, we first assessed the mitochondrial transmembrane potential. The results, displayed in Fig. 4, show that the average transmembrane potential is ca. 1.5-fold higher in DMEM than in RPMI, which is consistent with the greater richness in nutrients in DMEM.

We then measured some of the metabolic enzymes activities found through the proteomic screen, and the results are shown in Table 2. The activity measurements confirmed the proteomic-detected changes for malate dehydrogenase (+14% in DMEM), lactate dehydrogenase (+26% in DMEM), and pyruvate kinase (+32 % in DMEM), while they did not for biliverdin reductase and transaldolase.

Finally, as many spots corresponding to cytoskeletal proteins involved in the actin cytoskeleton were found in the proteomic screen, we studied the actin cytoskeleton using labeled phalloidin and confocal microscopy. The results, displayed in Fig. 5 and Supporting Information Fig. 2, show that cells grown in RPMI and DMEM have a different shape and different surface rugosity, as expected from changes in the actin cytoskeleton. Cells grown in RPMI are smaller and less adherent, with less ruffles but a lot of spiny plasma membrane extensions.

These medium-induced changes in the proteome led us to investigate whether besides the basal differences, the responses detected to a similar stimulus could be different for cells cultured in different media, on a proteomic scale. To this purpose, we treated J774 cells by copper oxide nanoparticles in DMEM, as we already had performed this study in RPMI [13]. In this context, it must be noted that we exposed the

cells to the same concentration of nanoparticles (10 µg/mL), corresponding to the LD20 in both media.

The proteomic results are shown for DMEM in Fig. 6 and Table 3, which recapitulate both results obtained in DMEM and those obtained in RPMI and published previously [13]. In both media, 2200–2300 reproducible spots (i.e. present in all biological replicates) were analyzed, and the *t*-test distribution diagrams (Supporting Information Fig. 1) suggest that the proportion of false positives should be similarly low in both cases.

These results show that only a few proteins are similarly modulated by copper oxide nanoparticles in cells cultured in RPMI or in DMEM. These include the ferritin light chain, regulatory subunit of glutamate cysteine ligase, HINT1 protein, cGMP phosphodiesterase, and proteasome assembly chaperone. Others (e.g. mago nashi) are even modulated in opposite directions by copper oxide in cells cultured in different media. Finally, it should be noted that more proteins are modulated in the case of the medium switch (74 protein species) than in response to copper oxide nanoparticles (43 protein species in DMEM).

4 Discussion

The above-mentioned proteomic results can be analyzed at two levels. The first level concerns the physiological state in which the cells are in different culture media. As DMEM is twice richer than RPMI in glucose, in many amino acids and vitamins, changes in central metabolic enzymes are expected, and are indeed detected. However, these changes are often of moderate amplitude (ca. 20–30%) and are detected in a statistical filter because of the rather low data dispersion afforded by our proteomic setup.

Table 1. Differentially expressed proteins identified in the proteomic screen for cells grown in different media

Spot ref.	Protein name	Swiss-Prot accession no.	Predicted Mw (Da)	No. of peptides	Sequence coverage (%)	DMEM/RPMI fold/t-test
E1	Pyrroline carboxylate reductase	Q9DCC4	28 720	5	18	1.20/0.04
E2	Aldose reductase	P45376	35 732	5	15	1.27/0.01
E3	Malate dehydrogenase cytosol	P14152	36 511	11	42	1.19/0.01
E4a	Lactate dehydrogenase	P06151	36 499	4	13	1.33/0.04
E4b	Lactate dehydrogenase	P06151	36 499	24	57	1.12/0.06
E5a	Transaldolase	Q93092	37 387	8	26	0.73/0.01
E5b	Transaldolase	Q93092	37 387	16	45	0.91/0.05
E5c	Transaldolase	Q93092	37 387	17	46	1.03/0.90
E5d	Transaldolase	Q93092	37 387	16	47	0.99/0.94
E6	Aldolase C	P05063	39 395	10	23	1.14/0.04
E7a	Pyruvate kinase	P52480	57 845	18	40	1.36/0.01
E7b	Pyruvate kinase	P52480	57 845	24	57	0.90/0.01
E8	Asparagine synthetase	Q61024	64 283	20	44	0.63/0.01
E9	Transketolase	P40142	67 630	19	47	0.55/0.01
C1a	Cofilin 1	P18760	18 560	2	17	1.99/0.01
C1b	Cofilin 1	P18760	18 560	6	50	1.91/0.01
C2a	Rho gdi1	Q99PT1	23 407	2	11	1.26/0.02
C2b	Rho gdi1	Q99PT1	23 407	11	53	0.99/0.92
C3a	Rho gdi2	Q61599	22 851	2	19	1.33/0.05
C3b	Rho gdi2	Q61599	22 851	5	36	0.98/0.63
C4a	α -Soluble NSF attachment protein	Q9DB05	33 190	4	15	1.17/0.05
C4b	α -Soluble NSF attachment protein	Q9DB05	33 190	18	82	0.85/0.16
C5	Actin-related protein 2	P61161	44 761	16	45	0.84/0.01
C6	Tropomodulin 3	Q9JHJ0	39 503	14	46	0.82/0.02
C7	Moesin	P26041	67 767	27	47	0.75/0.02
C8	Vinculin	Q64727	116 717	24	25	1.32/0.05
M1	ATP synthase subunit d. mitochondrial	Q9DCX2	18 749	4	35	1.09/0.05
M2	Dihydrolipoyl acetyltransferase comp. PDH	Q8BMF4	67 942	19	40	0.75/0.01
M3	2-Oxoglutarate dehydrogenase. mito.	Q60597	116 449	13	14	1.49/0.02
M4	Voltage-dependent anion channel 2	Q60930	31 733	5	22	1.42/0.01
M5a	Glycine amidino transferase	Q9D964	48 297	5	16	0.90/0.04
M5b	Glycine amidino transferase	Q9D964	48 297	10	31	0.81/0.03
M6	NADH-ubiquin. oxidoreductase 75 kDa subunit	Q91VD9	79 777	17	26	0.72/0.01
M7	MICOS complex subunit Mic60	Q8CAQ8	83 900	31	46	0.67/0.03
M8	Lon protease. mitochondrial	Q8CGK3	105 843	10	17	0.74/0.05
P1a	Translation initiation factor 5A-1	P63242	16 832	4	21	1.44/0.01
P1b	Translation initiation factor 5A-1	P63242	16 832	8	50	1.1/0.11
P2	Ribosomal protein rla0	P14869	34 216	11	47	0.84/0.03
P3	Asparagine-tRNA ligase	Q8BP47	64 279	6	35	0.62/0.03
P4	hsp90	P11499	83 281	14	22	0.84/0.03
P5	Translation elongation factor 2	P58252	95 314	45	60	0.80/0.01
Q1	Proteasome subunit beta6	Q60692	25 379	10	69	1.22/0.02
Q2	Proteasome subunit beta2	Q9R1P3	22 906	15	44	0.78/0.02
Q3	Proteasome regulatory subunit 8	Q9CX56	39 930	7	18	1.26/0.01
Q4	Proteasome activator complex subunit 1	P97371	28 673	16	62	0.86/0.02
Q5	Ubiquitin carboxyl hydrolase L5	Q9WUP7	37 617	17	71	0.76/0.05
Q6	SUMO-activating enzyme 1	Q9R1T2	38 620	2	71	0.55/0.01
Q7	Cathepsin D	P18242	44 954	3	7	1.25/0.01
Q8	Serpin b6	Q60854	42 599	8	23	0.83/0.03
S1	Inositol triphosphate pyrophosphatase	Q9D892	21 897	7	60	1.19/0.02
S2	Acyl protein thioesterase 1	P97823	24 688	6	42	1.34/0.01
S3	14-3-3 Protein delta/zeta	P63101	27 772	13	56	0.79/0.03
S4	14-3-3 Protein gamma	P61982	28 253	9	55	0.74/0.01
S5	EF hand domain protein 2	Q9D8Y0	26 791	9	38	0.8/0.01
S6a	S/T kinase receptor associated protein	Q9Z1Z2	38 443	16	34	1.17/0.01
S6b	S/T kinase receptor associated protein	Q9Z1Z2	38 443	20	77	0.97/0.66
S7	MAP kinase 1	P63085	41 278	20	67	0.80/0.02
S8	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7	Q3UM45	41 294	16	47	1.12/0.05

Table 1. Continued

Spot ref.	Protein name	Swiss-Prot accession no.	Predicted Mw (Da)	No. of peptides	Sequence coverage (%)	DMEM/RPMI fold/t-test
S9	S/T-phosphatase 2A, 55 kDa regulatory subunit Ba	Q6P1F6	51 693	12	31	0.56/0.01
S10	Gnpi1	O88958	32 550	8	29	1.59/0.01
N1	Pre-mRNA splicing factor SPF27	Q9D287	26 132	14	61	0.72/0.02
N2a	Purine nucleoside phosphorylase	P23492	32 277	7	29	1.46/0.01
N2b	Purine nucleoside phosphorylase	P23492	32 277	17	78	0.99/0.83
N3	Translin-associated protein X	Q9QZE7	32 927	9	39	0.56/0.01
N4	DnaJ homolog subfamily C member 9	Q91WN1	30 060	4	13	0.77/0.02
N5	Heterogeneous nuclear RNP C1/C2	Q9Z204	34 385	12	35	0.63/0.03
N6	CCA tRNA nucleotidyltransferase 1. mito.	Q8K1J6	49 897	6	16	0.53/0.01
N7	Adenosine kinase	P55264	40 150	3	10	1.28/0.02
N8	Spliceosome RNA helicase Ddx39b	Q921N5	49 035	19	50	0.82/0.03
N9	Inosine monophosphate dehydrogenase 2	P24547	55 817	26	57	0.75/0.01
N10	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	Q8R081	63 964	5	9	1.21/0.03
N11	Far upstream element-binding protein 2	Q3U0V1	76 775	2	3	1.34/0.01
N12a	DNA replication licensing factor MCM7	Q61881	81 212	15	27	2.09/0.01
N12b	DNA replication licensing factor MCM7	Q61881	81 212	27	46	0.92/0.46
N13	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	Q5SUR0	144 629	15	17	1.31/0.02
H1	Flavin/biliverdin reductase	Q923D2	22 197	13	82	0.88/0.04
H2a	Biliverdin reductase A	Q9CY64	33 525	10	35	0.71/0.01
H2b	Biliverdin reductase A	Q9CY64	33 525	13	54	0.95/0.59
U1	Cytochrome b5a	P56395	15 241	5	50	1.86/0.04
U2	Chloride intracellular channel protein 4	Q9QYB1	28 731	15	71	0.83/0.01
U3	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	P10518	36 024	12	38	0.81/0.03
U4	Pyridoxal kinase	Q8K183	35 014	9	38	0.74/0.04
U5	Annexin A3	O35639	36 386	21	59	0.89/0.01
U6	Aldose reductase related protein 2	Q45377	36 121	6	25	0.80/0.02
U7	Adenosylhomocysteinase	P50247	47 689	17	50	0.71/0.01
U8	EH domain containing protein 1	Q9WVK4	60 605	29	55	0.41/0.01
U9	Bifunctional pA-phosphosulfate synthase 1	Q60967	70 794	13	25	0.53/0.03
U10	von Willebrand A domain protein 5A	Q99KC8	87 145	19	25	0.81/0.01
U11	Insulin-degrading enzyme	Q9JHR7	117 778	13	14	0.75/0.02

It is noteworthy that although the glycolytic enzymes are very easily detected on 2D gels [36–38], we detected an increase in only the last enzyme of glycolysis (i.e. pyruvate kinase) and in two enzymes involved in the cytoplasmic re-oxidation of NADH (i.e. lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase) in cells grown in DMEM. This suggests a stronger Warburg effect in these cells, which is completely consistent with the high-glucose content of DMEM.

It has also been recently described that glucose induced important changes in macrophages, such as the glucose-driven reprogramming of macrophages [39], and the glucose-driven morphodynamics of macrophages [40], both observed on the closely related RAW264 macrophage cell line. In line with these observations, we observed changes in several proteins implicated in the actin cytoskeleton dynamics, and confirmed important differences in the actin cytoskeleton between cells grown in RPMI and cells grown in DMEM. Culture medium induced differences in the cell shape have previously been observed by Cohly et al., although they used a DMEM/F12 medium [34] instead of DMEM as we did. On a more functional point of view, these changes in the actin cytoskeleton

are in line with the increased phagocytic capacity, as measured by the mean fluorescence of phagocytic cells (shown in Fig. 2), in cells grown in DMEM.

In our case, the changes brought by the medium switch are however more complex than a simple change in glycolytic capacity, as the concentration of amino acids and vitamins also change. In this respect, aromatic amino acids are known to modulate the activity of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) [35], which induces an anti-inflammatory phenotype [41]. Thus, the medium change between RPMI and DMEM induces conflicting signals, high glucose driving a pro-inflammatory signal [42], and high tryptophan, an anti-inflammatory signal. Under those precise circumstances, the anti-inflammatory signal overwhelms the pro-inflammatory signal from the medium, as shown in Fig. 2. As expected, the level of inhibition decreases when the extraneous pro-inflammatory signal (i.e. the LPS concentration) increases.

In the same trend, several mitochondrial proteins and several proteins involved in nucleotide and nucleic acids metabolism are also modulated by the medium change. Here

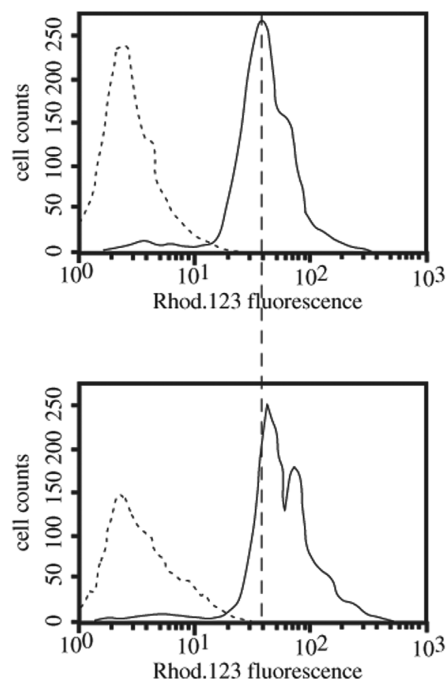


Figure 4. Study of the mitochondrial transmembrane potential. Top panel: Distribution of rhodamine 123 fluorescence for cells grown in RPMI. Dotted line: negative control (no rhodamine). Solid line: positive control (40 nM rhodamine 123, 30 min). The mean fluorescence is 2.5 ± 0.1 units for the negative control and 44 ± 3.2 units for the positive control. Bottom panel: Distribution of rhodamine 123 fluorescence for cells grown in DMEM. Dotted line: negative control (no rhodamine). Solid line: positive control (40 nM rhodamine 123, 30 min). The mean fluorescence is 2.8 ± 0.1 units for the negative control and 66 ± 2.1 units for the positive control. The difference between the transmembrane potentials of cells grown in DMEM versus cells grown in RPMI is significant ($p < 0.005$, Student's *t*-test).

again, the changes are generally of moderate amplitude, and when stronger changes are observed (e.g. MCM7, PNPH), they often concern only one minor protein form, the major one being almost unchanged.

This poses the question of the relevance of small changes that can even be restricted to one protein form and not to all of the various proteoforms of the same protein. The various forms of the same protein detected in 2D gel spots most often correspond to charge variants induced by posttranslational modifications, for example, phosphorylation or acetylation, and this has been used since the very early days of 2D electrophoresis (e.g. in [3]). However, the functional changes brought by posttranslational modifications are not predictable a priori. For example, protein acetylation on lysines can either activate or deactivate proteins [43]. As another example, the RhoGDIs deactivate the Rho and Rac GTPases by sequestering them [44, 45]. However, modification of the RhoGDIs, for example, by phosphorylation, removes them from the GTPases, which become active in turn [46, 47]. Thus, the activity of Rho and Rac, and the remodeling of the actin cytoskeleton in turn, do not correlate with the total amount of the RhoGDIs, but only with the amount of the modified RhoGDIs. This piece of data is easily accessible by 2D gel based proteomics, but not by shotgun proteomics. The situation is however not always as simple, as shown by the example of transaldolase. Transaldolase has been shown to be regulated by posttranslational modifications, but the spot pattern is very complex [48], so that there is no easy correlation between the overall activity and the precise abundance of some spots.

Overall, these various examples show that the final activity cannot be easily correlated with either the total amount of the protein or with the amount of a given spot. Our data show both interest of the ability to deconvolute the various protein forms and necessity not to limit the protein identification scheme to the modulated spots, but also to their neighbors to pick out as many forms as possible of a given protein.

As different media obviously bring different states to the cells, they could also bring different levels of responses to external stimuli. While the responses to a physiological stimulus, such as LPS, have been shown to depend on the metabolic state of the cells [39], we also wanted to determine if this was the case for a toxic stimulus. Metallic nanoparticles represent one type of new, anthropic toxic stimulus to which macrophages are exposed, and we already have studied the proteomic response to copper oxide nanoparticles for both RAW264 [14] and J774 [13] macrophages cell lines, both in the RPMI medium. We therefore carried out the same study

Table 2. Enzyme activities in J774 cells grown in RPMI or DMEM media

Enzyme	Activity in RPMI-cultured cells	Activity in DMEM-cultured cells	Activity ratio DMEM/RPMI	<i>t</i> -Test DMEM vs. RPMI
LDH	216.37 ± 11.59	272.50 ± 11.19	1.26	0.00043
MDH	56.87 ± 2.25	65.00 ± 4.81	1.14	0.035
Transaldolase	30.31 ± 1.92	30.69 ± 1.25	1.01	0.756
Pyruvate kinase	190.48 ± 21.65	251.99 ± 19.97	1.32	0.0059
Billiverbin reductase	3.84 ± 1.02	3.87 ± 1.06	1.01	0.964

The units are expressed in micromole substrate converted per minute per milligram total protein. The measures were made on four independent biological replicates.

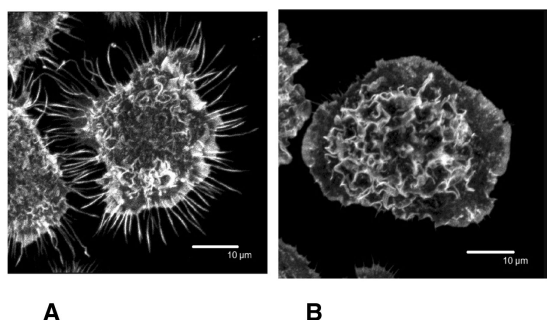


Figure 5. Changes in the cell morphology and actin cytoskeleton. Three-dimensional reconstructions of the F-actin cytoskeleton (visualized by phalloidin staining) are shown, allowing visualization of the surface ruffles of the cells. (A) Cell grown in RPMI1640 medium and (B) cell grown in DMEM medium. The differences in shell shape and membrane ruffles for cells grown in different media are obvious. Further details can be found in Supporting Information Figs. 2 and 3.

on the same nanoparticles in the J774 cell line, but in the DMEM medium.

In such a comparative context, classical targeted biochemical studies only determine the level of responses (e.g. the level of NO produced in response to LPS). Proteomics can be seen as a highly parallel readout that produces quantitative responses for several hundreds of proteins at the same time. In addition, 2D gel based proteomics also provide a view at changes at the protein species level, as shown by the Rho-GDIs examples. When examined in detail, the results obtained in comparative analyses (control cells vs. nanoparticles-exposed cells in RPMI or DMEM) show different cases.

- (1) For a few proteins (in our case the ferritin light chain, glutamate cysteine ligase and HINT1 proteins, the proteasome chaperone, and cGMP phosphodiesterase), the changes are significant and in the same direction in both culture media. It is noteworthy that these changes are those with the highest amplitude (modulation factors of 2 and above), and affect primarily proteins known to be implied in responses to metallic stresses.
- (2) For another few proteins, the changes are of the same amplitude in both media, and only the data dispersion explains why they are detected as significant in one medium and not in the other one; examples include the formylglutathione hydrolase, Annexin A3, elongation factor Ts, the VPS 36 protein, and the ferritin heavy chain. In the same trend, some proteins show a change of lesser amplitude in one medium compared to the other, leading to a change classified as significant in one case and not in the other (e.g. mitochondrial ribosomal protein L1, ERP29, MVB protein 4b, acylamino acid releasing enzyme, acidic form of the inositol polyphosphate phosphatase, GST omega 1, hippocalcin-like protein, coiled coil protein 51). Such cases are likely to occur in a process that is somewhat stochastic, as the proteomic analysis of complete cell extracts.
- (3) For the majority of the modulated proteins, in most cases the modulation is present in one medium and absent in the other. In some extreme cases, however (e.g. the mago nashi protein and myosin 12B), the changes go in opposite directions in the two different media.

Nevertheless, when taken at the pathway level, the same pathways are altered when J774 cells respond to copper oxide nanoparticles in RPMI or in DMEM, with a very good consistency in response for the oxidative stress related

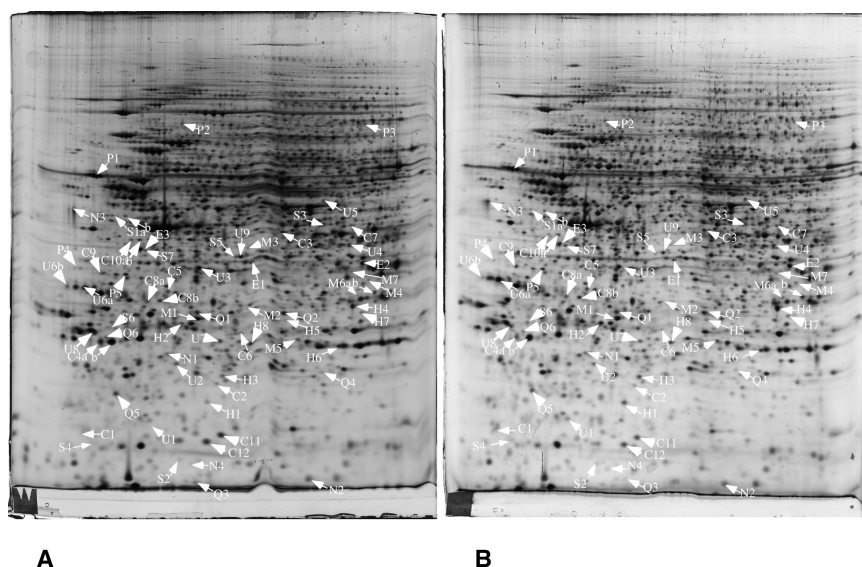


Figure 6. Proteomic analysis of total cell extracts by 2D electrophoresis: effect of copper oxide. Total cell extracts of J774A1 cells were separated by 2DE. The first dimensions covered a 4–8 pH range and the second dimension a 15–200 kDa range. Total cellular proteins (150 µg) were loaded on the first-dimension gel. (A) Gel obtained from control cells and (B) gel obtained from cells treated with copper oxide (10 µg/mL, 24 h). The arrows point to spots that show reproducible and statistically significant changes between the control and nanoparticles-treated cells and to the control neighbor spots in some cases. Spot numbering is according to Table 2.

Table 3. Differentially expressed proteins identified in the proteomic screen for cells exposed to copper oxide nanoparticles

Spot number	Protein name	Swiss-Prot accession no.	Predicted Mw	No. of unique peptides	Sequence coverage (%)	CuO/ctrl Fold/t-test DMEM	CuO/ctrl Fold/t-test RPMI
<i>Metabolism</i>							
E1	Transaldolase	Q93092	37 389	13	34	1.23/0.01	1.04/0.80
E2	Aldose reductase	P45376	35 732	20	60	1.03/0.68	0.53/0.02
E3	Galactokinase	Q9R0N0	42 295	3	8	0.93/0.62	0.32/0.001
<i>Mitochondria</i>							
M1	Prohibitin	P67778	29 821	19	85	0.83/0.01	0.96/0.43
M2	Elongation factor Ts, mitochondrial	Q9CZR8	35 334	2	12	0.84/0.01	0.86/0.67
M3	Stomatin-like protein 2, mitochondrial	Q99JB2	38 385	2	9	0.50/0.05	0.95/0.86
M4	Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	P38060	34 238	2	11	0.7/0.01	1.42/0.20
M5	Persulfide dioxygenase ETHE1	Q9DCM0	27 739	2	11	0.65/0.04	1.14/0.25
M6a	ETFA	Q99LC5	35 080	3	11	0.58/0.03	1.38/0.10
M6b	ETFA	Q99LC5	35 080	4	16	0.92/0.54	0.74/0.08
M7	39S ribosomal protein L1, mitochondrial	Q99N96	37 598	4	13	0.77/0.01	0.88/0.55
<i>Cytoskeleton and trafficking</i>							
C1	Myosin regulatory light chain 12B	Q3THE2	19 795	4	23	2.0/0.02	0.54/0.01
C2	Dynactin subunit 3	Q9Z0Y1	20 979	3	15	1.40/0.03	0.70/0.28
C3	Septin-2	P42208	41 526	9	35	1.58/0.02	0.74/0.06
C4a	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	Q61599	22 852	2	19	1.48/0.01	1.11/0.36
C4b	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	Q61599	22 852	5	36	1.01/0.82	0.98/0.68
C5	Alpha-soluble NSF attachment protein	Q9DB05	33 191	15	70	1.26/0.01	0.96/0.83
C6	Endoplasmic reticulum protein 29	P57759	28 825	3	13	0.67/0.03	0.80/0.35
C7	VPS 36	Q91XD6	43 737	2	6	1.37/0.03	1.48/0.13
C8a	MAPREB1 (acidic spot)	Q61166	30 016	3	17	0.99/0.98	0.3/0.001
C8b	MAPREB1 (basic spot)	Q61166	30 016	4	16	1.11/0.22	0.7/0.04
C9	Charged MVB protein 4b	Q9D8B3	24 936	4	17	0.89/0.34	0.7/0.04
C10a	Tropomodulin-3	Q9JHJ0	39 503	3	10	1.16/0.28	0.54/0.025
C10b	Tropomodulin-3	Q9JHJ0	39 503	14	46	1.30/0.01	0.82/0.31
C11	Stathmin	P54227	17 274	6	39	0.94/0.50	0.49/0.04
C12	ARP 2/3 complex subunit 5	Q9CPW4	16 288	4	27	1.12/0.48	0.22/0.001
<i>Nucleic acids</i>							
N1	5'(3')-deoxyribonucleotidase,	Q9JM14	23 077	7	50	1.23/0.05	0.69/0.07
N2	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	P70349	13 777	8	79	1.26/0.05	2.91/0.01
N3	Ribonuclease inhibitor	Q91VI7	49 818	2	4	1.72/0.01	0.78/0.61
N4	Protein mago nashi homolog	P61327	17 309	2	21	0.49/0.04	2.62/0.03
<i>Protein production</i>							
P1	Protein disulfide-isomerase	P09103	57 061	29	59	1.15/0.03	0.92/0.24
P2	Acylamino-acid-releasing enzyme	Q8R146	81 581	4	7	1.24/0.02	1.11/0.80
P3	Threonine-tRNA ligase, cytoplasmic	Q9D0R2	83 358	7	10	0.62/0.01	0.96/0.80
P4	eIF3j	Q66JS6	29 486	2	10	1.67/0.21	0.46/0.025
P5	Elongation factor 1-delta	P57776	31 293	2	13	1.19/0.20	0.7/0.04
<i>Protein degradation</i>							
Q1	Proteasome activator complex subunit 2	P97372	27 058	16	72	1.58/0.03	0.89/0.23
Q2	Proteasome subunit alpha type-1	Q9R1P4	29 547	17	83	1.60/0.02	1.00/0.98
Q3	Proteasome assembly chaperone 4	P0C7N9	13 974	4	42	2.15/0.02	10.77/0.02
Q4	COMM domain-containing protein 4	Q9CQ02	21 765	2	10	1.54/0.01	0.76/0.18
Q5	Proteasome subunit beta type-9	P28076	23 397	2	10	1.08/0.60	0.45/0.01
Q6	Ubiquitin C-terminal hydrolase L3	Q9JKB1	26 152	2	10	1.24/0.31	0.42/0.02
<i>Signalling</i>							
S1a	Inositol polyphosphate 1-phosphatase	P49442	43 348	3	7	0.22/0.01	0.75/0.56
S1b	Inositol polyphosphate 1-phosphatase	P49442	43 348	3	9	1.13/0.52	0.49/0.09
S2	cGMP 3',5'-phosphodiesterase delta	O55057	17 390	2	21	1.86/0.01	2.19/0.02
S3	Dual specificity MAP kinase kinase 1	P31938	43 440	3	7	1.52/0.01	0.99/0.99
S4	Neudesin	Q9CQ45	18 905	2	12	1.48/0.03	0.75/0.09
S5	S/T phosphatase PP1-g catalytic subunit	P63087	36 957	4	14	0.46/0.03	1.21/0.54
S6	Inositol monophosphatase 1	O55023	30 436	4	17	0.97/0.93	0.65/0.045
S7	Guanine nucleotide-binding protein G	P08752	40 489	4	13	0.92/0.30	0.6/0.03

Table 3. Continued

Spot number	Protein name	Swiss-Prot accession no.	Predicted Mw	No. of unique peptides	Sequence coverage (%)	CuO/ctrl Fold/t-test DMEM	CuO/ctrl Fold/t-test RPMI
<i>Oxidative stress response</i>							
H1	Ferritin heavy chain	P09528	21 067	3	17	2.35/0.01	1.76/0.35
H2	<i>Glutamate–cysteine ligase reg. subunit</i>	<i>O09172</i>	<i>30 535</i>	<i>6</i>	<i>30</i>	<i>1.85/0.01</i>	<i>1.735/0.02</i>
H3	Ferritin light chain 1	P29391	20 803	4	27	1.97/0.01	1.65/0.03
H4	S-formylglutathione hydrolase	Q9R0P3	31 320	6	38	1.17/0.03	1.18/0.13
H5	Heme oxygenase 1	P14901	32 911	5	25	14.7/0.04	6.37/0.05
H6	Flavin/biliverdin reductase	Q923D2	22 197	13	82	1.34/0.01	0.98/0.93
H7	<i>GSTomega-1</i>	<i>O09131</i>	<i>27 498</i>	<i>4</i>	<i>18</i>	<i>0.84/0.33</i>	<i>0.53/0.01</i>
H8	<i>Peroxiredoxin-6</i>	<i>O08709</i>	<i>24 871</i>	<i>6</i>	<i>33</i>	<i>1.12/0.40</i>	<i>0.83/0.01</i>
<i>Unclassified</i>							
U1	Hippocalcin-like protein 1	P62748	22 339	7	34	1.50/0.01	1.24/0.17
U2	<i>Pycard</i>	<i>Q9EPB4</i>	<i>21 459</i>	<i>6</i>	<i>43</i>	<i>1.03/0.69</i>	<i>0.51/0.04</i>
U3	Annexin A3	Q35639	36 386	23	72	0.76/0.01	0.73/0.08
U4	Coiled-coil domain-containing protein 51	Q3URS9	45 133	6	17	0.64/0.02	0.89/0.07
U5	Ufm1-specific protease 2	Q99K23	52 516	2	6	1.66/0.01	0.72/0.14
U6a	Proliferating cell nuclear antigen	P17918	28 786	13	66	1.23/0.01	0.88/0.01
U6b	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>	<i>P17918</i>	<i>28 786</i>	<i>8</i>	<i>33</i>	<i>0.72/0.48</i>	<i>1.67/0.045</i>
U7	<i>Sepiapterin reductase</i>	<i>Q64105</i>	<i>27 883</i>	<i>3</i>	<i>15</i>	<i>1.21/0.28</i>	<i>0.76/0.04</i>
U8	<i>Tumor protein D52</i>	<i>Q62393</i>	<i>24 313</i>	<i>3</i>	<i>17</i>	<i>1.15/0.28</i>	<i>0.38/0.001</i>
U9	NADPH oxidase p40	P97369	37 389	16	44	0.68/0.05	1.02/0.87

Bold: statistically differently expressed protein species for cells grown in DMEM and treated with copper oxide nanoparticles; italics: statistically differently expressed protein species for cells grown in RPMI and treated with copper oxide nanoparticles [17]; bold italics: protein species common to both responses; plain font: control protein species.

proteins. Conversely, mitochondrial proteins respond more to nanoparticles in DMEM than in RPMI, but this may be linked to a different mitochondrial activity in the two media. Finally, on a protein species point of view, it sometimes happens that one protein species is modulated in one culture medium and another protein species of the same protein in another medium (e.g. tropomodulin 3 and PCNA).

In conclusion, the first lesson from this work is that a simple medium switch induces more changes in the core cellular proteome than responses to low toxicity nanoparticles such as titanium dioxide [13] or zinc dioxide [21]. Somewhat surprisingly, the classes of proteins modulated by the medium change go much beyond the metabolism-associated proteins in a wide sense (e.g. mitochondrial proteins and true metabolic enzymes). Structural proteins such as the cytoskeletal associated proteins, as well as the signaling-associated proteins, are also modulated by the composition of the culture medium. Consequently, the cells are probably in a fairly different basal state depending on the culture medium, and it is therefore not surprising that they respond differently to the same stimulus in different culture media. Some core stress-related responses are however similar in the two different media, but the majority of the responses observed at the proteomic scale are different in the two different media. This further shows, if needed, how sensitive proteomic techniques are to the details of cellular physiology and metabolism. It also suggests that different responses reported in different studies on the same model may derive from subtle differences in the cell culture protocol, including

of course the starting medium (as shown here) but probably extendable to the medium consumption, depending in turn on the cell inoculum and pretreatment time.

This work was funded by the CNRS, the University of Grenoble, University of Strasbourg Unistra, Région Alsace, Transverse Toxicology program of the CEA (Nanostress grant), and through the French National Agency for Research (ANR) (grant ANR-22 10-INBS-08; ProFI project, “Infrastructures Nationales en Biologie et Santé”; “Investissements d’Avenir” call). We thank the Fondation pour la Recherche Médicale for financial support of a Synapt HDMS mass spectrometer. BD also thanks the CNRS for a handicap PhD fellowship.

The authors have declared no conflict of interest.

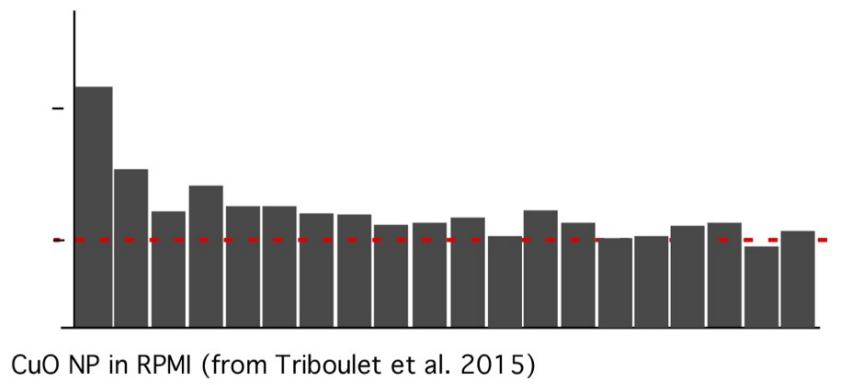
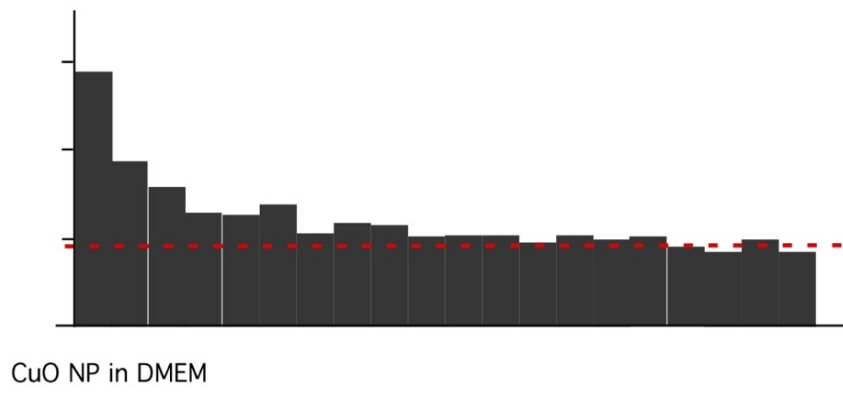
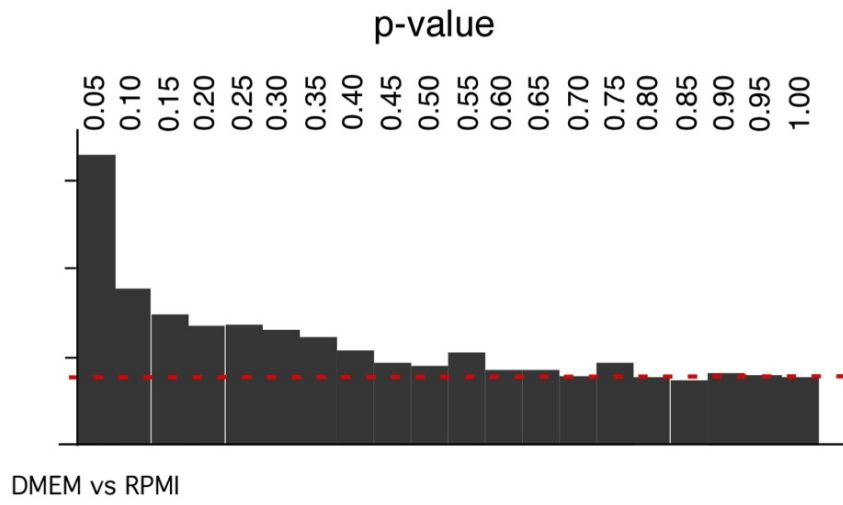
5 References

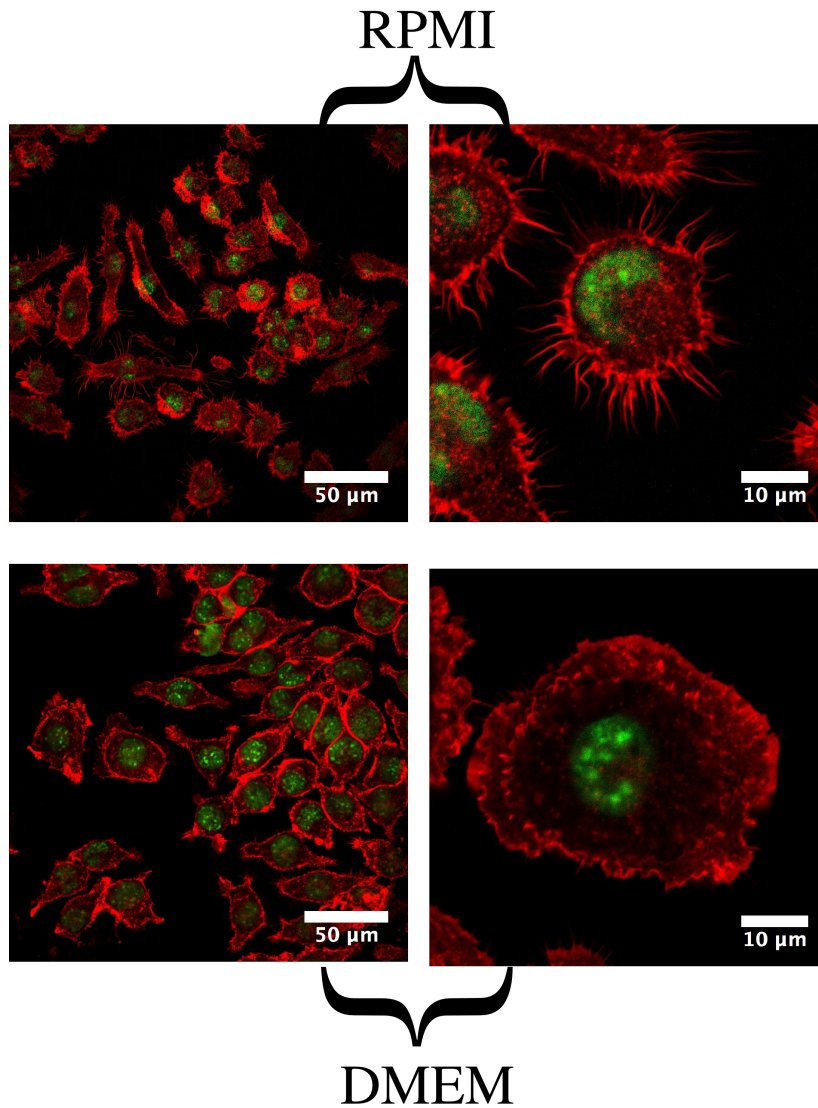
- Bravo, R., Celis, J. E., A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. *J. Cell. Biol.* 1980, *84*, 795–802.
- Bravo, R., Frank, R., Blundell, P. A., Macdonald-Bravo, H., Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* 1987, *326*, 515–517.
- Chneiweiss, H., Beretta, L., Cordier, J., Bouterin, M. C. et al., Stathmin is a major phosphoprotein and cyclic amp-dependent protein-kinase substrate in mouse-brain neurons but not in astrocytes in culture—regulation during ontogenesis. *J. Neurochem.* 1989, *53*, 856–863.

- [4] Doye, V., Boutterin, M. C., Sobel, A., Phosphorylation of stathmin and other proteins related to nerve growth factor-induced regulation of Pc12 cells. *J. Biol. Chem.* 1990, *265*, 11650–11655.
- [5] Rasmussen, H. H., Celis, J. E., Evidence for an altered protein-kinase-C (Pkc) signaling pathway in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 1993, *101*, 560–566.
- [6] Rabilloud, T., Berthier, R., Valette, C., Garin, J., Lawrence, L. J., Induction of stathmin expression during erythropoietic differentiation. *Cell Growth Differ.* 1995, *6*, 1307–1314.
- [7] Rabilloud, T., Berthier, R., Vincon, M., Ferbus, D. et al., Early events in erythroid differentiation: accumulation of the acidic peroxidoxin (PRP/TSA/NKEF-B). *Biochem. J.* 1995, *312*, 699–705.
- [8] Sinha, P., Hutter, G., Kottgen, E., Dietel, M. et al., Increased expression of annexin I and thioredoxin detected by two-dimensional gel electrophoresis of drug resistant human stomach cancer cells. *J. Biochem. Biophys. Methods* 1998, *37*, 105–116.
- [9] Sinha, P., Hutter, G., Kottgen, E., Dietel, M. et al., Search for novel proteins involved in the development of chemoresistance in colorectal cancer and fibrosarcoma cells in vitro using two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry and microsequencing. *Electrophoresis* 1999, *20*, 2961–2969.
- [10] Sinha, P., Hutter, G., Kottgen, E., Dietel, M. et al., Increased expression of epidermal fatty acid binding protein, cofilin, and 14-3-3-sigma (stratifin) detected by two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry and microsequencing of drug-resistant human adenocarcinoma of the pancreas. *Electrophoresis* 1999, *20*, 2952–2960.
- [11] Rabilloud, T., Lescuyer, P., Proteomics in mechanistic toxicology: history, concepts, achievements, caveats, and potential. *Proteomics* 2015, *15*, 1051–1074.
- [12] Ham, R. G., McKeehan, W. L., Media and growth requirements. *Methods Enzymol.* 1979, *58*, 44–93.
- [13] Triboulet, S., Aude-Garcia, C., Armand, L., Collin-Faure, V. et al., Comparative proteomic analysis of the molecular responses of mouse macrophages to titanium dioxide and copper oxide nanoparticles unravels some toxic mechanisms for copper oxide nanoparticles in macrophages. *PLoS ONE* 2015, *10*, e0124496.
- [14] Triboulet, S., Aude-Garcia, C., Carriere, M., Diemer, H. et al., Molecular responses of mouse macrophages to copper and copper oxide nanoparticles inferred from proteomic analyses. *Mol. Cell. Proteomics* 2013, *12*, 3108–3122.
- [15] Abel, G., Szollosi, J., Fachel, J., Phagocytosis of fluorescent latex microbeads by peritoneal macrophages in different strains of mice: a flow cytometric study. *Eur. J. Immunogenet.* 1991, *18*, 239–245.
- [16] Perry, S. W., Norman, J. P., Barbieri, J., Brown, E. B., Gelbard, H. A., Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques* 2011, *50*, 98–115.
- [17] Mayer, K. M., Arnold, F. H., A colorimetric assay to quantify dehydrogenase activity in crude cell lysates. *J. Biomol. Screen.* 2002, *7*, 135–140.
- [18] Baranano, D. E., Rao, M., Ferris, C. D., Snyder, S. H., Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002, *99*, 16093–16098.
- [19] Malcovati, M., Valentini, G., AMP- and fructose 1,6-bisphosphate-activated pyruvate kinases from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 1982, *90 Pt E*, 170–179.
- [20] Simcox, P. D., Reid, E. E., Canvin, D. T., Dennis, D. T., Enzymes of the glycolytic and pentose phosphate pathways in proplastids from the developing endosperm of *Ricinus communis* L. *Plant Physiol.* 1977, *59*, 1128–1132.
- [21] Aude-Garcia, C., Dalzon, B., Ravanat, J. L., Collin-Faure, V. et al., A combined proteomic and targeted analysis unravels new toxic mechanisms for zinc oxide nanoparticles in macrophages. *J. Proteomics* 2016, *134*, 174–185.
- [22] Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, *72*, 248–254.
- [23] Gianazza, E., Celentano, F., Magenes, S., Etori, C., Righetti, P. G., Formulations for immobilized pH gradients including pH extremes. *Electrophoresis* 1989, *10*, 806–808.
- [24] Rabilloud, T., Valette, C., Lawrence, J. J., Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension. *Electrophoresis* 1994, *15*, 1552–1558.
- [25] Rabilloud, T., Adessi, C., Giraudel, A., Lunardi, J., Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 1997, *18*, 307–316.
- [26] Luche, S., Diemer, H., Tastet, C., Chevallet, M. et al., About thiol derivatization and resolution of basic proteins in two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* 2004, *4*, 551–561.
- [27] Gorg, A., Postel, W., Weser, J., Gunther, S. et al., Elimination of point streaking on silver stained two-dimensional gels by addition of iodoacetamide to the equilibration buffer. *Electrophoresis* 1987, *8*, 122–124.
- [28] Tastet, C., Lescuyer, P., Diemer, H., Luche, S. et al., A versatile electrophoresis system for the analysis of high- and low-molecular-weight proteins. *Electrophoresis* 2003, *24*, 1787–1794.
- [29] Sinha, P., Poland, J., Schnolzer, M., Rabilloud, T., A new silver staining apparatus and procedure for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis of proteins after two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* 2001, *1*, 835–840.
- [30] Storey, J. D., Tibshirani, R., Statistical significance for genome-wide studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003, *100*, 9440–9445.
- [31] Morrissey, J. H., Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* 1981, *117*, 307–310.
- [32] Gharahdaghi, F., Weinberg, C. R., Meagher, D. A., Imai, B. S., Mische, S. M., Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* 1999, *20*, 601–605.

- [33] Richert, S., Luche, S., Chevallet, M., Van Dorsselaer, A. et al., About the mechanism of interference of silver staining with peptide mass spectrometry. *Proteomics* 2004, 4, 909–916.
- [34] Cohly, H., Stephens, J., Markhov, A., Angel, M. et al., Cell culture conditions affect LPS inducibility of the inflammatory mediators in J774A.1 murine macrophages. *Immunol. Invest.* 2001, 30, 1–15.
- [35] Heath-Pagliuso, S., Rogers, W. J., Tullis, K., Seidel, S. D. et al., Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites. *Biochemistry* 1998, 37, 11508–11515.
- [36] Petrak, J., Ivanek, R., Toman, O., Cmejla, R. et al., Deja vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics* 2008, 8, 1744–1749.
- [37] Wang, P., Bouwman, F. G., Mariman, E. C., Generally detected proteins in comparative proteomics—a matter of cellular stress response? *Proteomics* 2009, 9, 2955–2966.
- [38] Triboulet, S., Aude-Garcia, C., Armand, L., Gerdil, A. et al., Analysis of cellular responses of macrophages to zinc ions and zinc oxide nanoparticles: a combined targeted and proteomic approach. *Nanoscale* 2014, 6, 6102–6114.
- [39] Freerman, A. J., Johnson, A. R., Sacks, G. N., Milner, J. J. et al., Metabolic reprogramming of macrophages: glucose transporter 1 (GLUT1)-mediated glucose metabolism drives a proinflammatory phenotype. *J. Biol. Chem.* 2014, 289, 7884–7896.
- [40] Venter, G., Oerlemans, F. T., Wijers, M., Willemse, M. et al., Glucose controls morphodynamics of LPS-stimulated macrophages. *PLoS ONE* 2014, 9, e96786.
- [41] Esser, C., Rannug, A., The aryl hydrocarbon receptor in barrier organ physiology, immunology, and toxicology. *Pharmacol. Rev.* 2015, 67, 259–279.
- [42] Sharma, K., Danoff, T. M., DePiero, A., Ziyadeh, F. N., Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages and glomerular mesangial cells by elevated glucose levels: possible mediation via protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995, 207, 80–88.
- [43] Xiong, Y., Guan, K. L., Mechanistic insights into the regulation of metabolic enzymes by acetylation. *J. Cell. Biol.* 2012, 198, 155–164.
- [44] Dovas, A., Couchman, J. R., RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem. J.* 2005, 390, 1–9.
- [45] Garcia-Mata, R., Boulter, E., Burridge, K., The “invisible hand”: regulation of RHO GTPases by RHO GDIs. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2011, 12, 493–504.
- [46] DerMardirossian, C., Rocklin, G., Seo, J. Y., Bokoch, G. M., Phosphorylation of RhoGDI by Src regulates Rho GTPase binding and cytosol-membrane cycling. *Mol. Biol. Cell* 2006, 17, 4760–4768.
- [47] DerMardirossian, C., Schnelzer, A., Bokoch, G. M., Phosphorylation of RhoGDI by Pak1 mediates dissociation of Rac GTPase. *Mol. Cell* 2004, 15, 117–127.
- [48] Lachaise, F., Martin, G., Drougard, C., Perl, A. et al., Relationship between posttranslational modification of transaldolase and catalase deficiency in UV-sensitive repair-deficient xeroderma pigmentosum fibroblasts and SV40-transformed human cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2001, 30, 1365–1373.

Supporting Informations





Supplementary figure 2: Changes in the cell morphology and actin cytoskeleton

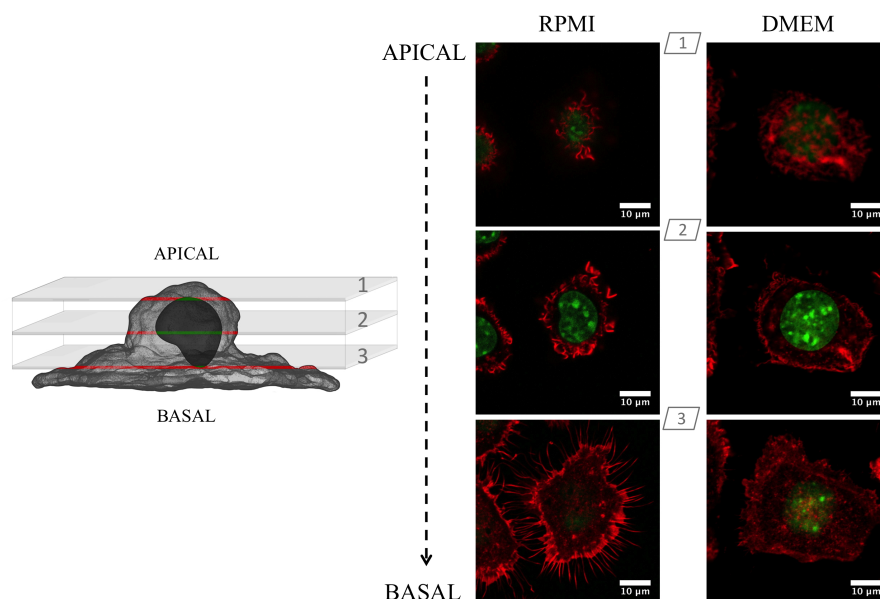
Observation of the macrophages basal side obtained with a Leica confocal microscope.

Top row: cells grown in RPMI1640 medium.

Bottom row: cells grown in DMEM medium.

The nucleus is identified using Vectashield mounting medium containing DAPI (green color added on ImageJ software).

The F-actin cytoskeleton is identified using 500nM cyanine labelled phalloidin (red color added on ImageJ software).



Supplementary figure 3: Details in the changes in the cell morphology and actin cytoskeleton

Left : schematic representation of a macrophage highlighting the different zones observed by confocal microscopy 1 : apical side, 2 : median plane, 3 : basal side (i.e. contact zone between cell macrophage and lamella).

Right : Results of observation (Apical side (1) median plane (2) and basal side (3)) obtained with a Leica confocal microscope. Comparison of the difference of Cell morphology and actin cytoskeleton in RPMI1640 medium and DMEM medium. Lens 63x/1,4 oil with numerical zoom=4.

The nucleus is identified using Vectashield mounting medium containing DAPI (green color added on ImageJ software).

The F-actin cytoskeleton is identified using 500nM cyanine labelled phalloidin, (red color added on ImageJ software).

3. Conclusion

Au vu des résultats obtenus à la fois en protéomique et dans les études fonctionnelles, il apparaît que les conditions de culture influent sur la physiologie cellulaire. Dans la littérature, les macrophages J774 sont utilisés dans un grand nombre d'études et il est possible de trouver des conditions de culture différentes. Parfois, ils sont cultivés en milieu RPMI et dans d'autres cas en DMEM. Ce dernier milieu est environ deux fois plus riche en glucose, en vitamines et

en acides aminés et il possède également davantage de tryptophane que le RPMI. La présence d'une plus forte quantité de glucose augmente le métabolisme glycolytique. Les nutriments étant plus présents, ils améliorent l'activité mitochondriale. La présence de tryptophane active le récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR). Celui-ci a une activité anti-inflammatoire, limitant ainsi la sécrétion de NO lorsque la stimulation au LPS est modérée. Enfin, nous avons observé via le cytosquelette d'actine que la morphologie cellulaire est aussi influencée par le milieu de culture (la présence de prolongements cytoplasmiques est beaucoup plus importante en condition RPMI qu'en DMEM). Cela explique ainsi les différences observées dans l'aptitude des J774 à phagocyter. C'est donc à cause de l'ensemble des changements physiologiques des cellules qu'il n'est pas surprenant d'observer des variations visibles en protéomique lorsque les macrophages sont confrontés à un même stimulus (NP-CuO) alors que seul le milieu de culture varie.

Ces travaux permettent de vérifier l'importance de prendre en considération les conditions de cultures lors des études de l'effet des NPs (ou autres molécules) sur les cellules. Ce phénomène peut parfois expliquer certaines variabilités de résultats, ce qui prouve l'importance d'explicitier de manière précise les conditions de culture afin de faciliter la reproductibilité des données. De plus, ces travaux montrent que de nombreux paramètres en apparence mineurs sont susceptibles d'influer sur un résultat. Dans le cadre de l'évaluation de la toxicité de diverses NPs, il s'avère donc primordial de confronter l'ensemble des données disponibles dans la littérature avant de conclure définitivement sur la toxicité induite par un type de NPs.

Enfin, dans les conditions réelles, les macrophages se situent dans divers endroits de

l'organisme. Ils ne se trouvent donc pas tous dans les mêmes conditions physiologiques. Or, les résultats obtenus dans cet article démontrent aussi que ces conditions sont susceptibles d'influencer différemment la réponse des macrophages résidents exposés aux NPs.

Projet 1 : Evaluation de la toxicité de différents types de nanoparticules de silices amorphes sur les macrophages

1. Présentation du projet

Ce projet répond à un problème de santé publique et a pour objectif d'évaluer l'effet potentiellement toxique des NP-SiO₂ amorphes sur les macrophages.

Contrairement à la silice cristalline, dont les effets toxiques ont largement été décrits dans la littérature puisqu'elle engendre des maladies pulmonaires chroniques graves, la silice amorphe, qui est un matériau largement utilisé en industrie n'a suscité d'intérêt que récemment. C'est pourquoi nous souhaitons d'une part, comparer les effets intrinsèques de plusieurs types de NP-SiO₂ amorphes et d'autre part, explorer les possibilités de toxicités croisées (ou indirectes) avec d'autres molécules également issues de l'industrie.

Ce projet intitulé « SILIMMUN » est mené via un financement octroyé par l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES). Nous souhaitons évaluer les risques pour la santé suite à une exposition chronique ou aiguë aux NP-SiO₂ amorphes. La silice étant un composant présent dans de nombreuses applications industrielles (travaux publics, fabrication du verre, électronique, agro-alimentaire, etc.), elle est produite à raison de plusieurs centaines de millions de tonnes par an à travers le monde (100.000 tonnes estimées en France). ([Honnert and Vincent, 2007](#); [Mansour, 2015](#)) Cette industrialisation massive de la production de silice libère également des déchets sous forme particulaire et nanoparticulaire appelés « fumées de silice ». Celles-ci ont longtemps été jugées amorphes donc peu toxiques. Cependant, il s'avère qu'elles renferment en leur centre

une partie cristalline hautement toxique, (Dow Corning corporation, 2012; Fletcher et al., 1994) ce qui pose un problème de santé publique pour les travailleurs qui y sont très exposés. En effet, la silice cristalline est reconnue pour être l'agent étiologique de la silicose et les macrophages alvéolaires, du fait de leur forte activité phagocytaire, sont particulièrement vulnérables aux effets des NP-SiO₂ cristallines. Ils jouent donc un rôle important dans la maladie (Figure 43).

C'est pour l'ensemble de ces raisons qu'il est important d'évaluer l'effet des fumées de silice sur les fonctionnalités des macrophages par comparaison avec les silices amorphes dépourvues de parties cristallines.

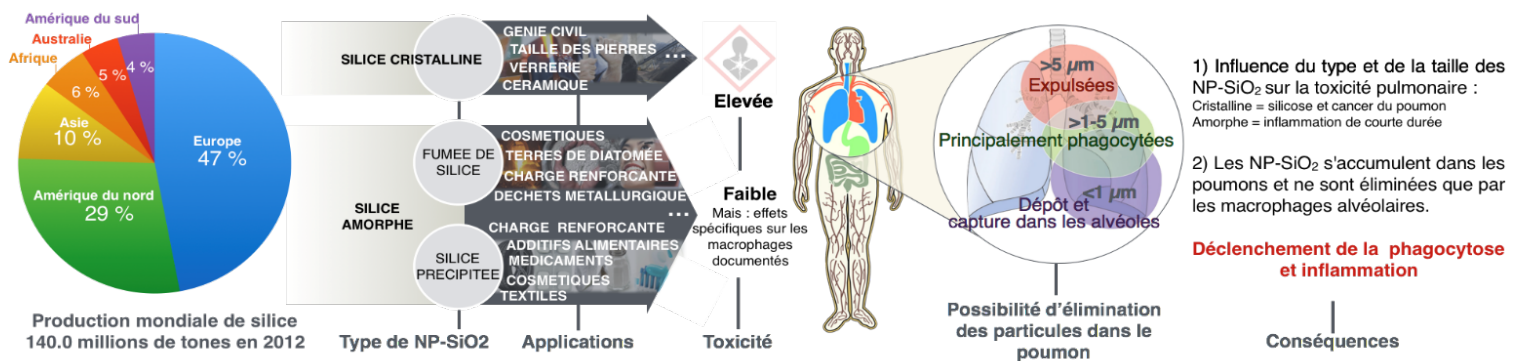


Figure 43. Production industrielle, usages et effets de la silice sur la santé.

2. Stratégie élaborée

Les premières expériences, valorisées par une publication ont été menées sur des NP-SiO₂ amorphes précipitées et référencées sous le nom de Ludox TMA® (Sigma-Aldrich). Les travaux ont été effectués sur des lignées cellulaires de macrophages RAW 264.7 déjà largement utilisées en études de toxicité et auxquelles une concentration subtoxique de NP-SiO₂ a été ajoutée. Cette concentration correspond à la dose létale 20 (DL20) qui permet

d'avoir un bon compromis pour analyser la modulation de l'expression de protéines (en études protéomiques) et déterminer l'effet des NPs sur la fonctionnalité des macrophages tout en évitant les artefacts provoqués par une mortalité cellulaire trop élevée. Après avoir caractérisé les NP-SiO₂ et obtenu des résultats en protéomique, les principaux tests fonctionnels effectués dans le but de connaître les effets intrinsèques de ces NPs sont les tests de viabilité, de phagocytose, d'inflammation (sécrétion de NO et de cytokines), du potentiel mitochondrial, enzymatiques, etc. Enfin, des tests de toxicité croisée ont été effectués afin de vérifier l'hypothèse d'une sensibilité plus accrue des macrophages aux agents connus pour endommager l'ADN tels que le styrène.

Ces travaux ont ensuite été poursuivis en étudiant l'effet d'autres types de NP-SiO₂ amorphes qui sont soit sous forme précipitée (nommées Ludox LS30® - Sigma-Aldrich), soit sous forme pyrogénique (fumed silica – Sigma-Aldrich). Dans ces travaux, nous nous sommes surtout attachés à comparer l'effet de différents modes d'exposition avec des NP-SiO₂ (expositions aiguë, chronique et récupération) sur les macrophages. La mise en place de ces différents modes d'exposition est détaillée dans le paragraphe suivant.

En France, la limite d'exposition autorisée par fraction alvéolaire est de 5mg/m³. Cela correspond à 50mg de silice par journée de travail (8h). Cette dose a été transposée sur un modèle cellulaire de macrophages et elle correspond à une concentration journalière de 1µg/mL de NP-SiO₂ pour 1x10⁶ macrophages. Afin d'évaluer la toxicité des NP-SiO₂ en exposition chronique, nous proposons d'exposer les macrophages pendant 20 jours en présence de NP-SiO₂ (1µg/mL/jour) et de comparer les effets avec une exposition aiguë aux NP-SiO₂ (dose accidentelle, 20µg/mL = DL20) et de récupération trois jours après exposition

aux NP-SiO₂. La condition récupération (trois jours sans NPs après une exposition aiguë) permet de vérifier si les macrophages retrouvent leurs fonctions plusieurs jours après avoir été stressés par les NP-SiO₂ (Figure 44).

Enfin, afin de s'affranchir des effets spécifiques liés à la lignée cellulaire RAW 264.7, des études de toxicité ont également été effectuées sur des macrophages primaires plus complexes à cultiver mais plus proches des conditions réelles *in vivo* (Figure 44).

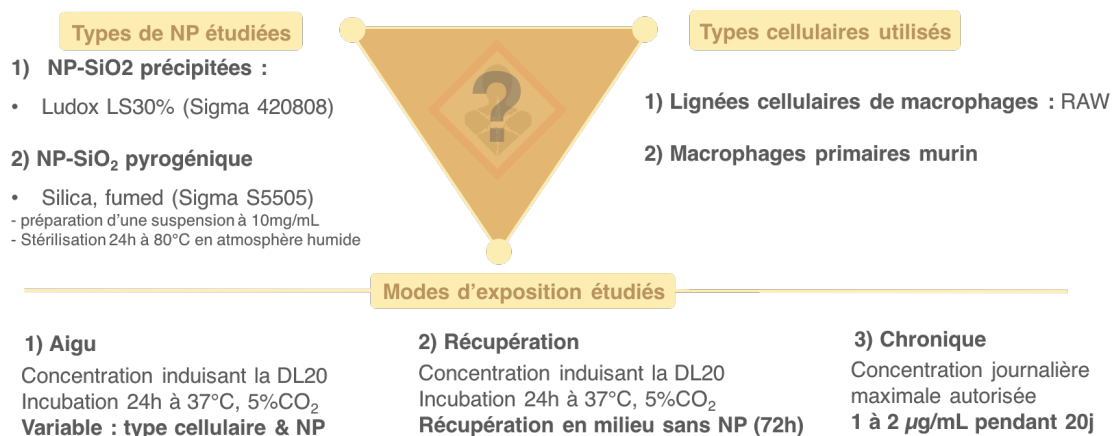


Figure 44. Stratégie mise en place pour évaluer l'effet des NP-SiO₂ pyrogéniques et précipitées sur différents modèles cellulaires et différents modes d'exposition.

3. Résultats publiés concernant les NP-SiO₂ (Ludox TMA®)

Cite this: *Nanoscale*, 2017, 9, 9641

Differential proteomics highlights macrophage-specific responses to amorphous silica nanoparticles†

Bastien Dalzon,^a Catherine Aude-Garcia,^a Véronique Collin-Faure,^a Hélène Diemer,^b David Béal,^c Fanny Dusseret,^c Daphna Fenel,^d Guy Schoehn,^d Sarah Cianfèrani,^b Marie Carri ere^b and Thierry Rabilloud ^{*a}

The technological and economic benefits of engineered nanomaterials may be offset by their adverse effects on living organisms. One of the highly produced nanomaterials under such scrutiny is amorphous silica nanoparticles, which are known to have an appreciable, although reversible, inflammatory potential. This is due to their selective toxicity toward macrophages, and it is thus important to study the cellular responses of this cell type to silica nanoparticles to better understand the direct or indirect adverse effects of nanosilica. We have here studied the responses of the RAW264.7 murine macrophage cells and of the control MPC11 plasma cells to subtoxic concentrations of nanosilica, using a combination of proteomic and targeted approaches. This allowed us to document alterations in the cellular cytoskeleton, in the phagocytic capacity of the cells as well as their ability to respond to bacterial stimuli. More surprisingly, silica nanoparticles also induce a greater sensitivity of macrophages to DNA alkylating agents, such as styrene oxide, even at doses which do not induce any appreciable cell death.

Received 26th March 2017,

Accepted 27th May 2017

DOI: 10.1039/c7nr02140b

rsc.li/nanoscale

1. Introduction

Silica-based particulate materials are highly used as abrasives both in the industry and in consumer products such as tooth-pastes, as well as reinforcing agents (*e.g.* as mineral charges in tires) or in the high-tech industry (*e.g.* in photovoltaics or as high precision molding agents). These wide uses increase the exposure potential of individuals to silica, which poses in turn the problem of the direct and indirect toxicity of silica. In this frame, crystalline silica has long been known as the causative agent of silicosis and is therefore highly regulated. Conversely, amorphous silica has been demonstrated to induce only a transient and reversible inflammation upon pulmonary exposure,^{1–3} and is therefore considered as safer. However, the

amorphous silica-induced inflammation can be pronounced³ and are found *in vivo* and *in vitro* as well.⁴

Considerable work has been devoted to the analysis of the toxicity of amorphous silica *in vitro*, and strong directions have emerged. One of them is the differential sensitivity of different cell types to amorphous silica,^{5–8} and the other one is the influence of the size of the nanoparticles.^{5,9–15} However, it has been shown that within a given cell type, the type of response is similar for particles of different sizes.¹⁶

Regarding the toxic mechanisms induced by amorphous silica, oxidative stress effects have been demonstrated,^{17–20} and seems to be linked more to direct ROS generation than to an indirect mechanism *via* glutathione depletion.^{21,22} Genotoxicity has also been observed,^{23–27} and is likely to be linked to the oxidative stress mentioned before.

Beyond these toxic mechanisms, it is interesting to understand more widely the cellular responses at sub-toxic concentrations of amorphous silica, as they may be linked to the inflammatory responses observed *in vitro*,^{8,11,14,17,28–30} or *in vivo*.²

One of the emerging mechanisms at play is the autophagy/inflammasome axis,^{31–36} which clearly plays a pivotal role in the induction of pro-inflammatory cytokines by silica.

However there are clearly other cellular responses to amorphous silica, as exemplified by transcriptomic studies,^{16,37,38} and deciphering these responses may help to understand

^aLaboratory of Chemistry and Biology of Metals, UMR 5249, Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, Grenoble, France. E-mail: thierry.rabilloud@cea.fr

^bLaboratoire de Spectrom etrie de Masse BioOrganique, Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, 67000 Strasbourg, France

^cChimie Interface Biologie pour l'Environnement, la Santé et la Toxicologie (CIBEST), UMR 5819, Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, INAC, SYMMES, F-38000 Grenoble, France

^dInstitut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, UMR5075, Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, Grenoble, France

†Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c7nr02140b



cross toxicities between amorphous silica and metals^{39,40} or organic compounds.⁴¹

In this frame, proteomic studies can be useful in addition to transcriptomics, and have indeed been used to study cellular responses to amorphous silica, on keratinocytes⁴² and in lung epithelial cells.⁴³ We have thus decided to perform a proteomic study of the effects of amorphous silica on macrophages, using the well documented RAW264.7 line.⁴⁴ As the cellular responses have been reported to be largely conserved across the size range for silica¹⁶ we have focused our study on a single precipitated silica nanoparticle, previously used in ecotoxicology.⁴⁵ In order to take into account the cell type-specific responses, we have performed this study simultaneously on the RAW264.7 macrophage cell line and in a control, less silica-sensitive cell line of the same genotype and of hematopoietic origin, the MPC11 plasmacytoma cell line. This cell line grows at the same speed as the RAW264.7 line in the same culture medium, and also has a similar nucleocytoplasmic ratio.

2. Experimental

Most experiments have been performed essentially as described in previous publications.^{46–48} Details are given here for the sake of the consistency of the paper. All biological experiments were carried out at least on three independent biological replicates.

2.1. Nanoparticles

The silica nanoparticles (Ludox TMA®) were purchased from Sigma, directly as a concentrated suspension. This suspension was diluted to a silica concentration of 1 mg mL⁻¹ in distilled water just prior to use. The actual size of the particles was determined after dilution in water or in complete culture medium by dynamic light scattering, using a Wyatt Dynapro Nanostar instrument. The morphology of samples was observed by TEM (Transmission Electron Microscopy). Samples were absorbed to the clean side of a carbon film on mica and transferred to a 400-mesh copper grid. The images were taken under low dose conditions (<10 e⁻ Å⁻²) at a magnification of 11k×, 13k×, 23k× and 30k× with defocus values between 1.2 and 2.5 μm on a Tecnai 12 LaB6 electron microscope at 120 kV accelerating voltage using a CCD Camera Gatan Orius 1000.

2.2. Cell culture

The mouse macrophage cell line RAW264.7 and the mouse plasmacytoma cell line MPC11 were obtained from the European Cell Culture Collection (Salisbury, UK). The cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Cells were seeded at 200 000 cells per ml and harvested at 1 000 000 cells per ml. For treatment with nanoparticles, cells were seeded at 500 000 cells per ml. They were treated with nanoparticles on the following day and harvested after a further 24 hours in culture. Cell viability was measured by a dye exclusion assay, either with eosin

(1 mg mL⁻¹)⁴⁹ under a microscope or with propidium iodide (1 μg mL⁻¹)⁵⁰ in a flow cytometry mode. For cross toxicity experiments, the cells were first exposed to silica alone for 6 hours. The tested inhibitors or toxicants were then added for an additional 18 hours and the cell viability measured afterwards.

2.3. Phagocytosis and particle internalization assay

The phagocytic activity was measured using fluorescent latex beads (1 μm diameter, green labelled, catalog number L4655 from Sigma). The beads were pre-incubated at a final concentration of 55 μg mL⁻¹ for 30 minutes at 37 °C in PBS/FBS (v/v). Then, they were incubated with cells (5 μg mL⁻¹) for 2 h 30 min at 37 °C. The cells were harvested and washed with PBS. The cells were resuspended by vortexing with addition of 3/4 water volume and then 1/4 NaCl (35 mg mL⁻¹) volume was added under vortexing in order to clean the cell surface of adsorbed particles. The cells were harvested in PBS with propidium iodide (1 μg mL⁻¹). Viability and phagocytic activity were measured simultaneously by flow cytometry on a FACS Calibur instrument (Beckton Dickinson). The dead cells (propidium positive) were excluded from the analysis.

For the internalization assay, latex nanoparticles (fluorescent green, from Sigma) were used. The nanoparticles were added directly to the serum-containing cell culture medium and left for 24 hours in contact with the cells. Post-exposure cell harvesting, treatment and analysis were performed similar to the phagocytosis assay.

2.4. Mitochondrial transmembrane potential measurement

The mitochondrial transmembrane potential was assessed by Rhodamine 123 uptake. The cells were incubated with Rhodamine 123 (80 nM) for 30 minutes at 37 °C, 5% CO₂ then rinsed twice in cold glucose (1 mg mL⁻¹)-PBS (PBSG) and harvested in cold PBSG supplemented with propidium iodide (1 μg mL⁻¹). The mitochondrial potential of cells was analysed by flow cytometry on a FACS Calibur instrument (Beckton Dickinson). The dead cells (propidium positive) were excluded from the analysis. The low Rhodamine concentration was used to avoid intramitochondrial fluorescence quenching that would result in a poor estimation of the mitochondrial potential.⁵¹

2.5. Enzyme assays

The enzymes were assayed according to published procedures. Isocitrate dehydrogenase was assayed by a coupled assay using nitro blue tetrazolium as the final acceptor and phenazine methosulfate as a relay.⁵² Biliverdin reductase was assayed directly for the NADPH-dependent conversion of biliverdin into bilirubin, followed at 450 nm.⁵³ Lactoylglutathione lyase activity was followed at 240 nm as previously described.⁵⁴

The cell extracts for enzyme assays were prepared by lysing the cells for 20 minutes at 0 °C in 20 mM Hepes (pH 7.5), 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1 mM EGTA, 0.15% (w/v) tetradecyldimethylammonio propane sulfonate (SB 3-14), followed by centrifugation at 15 000g for 15 minutes to clear the extract. The protein concentration was determined by a dye-binding assay.⁵⁵



2.6. NO production and cytokine production

The cells were grown to confluence in a 6 well plate and pre-treated with silica for 6 hours. Then half of the wells were treated with 100 ng ml⁻¹ LPS (from salmonella, purchased from Sigma), and arginine monohydrochloride was added to all the wells (5 mM final concentration) to give a high concentration of substrate for the nitric oxide synthase. After 18 hours of incubation, the cell culture medium was recovered, centrifuged at 10 000g for 10 minutes to remove cells and debris, and the nitrite concentration in the supernatants was read at 540 nm after addition of an equal volume of Griess reagent and incubation at room temperature for 30 minutes.

For cytokine production, a commercial kit (BD Cytometric Bead Array, catalog number 552364 from BD Biosciences) was used. The supernatant of cells treated with NP-SiO₂ was recovered and the kit protocol was followed.

2.7. F-actin staining

The experiments were performed essentially as previously described.⁵⁶ The cells were cultured on coverslips placed in 6-well plates and exposed to silica or latex nanoparticles for 24 h at 37 °C. At the end of the exposure time, the cells were washed twice for 5 min at 4 °C in PBS and fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min at room temperature. After two washes (5 min/4 °C in PBS), they were permeabilized in 0.1% Triton X-100 for 5 min at room temperature. After two more washes in PBS, 500 nM Phalloidin-Atto 550 (Sigma) was added to the cells and left undisturbed for 20 min at room temperature in the dark. Coverslip-attached cells were washed, placed on microscope slides (Thermo Scientific) using a Vectashield mounting medium containing DAPI (Eurobio) and imaged using a Zeiss LSM 800 confocal microscope. The images were processed using ImageJ software.

2.8. RT-qPCR

RNA was extracted using the GenElute™ mammalian total RNA miniprep kit with the optional DNase treatment step, then reverse-transcribed using SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies). RNA concentration and purity were assessed by measuring Abs 260/Abs 280 and Abs 260/Abs 230 absorbance ratios using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Then, cDNA from each of the three biological replicates for each exposure condition was loaded in duplicate on a 96-well plate. Primer sequences are given in ESI Table 2.† Their efficiencies were experimentally checked for compliance using a mix of all samples, with a quality criterion of 2 ± 0.3. Quantitative PCR was performed on a MX3005P Multiplex Quantitative PCR thermocycler (Stratagene), using the following thermal cycling steps: 95 °C for 5 min, then 95 °C for 15 s, 55 °C for 20 s and 72 °C for 40 s 40 times and finally 95 °C for 1 min, 55 °C for 30 s and 95 °C for 30 s for the dissociation curve. C_q was determined using the Mx-Pro 3.20 software with default settings. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and 18S ribosomal 1 (S18) were chosen as reference genes for normali-

zation, validated using BestKeeper.⁵⁷ mRNA expression analysis, normalization and statistical analysis were performed using REST2009 software⁵⁸ using the $\Delta\Delta C_q$ method and a pair-wise fixed reallocation randomization test.

2.9. Proteomics

The 2D gel based proteomic experiments were essentially carried out as previously described,⁴⁶ at least on independent biological triplicates. However, detailed materials and methods are provided for the sake of paper consistency.

2.9.1. Sample preparation. The cells were collected by scraping, and then washed three times in PBS. The cells were then washed once in TSE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA), and the volume of the cell pellet was estimated. The pellet was resuspended in its own volume of TSE buffer. Then 4 volumes (relative to the cell suspension just prepared) of concentrated lysis buffer (8.75 M urea, 2.5 M thiourea, 5% w/v CHAPS, 6.25 mM TCEP-HCl, 12.5 mM spermine base) were added and the solution was left undisturbed for extraction at room temperature for 1 hour. The nucleic acids were then pelleted by ultracentrifugation (270 000g at room temperature for 1 h), and the protein concentration in the supernatant was determined by a dye-binding assay.⁵⁵ Carrier ampholytes (Pharmalytes pH 3–10) were added to a final concentration of 0.4% (w/v), and the samples were kept frozen at –20 °C until use.

2.9.2. Isoelectric focusing. Home-made 160 mm long 4–8 linear pH gradient gels⁵⁹ were cast according to published procedures.⁶⁰ Four mm-wide strips were cut, and rehydrated overnight with the sample, diluted in a final volume of 0.6 ml of rehydration solution (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 0.4% carrier ampholytes (Pharmalytes pH 3–10) and 100 mM dithiodiethanol).⁶¹

The strips were then placed in a Multiphor plate (GE Healthcare), and IEF was carried out with the following electrical parameters: 100 V for 1 hour, then 300 V for 3 hours, then 1000 V for 1 hour, then 3400 V up to 60–70 kVh. After IEF, the gels were equilibrated for 20 minutes in 125 mM Tris, 100 mM HCl, 2.5% SDS, 30% glycerol and 6 M urea.⁶² They were then transferred on top of the SDS gels and sealed in place with 1% agarose dissolved in 125 mM Tris, 100 mM HCl, 0.4% SDS and 0.005% (w/v) bromophenol blue.

2.9.3. SDS electrophoresis and protein detection. Ten percent gels (160 × 200 × 1.5 mm) were used for protein separation. The Tris taurine buffer system⁶³ was used and operated at an ionic strength of 0.1 and a pH of 7.9. The final gel composition is thus 180 mM Tris, 100 mM HCl, 10% (w/v) acrylamide, and 0.27% bisacrylamide. The upper electrode buffer is 50 mM Tris, 200 mM Taurine, and 0.1% SDS. The lower electrode buffer is 50 mM Tris, 200 mM glycine, and 0.1% SDS. The gels were run at 25 V for 1 hour, then 12.5 W per gel until the dye front has reached the bottom of the gel. Detection was carried out by tetrathionate silver staining.⁶⁴

2.9.4. Image analysis. The gels were scanned after silver staining on a flatbed scanner (Epson perfection V750), using a 16 bit grayscale image acquisition. The gel images were then



analyzed using the Delta 2D software (v 3.6). Spots that were never expressed above 100 ppm of the total spots were first filtered out. Then, significantly-varying spots were selected on the basis of their Student's *t*-test *p*-value between the treated and the control groups. Spots showing a *p*-value lower than 0.05 were selected. This strategy is used to avoid the use of arbitrary thresholds, which can result in discarding statistically-valid relevant changes and including non-valid changes.⁶⁵ The false positive concern arising from the multiple testing problem was addressed using the Storey–Tibshirani approach,⁶⁶ as classical statistical filters (*e.g.* Bonferroni or Benjamini–Hochberg) yield to over-rejection of valid results.⁶⁷ Furthermore, we checked that all the spots that we found through the *t*-test also had a *p* < 0.05 in a non-parametric Mann–Whitney *U*-test.

2.9.5. Mass spectrometry. The spots selected for identification were excised from silver-stained gels and destained with ferricyanide/thiosulfate on the same day as silver staining in order to improve the efficiency of the identification process.^{68,69} Gel digestion was performed with an automated protein digestion system, MassPrep Station (Waters, Milford, USA). The gel plugs were washed twice with 50 μL of 25 mM ammonium hydrogen carbonate (NH_4HCO_3) and 50 μL of acetonitrile. The cysteine residues were reduced by 50 μL of 10 mM dithiothreitol at 57 $^\circ\text{C}$ and alkylated by 50 μL of 55 mM iodoacetamide. After dehydration with acetonitrile, the proteins were cleaved in gel with 10 μL of 12.5 ng μL^{-1} of modified porcine trypsin (Promega, Madison, WI, USA) in 25 mM NH_4HCO_3 . The digestion was performed overnight at room temperature. The generated peptides were extracted with 30 μL of 60% acetonitrile in 0.1% formic acid. Acetonitrile was evaporated under vacuum before nanoLC-MS/MS analysis.

NanoLC-MS/MS analysis was performed using a nanoACQUITY Ultra-Performance-LC (Waters Corporation, Milford, USA) coupled to the SynaptTM High Definition Mass SpectrometerTM (Waters Corporation, Milford, USA), or to the TripleTOF 5600 (Sciex, Ontario, Canada).

The nanoLC system was composed of an ACQUITY UPLC[®] CSH130 C18 column (250 mm \times 75 μm with a 1.7 μm particle size, Waters Corporation, Milford, USA) and a Symmetry C18 precolumn (20 mm \times 180 μm with a 5 μm particle size, Waters Corporation, Milford, USA). The solvent system consisted of 0.1% formic acid in water (solvent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (solvent B). 4 μL of sample were loaded into the enrichment column for 3 min at 5 $\mu\text{L min}^{-1}$ with 99% of solvent A and 1% of solvent B. Elution of the peptides was performed at a flow rate of 300 nL min^{-1} with a 8–35% linear gradient of solvent B in 9 minutes.

The SynaptTM High Definition Mass SpectrometerTM (Waters Corporation, Milford, USA) was equipped with a Z-spray ion source and a lock mass system. The system was fully controlled using MassLynx 4.1 SCN639 (Waters Corporation, Milford, USA). The capillary voltage was set at 2.8 kV and the cone voltage at 35 V. Mass calibration of the TOF was achieved using fragment ions from Glu-fibrino-peptide B on the [50;2000] *m/z* range. Online correction of this calibration was

performed with Glu-fibrino-peptide B as the lock-mass. The ion ($\text{M} + 2\text{H}$)²⁺ at *m/z* 785.8426 was used to calibrate MS data and the fragment ion ($\text{M} + \text{H}$)⁺ at *m/z* 684.3469 was used to calibrate MS/MS data during the analysis.

For tandem MS experiments, the system was operated with automatic switching between MS (0.5 s per scan on *m/z* range [150;1700]) and MS/MS modes (0.5 s per scan on *m/z* range [50;2000]). The two most abundant peptides (intensity threshold 20 counts per s), preferably doubly and triply charged ions, were selected on each MS spectrum for further isolation and CID fragmentation using collision energy profile. Fragmentation was performed using argon as the collision gas.

Mass data collected during analysis were processed and converted into .pkl files using ProteinLynx Global Server 2.3 (Waters Corporation, Milford, USA). Normal background subtraction type was used for both MS and MS/MS with 5% threshold and polynomial correction of order 5. Smoothing was performed on MS/MS spectra (Savitsky-Golay, 2 iterations, window of 3 channels). Deisotoping was applied for MS (medium deisotoping) and for MS/MS (fast deisotoping).

The TripleTOF 5600 (Sciex, Ontario, Canada) was operated in positive mode, with the following settings: ionspray voltage floating (ISVF) 2300 V, curtain gas (CUR) 10, interface heater temperature (IHT) 150, ion source gas 1 (GS1) 2, declustering potential (DP) 80 V. Information-dependent acquisition (IDA) mode was used with Top 10 MS/MS scans. The MS scan had an accumulation time of 250 ms in *m/z* [400;1250] range and the MS/MS scans 100 ms in *m/z* [150;1800] range in high sensitivity mode. Switching criteria were set to ions with a charge state of 2–4 and an abundance threshold of more than 500 counts and exclusion time was set at 4 s. IDA rolling collision energy script was used for automatically adapting the CE. Mass calibration of the analyser was achieved using peptides from digested BSA. The complete system was fully controlled by AnalystTF 1.7 (Sciex). Raw data collected were processed and converted with MSDataConverter in .mgf peak list format.

For protein identification, the MS/MS data were interpreted using a local Mascot server with the MASCOT 2.4.1 algorithm (Matrix Science, London, UK) against UniProtKB/SwissProt (version 2016_01, 550299 sequences). Research was carried out in all species. Spectra were searched with a mass tolerance of 15 ppm for MS and 0.05 Da for MS/MS data, allowing a maximum of one trypsin missed cleavage. Carbamidomethylation of cysteine residues and oxidation of methionine residues were specified as variable modifications. Protein identifications were validated with at least two peptides with a Mascot ion score above 30.

3. Results

3.1. Nanoparticles characterization and determination of the effective doses

The amorphous silica nanoparticle used (LudoxTM TMA) was characterized by several methods, and the results are summarized in Fig. 1 (panels A–C). Spherical nanoparticles were



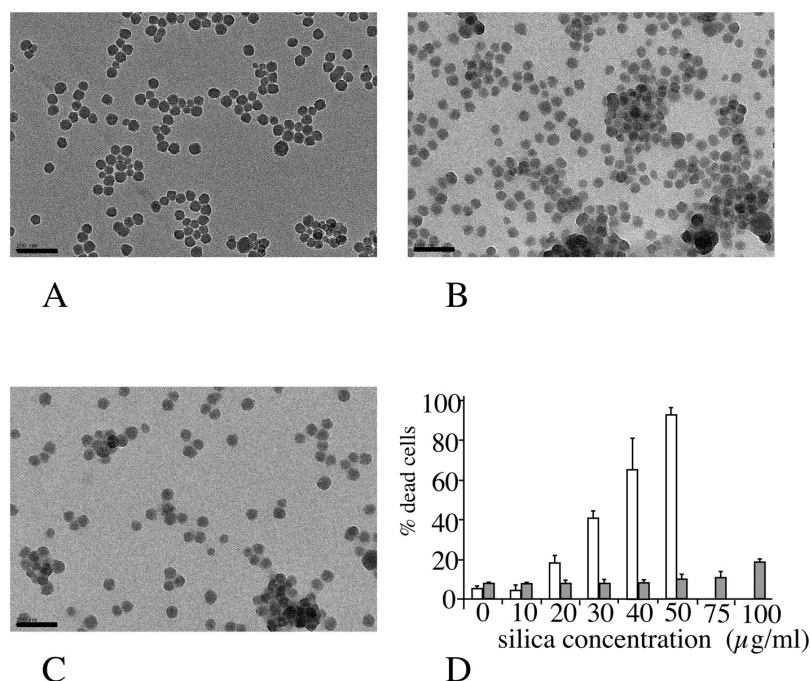


Fig. 1 Nanoparticles characterization and effects on cell viability. Panel A: TEM image of Ludox TMA silica nanoparticles suspended in water. Panels B and C: TEM images of Ludox TMA silica nanoparticles suspended in complete culture medium (RPMI 1640 + fetal bovine serum). B: Time in complete medium 30 minutes. C: Time in complete medium 24 hours. Scale bar: 100 µm. Panel D: Effects of Ludox TMA on cell viability on the RAW264.7 cell line (white bars) and MPC11 cell line (dotted bars).

obtained (primary diameter 26 ± 4 nm), and the average hydrodynamic diameter of these particles, as measured by DLS, was 37 ± 1 nm, with a polydispersity index of 20%. When placed in serum-containing culture medium the hydrodynamic diameter immediately increased to 155 ± 7 nm (polydispersity index 25%). The aggregation state increased over time in the serum-containing medium to up to 365 nm (multimodal) after 24 hours in the medium. Toxicity curves were then determined on the two cell lines of interest. The LD_{20} , *i.e.* the concentration inducing a 20% cell death after 24 hours of treatment, was determined to be $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ for the RAW264 cell line and $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ for the MPC11 cell line (Fig. 1D). These concentrations were chosen for the subsequent studies, as the LD_{20} offers a good compromise between cell viability and biological effect.

In order to determine whether the differences in toxicity were due to different internalization between the two cell lines of interest, we tested the internalization of particles in the two cell lines by using fluorescent latex beads of different diameters (30 and 100 nm). The results, displayed in ESI Fig. 1 and Table 1,† show that silica toxicity parallels the internalization capacity of the cells.

3.2. Proteomic studies

In order to gain further insights into the molecular responses of cells to the amorphous silica nanoparticles, we performed

proteomic studies. We used two different doses for each cell line. For the RAW264 cell line, $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ (*i.e.* the LD_{20}) and $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ (*i.e.* a dose where no increased mortality and very minimal functional effects were observed) were used. For the MPC11 cell line we used $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ (*i.e.* the same dose as on RAW264, but with no visible macroscopic effects in this case) and $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ (*i.e.* the LD_{20} for this cell line). This proteomic analysis probed 2590 protein species for the RAW264 cell line, and 2180 for the MPC11 cell line. The median coefficient of variation of the spots was 24.5% for the RAW cell line, and 21% for the MPC11 cell line. These coefficients of variation are in the range of those found in typical 2D DIGE experiments, where coefficient of variations range from 18 to 28%, depending on the sample.^{70–73} The significant protein changes were detected through the use of a variance-based screen, which compensates automatically for the variability of each spot, and enables to take into account small but reproducible changes, thus avoiding the arbitrary exclusion of changes that can be biologically meaningful. Through this proteomic screen, we could detect modulation of proteins belonging to various functional classes, as shown in Fig. 2, Table 1, ESI Table 2 and Fig. 2–7.† Among the 113 significantly variable spots, 15 were common between RAW264 and MPC11 and 19 varied for the two doses of silica in the RAW264 cell line. This means in turn that the majority of significant variables are specific for the



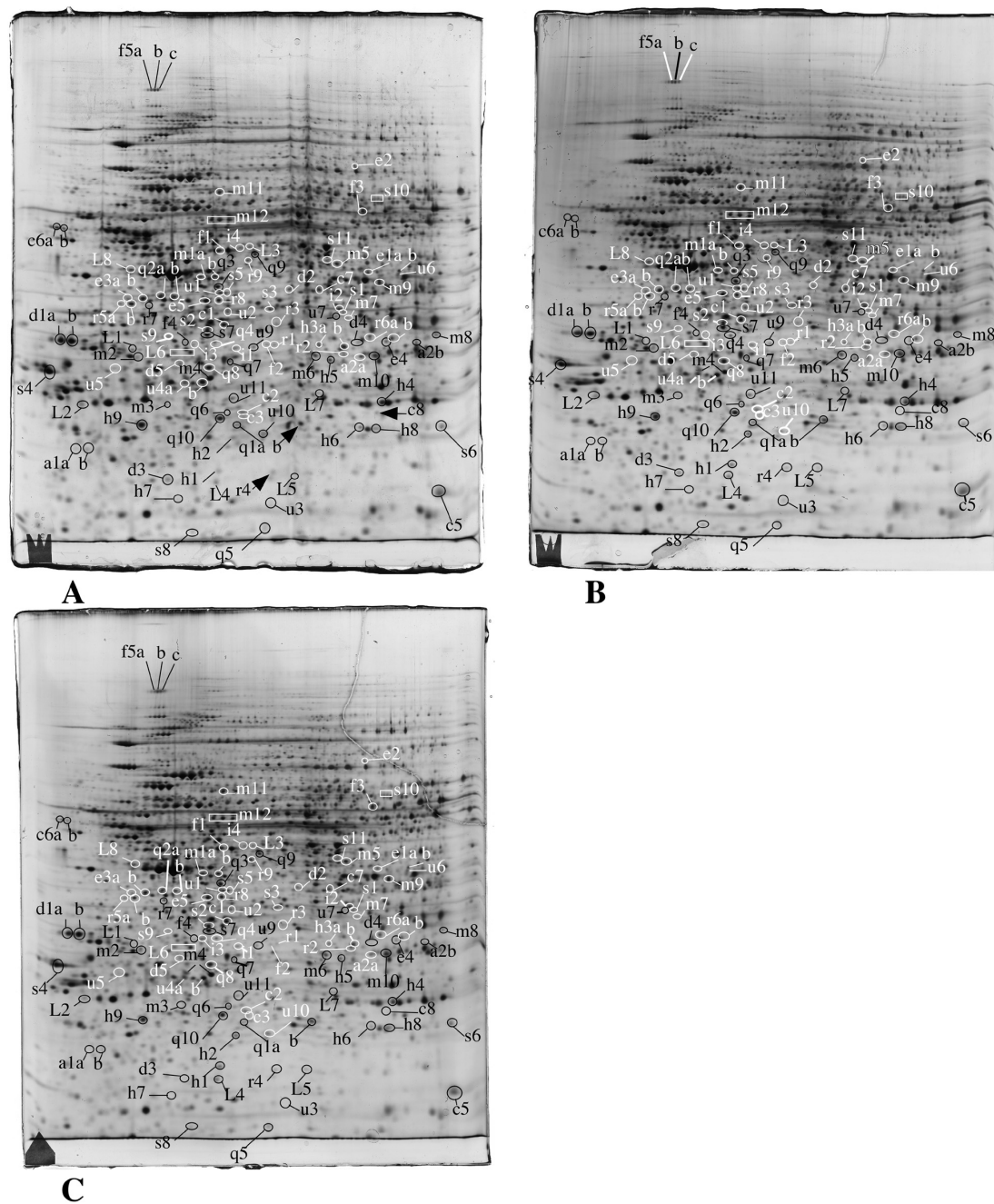


Fig. 2 Proteomic analysis of total cell extracts by 2D electrophoresis. Total cell extracts of RAW274.7 cells were separated by two-dimensional gel electrophoresis. The first dimensions covered a 4–8 pH range and the second dimension a 15–200 kDa range. Total cellular proteins (150 µg) were loaded on the first dimension gel. A: Gel obtained from control cells. B: Gel obtained from cells treated for 24 hours with 10 µg ml⁻¹ Ludox TMA. C: Gel obtained from cells treated for 24 hours with 20 µg ml⁻¹ Ludox TMA. The lines and arrows point to spots that show reproducible and statistically significant changes between the control and nanoparticle-treated cells and to the control neighbor spots in some cases. Spot numbering according to Table 1.

Open Access Article. Published on 31 May 2017. Downloaded on 23/01/2018 16:06:23.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence.



Open Access Article. Published on 31 May 2017. Downloaded on 23/01/2018 16:06:23.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence.



Table 1 Differentially-expressed proteins identified in the proteomic screen

Spot	Protein Short name	Protein Full name	Prot. acc. no. (uniprot)	Ratio RAW264.7 TMA10 vs. ctl	t test RAW264.7 TMA10 vs. ctl	Ratio RAW264.7 TMA20/ctl	t test RAW264.7 TMA20 vs. ctl	Ratio MPC11 TMA100/ TMA100 vs. ctl	t test MPC11 TMA100 vs. ctl
Protein quality control & degradation (q)									
q1a	psb3 ac	Proteasome beta 3 subunit	Q9R1P1	1.01	0.94	0.65	0.01	1.09	0.93
q1b	psb3 bas	Proteasome beta 3 subunit	Q9R1P1	1.31	0.01	1.29	0.01	0.91	0.71
q2a	sae1 ac	SUMO-activating enzyme subunit 1	Q9R1T2	0.97	0.66	0.72	0.04	1.10	1.00
q2b	sae1 bas	SUMO-activating enzyme subunit 1	Q9R1T2	0.9	0.51	0.33	0.01	1.07	0.85
q3	psd13	Proteasome regulatory subunit 13	Q9WVJ2	1.05	0.55	1.32	0.01	1.32	1.31
q4	brc3	Lys63-deubiquitinase brc36	P46737	0.96	0.65	0.82	0.02	1.62	1.51
q5	ube2n	Ubiquitin conjugating enzyme 2N	P61088	1.09	0.82	0.56	0.02	0.87	0.93
q6	psd10	Proteasome regulatory subunit 10	Q9Z2X2	1.46	0.11	1.73	0.03	0.95	0.75
q7	psmd8	Proteasome regulatory subunit 8	Q9CX56	0.84	0.23	0.69	0.03	1.14	1.01
q8	psme2	Proteasome activator complex subunit 2	P97372	1.18	0.06	1.21	0.04	1.28	1.07
q9	ps7	Proteasome regulatory subunit 7	P46471	1.07	0.52	1.16	0.04	1.12	1.2
q10	psb4	Proteasome beta 4 subunit	P99026	1.13	0.04	1.15	0.05	1.13	0.01
Protein production & folding (f)									
f1	if2b	Translation initiation factor 2 subunit 2	Q99L45	0.92	0.51	1.50	0.01	1.08	0.62
f2	dnj9	DnaJ homolog subfamily C member 9	Q91WN1	0.71	0.15	0.43	0.02	1.09	0.48
f3	tcz	T-complex protein 1 subunit zeta	P80317	0.83	0.14	0.69	0.03	0.90	1.06
f4	ppie	Peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> isomerase E	Q9QZH3	1.2	0.31	2.03	0.04	0.92	0.56
f5a*	hyou1 ac	Hypoxia up-regulated protein 1	Q9JKR6	1.46	0.24	1.63	0.10	0.29	0.23
f5b	hyou1 med	Hypoxia up-regulated protein 1	Q9JKR6	1.28	0.27	1.71	0.03	0.73	1.08
f5c	hyou1 bas	Hypoxia up-regulated protein 1	Q9JKR6	1.00	0.98	1.76	0.04	1.12	0.31
Homeostasis (h)									
h1	frlh	Ferritin heavy chain	P09528	1.78	0.02	1.88	0.01	1.28	0.02
h2*	fril	Ferritin light chain	P29391	1.38	0.09	1.25	0.22	0.61	0.74
h3a	blvra ac	Biliverdin reductase A	Q9CY64	0.84	0.27	0.67	0.01	1.06	0.61
h3b*	blvra bas	Biliverdin reductase A	Q9CY64	1.02	0.87	1.19	0.23	1.03	0.92
h4	blvrb	Biliverdin reductase B	Q923D2	1.05	0.49	1.30	0.01	N.D.	N.D.
h5	nmr1	NmrA-like family domain-containing protein 1	Q8K2T1	0.77	0.14	0.80	0.02	1.07	0.84
h6	pdcl1	Parkinson disease 7 domain-containing protein 1	Q8BRQ8	0.9	0.31	0.81	0.02	1.27	0.06
h7	txd12	Thioredoxin domain-containing protein 12	Q9CQU0	0.9	0.62	0.57	0.04	1.08	0.68
h8	prd1ox	Peroxiredoxin 1, oxidized form	P35700	1.00	0.99	1.38	0.04	0.60	0.03
h9	lgl	Lactoylglutathione lyase	Q9CFU0	0.94	0.36	0.81	0.05	1.25	0.01
Energy & lipid metabolism (e)									
e1a	idhc ac	Isocitrate dehydrogenase, cytoplasmic	O88844	0.95	0.48	0.75	0.01	1.08	0.55
e1b*	idhc bas	Isocitrate dehydrogenase, cytoplasmic	O88844	0.94	0.75	1.07	0.70	0.78	0.30
e2	pfkal	6-Phosphofructokinase, liver type	P12382	0.99	0.97	1.45	0.03	0.92	0.73
e3a	galK ac	Galactose kinase	Q9RON0	0.75	0.03	0.74	0.05	0.94	0.22
e3b*	galK bas	Galactose kinase	Q9RON0	0.96	0.60	0.94	0.44	1.21	1.15
e4	plpnb	Phosphatidylinositol transfer protein beta isoform	P53811	0.53	0.02	0.52	0.02	1.17	0.56
e5	fppls bas	Farnesyl pyrophosphate synthase	Q920E5	1.04	0.60	1.21	0.03	1.15	0.03
DNA metabolism and repair (d)									
d1a	pna ac	Proliferating cell nuclear antigen	P17918	0.89	0.06	0.81	0.01	1.11	0.23
d1b	pna bas	Proliferating cell nuclear antigen	P17918	0.90	0.13	0.89	0.09	1.27	0.02

Open Access Article. Published on 31 May 2017. Downloaded on 23/01/2018 16:06:23.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence.



Table 1 (Contd.)

Spot	Protein Short name	Protein Full name	Prot. acc. no. (uniprot)	Ratio RAW264.7 TMA10/ctl	<i>t</i> test RAW264.7 TMA10 vs. ctl	Ratio RAW264.7 TMA20/ctl	<i>t</i> test RAW264.7 TMA20 vs. ctl	Ratio MPC11 TMA100 vs. ctl	<i>t</i> test MPC11 TMA100 vs. ctl
d2	rfc2	Replication factor C subunit 2	Q9WUK4	0.51	0.02	0.54	0.03	1.16	0.50
d3	dnp1	2'-deoxynucleoside 5'-phosphate N-hydrolyase 1	Q80VJ3	0.87	0.28	0.73	0.04	1.27	0.03
d4	tatd3	Putative deoxyribonuclease TATDN3	Q3U1C6	0.59	0.06	0.53	0.04	1.13	0.21
d5	rfa2	Replication protein A 32 kDa subunit	Q62193	0.91	0.20	0.80	0.01	0.74	0.02
r1	tsnax	RNA and nucleotide metabolism (r)							
r2	sarp	Translin-associated protein X	Q9QZE7	0.82	0.26	0.57	0.02	1.28	0.24
r3	osgp	SAP domain-containing ribonucleoprotein	Q9DJJ3	0.76	0.08	0.64	0.02	1.27	0.10
r4	bt3L4	Probable tRNA N6-adenosine threonylcarbamoyltransferase	Q8BWU5	0.82	0.20	0.69	0.02	1.02	0.94
r5a	strap ac	Transcription factor BTF3 homolog 4	Q9CQH7	0.18	0.03	0.15	0.03	1.36	0.02
r5b*	strap bas	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	Q971Z2	0.72	0.08	0.64	0.03	0.84	0.37
r6a	prps1 a	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	Q9Z1Z2	0.90	0.40	0.86	0.28	1.30	0.03
r6b	prps1 b	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1	Q9D7G0	1.01	0.91	1.61	0.04	1.09	0.3
r7	plhd1	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1	Q9D7G0	0.73	0.01	0.89	0.48	1.13	0.42
r8	bpnt1	PIH1 domain-containing protein 1	Q9W7M5	0.49	0.02	0.42	0.02	0.43	0.03
r9	adk	3'(2')5'-Bisphosphate nucleotidase 1	Q970S1	1.12	0.31	1.40	0.01	1.29	0.01
		Adenosine kinase	P55264	0.68	0.01	0.50	0.01	0.82	0.21
		Cytoskeleton (c)							
c1	caza2	F-actin-capping protein subunit alpha-2	P47754	0.97	0.81	0.38	0.01	0.74	0.12
c2	rhoA	Transforming protein RhoA	Q9QUJ0	0.80	0.07	0.47	0.01	0.91	0.45
c3	rab14	Ras-related protein Rab-14	Q91V41	0.80	0.07	0.47	0.01	1.01	0.97
c4	twf1	Twinfilin-1	Q91YR1	1.99	0.02	2.05	0.01	1.15	0.11
c5	cof1	Cofilin-1, monophosphorylated form	P18760	0.90	0.39	0.53	0.01	0.66	0.09
c6a	lsp1 ac	Lymphocyte-specific protein 1	P19973	0.68	0.02	0.82	0.11	N.D.	N.D.
c6b	lsp1 bas	Lymphocyte-specific protein 1	P19973	0.63	0.05	0.56	0.04	0.51	0.05
c7	twf2 ac	Twinfilin-2	Q920F5	0.93	0.39	0.74	0.04	0.71	0.06
c8	rras	Ras-related protein R-Ras	P10833	0.57	0.40	0.23	0.01	0.80	0.23
		Mitochondria (m)							
m1a	sueb2 ac	Succinate-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial	Q9Z2I8	0.99	0.93	1.35	0.01	0.86	0.09
m1b	sueb2 bas	Succinate-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial	Q9Z2I8	1.17	0.01	1.19	0.01	1.19	0.16
m2	coq9	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial	Q8K1Z0	1.14	0.28	1.61	0.01	1.69	0.02
m3	mtx2	Metaxin-2	O88441	0.68	0.01	0.48	0.01	0.86	0.46
m4a	phb ac.	Prohibitin	P67778	1.02	0.72	1.30	0.03	0.73	0.15
m4b	phb	Prohibitin	P67778	1.11	0.26	1.32	0.02	1.12	0.28
m5	eftu	Elongation factor Tu, mitochondrial	Q8BFR5	1.03	0.71	1.16	0.02	1.30	0.08
m6	thtm	3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase	Q9J999	1.14	0.05	1.24	0.02	0.92	0.44
m7	htra2	Serine protease HTRA2, mitochondrial	Q9JY5	0.74	0.34	1.74	0.04	1.27	0.09
m8	hmgCL	Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, mitochondrial	P38060	1.00	0.99	0.66	0.04	1.05	0.58
m9	acacl1	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	P51174	1.00	0.97	1.15	0.04	1.13	0.25
m10	vdac2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	Q60930	0.95	0.59	1.16	0.05	0.86	0.19

Open Access Article. Published on 31 May 2017. Downloaded on 23/01/2018 16:06:23.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence.



Table 1 (Contd.)

Spot	Protein Short name	Protein Full name	Prot. acc. no. (uniprot)	Ratio RAW264.7 TMA10/ctl	t test RAW264.7 TMA10 vs. ctl	Ratio RAW264.7 TMA20/ctl	t test RAW264.7 TMA20 vs. ctl	Ratio MPC11 TMA100/ vs.ctl	t test MPC11 TMA100 vs.ctl	
m11	odp2 ac	Dihydropyridyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	Q8BMF4	1.10	0.39	1.29	0.05	1.11	0.09	
m12a	fkbp4 ac	Peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> isomerase FKBP4	P30416	1.07	0.53	1.38	0.02	0.96	0.64	
m12b	fkbp4 med	Peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> isomerase FKBP4	P30416	1.03	0.73	1.23	0.03	1.02	0.81	
m12c*	fkbp4 bas	Peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> isomerase FKBP4	P30416	1.00	0.95	1.17	0.08	1.10	0.45	
Lysosomes & vesicles (L)										
L1	catz	Cathepsin Z	Q9WUJ7	0.25	0.01	0.10	0.01	1.49	0.05	
L2	snap23	Synaptosomal-associated protein 23	O09044	1.32	0.11	0.81	0.01	1.34	0.04	
L3	smx6 ac.	Sorting nexin 6	Q6F8X1	0.74	0.10	0.47	0.02	0.66	0.02	
L4	ssrd	Translocon-associated protein subunit delta	Q62186	1.15	0.15	1.24	0.04	1.07	0.49	
L5	vps25	Vacuolar protein-sorting-associated protein 25	Q9CQ80	0.30	0.03	0.35	0.10	1.39	0.06	
L6a	anxa4 ac	Annexin A4	P97429	1.18	0.02	1.02	0.71	1.76	0.01	
L6b	anxa4 bas	Annexin A4	P97429	1.33	0.01	1.24	0.07	1.01	0.97	
L7	snf8	Vacuolar-sorting protein SNF8	Q9CZ28	1.57	0.01	1.24	0.08	1.05	0.66	
L8	nsf1c	NSFL1 cofactor p47	Q9CZ44	0.82	0.10	0.61	0.01	1.43	0.01	
Signalling (s)										
s1	cab39 ac	Calcium-binding protein 39	Q06138	0.85	0.24	0.45	0.01	1.01	0.95	
s2	gbb1	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	P62874	1.06	0.24	1.39	0.01	1.13	0.45	
s3	ppp1ca	Serine/threonine-protein phosphatase PPI-alpha catalytic subunit	P62137	0.90	0.18	0.76	0.01	0.99	0.93	
s4	14-3-3 eps	14-3-3 protein epsilon	P62259	1.05	0.57	0.83	0.01	1.59	0.02	
s5	mk14	Mitogen-activated protein kinase 14	P47811	0.99	0.91	1.35	0.02	1.07	0.67	
s6	arl3	ADP-ribosylation factor-like protein 3	Q9WUL7	1.23	0.31	0.51	0.02	1.18	0.35	
s7	gbb2	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	P62880	0.98	0.76	1.17	0.04	1.23	0.02	
s8	ptd6d	Retinal rod rhodopsin-sensitive cGMP 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit delta	O55057	1.52	0.25	2.07	0.04	1.95	0.04	
s9	cppep	Serine/threonine-protein phosphatase CPPED1	Q8BFS6	0.63	0.06	0.60	0.04	1.07	0.65	
s10a	ptpn6 ac	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6	P29351	0.72	0.14	0.59	0.05	N.D.	N.D.	
s10b*	ptpn6 bas	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6	P29351	0.62	0.10	0.56	0.07	N.D.	N.D.	
s11	ctbp1	C-terminal-binding protein 1	O88712	0.83	0.05	0.86	0.09	1.3	0.11	
Cell death control (a)										
ata	bid ac.	BH3-interacting domain death agonist	P70444	0.64	0.17	0.31	0.01	1.49	0.03	
a1b	bid bas.	BH3-interacting domain death agonist	P70444	1.32	0.01	1.06	0.63	1.23	0.48	
a2b	Casp 3 bas	Caspase-3	P70677	0.71	0.09	0.26	0.01	1.74	0.52	
a2a	casp3 mod	Caspase-3	P70677	0.77	0.02	1.01	0.92	0.87	0.18	
Inflammation (i)										
i1	in35	Interferon-induced 35 kDa protein homolog	Q9D8C4	0.80	0.03	0.59	0.01	1.15	0.09	
i2	anxa1	Annexin A1	P10107	1.02	0.73	1.13	0.01	1.4	0.27	
i3	myd88	Myeloid differentiation primary response protein MyD88	P22366	0.74	0.24	0.43	0.02	1.22	0.15	

Open Access Article. Published on 31 May 2017. Downloaded on 23/01/2018 16:06:23.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence.



Table 1 (Contd.)

Spot	Protein Short name	Protein Full name	Prot. acc. no. (uniprot)	Ratio RAW264.7 TMA10 vs. ctl	t test RAW264.7 TMA10 vs. ctl	Ratio RAW264.7 TMA20/ctl	t test RAW264.7 TMA20 vs. ctl	Ratio MPC11 TMA20/ctl	t test MPC11 TMA20 vs. ctl	Ratio MPC11 TMA100/ctl	t test MPC11 TMA100 vs. ctl
i4	casp1	Caspase-1	P29452	0.85	0.43	0.45	0.02	0.61	0.01	0.56	0.04
Miscellaneous (u)											
u1	mtna	Methylthioribose-1-phosphate isomerase	Q9CQT1	1.08	0.20	1.30	0.01	1.32	0.04	1.40	0.02
u2	cry11	Lambda-crystalline homolog	Q99KP3	1.00	0.99	0.49	0.01	1.14	0.51	1.24	0.33
u3	ppac	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	Q9D358	0.40	0.01	0.32	0.01	1.28	0.15	1.61	0.03
u4a	cltc4 ac	Chloride intracellular channel protein 4	Q9QYB1	1.26	0.05	1.19	0.06	1.13	0.17	1.25	0.01
u4b	cltc4 bas	Chloride intracellular channel protein 4	Q9QYB1	1.15	0.03	1.22	0.01	1.44	0.01	1.34	0.01
u5	lhpp	Phosphotyrosine phosphohistidine inorganic pyrophosphatase	Q9D715	1.20	0.16	1.63	0.01	0.57	0.11	0.4	0.11
u6	amrp	Alpha-2-macroglobulin receptor-associated protein	P55302	0.98	0.92	1.64	0.01	0.78	0.29	0.75	0.35
u7	mat2b	Methionine adenosyltransferase 2 subunit beta	Q99LB6	0.74	0.11	0.79	0.03	0.94	0.73	0.62	0.17
u9	fa49b	Protein FAM49B	Q921 M7	0.85	0.47	0.48	0.04	1.80	0.01	1.39	0.17
u10	cdc42	Cell division control protein 42	P60766	0.67	0.14	0.48	0.04	1.16	0.07	1.07	0.54
u11	spre	Sepiapterin reductase	Q64105	0.99	0.95	0.74	0.04	1.14	0.23	1.08	0.62

Underlined: proteins that change in opposite directions in RAW264 and MPC11 cell lines. Bold: proteins that change significantly in both RAW264 and MPC11 cell lines. Italics: proteins that change significantly in RAW264 at the low dose but not at the high dose. *Proteins that do not change significantly but are included as controls.

RAW264 cell line at the LD₂₀. It can also be noted that most proteins are present in both the MPC11 and RAW264 cell lines, although their amounts may be different in the two lines. This feature has been observed in wider proteomic screens⁷⁴ and show that “housekeeping proteins” represent in fact the vast majority of proteins, at least those detected in proteomic screens.

3.3. Validation studies

The inclusion of small but reproducible protein changes means in turn that these changes cannot be validated easily by classical biochemical techniques at the protein expression level. For example, protein blotting often shows a technical variability well above 20%, and a response curve often lower than that of 2D electrophoresis, making this technique unsuitable for the validation of small fold changes. This renders functional validation even more necessary, to confirm the biological relevance of the proteomics-detected protein modulations.

3.3.1. Enzyme activities. In 2D gel-based proteomics, proteins are often represented by several spots, and it happens frequently that one spot is changed under the biological conditions of interest while the others are more or less constant. As the different spots correspond to modified forms of the protein and as protein modifications are known to modulate enzyme activities (e.g. acetylation⁷⁵), the correspondence between spot variations and enzyme activities is far from obvious and must be verified. We carried out this verification on three enzymes, namely isocitrate dehydrogenase (spots e1a and e1b), lactoylglutathione lyase (spot h9) and biliverdin reductase (spots h3a, h3b and h4). The results, displayed in Table 2, show that the activity correlates with the spot change observed on 2D gels for lactoylglutathione lyase. In the case of isocitrate dehydrogenase, the activity correlates with the change in the acidic spot corresponding to the enzyme, and neither with the basic spot nor with the sum of the two spots. This example demonstrates, if further needed, the interest of a proteomic analysis taking into account the protein species and not only the gene product level. In the case of the biliverdin reductase activity, the situation is more complex. The best correlation is found with a combination of the acidic spot of biliverdin reductase A and the spot of biliverdin reductase B. This is in line with the known role of phosphorylation in the activity of biliverdin reductase A.⁷⁶

3.3.2. Cytoskeleton and phagocytosis. Numerous proteins associated with the actin cytoskeleton emerged from the proteomic screen (see category c in Table 1). This led us to study if the actin cytoskeleton was altered in macrophages upon treatment with silica nanoparticles, using labelled phalloidin and confocal microscopy. The results, displayed in Fig. 3, show that silica nanoparticles induce a decrease in the number of spikes observed at the surface of the macrophages. This effect was not due to the internalization of particles *per se*, as internalization of latex particles did not induce this effect (Fig. 3, panels D and E).

Table 2 Enzyme activities measured in control cell extracts and in extracts prepared from cells treated for 24 hours with either 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ or 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ silica nanoparticles. The activities are expressed in units per mg protein, the unit being defined as 1 μmol of substrate converted per minute

umol per min per mg prot			
	Control	Silica (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	Silica (20 $\mu\text{g ml}^{-1}$)
Igul			
A	364.9	329.3	334.7
B	356.	316.9	300.9
C	370.3	336.5	238.6
D	366.7	349.0	306.2
Mean	364.5	332.9	295.1
Std deviation	6.06	13.40	40.5
Fold change		0.91	0.81
<i>t</i> test vs. control		0.011	0.040
IDHC			
A	21.5	23.5	14.5
B	19.5	29.5	16.5
C	31.5	21.0	20.5
D	33.5	27.5	11.0
Mean	26.5	25.37	15.62
Std deviation	7.02	3.84	3.97
Fold change		0.96	0.59
<i>t</i> test vs. control		0.791	0.045
Biliverdin reductase			
A	1.0	0.5	0.77
B	0.82	0.68	0.68
C	0.73	0.68	0.73
D	0.86	0.77	0.82
Mean	0.85	0.66	0.75
Std deviation	0.11	0.11	0.06
Fold change		0.77	0.88
<i>t</i> test vs. control		0.053	0.177

As the actin cytoskeleton is also involved in phagocytosis, we also tested this macrophage function. The results, displayed in Fig. 4A and B, show a moderate decrease in the proportion of phagocytic cells and an almost unchanged phagocytic ability for the phagocytosis-positive cell, for the cells exposed to 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ silica nanoparticles.

3.3.3. Mitochondrial potential. Numerous mitochondrial proteins were found in the proteomic study (see category m in Table 1), some of them implied in energy generation directly (e.g. the long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase (acadl, spot m9)), the beta subunit of the succinate-CoA ligase [GDP-forming] (sucb2, spots m1a and m1b) or indirectly through control of the oxphos complexes (e.g. the mitochondrial elongation factor Tu (eftu, spot m5), or the ubiquinone biosynthesis protein coq9 (spot m2)). This prompted us to assess the mitochondrial transmembrane potential. The results, displayed in Fig. 4C and D, show no alteration either in the proportion of cells with a normal transmembrane potential or on the value of the potential. This result is in line with the fact that most mitochondrial proteins picked in the proteomic screen show an increase of abundance. This illustrates the fact that the cells increase the amount of some mitochondrial proteins to compensate for the effects of the silica treatment, and

are thus able to maintain the mitochondrial potential at the sub-toxic concentrations used.

3.3.4. Effects on signaling pathways. Several proteins associated with signaling were found modulated upon silica nanoparticle treatment of macrophages, according to proteomics. We focused on the AMP-activated protein kinase (AMPK pathway) and on the myeloid differentiation primary response protein 88 (myd88) pathway.

The activity of the AMPK pathway is controlled by the STK11/LKB1 kinase,⁷⁷ whose activity is controlled through the formation of a ternary LKB1-STRAD-CAB39/Mo25 complex.⁷⁸ In this model, a decrease in the calcium binding protein 39 (CAB39/Mo25) should result in a decrease of the LKB1 activity, resulting in turn in a decrease of the AMPK activity. Macrophages respond to silica nanoparticles by decreasing the amount of CAB39/Mo25 (spot s1) and thus putatively decreasing the activity of the AMPK pathway. It is also worth noting that macrophages also respond to silica nanoparticles by a strong decrease of adenosine kinase (adk, spot r9) whose product is AMP, *i.e.* another activator of AMPK.

We thus tested if a pharmacological inhibition of AMPK would alter cell survival after treatment with silica nanoparticles. The results, displayed in Fig. 5A, show that inhibition of the AMPK pathway dramatically increases cell survival upon treatment with silica.

The myd88 pathway is involved in the transduction of the signals produced by activation of most Toll like receptors (TLR).⁷⁹ Consequently, a decrease in myd88, as we observed in our proteomic screen (spot i3), should result in a lesser efficiency of the TLR pathways and thus to decreased responses when the TLR are stimulated. To test this hypothesis, we used the classical lipopolysaccharide (LPS)-induced NO production, linked to the stimulation of TLR4. The results of these experiments, displayed in Fig. 5B, show a progressive decline of the LPS-induced NO production when cells are treated with silica nanoparticles. This effect was also observed for the production of interleukin 6, while Tumor Necrosis Factor alpha (TNF-alpha) did not show the same response (Fig. 5C and D).

3.3.5. Effects on DNA. Among the proteins modulated in response to silica nanoparticles, a few are associated with DNA replication and DNA repair. We thus first checked if DNA damage was observable in silica treated RAW264.7 cells. The results, displayed in ESI Fig. 8,† show that treatment of RAW264.7 cells with 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ silica induces an increase in DNA damage, as previously detected in other cell types⁶ and/or with larger silica particles.²⁴ One of the modulated proteins is the 2'-deoxynucleoside 5'-phosphate *N*-hydrolase 1 (DNPH1, spot d3), a protein cleaving off the base from deoxyribonucleotides, independently from the nature of the base, although the kinetics of the cleavage may differ from one nucleotide to another.^{80–82} In the context of nucleotide excision repair, whose end products are nucleotides, the role of such an enzyme is to remove the damaged bases from the nucleotides, so that damaged nucleotides cannot re-enter the salvage pathway and be re-incorporated into DNA.



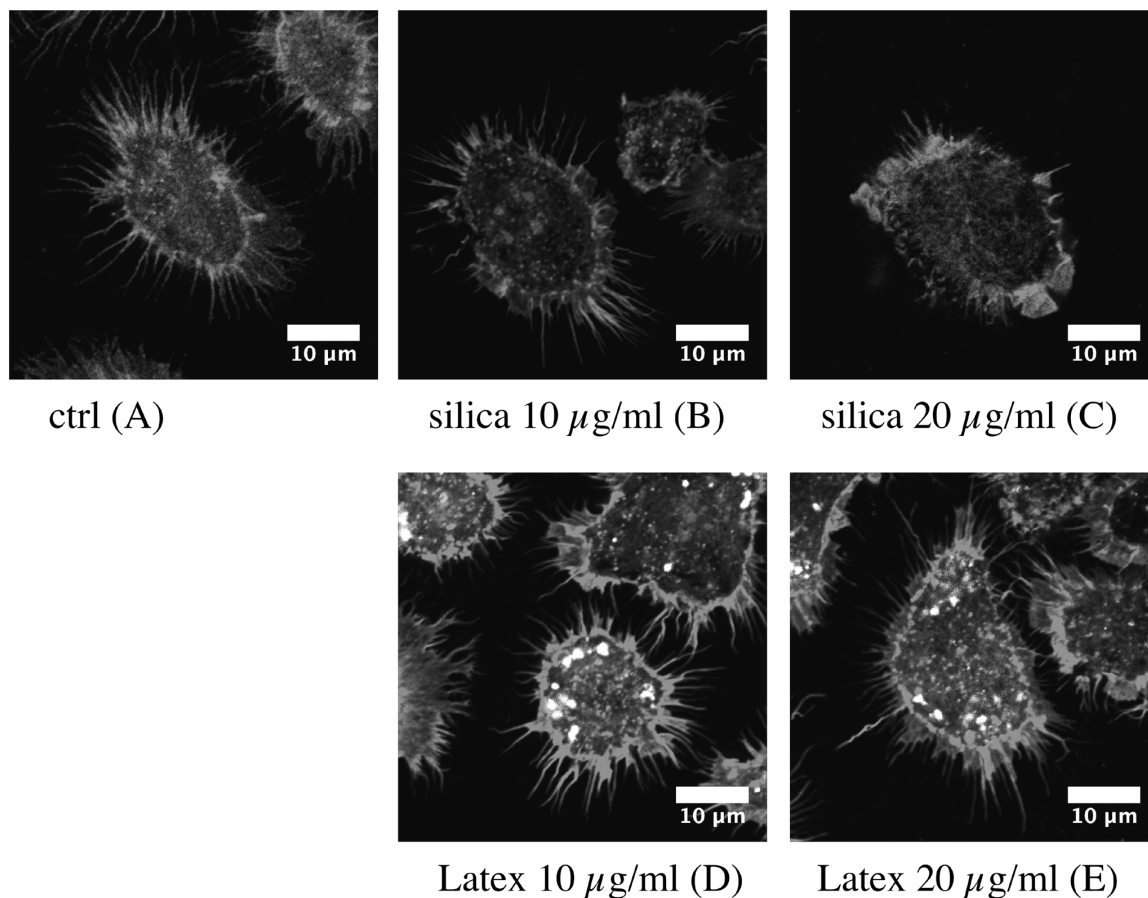


Fig. 3 Changes in the cell morphology and actin cytoskeleton. Three dimensional reconstructions of the F-actin cytoskeleton (visualized by phalloidin staining) are shown, allowing visualization of the surface ruffles of the cells. Top row: Control cells and cells treated for 24 hours with Ludox TMA silica. Bottom row: Cells treated with fluorescent latex beads. Note the loss of surface spikes induced by silica but not by latex, showing that the effect is not solely induced by the phagocytosis process *per se*.

Open Access Article. Published on 31 May 2017. Downloaded on 23/01/2018 16:06:23.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence.



Another enzyme that can be implicated, although indirectly, in the control of DNA damage is lactoylglutathione lyase,⁸³ as it prevents glycation of nucleotides by destroying methylglyoxal. As guanine glycation has been already observed with zinc oxide nanoparticles,⁵⁶ we first checked if the observed decrease in the amount and activity of lactoylglutathione lyase (spot h9) was correlated with an increased sensitivity to methylglyoxal. The results, displayed in Fig. 6A and B, show no significant difference in methylglyoxal sensitivity between control cells and silica-treated cells.

If the hypothesis regarding the role of DNPH1 is correct, a decrease in this protein may mean a decrease in detoxification of damaged DNA and thus an increased sensitivity to DNA-damaging agents detoxified *via* the nucleotide excision repair (NER) pathway. To test this hypothesis, we examined the effect of silica nanoparticles on the cellular sensitivity to styrene oxide, a bulky nucleophilic agent inducing cell death and DNA

damage in other models.^{84,85} The results, displayed in Fig. 6C and D, show that pre-treatment of macrophages with silica nanoparticles induces an increased sensitivity to styrene oxide. This cross-toxicity effect is not present on MPC11 cells, which show a silica-induced increase in the cellular amount of DNPH1 instead of the decrease observed in macrophages. To obtain further insights into the alterations of the NER system induced by silica nanoparticles, we investigated the changes in the expression of some of the proteins of the system by RT-qPCR. The results, displayed in Fig. 7, show a decrease in the expression of some of these genes: Cockayne Syndrome Protein A (CSA), Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), DNA repair protein XRCC1, and DNA excision repair protein (ERCC1) upon macrophage treatment with silica nanoparticles at the LD₂₀ dose. Only two genes (CSA and XRCC) show a modulated response in the MPC11 cell line and here again at the LD₂₀ dose.

Nanoscale

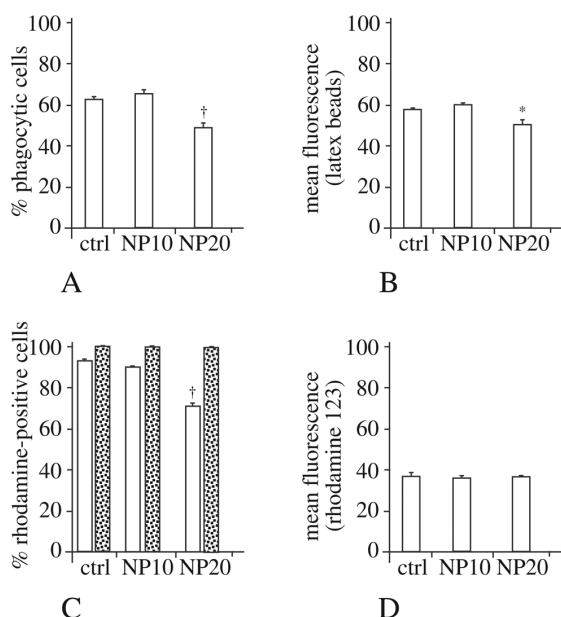


Fig. 4 Study of the phagocytic index and of the mitochondrial transmembrane potential. Panel A: Proportion of phagocytic cells (in the viable cell population only) for control cells or cells treated for 24 hours with 10 or 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Ludox TMA silica. Panel B: Mean fluorescence of phagocytic cells (in the viable cell population only) for control cells or cells treated for 24 hours with 10 or 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Ludox TMA silica. Panel C: Proportion of Rhodamine 123-positive cells in the total population (white bars) or in the viable cell population only (dotted bars) for control cells or cells treated for 24 hours with 10 or 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Ludox TMA silica. Panel D: Mean Rhodamine 123 fluorescence (in the viable cell population only) for control cells or cells treated for 24 hours with 10 or 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Ludox TMA silica. Symbols indicate the statistical significance (Student's *t*-test): **p* < 0.05; †*p* < 0.01.

4. Discussion

One of the major problems in the field of nanotoxicology is the variability of the results presented in the scientific literature. The variability of the nanomaterials, even if they bear the same chemical name, and their poor characterization have often been blamed as the main cause of this observed variability. However, in many cases both the cell types and the nanoparticles used change from one study to another, and it is difficult to evaluate the influence of each factor on the final variability. Even worse, some cell lines such as those used in the present study can be cultured in two different media, namely RPMI 1640 and DMEM. When comparing our results with those obtained by Panas *et al.*⁷ on the same cell line with precipitated amorphous silica of very similar size (26 vs. 25 nm), we found a much higher cytotoxicity than they did. However our cells are grown in RPMI 1640 while in their study the cells were grown in DMEM, and it has been recently demonstrated that such a medium change induces significant changes in the cellular proteome and in the observed

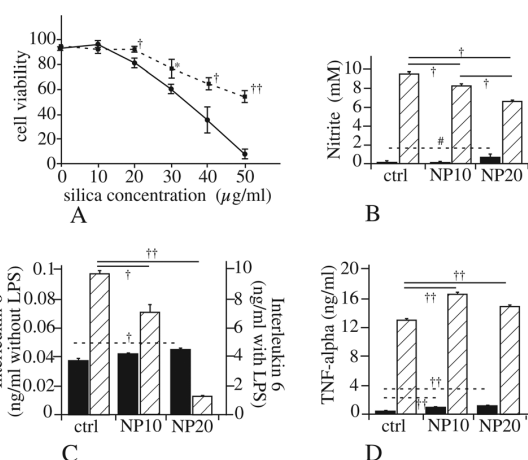


Fig. 5 Validation of the effects on signaling pathways. Panel A: Dose dependent survival curve for RAW264.7 cells treated for 24 hours with various concentrations of Ludox TMA silica, with (dotted lines) or without co-treatment with the PKA inhibitor H89 (10 μM). Panel B: NO production of RAW264.7 cells treated with Ludox TMA nanoparticles only (black bars) or treated with nanoparticles and 100 ng ml^{-1} lipopolysaccharide (hatched bars). #Significant difference at *p* < 0.05 with the Mann–Whitney *U* test but not the Student's *t*-test (*p* = 0.08). †*p* < 0.01 according to the Student's *t*-test. Panel C: IL6 production of RAW264.7 cells treated with Ludox TMA nanoparticles only (black bars) or treated with nanoparticles and 100 ng ml^{-1} lipopolysaccharide (hatched bars). Symbols indicate the statistical significance (Student's *t*-test): **p* < 0.05; †*p* < 0.01; ††*p* < 0.001. Note the different scales for IL6 production for cells treated with silica alone (left scale) or with silica and LPS (right scale). Panel D: TNF-alpha production of RAW264.7 cells treated with Ludox TMA nanoparticles only (black bars) or treated with nanoparticles and 100 ng ml^{-1} lipopolysaccharide (hatched bars). Symbols indicate the statistical significance (Student's *t*-test): **p* < 0.05; †*p* < 0.01; ††*p* < 0.001.

responses to nanoparticles.⁸⁶ This may be linked to the already-described dependence of silica toxicity on metabolic activity,⁸⁷ which may be different between the rich DMEM medium and the relatively poorer RPMI 1640 medium.

This being stated, the increased sensitivity of macrophages to amorphous silica, which has been established in several studies, both for nanoparticles *e.g.* ref. 5–7 and microparticles¹² is further confirmed in the present study.

In the case of amorphous silica, one factor that greatly affects cytotoxicity is the presence of a protein corona, which forms when silica is introduced into a protein-containing medium such as culture media with bovine serum.⁸⁸ It has been shown that the presence of the corona decreases the toxicity of silica (*e.g.* in ref. 89 and 90). This means that in the presence of proteins, the entity that is internalized is not a bare silica particle, but a core-shell silica-protein particle, which means in turn that in this case, adsorbed proteins are introduced into the cell. It may be then questioned whether such internalized proteins may affect cellular physiology. Although such a hypothesis cannot strictly be ruled out, it seems unlikely for two reasons. First the proteins adsorbed on nanoparticles are often denatured,^{91,92} which means that they



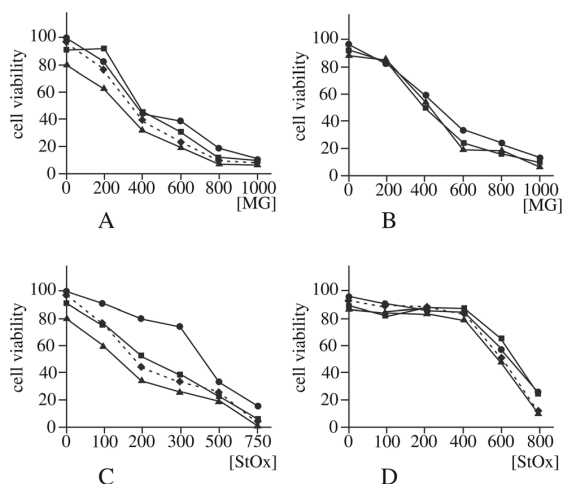


Fig. 6 Validation of cross toxic effects. In these experiments the cells were pre-treated with 0, 10 or 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Ludox TMA nanoparticles for 6 hours, then the toxic agent was added for a further 18 hours. Cell viability was assessed by dye exclusion after this total 24 hour treatment. Panel A: Survival curve for RAW264.7 cells co treated with silica and methylglyoxal (MG). Circles: Control cells (not treated with silica). Squares: Cells treated with 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ silica. Triangles: Cells treated with 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ silica. Diamonds and dotted line: Cells treated with 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ silica, with correction of the mortality induced by silica alone. No statistically significant effect can be detected for cells treated with 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ silica, and after correction of the mortality induced by silica alone, a moderate but statistically significant effect ($p < 0.05$) can be detected for cells treated with 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ silica only at 600 μM methylglyoxal. Panel B: Same as panel A, but for MPC11 cells. No statistically significant effect could be detected. Panel C: Survival curve for RAW264.7 cells co-treated with silica and styrene oxide (StOx). Circles: Control cells (not treated with silica). Squares: Cells treated with 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ silica. Triangles: Cells treated with 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ silica. Diamonds and dotted line: Cells treated with 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ silica, with correction of the mortality induced by silica alone. Except for the 0 μM styrene oxide point, all points are statistically different between the cells treated with 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ silica ($p < 0.01$ for 100, 200, 300 μM styrene oxide, $p < 0.05$ for 500 and 750 μM styrene oxide) and cells treated with styrene oxide alone, even after correction of the mortality induced by silica alone. For the cells treated with 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ silica, all points except the 0 μM styrene oxide point are statistically different from the control ($p < 0.01$). Panel D: Same as panel C, but for MPC11 cells. No statistically significant effect could be detected.

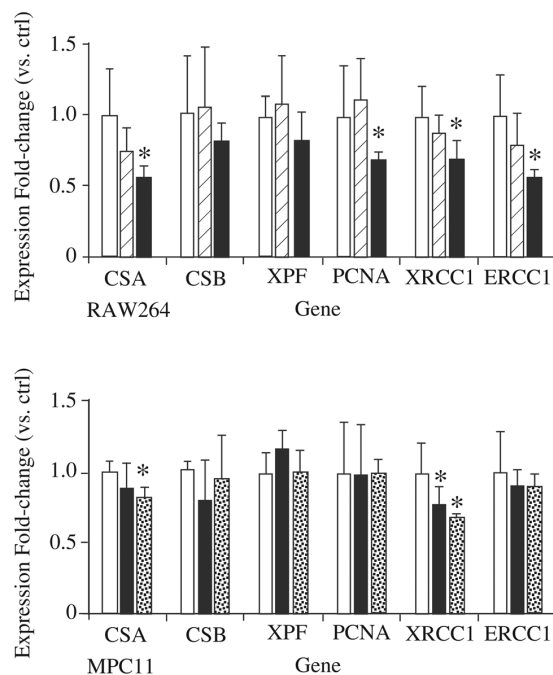


Fig. 7 Expression analysis by RT-qPCR of genes involved in the nucleotide excision repair (NER) pathway. The expression of six genes involved in the NER pathway was monitored by RT-qPCR for RAW264.7 and MPC11 cells treated with Ludox TMA silica nanoparticles. White bars: Control cells. Hatched bars: Cells treated for 24 hours with 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ silica. Black bars: Cells treated for 24 hours with 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ silica. Dotted bars: Cells treated for 24 hours with 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ silica. * $p < 0.05$ in the Student's t -test.

lose their functions. Second, silica nanoparticles are internalized in lysosomes¹⁴ which are in an acidic environment where massive protein degradation occurs. Consequently, a functional effect of the corona inside the cells seems rather unlikely.

As another example of the variability of the results published in the literature, proteomic studies on the cellular responses to silica nanoparticles have been published previously^{42,93} and have shown widely different results and even results different from those presented in the present study. However, the low number of common responses detected in the present study between two different cell lines at equal

effect dose or at identical doses clearly demonstrates that cellular responses are widely different from one cell type to another, and such cell type-specific effects are the main explanation for the different responses reported using proteomic studies.

There are however discrepancies that remain, even when working with the same cell line in the same culture medium and with similar nanoparticles. One example can be found in the synergy between silica and LPS for NO production. In our study we found a negative synergy (silica decreases the LPS-induced NO production) while Di Cristo *et al.* found a positive synergy.³⁰ Several factors can explain this discordance in the results: (i) the duration of the LPS treatment (24 hours in our case instead of 48 hours in the Di Cristo *et al.* study), (ii) the concentration of silica used (10 $\mu\text{g cm}^{-2}$ in the Di Cristo *et al.* study instead of 4 $\mu\text{g cm}^{-2}$ in our case) and (iii) the fact that in this precise case Di Cristo *et al.* used a suboptimal LPS concentration (10 ng ml^{-1}) instead of the 100 ng ml^{-1} concentration that we used and also gave full NO production in the Di Cristo *et al.* study. While the duration of the treatment may explain the differences in the absolute NO concentration found (20 mM in their case instead of 9.5 mM in our study), the

Open Access Article. Published on 31 May 2017. Downloaded on 23/01/2018 16:06:23. This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence.



opposite synergies found probably depend on the last two factors. Indeed, a positive synergy will be impossible to observe if the maximal stimulation is already reached. In addition, the silica dose used in the Di Cristo *et al.* study is fairly important and induces strong membrane permeability (50% at 24 hours). As this parameter is the one tested by the viability assay that we used (trypan blue exclusion), such a condition corresponds to the LD₅₀ in our system. Such an activation of the proinflammatory functions of macrophages at toxic concentrations has already been described for silica¹¹ and for other nanoparticles,⁹⁴ and may contribute to explain the differences between the two sets of results on the silica-LPS synergy.

In order to extend our observations on the TLR axis, we also measured the release of the two inflammatory cytokines IL6 and TNF. While IL6 showed the same response as NO production (weak induction by silica alone and strong reduction by silica of the LPS-induced response) TNF did not show the same response pattern. This discordance between the two cytokine responses has been observed previously in the case of copper oxide nanoparticles.⁴⁸

One of the more interesting outcomes of the proteomic analysis lies in the proteins involved, directly or indirectly, in the DNA repair pathway. Such proteins include PCNA, DNPH1 and lactoylglutathione lyase. Regarding lactoylglutathione lyase, we did not observe any cross toxicity between silica and methylglyoxal, opposite to what was observed with zinc nanoparticles.⁵⁶ The decrease of PCNA and DNPH1 suggested however a decrease in the efficiency of the NER pathway, which resulted in a higher sensitivity to bulky DNA alkylating agents. This sensitivity was however observed only on the sensitive cell type (macrophage) and not on the less sensitive MPC11 cell line. Such a cross sensitivity may be relevant for pulmonary toxicity, as it could induce a decrease in the number of viable lung macrophages if they are exposed both to silica nanoparticles and to DNA alkylating agents, such as those contained in tobacco smoke or combustion particles at a larger sense. A similar cross toxicity between insoluble nanoparticles and DNA alkylating agents has been previously observed with titanium dioxide.⁹⁵ Genotoxicity has been previously described for silica nanoparticles,^{25,27} but has been observed only at high, cytotoxic concentrations.

These cross toxic effects between nanoparticles and chemicals have been described with metallic ions such as cadmium³⁹ and lead,⁴⁰ but our work and the one of Armand *et al.* extend it to organic chemicals. The sequential treatment used (nanoparticles first, then chemicals) is not in favor of a direct trojan horse effect, *i.e.* an adsorption of the chemical on the nanoparticles leading to a better penetration in the cells and an intracellular release of the adsorbed chemical. It is more in favor of a synergistic effect, *i.e.* an alteration of the cellular physiology by the nanoparticle which renders the cell more sensitive to the chemical of interest.

Such studies of cross effects are important in a safe by design perspective. Primary determinants of cellular toxicity are of course of crucial importance, and have been recently

described for silica.²⁰ They are however not sufficient, as the real use of the products involves co-expositions that are difficult to predict and may vary greatly, *e.g.* according to lifestyle. In such a frame, wide-scope studies such as omics studies are able to provide valuable insights, provided that they are fully interpreted down to the protein level and not only to the pathway level, and provided that their predictions are tested.

Author contributions

BD and CAG performed the DLS, phagocytosis, NO and the mitochondrial potential experiments. In addition BD performed the F-actin staining. MC, FD and DB performed the RT-qPCR and the comet experiments. HD and SC performed and interpreted the mass spectrometry identification in the proteomics experiments, and helped in drafting the manuscript.

DF and GS performed and interpreted the TEM experiments on the nanomaterial.

VCF and TR performed the 2D gel electrophoresis and enzyme assay experiments. TR performed the cross-toxicity experiments. In addition TR conceived and designed the whole study and drafted the manuscript. MC and CAG helped in designing the whole study and in drafting the manuscript, and critically revised the manuscript. All authors critically read and approved the manuscript.

Abbreviations

AMP	Adenosine 5' monophosphate
CHAPS	3-[[3-Cholamidopropyl]dimethylammonio]-1-propanesulfonate
DIGE	Differential in-gel electrophoresis
DMEM	Dulbecco modified Eagle's medium
EDTA	Ethylene diamine <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
FBS	Fetal bovine serum
LD ₂₀	Lethal dose 20%
LPS	Lipopolysaccharide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form
PBS	Phosphate buffered saline
RPMI	Rockwell Park Memorial Institute
RT-qPCR	Reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TCEP	Tris(carboxyethyl) phosphine

Acknowledgements

This work was funded by the CNRS, The University of Grenoble, the University of Strasbourg Unistra, the Région



Alsace, the French National Research Program for Environmental and Occupational Health of ANSES (PNREST 2015/032, Silimmun Grant), the toxicology project of the CEA (Imaginatox grant), and the French National Research Agency (ANR-16-CE34-0011, Paipito grant).

This work is a contribution to the Labex Serenade (no. ANR-11-LABX-0064) funded by the "Investissements d'Avenir" French Government program of the French National Research Agency (ANR) through the A*MIDEX project (no. ANR-11-IDEX-0001-02).

This work used the platforms of the Grenoble Instruct centre (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UJF-EMBL) with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (ANR-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB), as well as the platforms of the French Proteomic Infrastructure (ProFI) project (grant ANR-10-INBS-08-03). The electron microscope facility is supported by the Rhône-Alpes Region, the Fondation Recherche Médicale (FRM), the fonds FEDER, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the CEA, the University of Grenoble, EMBL, and the GIS-Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie (IBISA). We also thank the Fondation pour la Recherche Médicale for financial support of a Synapt HDMS mass spectrometer.

Last but certainly not least, BD thanks the CNRS for a handicap PhD fellowship.

References

- 1 P. G. Reuzel, J. P. Bruijntjes, V. J. Feron and R. A. Woutersen, *Food Chem. Toxicol.*, 1991, **29**, 341–354.
- 2 C. J. Johnston, K. E. Driscoll, J. N. Finkelstein, R. Baggs, M. A. O'Reilly, J. Carter, R. Gelein and G. Oberdorster, *Toxicol. Sci.*, 2000, **56**, 405–413.
- 3 J. H. Arts, H. Muijsers, E. Duistermaat, K. Junker and C. F. Kuper, *Food Chem. Toxicol.*, 2007, **45**, 1856–1867.
- 4 C. M. Sayes, K. L. Reed and D. B. Warheit, *Toxicol. Sci.*, 2007, **97**, 163–180.
- 5 V. Rabolli, L. C. Thomassen, C. Princen, D. Napierska, L. Gonzalez, M. Kirsch-Volders, P. H. Hoet, F. Huaux, C. E. Kirschhock, J. A. Martens and D. Lison, *Nanotoxicology*, 2010, **4**, 307–318.
- 6 A. Malugin, H. Herd and H. Ghandehari, *J. Nanopart. Res.*, 2011, **13**, 5381–5396.
- 7 A. Panas, C. Marquardt, O. Nalcaci, H. Bockhorn, W. Baumann, H. R. Paur, S. Mulhopt, S. Diabate and C. Weiss, *Nanotoxicology*, 2013, **7**, 259–273.
- 8 D. Breznan, D. D. Das, J. S. O'Brien, C. MacKinnon-Roy, S. Nimesh, N. Q. Vuong, S. Bernatchez, N. DeSilva, M. Hill, P. Kumarathan and R. Vincent, *Nanotoxicology*, 2017, **1**–45.
- 9 D. Napierska, L. C. Thomassen, V. Rabolli, D. Lison, L. Gonzalez, M. Kirsch-Volders, J. A. Martens and P. H. Hoet, *Small*, 2009, **5**, 846–853.
- 10 V. Rabolli, L. C. J. Thomassen, F. Uwambayinema, J. A. Martens and D. Lison, *Toxicol. Lett.*, 2011, **206**, 197–203.
- 11 M. Park, I. Lynch, S. Ramirez-Garcia, K. A. Dawson, L. de la Fonteyne, E. Gremmer, W. Slob, J. J. Briede, A. Elsaesser, C. V. Howard, H. van Loveren and W. H. de Jong, *J. Nanopart. Res.*, 2011, **13**, 6775–6787.
- 12 L. M. Costantini, R. M. Gilberti and D. A. Knecht, *PLoS One*, 2011, **6**, e14647.
- 13 Y. Rong, T. Zhou, W. J. Cheng, J. L. Guo, X. Q. Cui, Y. W. Liu and W. H. Chen, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 2013, **36**, 921–928.
- 14 T. Kusaka, M. Nakayama, K. Nakamura, M. Ishimiya, E. Furusawa and K. Ogasawara, *PLoS One*, 2014, **9**, e92634.
- 15 E. Uemura, Y. Yoshioka, T. Hirai, T. Handa, K. Nagano, K. Higashisaka and Y. Tsutsumi, *J. Nanopart. Res.*, 2016, **18**, 165.
- 16 K. M. Waters, L. M. Masiello, R. C. Zangar, R. C. Zangar, N. J. Karin, R. D. Quesenberry, S. Bandyopadhyay, J. G. Teeguarden, J. G. Pounds and B. D. Thrall, *Toxicol. Sci.*, 2009, **107**, 553–569.
- 17 E. J. Park and K. Park, *Toxicol. Lett.*, 2009, **184**, 18–25.
- 18 D. Napierska, V. Rabolli, L. C. Thomassen, D. Dinsdale, C. Princen, L. Gonzalez, K. L. Poels, M. Kirsch-Volders, D. Lison, J. A. Martens and P. H. Hoet, *Chem. Res. Toxicol.*, 2012, **25**, 828–837.
- 19 D. Sahu, R. Vijayaraghavan and G. M. Kannan, *J. Exp. Nanosci.*, 2014, **10**, 983–1000.
- 20 S. E. Lehman, A. S. Morris, P. S. Mueller, A. K. Salem, V. H. Grassian and S. C. Larsen, *Environ. Sci.: Nano*, 2016, **3**, 56–66.
- 21 M. J. Akhtar, M. Ahamed, S. Kumar, H. Siddiqui, G. Patil, M. Ashquin and I. Ahmad, *Toxicology*, 2010, **276**, 95–102.
- 22 J. C. Duan, V. K. Kodali, M. J. Gaffrey, J. Guo, R. K. Chu, D. G. Camp, R. D. Smith, B. D. Thrall and W. J. Qian, *ACS Nano*, 2016, **10**, 524–538.
- 23 J. Duan, Y. Yu, Y. Li, Y. Yu, Y. Li, X. Zhou, P. Huang and Z. Sun, *PLoS One*, 2013, **8**, e62087.
- 24 P. Guidi, M. Nigro, M. Bernardeschi, V. Scarcelli, P. Lucchesi, B. Onida, R. Mortera and G. Frenzilli, *Mutagenesis*, 2013, **28**, 171–180.
- 25 M. Hashimoto and S. Imazato, *Dent. Mater.*, 2015, **31**, 556–564.
- 26 A. Tarantini, R. Lancelleur, A. Mourrot, M. T. Lavault, G. Casterou, G. Jarry, K. Hogeveen and V. Fessard, *Toxicol. in Vitro*, 2015, **29**, 398–407.
- 27 H. Yang, Q. Y. Wu, C. S. Lao, M. Y. Li, Y. Gao, Y. Zheng and B. Shi, *Genet. Mol. Res.*, 2016, **15**, DOI: 10.4238/gmr.15039005.
- 28 D. Napierska, L. C. J. Thomassen, B. Vanaudenaerde, K. Luyts, D. Lison, J. A. Martens, B. Nemery and P. H. M. Hoet, *Toxicol. Lett.*, 2012, **211**, 98–104.
- 29 L. R. Farcas, C. Uboldi, D. Mehn, G. Giudetti, P. Nativo, J. Ponti, D. Gilliland, F. Rossi and A. Bal-Price, *Nanotoxicology*, 2013, **7**, 1095–1110.
- 30 L. Di Cristo, D. Movia, M. G. Bianchi, M. Allegri, B. M. Mohamed, A. P. Bell, C. Moore, S. Pinelli,



- K. Rasmussen, J. Riego-Sintes, A. Prina-Mello, O. Bussolati and E. Bergamaschi, *Toxicol. Sci.*, 2016, **150**, 40–53.
- 31 M. Winter, H. D. Beer, V. Hornung, U. Kramer, R. P. F. Schins and I. Forster, *Nanotoxicology*, 2011, **5**, 326–340.
- 32 V. Rabolli, A. A. Badissi, R. Devosse, F. Uwambayinema, Y. Yakoub, M. Palmi-Pallag, A. Lebrun, V. De Gussem, I. Couillin, B. Ryffel, E. Marbaix, D. Lison and F. Huaux, *Part. Fibre Toxicol.*, 2014, **11**, 69.
- 33 L. Baron, A. Gombault, M. Fanny, B. Villeret, F. Savigny, N. Guillou, C. Panek, M. Le Bert, V. Lagente, F. Rassendren, N. Riteau and I. Couillin, *Cell Death Dis.*, 2015, **6**, e1629.
- 34 V. Rabolli, D. Lison and F. Huaux, *Part. Fibre Toxicol.*, 2016, **13**, 40.
- 35 C. Xi, J. Zhou, S. Z. Du and S. J. Peng, *Inflammation Res.*, 2016, **65**, 325–341.
- 36 C. Marquardt, S. Fritsch-Decker, M. Al-Rawi, S. Diabate and C. Weiss, *Toxicology*, 2017, **379**, 40–47.
- 37 V. Kodali, M. H. Littke, S. C. Tilton, J. G. Teeguarden, L. Shi, C. W. Frevert, W. Wang, J. G. Pounds and B. D. Thrall, *ACS Nano*, 2013, **7**, 6997–7010.
- 38 C. Pisani, J. C. Gaillard, V. Nouvel, M. Odorico, J. Armengaud and O. Prat, *BMC Genomics*, 2015, **16**, 315.
- 39 M. C. Guo, X. L. Xu, X. C. Yan, S. S. Wang, S. Gao and S. S. Zhu, *J. Hazard. Mater.*, 2013, **260**, 780–788.
- 40 C. F. Lu, X. Y. Yuan, L. Z. Li, W. Zhou, J. Zhao, Y. M. Wang and S. Q. Peng, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2015, **122**, 537–544.
- 41 J. Wu, Y. Shi, C. O. Asweto, L. Feng, X. Yang, Y. Zhang, H. Hu, J. Duan and Z. Sun, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2016, **23**, 23134–23144.
- 42 X. Yang, J. Liu, H. He, L. Zhou, C. Gong, X. Wang, L. Yang, J. Yuan, H. Huang, L. He, B. Zhang and Z. Zhuang, *Part. Fibre Toxicol.*, 2010, **7**, 1.
- 43 O. Okoturo-Evans, A. Dybowska, E. Valsami-Jones, J. Cupitt, M. Gierula, A. R. Boobis and R. J. Edwards, *PLoS One*, 2013, **8**, e72363.
- 44 S. Fritsch-Decker, T. Both, S. Mulhopt, H. R. Paur, C. Weiss and S. Diabate, *Part. Fibre Toxicol.*, 2011, **8**, 23.
- 45 V. Mommaerts, K. Jodko, L. C. Thomassen, J. A. Martens, M. Kirsch-Volders and G. Smagghe, *Nanotoxicology*, 2012, **6**, 554–561.
- 46 S. Triboulet, C. Aude-Garcia, M. Carriere, H. Diemer, F. Proamer, A. Habert, M. Chevallet, V. Collin-Faure, J. M. Strub, D. Hanau, A. Van Dorsselaer, N. Herlin-Boime and T. Rabilloud, *Mol. Cell. Proteomics*, 2013, **12**, 3108–3122.
- 47 S. Triboulet, C. Aude-Garcia, L. Armand, A. Gerdil, H. Diemer, F. Proamer, V. Collin-Faure, A. Habert, J. M. Strub, D. Hanau, N. Herlin, M. Carriere, A. Van Dorsselaer and T. Rabilloud, *Nanoscale*, 2014, **6**, 6102–6114.
- 48 S. Triboulet, C. Aude-Garcia, L. Armand, V. Collin-Faure, M. Chevallet, H. Diemer, A. Gerdil, F. Proamer, J. M. Strub, A. Habert, N. Herlin, A. Van Dorsselaer, M. Carriere and T. Rabilloud, *PLoS One*, 2015, **10**, e0124496.
- 49 W. E. Hathaway, L. A. Newby and J. H. Githens, *Blood*, 1964, **23**, 517–525.
- 50 A. Moore, C. J. Donahue, K. D. Bauer and J. P. Mather, *Methods Cell Biol.*, 1998, **57**, 265–278.
- 51 S. W. Perry, J. P. Norman, J. Barbieri, E. B. Brown and H. A. Gelbard, *BioTechniques*, 2011, **50**, 98–115.
- 52 K. M. Mayer and F. H. Arnold, *J. Biomol. Screening*, 2002, **7**, 135–140.
- 53 D. E. Baranano, M. Rao, C. D. Ferris and S. H. Snyder, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, **99**, 16093–16098.
- 54 B. Mannervik, B. Gorna-Hall and T. Bartfai, *Eur. J. Biochem.*, 1973, **37**, 270–281.
- 55 M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248–254.
- 56 C. Aude-Garcia, B. Dalzon, J. L. Ravanat, V. Collin-Faure, H. Diemer, J. M. Strub, S. Cianferani, A. Van Dorsselaer, M. Carriere and T. Rabilloud, *J. Proteomics*, 2016, **134**, 174–185.
- 57 M. W. Pfaffl and W. Windisch, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2003, **17**, 97–106.
- 58 M. W. Pfaffl, *Nucleic Acids Res.*, 2001, **29**, e45.
- 59 E. Gianazza, F. Celentano, S. Magenes, C. Etori and P. G. Righetti, *Electrophoresis*, 1989, **10**, 806–808.
- 60 T. Rabilloud, C. Valette and J. J. Lawrence, *Electrophoresis*, 1994, **15**, 1552–1558.
- 61 S. Luche, H. Diemer, C. Tastet, M. Chevallet, A. Van Dorsselaer, E. Leize-Wagner and T. Rabilloud, *Proteomics*, 2004, **4**, 551–561.
- 62 A. Gorg, W. Postel, J. Weser, S. Gunther, J. R. Strahler, S. M. Hanash and L. Somerlot, *Electrophoresis*, 1987, **8**, 122–124.
- 63 C. Tastet, P. Lescuyer, H. Diemer, S. Luche, A. van Dorsselaer and T. Rabilloud, *Electrophoresis*, 2003, **24**, 1787–1794.
- 64 P. Sinha, J. Poland, M. Schnolzer and T. Rabilloud, *Proteomics*, 2001, **1**, 835–840.
- 65 A. G. Herrmann, J. L. Searcy, T. Le Bihan, J. McCulloch and R. F. Deighton, *Proteomics*, 2013, **13**, 3251–3255.
- 66 J. D. Storey and R. Tibshirani, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2003, **100**, 9440–9445.
- 67 A. P. Diz, A. Carvajal-Rodriguez and D. O. Skibinski, *Mol. Cell. Proteomics*, 2011, **10**, M110004374.
- 68 F. Gharahdaghi, C. R. Weinberg, D. A. Meagher, B. S. Imai and S. M. Mische, *Electrophoresis*, 1999, **20**, 601–605.
- 69 S. Richert, S. Luche, M. Chevallet, A. Van Dorsselaer, E. Leize-Wagner and T. Rabilloud, *Proteomics*, 2004, **4**, 909–916.
- 70 W. Winkler, M. Zellner, M. Diestinger, R. Babeluk, M. Marchetti, A. Goll, S. Zehetmayer, P. Bauer, E. Rappold, I. Miller, E. Roth, G. Allmaier and R. Oehler, *Mol. Cell. Proteomics*, 2008, **7**, 193–203.
- 71 M. A. Merkle, E. Hildebrandt, R. H. Podolsky, H. Arnouk, D. G. Ferris, W. S. Dynan and H. Stoppler, *Proteome Sci.*, 2009, **7**, 29.
- 72 E. Maes, B. Landuyt, I. Mertens and L. Schoofs, *PLoS One*, 2013, **8**, e61933.

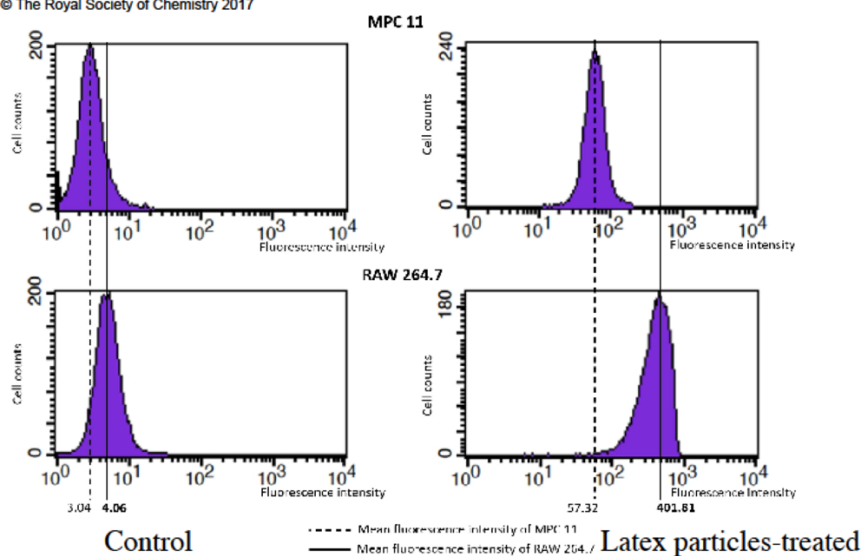


- 73 N. Jehmlich, K. H. Dinh, M. Gesell-Salazar, E. Hammer, L. Steil, V. M. Dhople, C. Schurmann, B. Holtfreter, T. Kocher and U. Volker, *J. Periodontal Res.*, 2013, **48**, 392–403.
- 74 T. Geiger, A. Wehner, C. Schaab, J. Cox and M. Mann, *Mol. Cell. Proteomics*, 2012, **11**, M111014050.
- 75 Y. Xiong and K. L. Guan, *J. Cell Biol.*, 2012, **198**, 155–164.
- 76 M. Salim, B. A. Brown-Kippbut and M. D. Maines, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 10929–10934.
- 77 B. B. Kahn, T. Alquier, D. Carling and D. G. Hardie, *Cell Metab.*, 2005, **1**, 15–25.
- 78 J. Boudeau, A. F. Baas, M. Deak, N. A. Morrice, A. Kieloch, M. Schutkowski, A. R. Prescott, H. C. Clevers and D. R. Alessi, *EMBO J.*, 2003, **22**, 5102–5114.
- 79 M. U. Martin and H. Wesche, *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, **1592**, 265–280.
- 80 Y. K. Ghiorghi, K. I. Zeller, C. V. Dang and P. A. Kaminski, *J. Biol. Chem.*, 2007, **282**, 8150–8156.
- 81 K. Doddapaneni, B. Mahler, R. Pavlovicz, A. Haushalter, C. Yuan and Z. Wu, *J. Mol. Biol.*, 2009, **394**, 423–434.
- 82 C. Dupouy, C. Zhang, A. Padilla, S. Pochet and P. A. Kaminski, *J. Biol. Chem.*, 2010, **285**, 41806–41814.
- 83 P. J. Thornalley, *Biochem. Soc. Trans.*, 2003, **31**, 1372–1377.
- 84 T. Bastlova, P. Vodicka, K. Peterkova, K. Hemminki and B. Lambert, *Carcinogenesis*, 1995, **16**, 2357–2362.
- 85 M. Boccellino, F. Cuccovillo, M. Napolitano, N. Sannolo, C. Balestrieri, A. Acampora, A. Giovane and L. Quagliuolo, *Carcinogenesis*, 2003, **24**, 535–540.
- 86 B. Dalzon, H. Diemer, V. Collin-Faure, S. Cianferani, T. Rabilloud and C. Aude-Garcia, *Proteomics*, 2016, **16**, 2864–2877.
- 87 J. S. Chang, K. L. Chang, D. F. Hwang and Z. L. Kong, *Environ. Sci. Technol.*, 2007, **41**, 2064–2068.
- 88 N. P. Mortensen, G. B. Hurst, W. Wang, C. M. Foster, P. D. Nallathamby and S. T. Retterer, *Nanoscale*, 2013, **5**, 6372–6380.
- 89 A. Lesniak, F. Fenaroli, M. P. Monopoli, C. Aberg, K. A. Dawson and A. Salvati, *ACS Nano*, 2012, **6**, 5845–5857.
- 90 D. Docter, C. Bantz, D. Westmeier, H. J. Galla, Q. Wang, J. C. Kirkpatrick, P. Nielsen, M. Maskos and R. H. Stauber, *Beilstein J. Nanotechnol.*, 2014, **5**, 1380–1392.
- 91 H. Pan, M. Qin, W. Meng, Y. Cao and W. Wang, *Langmuir*, 2012, **28**, 12779–12787.
- 92 S. Devineau, J. M. Zanotti, C. Loupiac, L. Zargarian, F. Neiers, S. Pin and J. P. Renault, *Langmuir*, 2013, **29**, 13465–13472.
- 93 O. Okoturo-Evans, A. Dybowska, E. Valsami-Jones, J. Cupitt, M. Gierula, A. R. Boobis and R. J. Edwards, *PLoS One*, 2013, **8**, e72363.
- 94 J. Palomaki, P. Karisola, L. Pylkkanen, K. Savolainen and H. Alenius, *Toxicology*, 2010, **267**, 125–131.
- 95 L. Armand, A. Tarantini, D. Beal, M. Biola-Clier, L. Bobyk, S. Sorieul, K. Pernet-Gallay, C. Marie-Desvergne, I. Lynch, N. Herlin-Boime and M. Carriere, *Nanotoxicology*, 2016, **10**, 913–923.



Supporting Informations

Electronic Supplementary Material (ESI) for Nanoscale.
This journal is © The Royal Society of Chemistry 2017



Supplementary Figure 1: Particle internalization assay
RAW264.7 and MPC11 cells were treated for 24 hours with 50 µg/ml fluorescent latex particles. After cell harvesting and washing, the cells were analyzed by flow cytometry. The data show the mean intensity of cell fluorescence for a representative experiment.
Left column: control cells (untreated with particles)
Right column: particles-treated cells

Electronic Supplementary Material (ESI) for Nanoscale.
This journal is © The Royal Society of Chemistry 2017

Supplementary Table 1

Determination of the internalization capacity of the RAW264.7 and MPC11 cell lines with latex beads of 30 and 100 nm diameter. The values given in the table are the mean fluorescence intensity (MFI) values observed for the cells after particle internalization for 24 hours.

30 nm fluor. latex beads (µg/mL)	RAW 264.7	MPC 11	MFI ratio (RAW264/MPC11)
0	4.93 ± 0.665	3.17 ± 0.05	1.56
10	64.76 ± 0.59	11.18 ± 0.28	5.8
20	173.27 ± 1.44	28.42 ± 0.97	6.10
50	401.81 ± 11.25	57.32 ± 0.43	7.01

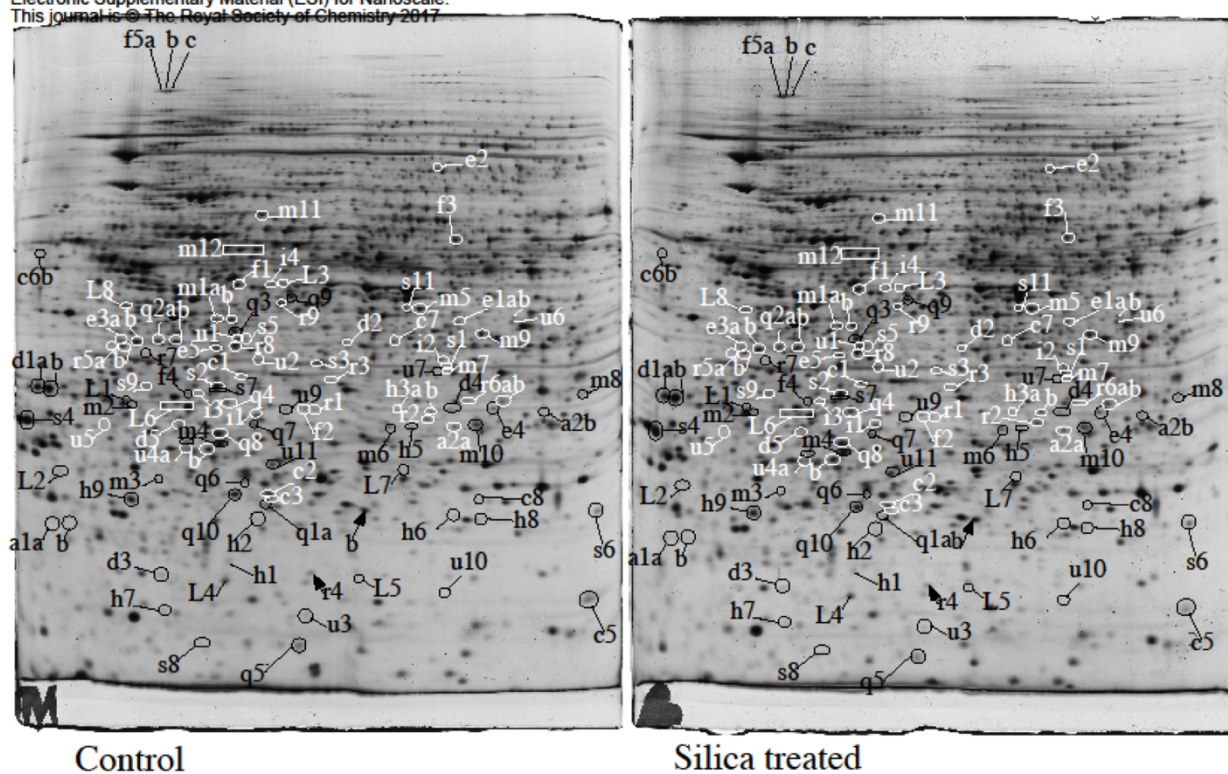
100 nm fluor. latex beads (µg/mL)	RAW 264.7	MPC 11	MFI ratio (RAW264/MPC11)
0	4.93 ± 0.665	3.17 ± 0.05	1.56
10	102 ± 1.54	6.75 ± 0.1	15.11
20	208.73 ± 15.22	11 ± 0.15	18.97
50	503.24 ± 4.26	20.25 ± 0.23	24.85

Electronic Supplementary Material (ESI) for Nanoscale.
This journal is © The Royal Society of Chemistry 2017

Supplementary Table 2. Primer sequences used for the RT-qPCR experiments

	Forward	Reverse
CSA	AGGAAACAGTTTACAGTCAT	ACATCCCATAATTTACTCT
CSB	GGTTTCTCTGTATAGTCCAG	TAACCATGTTTACAGATTCA
XPF	CTCAGAGAACACATAAGGAT	TGAACACATAAACAGCTAAC
PCNA	AGAAAACAAACCTTTGAAG	CAGTATTTGTAAAGCAGAAA
XRCC1	CTCTCTTCTCAGTCGTATC	ACTCAAGTCCAGTTTTCTC
ERCC1	CAGGAGGAAGTTTGTATC	CTATTAGACTTTGCTCCTGT

Electronic Supplementary Material (ESI) for Nanoscale.
This journal is © The Royal Society of Chemistry 2017



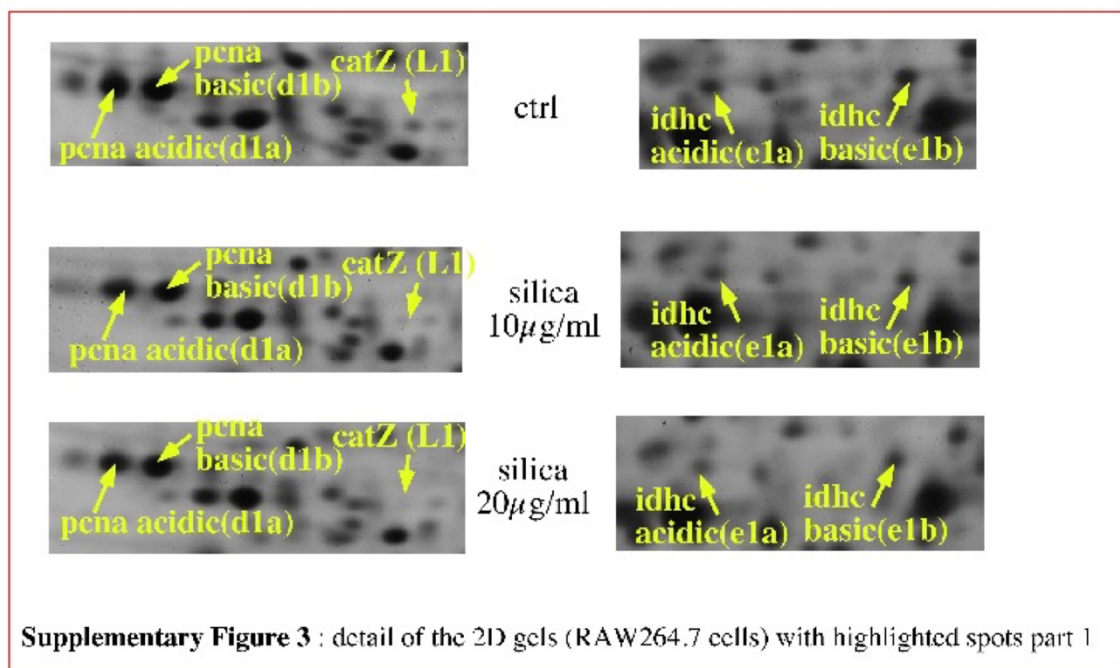
Supplementary Figure 2: Proteomic analysis of total cell extracts by 2D electrophoresis

Total cell extracts of MPC11 cells were separated by two-dimensional gel electrophoresis. Experimental parameters identical to Figure 2

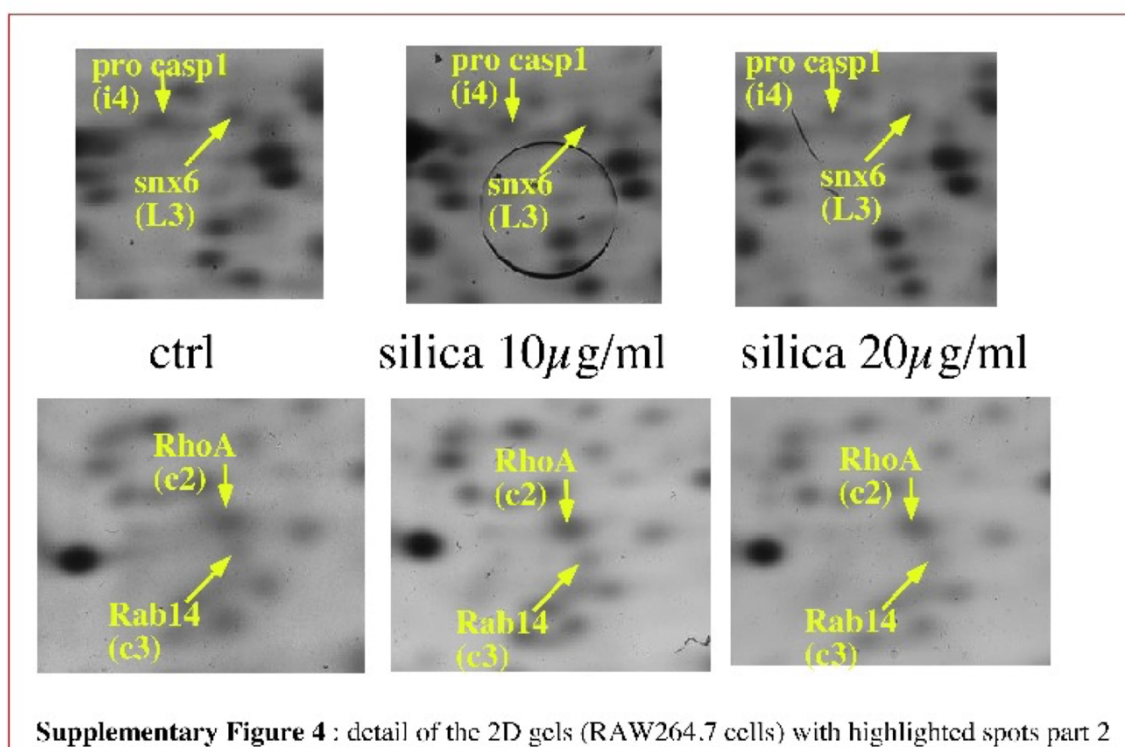
A: gel obtained from control cells.

B: gel obtained from cells treated for 24 hours with 100µg/ml Ludox TMA

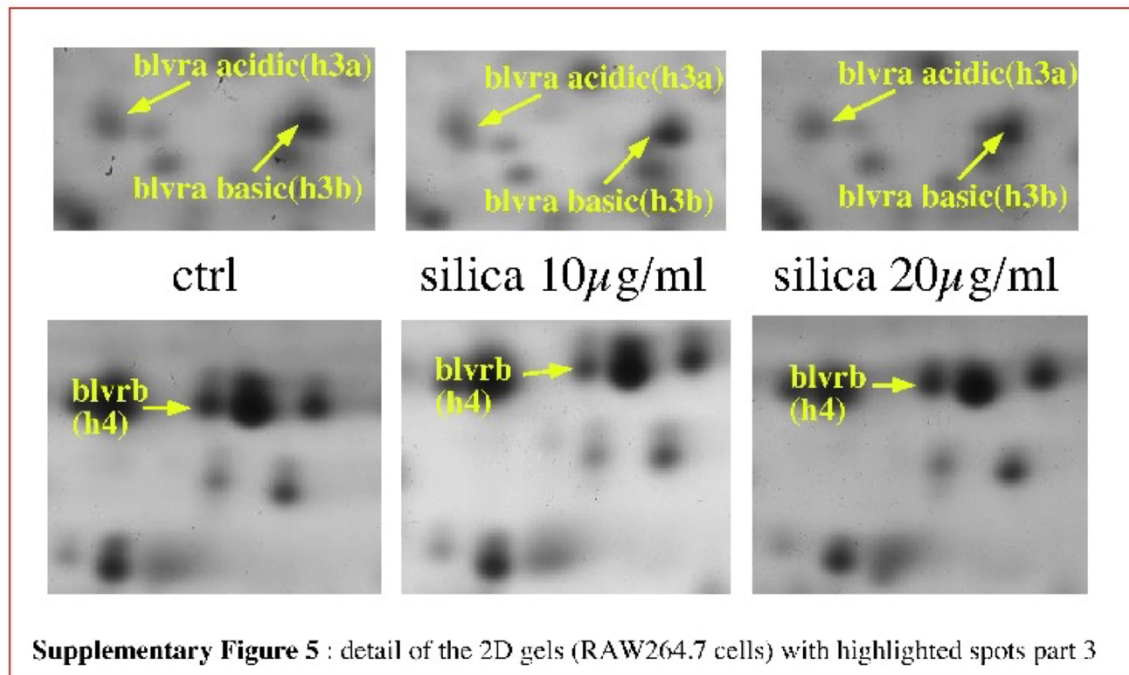
Electronic Supplementary Material (ESI) for Nanoscale.
This journal is © The Royal Society of Chemistry 2017



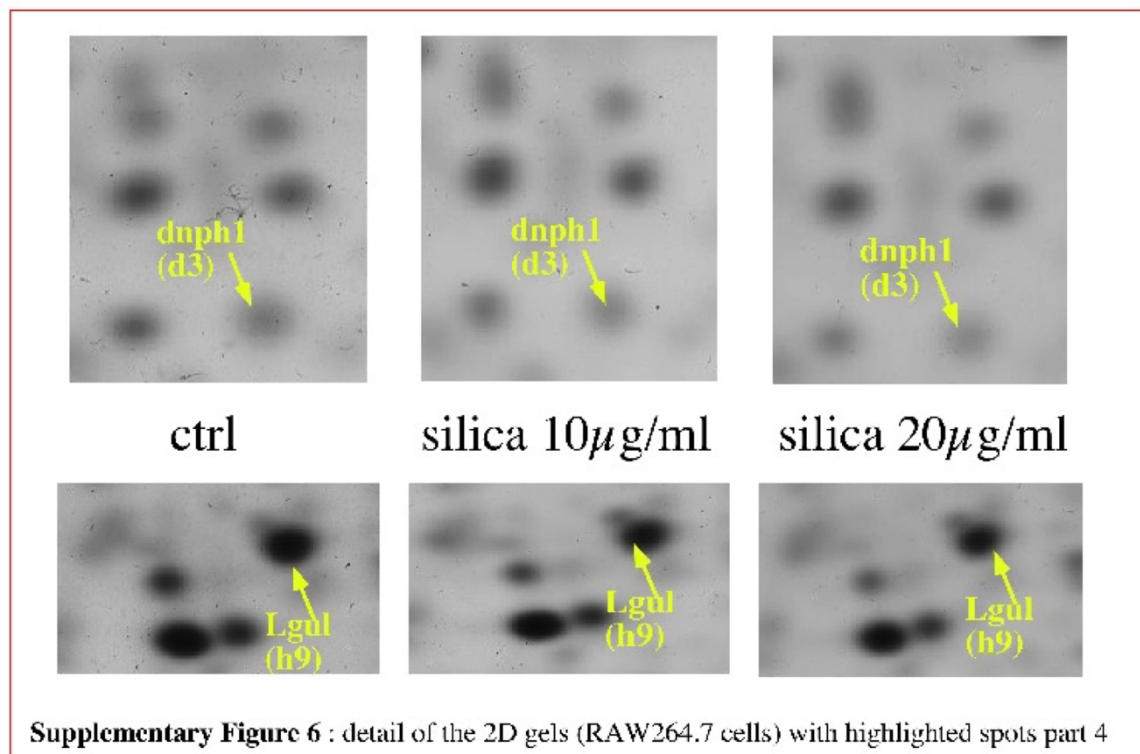
Electronic Supplementary Material (ESI) for Nanoscale.
This journal is © The Royal Society of Chemistry 2017



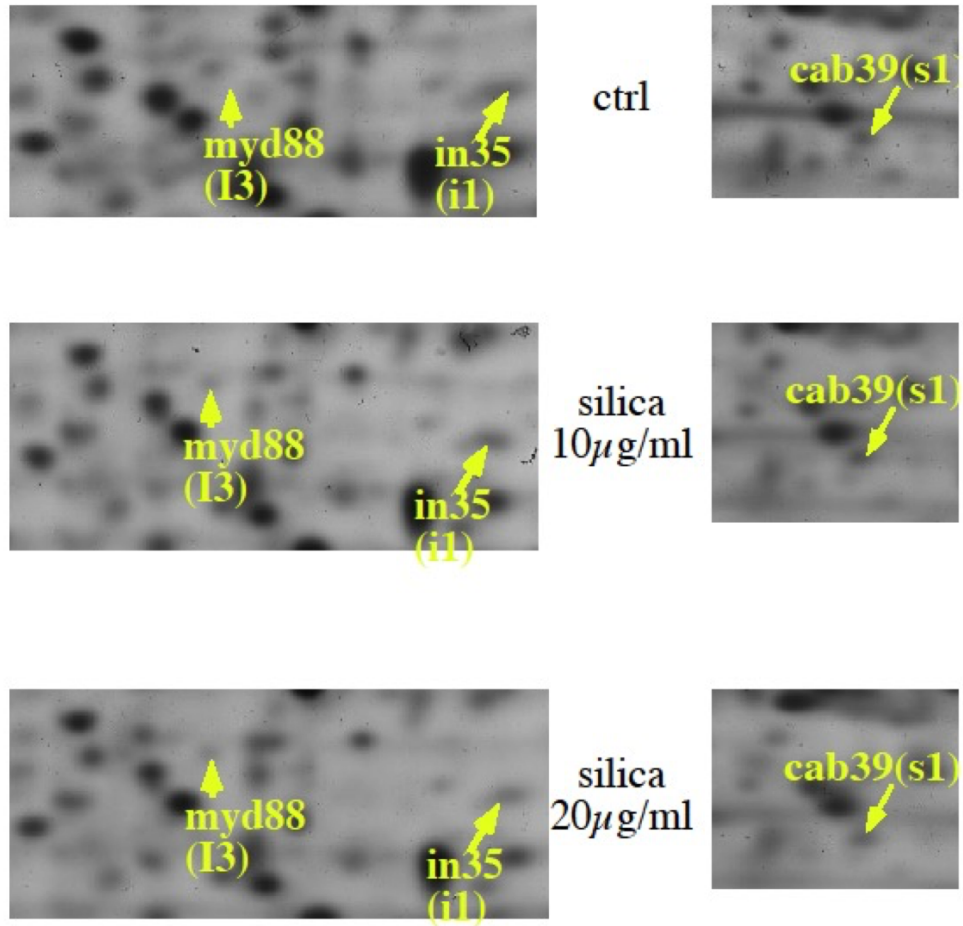
Electronic Supplementary Material (ESI) for Nanoscale.
This journal is © The Royal Society of Chemistry 2017



Electronic Supplementary Material (ESI) for Nanoscale.
This journal is © The Royal Society of Chemistry 2017

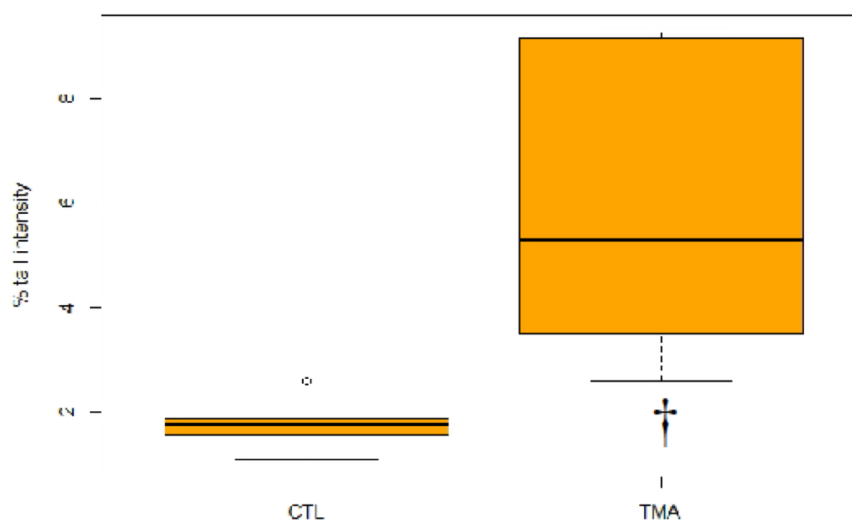


Electronic Supplementary Material (ESI) for Nanoscale.
This journal is © The Royal Society of Chemistry 2017



Supplementary Figure 7 : detail of the 2D gels (RAW264.7 cells) with highlighted spots part 5

Electronic Supplementary Material (ESI) for Nanoscale.
This journal is © The Royal Society of Chemistry 2017



Supplementary Figure 8: Genotoxicity of SiO₂-NPs.

DNA strand breaks and/or alkali-labile sites were quantified using the alkaline version of the comet assay. Cells were grown in 12-well plates, exposed to particles (20 μ g/ml for 24 hours), then harvested and stored at -80°C in 85.5 g/L sucrose, 11.76 g/L sodium citrate, 50 mL/L DMSO, pH 7.6. Cells were then embedded in 0.5% low melting point agar. Cells were lysed by immersion in 2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10 % DMSO, pH 10 overnight at 4°C, then the slides were rinsed in 0.4 M Tris-HCl pH 7.4. Slides were then immersed in cold migration buffer (NaOH 300 mM, EDTA 1mM) for 30 min to allow DNA to unwind. Electrophoresis was performed at 25 V, 300 mA, for 30 min. After neutralization by washing 3 times in 0.4 M Tris-HCl, pH 7.4, the cells were stained with Gel Red (VWR). % tail intensity was scored on 50 nuclei, using the Comet IV software (Perceptive instruments), prior to immersion in lysis buffer. Experiments were repeated 3 times independently. Results were normalized for % tail DNA in control (unexposed) cells, and expressed as mean percentage \pm standard error calculated over the three independent experiments. statistical significance was assessed with both non-parametric one-way analysis of variance on ranks approach (Kruskal-Wallis) and paired comparison Mann-Whitney U-test, using Statistica 8.0 (Statsoft, Chicago, USA).
Statistical significance: †P<0.01

spot id.	protein short name	protein full name	prot acc. N° M/w (uniprot)	unique peptides	sequence coverage	peptides identified (truncated)
protein quality control & degradation (q)						
q1a	pub3 ac	Proteasome beta 3 subunit	Q9RLP1 22966	8	51%	DAVSGMGVTVHVEIK - FGQAQAVTDFQR - FGPY
q1b	pub3 bas	Proteasome beta 3 subunit	Q9RLP1 22966	8	50%	DAVSGMGVTVHVEIK - FGQAQAVTDFQR - FG
q2a	saal ac	SUMO-activating enzyme subunit 1	Q9RLT2 38620	2	7%	AQNLNPMVDVK - VSQGVDDGPEAK
q2b	saal bas	SUMO-activating enzyme subunit 1	Q9RLT2 38620	16	60%	AQNLNPMVDVK - DFFNNHFFDGMK - EALEVDW
q3	pad13	Proteasome regulatory subunit 13	Q9WVJ2 42810	18	57%	CAWGQQDLAANEAIQLK - DLPVSEQQEK - DVPAL
q4	brec3	LysE3-deubiquitinase brec36	P46737 36131	3	13%	FYYTGEMK - VCLESAVELPK - VEISPEQLSAATEL
q5	uba2a	Ubiquitin conjugating enzyme 2N	P61088 17139	9	72%	ICLDILK - ICLDILKDK - LEFLPPEYPMAPK - ILLA
q6	pad10	Proteasome regulatory subunit 10	Q9ZXX2 25084	10	52%	ASTNQQTEGNTPLHLACDEER - DHYDAIAMHR - F
q7	psmd8	Proteasome regulatory subunit 8	Q9CYX6 39932	5	20%	GWVLGPNTYTSASQQKPEFSTPSTELAK - HPVS
q8	psma2	Proteasome activator complex subunit 2	P97372 27058	16	72%	AFYAEYHHSNLEK - ALVHERDEAAYGALK - AMV
q9	psr7	Proteasome regulatory subunit 7	P46471 48636	21	51%	ACLFFDEIDAGGAR - ALDEGDALLK - EVVETPLI
q10	pub4	Proteasome beta 4 subunit	P99026 29117	8	49%	ALHSWLTR - FDGGVVAADMVLSYGSLAR - FQIATV
protein production & folding (f)						
f1	izib	Translation initiation factor 2 subunit 2	Q9RL45 38093	27	75%	CSVASIK - DASDDLDLNFNOK - DDGIFSSQIAW
f2	dajc9	Daaj homolog subfamily C member 9	Q91WNI 30042	3	9%	GSEELNDIK - ELGLEGVNLIK
f3	tcpx	T-complex protein 1 subunit zeta	P80317 57958	4	15%	ELGLEGVNLIK - GSEELNDIK - ISLEDIQAFEK - (
f4	ppia	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E	Q9QZH3 33450	10	23%	ALQLEQVK - AQAALAVNISAAR - AOLGVQAFADA
f5a*	hyon1 ac	Hypoxia up-regulated protein 1	Q9IKK6 111183	6	24%	EEGPEPPK - EEGPEPPKAAQEGEPTAK - HVVFG
f5b	hyon1 med	Hypoxia up-regulated protein 1	Q9IKK6 111183.1	28	36%	AANSLEAFIFETQDK - AEPPFNASAGDQEEK - AHFN
f5c	hyon1 bas	Hypoxia up-regulated protein 1	Q9IKK6 111183.1	30	42%	AANSLEAFIFETQDK - AEPPFNASAGDQEEK - AHFN
homeostasis (h)						
h1	fnh	Ferritin heavy chain	P09728 21067	6	36%	ELGDHVTNLR - IFLQDIK - MGAPEAGMAFLYLDK -
h2*	fnl	Ferritin light chain	P29391 20803	4	27%	ALFQDVQKPSQDEWVK - LLEFQNDK - MGNHLITNL
h3a	bhva ac	Biliverdin reductase A	Q9CY64 33325	13	51%	DLKDPHSSAFNLIGYVSR - ELGSLDNYR - FGFRAF
h3b*	bhva bas	Biliverdin reductase A	Q9CY64 33325	14	59%	DLKDPHSSAFNLIGYVSR - ELGSLDNYR - FGFRAF
h4	bhvb	Biliverdin reductase B	Q923D2 22197	5	31%	LAIFGATGR - LPSEGRPAHVVVGDVR - LQDVTDFE
h5	nmr1	NmrA-like family domain-containing protein 1	Q8K2T1 34377	16	57%	ALLEDDGIFR - AQTLDQWLEQHK - DIGVPMVTVR - I
h6	pdck1	Pyruvate dehydrogenase kinase 1	Q8BFQ8 23278	3	19%	LESIDGAR - LPLVEDFVK - YHALLPSCFGALTDLA
h7	tax12	Thioredoxin domain-containing protein 12	Q9CQU0 19049	6	43%	DEDFSDGGYPR - EAAAAGLPLMIVTEHK - ILFLDPS
h8	prdx1 ox	Peroxiredoxin 1, oxidized form	P35700 22263	2	11%	QITNDLPVGR - TIAQDYGVIK
h9	lgal	Lactoylgalactosylase lyase	Q9CPJ0 20811	3	18%	ADEGISFR - QITNDLPVGR - QGGGLPANNPLISDPK
energy & lipid metabolism (e)						
e1a	idhc ac	Isocitrate dehydrogenase, cytoplasmic	O88844 46676	16	46%	ALEDVCIEIAGFMTK - ATDFVVPGRK - CATITPI
e1b*	idhc bas	Isocitrate dehydrogenase, cytoplasmic	O88844 46676	13	37%	AKLNNTELSFAEK - ALEDVCIEIAGFMTK - CAT
e2	pkfal	6-phosphofructokinase, liver type	P12382 85361	24	40%	AUGVLTSGDAQGMNAVR - AMDEERFDEAIQLR -

4. Résultats supplémentaires obtenus via l'évaluation de la toxicité des NPs-SiO₂ précipitées (Ludox LS30®) et pyrogéniques (Fumed silica)

4.1. Caractérisation des NPs et détermination de la dose de travail

Les deux types de NP-SiO₂ (LS30 et fumée) ont été dans un premier temps caractérisés à la fois par microscopie électronique à transmission (MET) et via la méthode de diffusion dynamique de la lumière (DLS). Ces deux méthodes complémentaires permettent d'évaluer la forme des NPs et leur taille ainsi que leur dispersité de taille.

RESULTATS

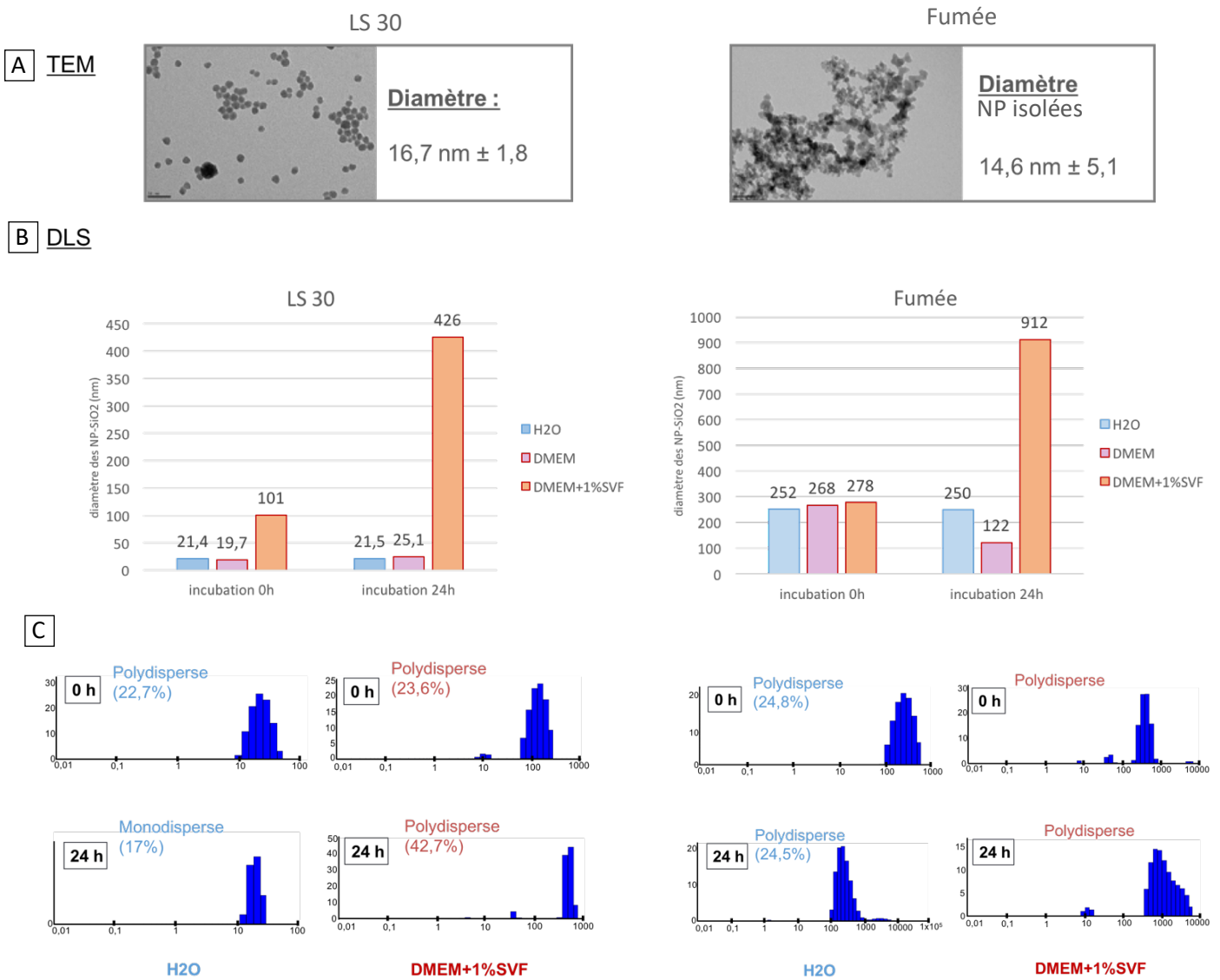


Figure 45. Caractérisation des NP-SiO₂ (LS30 et fumée) sur une suspension à 1mg/mL. A- Observation des différentes NP-SiO₂ en microscopie électronique à transmission. B- Détermination de la taille des NP-SiO₂ en fonction du temps d'incubation et du milieu de culture via diffusion dynamique de la lumière. C- Diagramme présentant l'état de dispersité des NP-SiO₂ en eau et en milieu de culture avec sérum.

Les résultats en MET (Figure 45A) ont montré deux morphologies très différentes entre ces deux types de NP-SiO₂. En effet, la LS30 possède des NPs plutôt isolées, de forme sphérique et dont la taille moyenne est de 16,7nm. La fumée de silice possède quant à elle des NPs d'une quinzaine de nanomètres rassemblées en agrégats et/ou en agglomérats dont les tailles sont très variables. Les résultats obtenus ont ensuite été confirmés par DLS (Figure

45B). Le diamètre hydrodynamique moyen de la LS30 est de l'ordre d'une vingtaine de nanomètres lorsqu'elle se situe dans l'eau ou en milieu de culture et cela quel que soit le temps d'incubation. En revanche, nous observons un fort phénomène d'agrégation en présence de sérum. Ce phénomène s'amplifie lorsque l'incubation perdure pendant 24h à 37°C. Concernant la fumée de silice, le diamètre hydrodynamique moyen mesuré varie entre 150 et 278nm en fonction des différents milieux testés. Nous observons également une amplification du phénomène d'agrégation lorsque la fumée de silice est incubée en présence de sérum pendant 24h à 37°C. En règle générale, la LS30 semble considérée comme mono- ou faiblement hétéro-disperse (dispersité comprise entre 17 et 23,6%) sauf dans le cas d'une incubation de 24h à 37°C en présence de sérum où les valeurs de la dispersité augmentent (42,7%). La forte hétérodispersité s'explique certainement par la présence d'un phénomène d'agrégation plus important. La fumée de silice est quant à elle considérée comme excessivement hétérodisperse en présence de sérum et c'est pour cette raison que les mesures obtenues ne sont plus chiffrables (Figure 45C).

De la même manière que pour les NP-SiO₂ (TMA) (Cf. article *Nanoscale Dalzon et al., 2017*), la DL20 a été estimée à l'aide de l'iodure de propidium (IP) et les résultats ainsi obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous.

RESULTATS

	Lignées cellulaires (RAW 264.7)	Macrophages primaires
Aigu DL20	<ul style="list-style-type: none"> • LS30 : 20 µg/mL • Fumée : 25 µg/mL 	<ul style="list-style-type: none"> • LS30 : 150 µg/mL • Fumée : 50 µg/mL
Chronique sur 20jours	<p>Entre 1 µg/mL et 2 µg/mL par jours</p> <p>Calculé en fonction des limites d'exposition autorisée = 5mg/m³ pour une fraction alvéolaire (INRS)</p>	

Tableau 4. Récapitulatif des doses effectives en NP-SiO₂ (LS30 et fumée) utilisées en fonction du type cellulaire testé et du mode d'exposition.

Les résultats (Tableau 4) montrent que la DL20 atteinte est similaire aux résultats obtenus pour les NP-SiO₂ TMA. La LS30 induit 20% de mortalité à partir de 20µg/mL alors que la fumée atteint une DL20 à partir de 25µg/mL. Nous avons en revanche observé des différences de sensibilité très importantes entre les lignées RAW 264.7 et les macrophages primaires qui semblent moins sensibles aux NP-SiO₂. Les macrophages primaires sont plus résistants que les lignées cellulaires et n'atteignent une DL20 qu'à partir de 150µg/mL pour la LS30 et de 50µg/mL pour la fumée de silice. Celle-ci semble donc être plus toxique pour les macrophages primaires que la LS30.

4.2. Evaluation de l'effet des NP-SiO₂ (Ludox LS30® et fumée) sur les macrophages RAW 264.7

4.2.1. Evaluation de la capacité phagocytaire en fonction des différents modes d'exposition aux NP-SiO₂

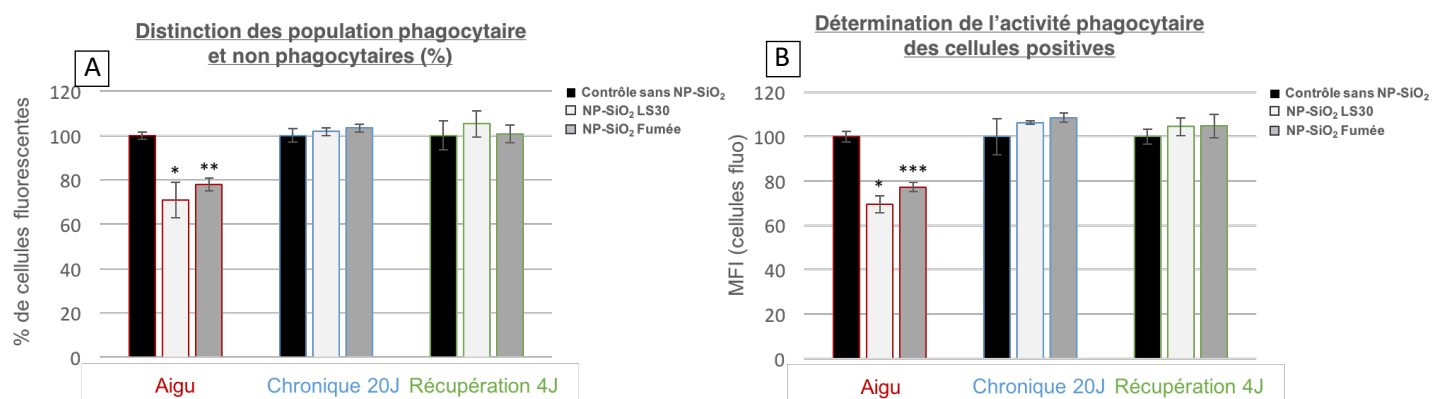


Figure 46. Tests de capacité phagocytaire en fonction des différents modes d'exposition (aiguë, chronique et récupération) A- pourcentage de cellules encore phagocytaires après avoir été exposées 24h avec des NP-SiO₂ (LS30 et fumée). B- Focalisation sur la population phagocytaire et estimation de leur capacité à accumuler les billes fluorescentes (latex 1µm).

Les résultats du test de phagocytose présentent une diminution importante du pourcentage de cellules phagocytaires lorsque les cellules RAW 264.7 sont mises en contact avec des NP-SiO₂ (LS30) ou des NP-SiO₂ (fumée). Le pourcentage de cellules phagocytaires chute à respectivement 70 % et 78 % (Figure 46A). De plus, lorsque nous nous focalisons sur les cellules phagocytaires, ces dernières accumulent moins de billes fluorescentes par rapport au contrôle sans NPs. Nous observons une diminution de 30% de l'activité phagocytaire pour la LS30 alors que pour la fumée, la diminution est de l'ordre de 20% (Figure 46B). En revanche, lors des conditions chronique et de récupération, aucun effet sur la phagocytose n'a été identifié (Figures 46A et 46B). L'ensemble des résultats suggère que les NP-SiO₂ précipitées ou pyrogéniques affectent la capacité phagocytaire des macrophages de manière quasi-similaire

lorsqu'ils y sont exposés à des concentrations subtoxiques (DL20). Néanmoins, lorsque les macrophages n'y sont plus exposés, ils retrouvent rapidement leur capacité phagocytaire. Enfin, l'accumulation progressive de NP-SiO₂ sur 20 jours n'impacte aucunement sur cette fonctionnalité.

L'étape de phagocytose faisant intervenir le cytosquelette d'actine, nous avons cherché à savoir si lors d'une exposition aiguë, les NP-SiO₂ (LS30 et fumée) induisaient ou non des modifications dans la conformation du cytosquelette d'actine grâce au marquage à la phalloïdine. En présence ou en absence de NP-SiO₂, les macrophages ainsi marqués ont ensuite été observés en microscopie confocale afin d'observer leur morphologie. Plusieurs contrôles ont été effectués, notamment avec des billes de latex de différentes tailles imitant soit les phénomènes d'agrégations observés lors des mesures au DLS (billes de latex de 1µm et de 200nm de diamètre), soit les NPs isolées (billes de latex de 30nm de diamètre). Des NPs de silice fluorescentes de 30 nm de diamètre ont également été utilisées afin de confirmer le lien entre l'internalisation des NPs et l'effet sur le cytosquelette.

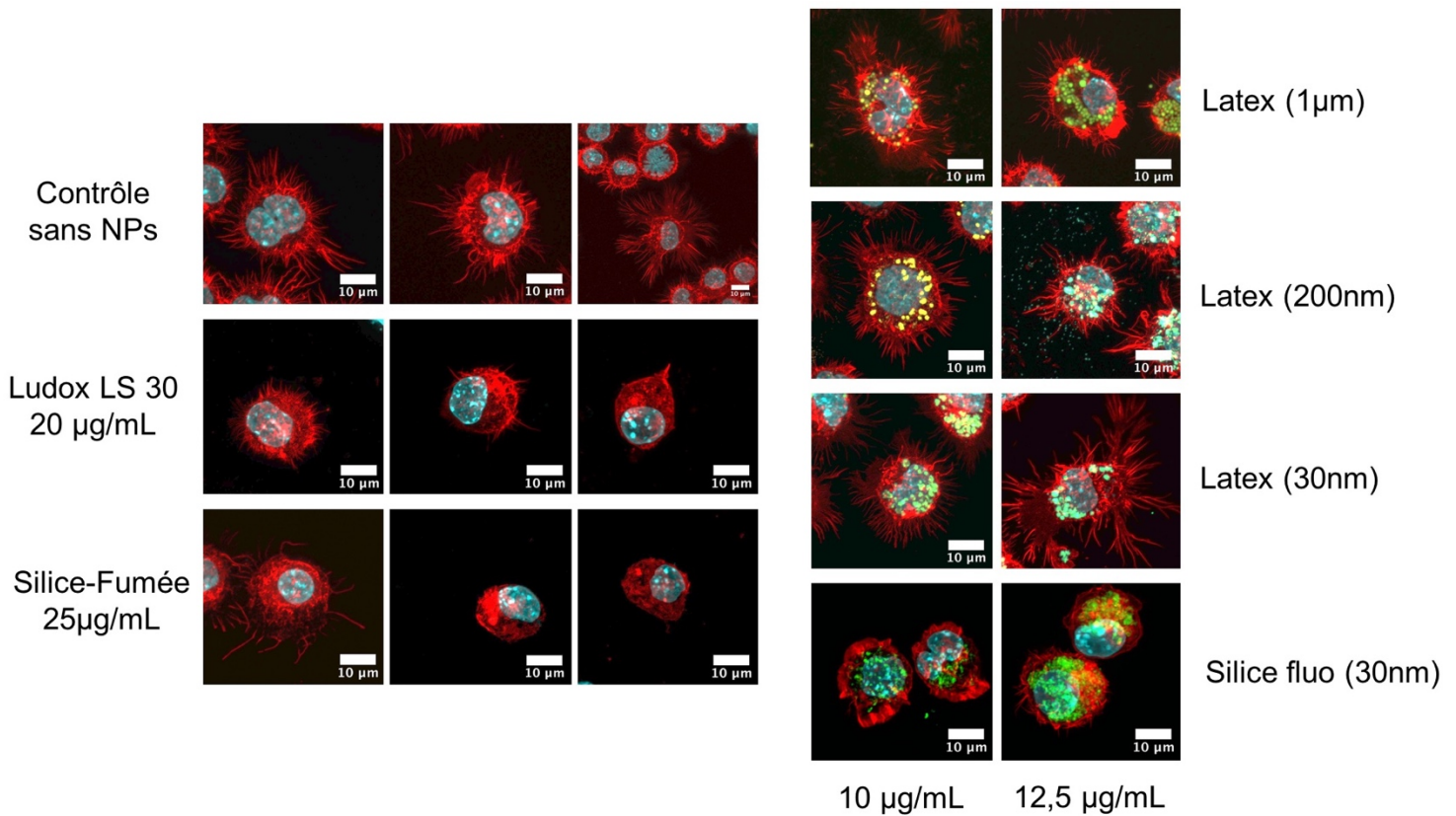


Figure 47. Visualisation du cytosquelette d'actine via la phalloïdine-atto 550. Les cellules RAW 264.7 sont mises en contact 24h avec plusieurs types de particules (NP-SiO₂ et billes de latex de différentes tailles).

Les résultats obtenus (Figure 47) montrent une diminution globale des prolongements cytoplasmiques (piques) lorsque les macrophages sont en contact avec les NP-SiO₂ précipitées (LS30) ou pyrogéniques (fumées de silice). Les changements de conformation des filaments d'actine sont observés uniquement en présence de NP-SiO₂ et ne sont pas simplement provoqués par le phénomène d'internalisation de particules. En effet, nous n'observons pas de différences entre les cellules contrôles (sans NPs) et les cellules incubées avec une dose équivalente de billes de latex. Du fait de la densité deux fois inférieure du latex par rapport à la silice, la quantité de billes de latex est donc deux fois plus élevée pour une même concentration donnée. C'est pour cette raison que nous avons divisé par deux les

concentrations en billes de latex (10µg/mL et 12,5µg/mL) par rapport aux NP-SiO₂ (20µg/mL et 25µg/mL).

4.2.2. Evaluation de la réponse inflammatoire suite aux différents modes d'exposition aux NP-SiO₂

De la même manière que pour les NP-SiO₂ (TMA), nous avons cherché à démontrer l'effet intrinsèque des NP-SiO₂ (LS30 et fumée) sur les mécanismes inflammatoires mis en place par les macrophages. Pour cela, nous avons dosé la sécrétion de médiateurs inflammatoires (NO et certaines cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF-α) dans les différentes conditions d'exposition (aiguë, chronique et récupération). Nous avons ensuite évalué l'effet des NP-SiO₂ (LS30 et fumée) sur la capacité des macrophages à répondre à des stimuli bactériens tels que le LPS.

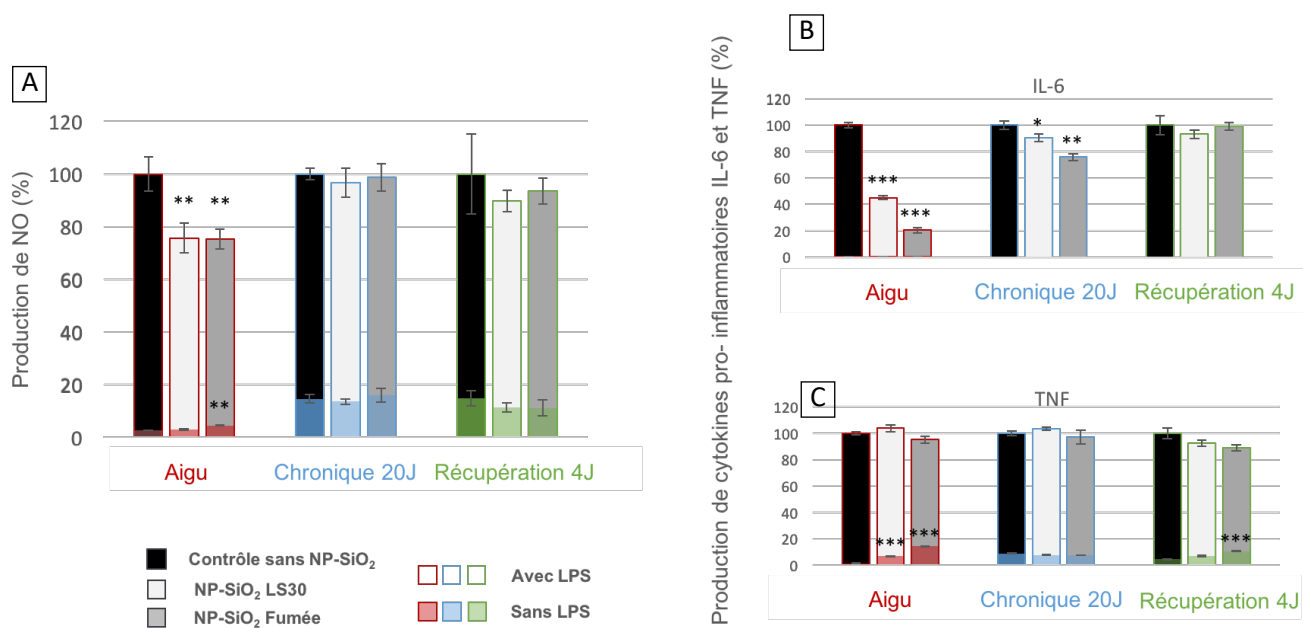


Figure 48. Dosage de médiateurs pro-inflammatoires en fonction des différents modes d'exposition aux NP-SiO₂. A- Dosage de la sécrétion de NO via le réactif de Griess. B- Dosage de l'IL-6 par cytométrie en flux. C- Dosage des TNF-α par cytométrie en flux.

Les résultats ainsi obtenus en exposition aiguë ont dans un premier temps révélé un effet intrinsèque légèrement pro-inflammatoire pour les deux types de silice. En l'absence de LPS, la LS30 ne semble pas augmenter la production de NO mais accroît légèrement la sécrétion de TNF- α qui devient alors quatre fois supérieure par rapport au contrôle (6,8% contre 1,6% en l'absence de NPs) (Figure 48C - histogrammes rouges). La fumée de silice semble en revanche avoir un effet plus important que la LS30 car nous observons une légère augmentation de la sécrétion de NO (4,5% contre 2,6% en l'absence de NPs) ainsi qu'une quantité plus importante de TNF- α (8,5 fois supérieure au contrôle) (Figures 48A et 48C - histogrammes rouges). Cette augmentation semble perdurer plusieurs jours après une exposition aux NPs. En effet, la concentration de TNF- α mesurée reste encore 2,3 fois supérieure au contrôle) (Figure 48C - histogrammes verts).

En présence de LPS, la LS30 et la fumée de silice induisent toutes les deux une baisse de 25% de la production de NO ainsi qu'une diminution brutale de la sécrétion d'IL-6 avec une diminution plus prononcée pour la fumée de silice (réduction de 55% pour la LS30 contre une baisse de 80% pour la fumée de silice) (Figure 48B). La sécrétion de TNF- α reste quant à elle inchangée par rapport au contrôle sans NPs (Figure 48C). Lors des expositions chroniques, nous n'observons pas d'effet sur la sécrétion de NO (Figure A). En revanche, en présence de LPS, une diminution modérée de la quantité d'IL-6 est observée par rapport au contrôle sans NPs avec également un effet plus visible pour la fumée de silice (diminution de 11% pour la LS30 contre 24% pour la fumée de silice) (Figure 48B).

Probablement de la même manière que pour les NP-SiO₂ (TMA), l'ensemble de ces résultats révèle qu'en concentration subtoxique, la présence de NP-SiO₂ (LS30 et fumée) diminue la réactivité des macrophages au LPS. Dans le cas de la silice pyrogénique, nous observons un effet intrinsèque pro-inflammatoire non négligeable et persistant. En fonction

de l'ensemble des résultats obtenus, nous pouvons conclure que les différents types de NP-SiO₂ rencontrés provoquent des désordres inflammatoires relativement similaires sur les macrophages avec des effets plus ou moins prononcés et durables dans le temps. Les NP-SiO₂ risquent de diminuer la sensibilité des macrophages à répondre aux infections bactériennes. (Zimmerman et al., 1986) Ce qui suggère que les travailleurs exposés aux NP-SiO₂ sont plus vulnérables aux maladies infectieuses pulmonaires.

4.2.3. Effet des NP-SiO₂ (LS30 et fumée) sur les compartiments acides

La silice cristalline étant connue pour induire une déstabilisation des membranes lysosomales aboutissant, dans un premier temps à une fuite du contenu acide et enzymatique dans le reste de la cellule et, dans un second temps à la mort cellulaire, notamment par l'activation des caspases. (Hamilton et al., 2008) Nous avons donc cherché à savoir si ce phénomène était inhérent à la silice sous forme cristalline ou si cet effet était également présent dans le cas d'expositions aux silices amorphes. L'acridine orange (AO) a déjà été largement utilisée pour évaluer la stabilité des compartiments acides de la cellule. En effet, l'AO est connue pour changer de longueur d'onde de fluorescence en fonction du pH. Elle vire au rouge à pH acide alors qu'à pH neutre, elle devient verte.

RESULTATS

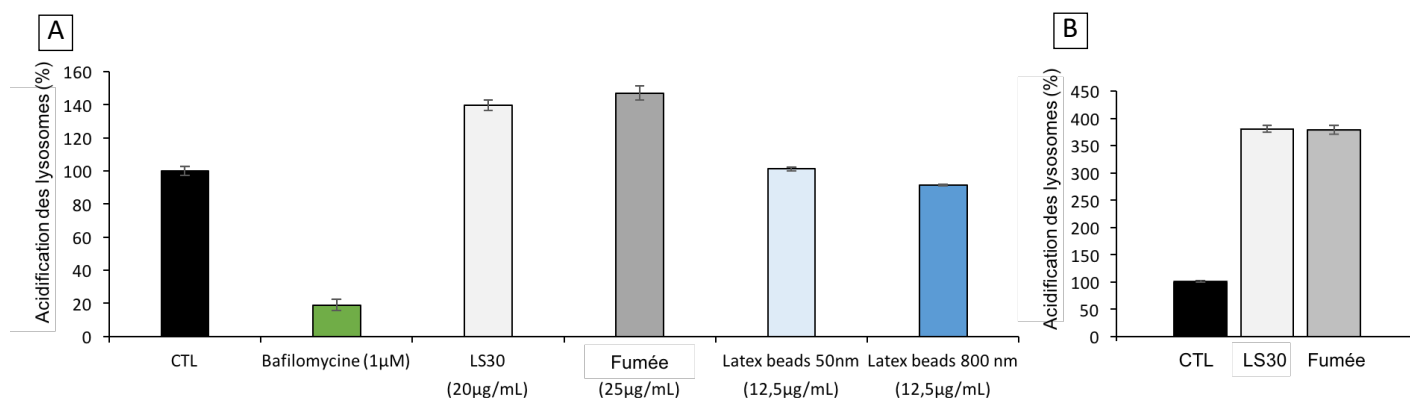


Figure 49. Estimation du pH des compartiments cellulaires acides par cytométrie en flux (marquage via l'acridine orange 1µM). A- Expérience n°1 : comparaison de l'effet des NP-SiO₂ sur les compartiments acides avec des contrôles tels que la bafilomycine (inhibiteur des pompes H⁺ empêchant l'AO d'entrer dans les lysosomes) et des billes de latex de différentes tailles). B- Expérience n°2 : focalisation sur l'effet des NP-SiO₂.

En lien avec des articles précédemment publiés, (Averette et al., 2009; Zdolsek et al., 1990) nous avons imaginé qu'une perturbation des membranes lysosomales par les NP-SiO₂ induirait une fuite du contenu acide présent dans les lysosomes et par conséquent une diminution de leur acidité ainsi qu'une libération de l'AO dans le cytoplasme. Cela aurait pu se manifester par une baisse de l'intensité rouge. Les résultats obtenus avec l'AO ont au contraire montré une augmentation globale de l'acidité lorsque les macrophages sont en présence de NP-SiO₂. Ces tests ont été effectués plusieurs fois et ont toujours révélé une acidité plus élevée en présence de NP-SiO₂ avec, en revanche des variations très importantes selon les expérimentations. En effet, l'acidité y est parfois augmentée de 1,5 fois par rapport au contrôle (Figure 49A) alors qu'elle peut aussi être multipliée par 3,5 ou 4 selon les expérimentations (Figure 49B). L'augmentation de l'acidité peut donner lieu à plusieurs interprétations : soit les NP-SiO₂ induisent une sur-activation des pompes à protons et favorisent l'accumulation des ions H⁺ dans les lysosomes, soit la destruction des lysosomes médiée par les NP-SiO₂ active des mécanismes d'autophagie. L'augmentation de l'acidité serait par conséquent causée par une accumulation d'autophagosomes de grande taille dans

le cytoplasme. (Chen et al., 2015) Comme suggéré par certains travaux, (Petersen et al., 2014) ces résultats devront être vérifiés par microscopie à fluorescence en utilisant également un marquage à l'AO.

4.3. Evaluation des effets des NP-SiO₂ sur la fonctionnalité des macrophages primaires

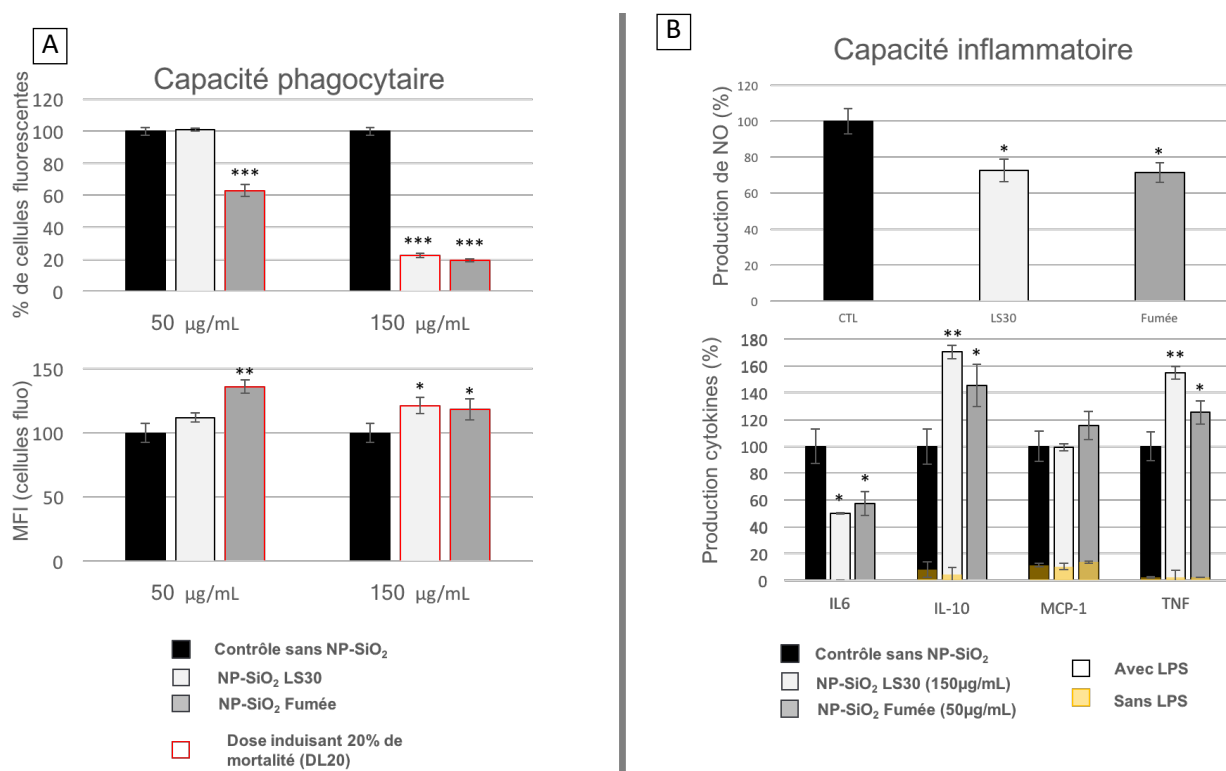


Figure 50. Réponse des macrophages primaires lors d'expositions subtoxiques (DL20) à des NP-SiO₂ (LS30 et fumée). A- Evaluation de la capacité phagocytaire (diagramme du haut = pourcentage de cellules capables d'assurer les fonctions de phagocytose ; diagramme du bas = capacité phagocytaire des cellules compétentes). B- Evaluation de la réponse inflammatoire en fonction de la DL20 choisie (150µg/mL pour la LS30 et 50µg/mL pour la fumée). Diagramme du haut = dosage des NO ; diagramme du bas = dosage des cytokines pro- et anti-inflammatoires avec et sans stimulation au LPS.

Comme avec les lignées cellulaires RAW 264.7, lorsque les macrophages primaires sont exposés aux DL20 des NP-SiO₂ testées, nous observons une diminution du pourcentage de

cellules phagocytaires. A 50µg/mL de fumée de silice, la DL20 est atteinte et seulement 63% des cellules sont capables de phagocyter les billes de latex fluorescentes par rapport au contrôle sans NPs. Nous remarquons cependant que la mortalité cellulaire n'augmente pas lorsque les cellules sont en contact avec une plus forte concentration en fumée de silice. En revanche, bien que le pourcentage de mortalité n'augmente pas, le pourcentage de cellules phagocytaires chute à 20%. Concernant la LS30, cette dernière n'atteint une DL20 qu'à partir de 150µg/mL et induit également une chute brutale du pourcentage de cellules phagocytaires (22%). De plus, lorsque nous nous focalisons sur la population de cellules phagocytaires restantes, nous observons une augmentation de la moyenne de fluorescence qui traduit une internalisation plus importantes des billes fluorescentes. Cela suggère un phénomène compensatoire au cours duquel les cellules les moins réceptives aux effets des NP-SiO₂ semblent augmenter leur activité phagocytaire (Figure 50A).

Enfin, aux DL20 respectives, la LS30 et la fumée de silice induisent une dérégulation des macrophages primaires en réponse au LPS. En effet, dans les deux cas, la production de NO diminue de 30% par rapport au contrôle et la sécrétion d'IL-6 baisse respectivement de 50% et 43%. Nous avons également remarqué que la sécrétion de TNF-α augmente, de même que les cytokines anti-inflammatoires IL-10. La sécrétion des cytokines pro-inflammatoires MCP-1 reste quant à elle inchangée.

Les résultats obtenus sur les macrophages primaires sont donc complexes à élucider et nécessiteront sans aucun doute de réitérer et de poursuivre les investigations afin de mieux comprendre les dérégulations observées. Nous pouvons néanmoins conclure qu'il existe des similitudes avec les effets observés sur les lignées cellulaires RAW 264.7 puisque lors d'une exposition à des doses subtoxiques en NP-SiO₂, les mécanismes de phagocytose et la capacité des macrophages primaires à répondre à des stimuli bactériens (tels que le LPS) sont altérés.

5. Conclusion

Les travaux menés sur les trois types de NP-SiO₂ amorphes (dont deux sous forme précipitée (TMA, LS30) et une sous forme pyrogénique (fumée de silice)) permettent de valider les inquiétudes concernant leur toxicité ainsi que l'importance de la présence de normes d'exposition les concernant. En effet, bien que les effets soient modérés lors d'expositions chroniques (conformément aux normes actuelles) par rapport aux expositions aiguës, il apparaît un effet immunosuppresseur non négligeable lors que les macrophages sont exposés à la fois au LPS et aux NP-SiO₂. Cet effet est par ailleurs plus important dans le cas d'expositions aux silices pyrogéniques. Bien que les NP-SiO₂ risquent de limiter la capacité des macrophages à éliminer une infection bactériennes (diminution de l'activité phagocytaire et de la capacité inflammatoire (via l'IL-6)), elles induisent également un effet inflammatoire intrinsèque qui persiste dans le cas de la silice pyrogénique. Cette persistance rappelle, dans une moindre mesure, les effets de la silice cristalline.

L'état actuel des connaissances ne permet cependant pas de conclure si la silice pyrogénique est « plus toxique » que la silice précipitée. En effet, les DL20 testées varient d'une silice à l'autre et selon le type cellulaire utilisé (lignée cellulaire RAW 264.7 et macrophages primaires). Dans le cas des RAW 264.7, La DL20 est atteinte plus rapidement avec la LS30 (20µg/mL) qu'avec la fumée de silice (25µg/mL). En revanche, celle-ci induit des effets plus importants sur la fonctionnalité des macrophages alors que les études menées sur les macrophages primaires montrent un phénomène inverse. Enfin, les différentes études ciblées ont permis de détailler certains mécanismes enrôlés dans la toxicité des NP-SiO₂ (Figure 51). Les modifications du cytosquelette d'actine justifient les perturbations de l'activité phagocytaire. Les NP-SiO₂ induisent également une perturbation des lysosomes dont les

répercussions doivent encore être élucidées. L'activité mitochondriale des macrophages semble quant à elle maintenue notamment par des mécanismes de compensation. Enfin, Les NP-SiO₂ augmentent la sensibilité des macrophages à d'autres molécules toxiques telles que les styrènes. Au laboratoire, plusieurs projets de toxicité croisée sont en prévision, nous souhaitons en particulier tester l'effet des NP-SiO₂ avec les fumées de cigarette mais aussi avec différentes espèces bactériennes puisque l'environnement pulmonaire n'est pas un environnement stérile.

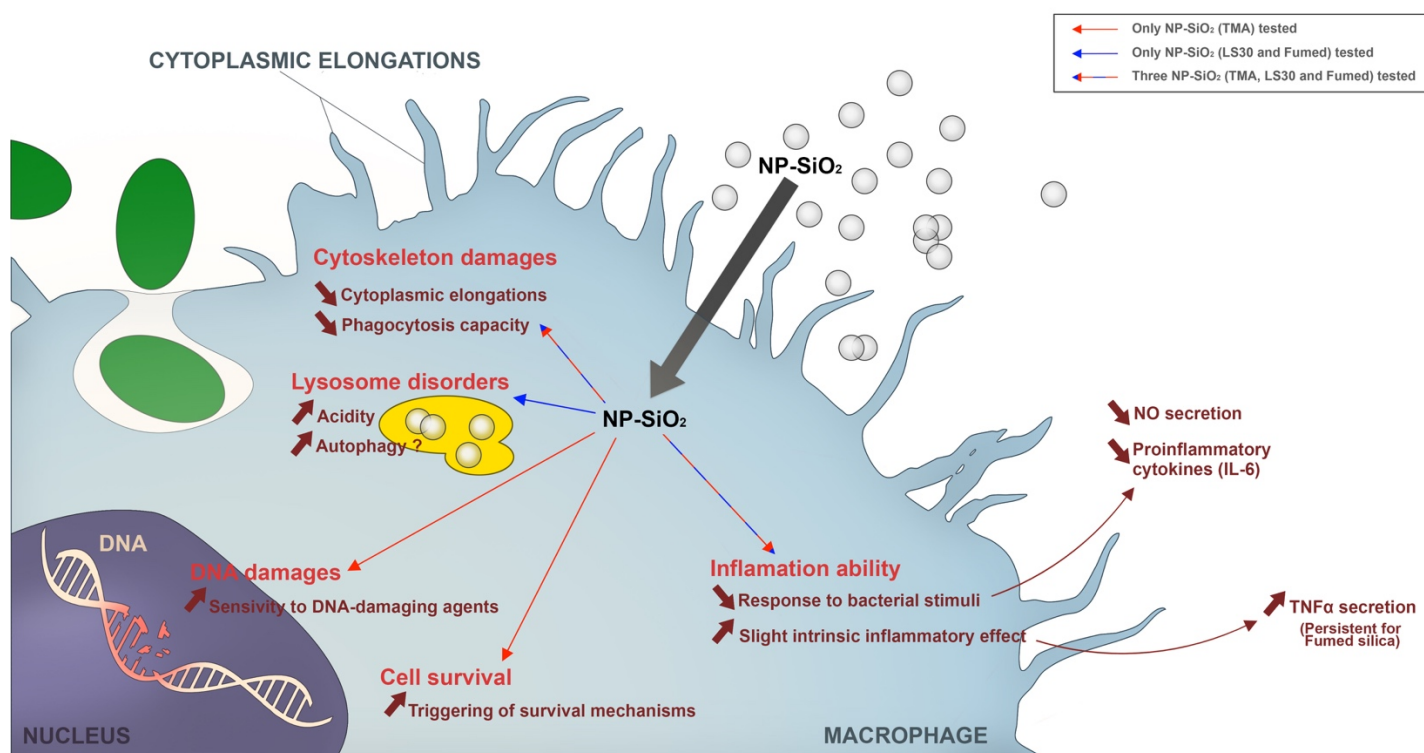


Figure 51. Schéma récapitulatif des principaux résultats obtenus lors de l'étude de l'effet des NP-SiO₂ (TMA, LS30, fumée de silice) sur les macrophages.

Projet 2 : Evaluation de l'effet de l'accumulation de nanoparticules d'oxyde de fer sur les macrophages et de l'efficacité d'une stratégie antitumorale via la vectorisation de ces particules par les macrophages

1. Présentation du projet

Ce projet a pour objectif d'évaluer l'effet des NP-Fe₂O₃ sur les macrophages au moyen de tests fonctionnels, cela afin d'évaluer en amont le bien-fondé d'une stratégie thérapeutique contre les tumeurs solides telles que les glioblastomes. La stratégie élaborée fait intervenir des NP-Fe₂O₃ photoactivables par rayonnement X qui pourront servir à améliorer l'efficacité des radiothérapies actuelles. Ces nanoparticules ont besoin d'un « véhicule » pour pouvoir s'accumuler spécifiquement au niveau de la zone tumorale. Les monocytes/macrophages sont des types cellulaires de l'immunité adaptative capables de phagocyter les NP-Fe₂O₃ et ils serviront à vectoriser les NP-Fe₂O₃ au sein de la tumeur.

Malgré de considérables progrès dans le traitement des cancers, les patients atteints de tumeurs solides ont encore un taux de mortalité élevé, notamment à cause de l'existence de cellules souches cancéreuses (CSCs). Depuis peu, ces dernières se sont vues attribuer un rôle majeur dans le degré d'agressivité du cancer, la possibilité de rechute et le développement de métastases. De plus, les CSCs sont peu sensibles aux chimio- et aux radiothérapies.

Dans le cas particulier des patients atteints de tumeurs cérébrales de type gliome dont l'espérance de vie est estimée à 12 mois en moyenne, d'autres contraintes s'ajoutent pour traiter efficacement le patient. D'une part, la barrière hémato-encéphalique (BHE) empêche le passage des molécules anti-cancéreuses vers le gliome (Mrugala, 2013) et d'autre part, la

radiothérapie s'avère être une méthode peu efficace car elle nécessite des séances répétées de rayonnements (gamma ou X) à forte énergie, ce qui détruit les tissus sains avoisinants. Cette méthode est donc trop invasive pour traiter un organe aussi complexe que le cerveau.

Dans notre stratégie thérapeutique contre les gliomes (applicable sur d'autres types de tumeurs solides), nous proposons d'utiliser des éléments chimiques avec un haut numéro atomique nommés « high Z element » (HZE). Ceux-ci sont photoactivables via des rayonnements X de faible intensité. La faible irradiation est suffisante pour exciter les HZE qui émettent à leur tour des photoélectrons de haute énergie, toxiques pour la tumeur et de manière très localisée, épargnant ainsi les tissus sains avoisinants (Choi et al., 2012). Dans cette stratégie, nous avons choisi d'utiliser des nanoparticules d'oxyde de fer (Fe_2O_3) qui ont l'avantage d'être peu coûteuses, facilement métabolisables par les cellules (Ganz, 2012) et non toxiques lorsqu'elles ne sont pas photoactivées. Dans le but de limiter tout effet secondaire indésirable sur l'organisme via ce métal, nous avons choisi de privilégier des NP- Fe_2O_3 déjà commercialisées dans le milieu médical tel que le Ferinject®. Dans un souci de ne pas se restreindre à un seul type de NP- Fe_2O_3 , nous avons également testé des NP- Fe_2O_3 commercialisées par Sigma-Aldrich.

Enfin, afin d'éviter la dispersion dans l'organisme des nanoparticules (ce qui réduirait notre effet thérapeutique) et de véhiculer spécifiquement les NP- Fe_2O_3 au niveau de la tumeur, elles seront vectorisées par les macrophages du patient lui-même (préalablement isolés à partir des monocytes sanguins, cultivés et différenciés en culture cellulaire). En effet, les macrophages sont des cellules immunitaires dont les deux rôles principaux sont : 1) de phagocyter les éléments particuliers étrangers à l'organisme et 2) de se diriger vers les zones

inflammatoires telles que les infections, les blessures et les tumeurs afin d'engager une réponse immunitaire. Les tumeurs étant fortement inflammatoires, les macrophages migreront facilement au niveau du site tumoral afin d'apporter les éléments photoactivables nécessaires à notre stratégie thérapeutique peu invasive. Dans le cas des gliomes, les macrophages étant capables de traverser la barrière hémato-encéphalique (Wu et al., 2006), l'utilisation de macrophages comme vecteurs de NP-Fe₂O₃ s'avère être une stratégie intéressante (Figure 52).

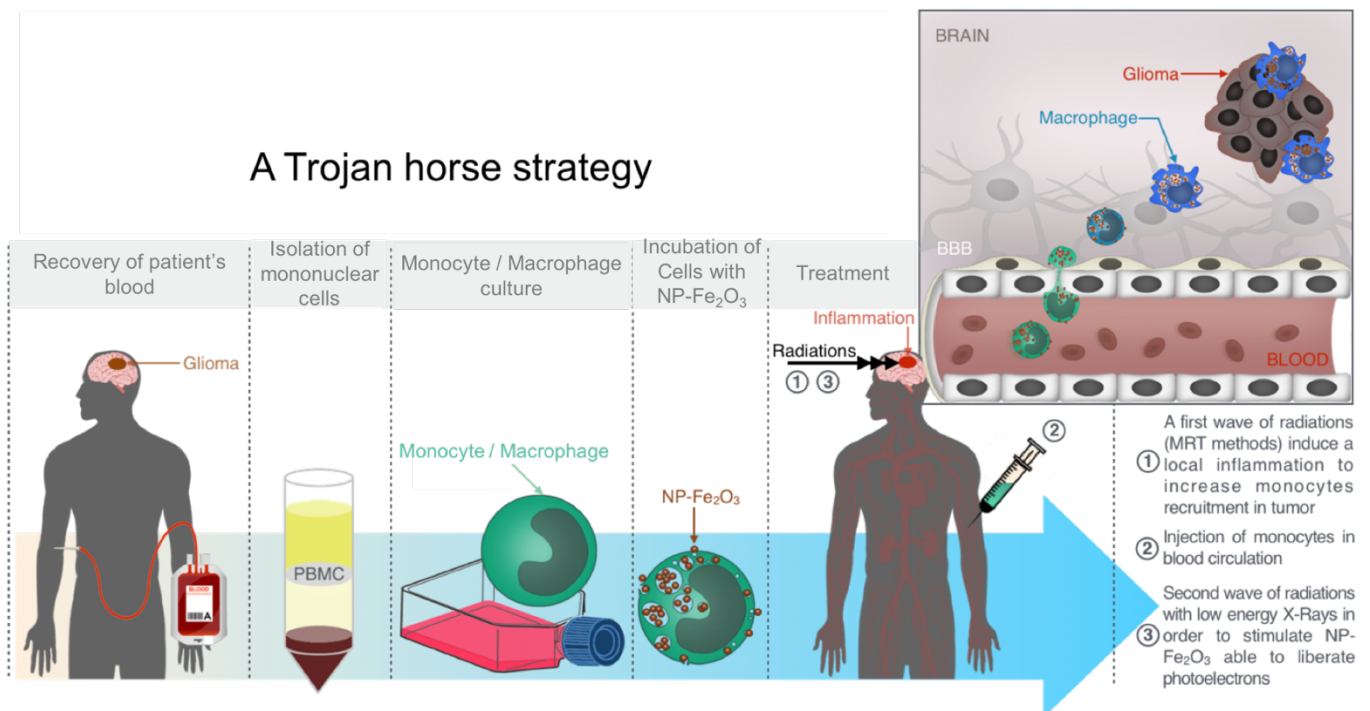


Figure 52. Vectorisation des NP-Fe₂O₃ vers la tumeur via les macrophages.

2. Déroulement du projet

Ce projet s'est déroulé en collaboration avec une équipe de l'Institut des Neurosciences de Grenoble (GIN) basée à l'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) en

charge de la partie thérapeutique et avec la plateforme Optimal basée à l'Institut pour l'Avancée des Biosciences (IAB) avec qui nous avons pu évaluer le tropisme des macrophages réinjectés dans la circulation sanguine vers la tumeur.

Dans le cadre de ce projet, mon travail s'est articulé en trois étapes :

a. Choisir et caractériser les NP-Fe₂O₃ utilisables dans la stratégie thérapeutique mise en place.

Le choix des NP-Fe₂O₃ s'est fait en fonction de la facilité d'accès au produit (Sigma Aldrich) ou de l'existence d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans le secteur hospitalier (Ferinject®). Le Ferinject® étant une solution nanoparticulaire d'oxyde de fer déjà largement utilisée dans le traitement contre l'anémie à de fortes doses (injection en intravasculaire à une concentration de 50 mg/mL), (Jahn et al., 2011; Moore et al., 2011) nous avons choisi de le tester dans notre stratégie thérapeutique contre les gliomes. La caractérisation des nanoparticules a été effectuée suivant plusieurs méthodes disponibles au CEA de Grenoble. La première méthode retenue a été la diffusion dynamique de la lumière (DLS) afin de mesurer la taille hydrodynamique des NP-Fe₂O₃ et de connaître leur pourcentage de dispersité en solution aqueuse. Cette méthode d'analyse a ensuite été confirmée et complétée par microscopie électronique à transmission afin de connaître la forme, la taille réelle des NP-Fe₂O₃ choisies ainsi que la présence d'agrégats.

- b. Déterminer l'impact des nanoparticules choisies sur les macrophages afin de ne pas induire d'autres pathologies et de disposer de macrophages fonctionnels pour la mise en œuvre du protocole (tests de viabilité cellulaire, de capacité phagocytaire, de la réponse des macrophages à des stimuli inflammatoires etc.).**

Evaluer le pourcentage de viabilité permet de connaître la dose maximale de NP-Fe₂O₃ à utiliser induisant une mortalité cellulaire inférieure ou égale à 20% (DL20). Choisir la DL20 comme dose de travail permet d'une part, de limiter le nombre de cellules mortes (la DL20 est un bon compromis entre la quantité de fer internalisée et le nombre de cellules vivantes susceptibles de vectoriser les NP-Fe₂O₃ au sein de la tumeur) et d'autre part, d'évaluer l'effet des NPs sur la fonctionnalité des macrophages sans que nos résultats soient faussés par une mortalité cellulaire trop élevée. Dans notre stratégie thérapeutique, ce sont des macrophages primaires qui seront utilisés. C'est pourquoi nous avons décidé de déterminer la dose de travail sur ces derniers. Nous avons également effectué des tests de viabilité sur la lignée cellulaire de macrophages J774 afin de s'assurer que la dose de travail choisie n'induit pas davantage de mortalité cellulaire par rapport aux macrophages primaires. La lignée cellulaire J774 étant plus simple d'utilisation, elle a permis d'effectuer les différents tests fonctionnels pour comparer les effets des deux types de NP-Fe₂O₃. Après cette étape, le Ferinject® a été choisi pour notre stratégie thérapeutique et nous avons donc poursuivi les tests fonctionnels sur les macrophages primaires avec le Ferinject® seulement. Dans ce projet, nous avons évalué la présence de l'élément fer à l'intérieur des macrophages via des dosages colorimétriques (Riemer et al., 2004), puis nous avons confirmé la présence de NP-Fe₂O₃ par microscopie électronique TEM et microscopie EDX. Enfin, les tests fonctionnels ont permis de vérifier si l'internalisation de NP-Fe₂O₃ induit ou non des dommages sur le cytosquelette des macrophages (tests de phagocytose et observations au microscope confocal des filaments d'actine) influençant ainsi la capacité motrice des macrophages. La capacité sensitive des

macrophages vis-à-vis de stimuli inflammatoires a également été vérifiée notamment en évaluant les réponses à des stimuli bactériens (LPS) par dosage de la sécrétion d'oxyde nitrique et de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, MCP-1 et TNF).

c. Evaluer le tropisme des macrophages vers une zone inflammatoire (Lee et al., 2017) ou tumorale par imagerie du petit animal (expérimentation menée en collaboration avec la plateforme Optimal).

A partir d'une préparation de macrophages primaires, les macrophages ont été rendus fluorescents grâce à une étape de phagocytose de fluosphères (ThermoFisher F8807). Les fluosphères utilisées émettent un signal dans le rouge lointain détectable par les outils d'imagerie du petit animal de la plateforme Optimal. Avant de débiter notre expérience, plusieurs étapes préliminaires ont été effectuées dans l'objectif de s'assurer que la concentration choisie en fluosphères émet une intensité de fluorescence suffisante pour suivre les macrophages en imagerie du petit animal. Il a également fallu s'assurer que les fluosphères utilisées ne soient pas toxiques pour les macrophages primaires (test de viabilité et fonctionnels). L'imagerie du petit animal permet de s'assurer que les macrophages primaires réinjectés dans la circulation sanguine sont capables de migrer vers la zone d'intérêt. Cette zone est soit une inflammation induite par injection de LPS en intradermique, soit une tumeur greffée en sous-cutané. L'expérience s'effectue sur trois groupes de souris (souris contrôle, souris avec inflammation au LPS, souris avec tumeurs solides). Pour chacun des trois groupes de souris, nous injectons à la moitié du groupe des macrophages chargés en fluosphères et à l'autre moitié, nous injectons des macrophages chargés en fluosphères + Ferinject® (Figure53). Les macrophages chargés uniquement en fluosphères servent de preuve de concept sur l'intérêt d'utiliser des macrophages pour traiter des tumeurs solides. Les

macrophages à la fois chargés en Ferinject® et en fluosphères servent à vérifier que les NP-Fe₂O₃ ne modifient pas la capacité des macrophages à migrer vers le site inflammatoire et tumoral par comparaison avec les macrophages uniquement chargés en fluosphères.

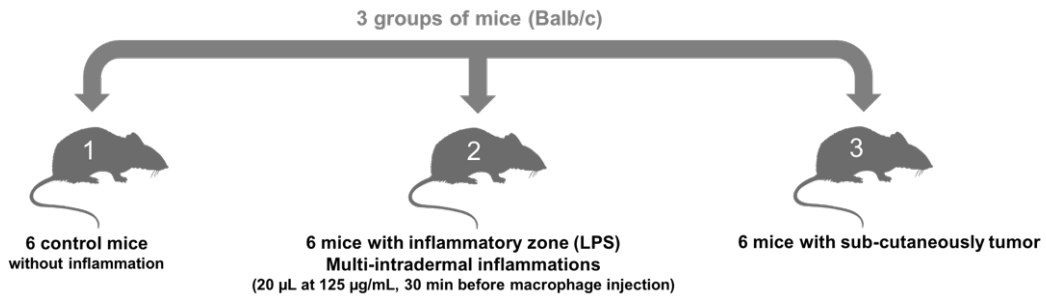
Les études *in vivo* ont débuté dans un premier temps par l'induction d'une inflammation localisée qui est l'expérimentation la plus simple à effectuer. Cette étape a permis de s'assurer de la possibilité de tropisme des macrophages injectés vers une zone inflammatoire. Puis dans un second temps, nous avons poursuivi notre étude sur les souris avec tumeurs implantées afin de valider notre stratégie de cheval de Troie en utilisant les macrophages. Par souci de clarté, seuls les résultats de la deuxième expérimentation seront présentés dans le corps de cette thèse. La première expérimentation est quant à elle présentée en annexe 1.



Scientific questions

- 1) Tropism toward the tumor
- 2) Tropism toward inflammatory site
- 3) Biodistribution
- 4) Elimination pathways

Models used



Experiment plan

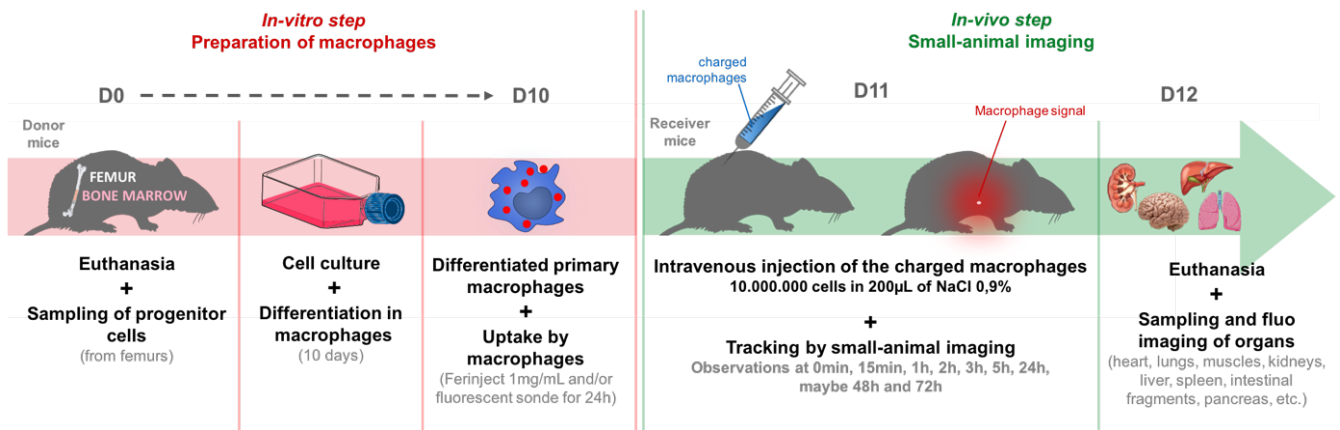


Figure 53. Stratégie mise en place pour observer le tropisme des macrophages vers les zones inflammatoires induites ou vers les zones tumorales.

3. Résumé des résultats obtenus et article en cours de soumission

3.1. Caractérisation des NP-Fe₂O₃ choisies

L'ensemble des résultats concernant la caractérisation des NP-Fe₂O₃ obtenus au moyen des méthodes de microscopie électronique à transmission (TEM) et de diffusion dynamique de la lumière a déjà permis de confirmer les variations de forme et de taille. Ces résultats ont également révélé des différences de comportement entre les deux types de NP-Fe₂O₃. En

effet, contrairement au Ferinject[®], les NP-Fe₂O₃ (Sigma) sont de plus grande taille (entre 70 et 80nm environ contre une vingtaine de nanomètres pour le Ferinject[®]) et ont tendance à former des agrégats de l'ordre du micromètre lorsqu'elles sont en contact avec le milieu de culture, et ce même après enrobage au carboxymaltose. Le carboxymaltose est une molécule qui entre également dans la confection du Ferinject[®]. (Mohan et al., 2012) (Figure 54 et tableau 5).

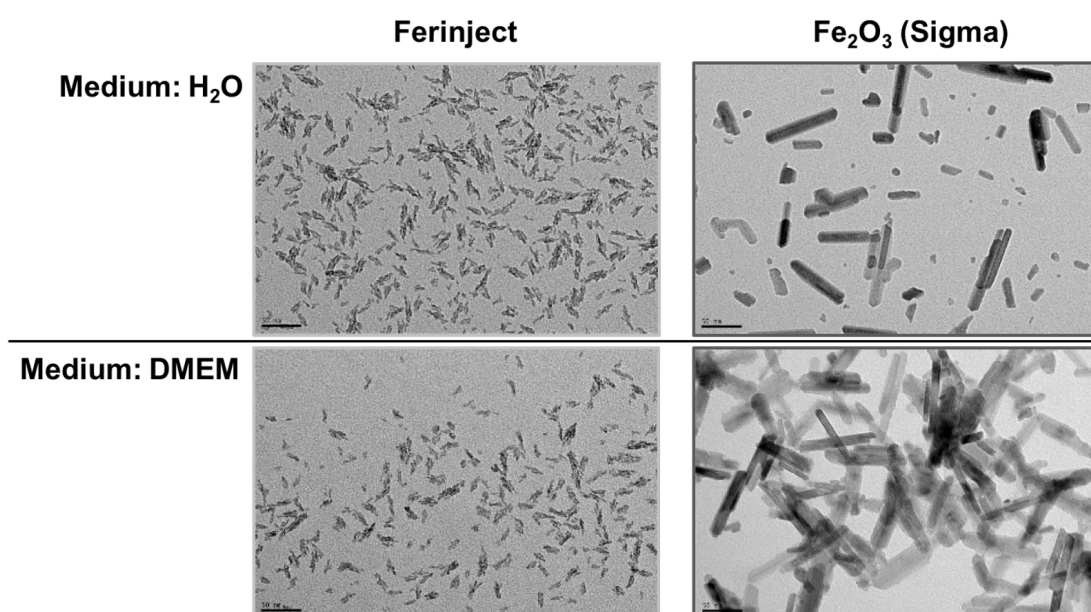


Figure 54. Caractérisation des deux types de NP-Fe₂O₃ choisies par microscopie électronique à transmission (TEM). Barre d'échelle = 50 nm.

		Ferinject [®]				Fe ₂ O ₃ (sigma)			
Milieu de culture		H2O		DMEM		H2O		DMEM	
Temps d'incubation		0h	24h	0h	24h	0h	24h	0h	24h
taille (nm)		23,4	22,4	24,3	21,9	73,4	79,6	1258	1120
Dispersité (%)		8,8	11,7	8,5	12,2	22,4	22,6	Multimodal	Multimodal

Tableau 5. Caractérisation des deux types de NP-Fe₂O₃ via la diffusion dynamique de la lumière (DLS).

3.2. Evaluation de la dose de travail

Les tests de viabilité cellulaire ont ensuite permis de choisir la concentration 1mg/mL en NP-Fe₂O₃ comme dose de travail (Figures 55A et 55B). Il s'agit de la DL20 sur les macrophages primaires et cette dose n'induit pas plus de mortalité cellulaire sur les lignées cellulaires J774 (Figure 55C).

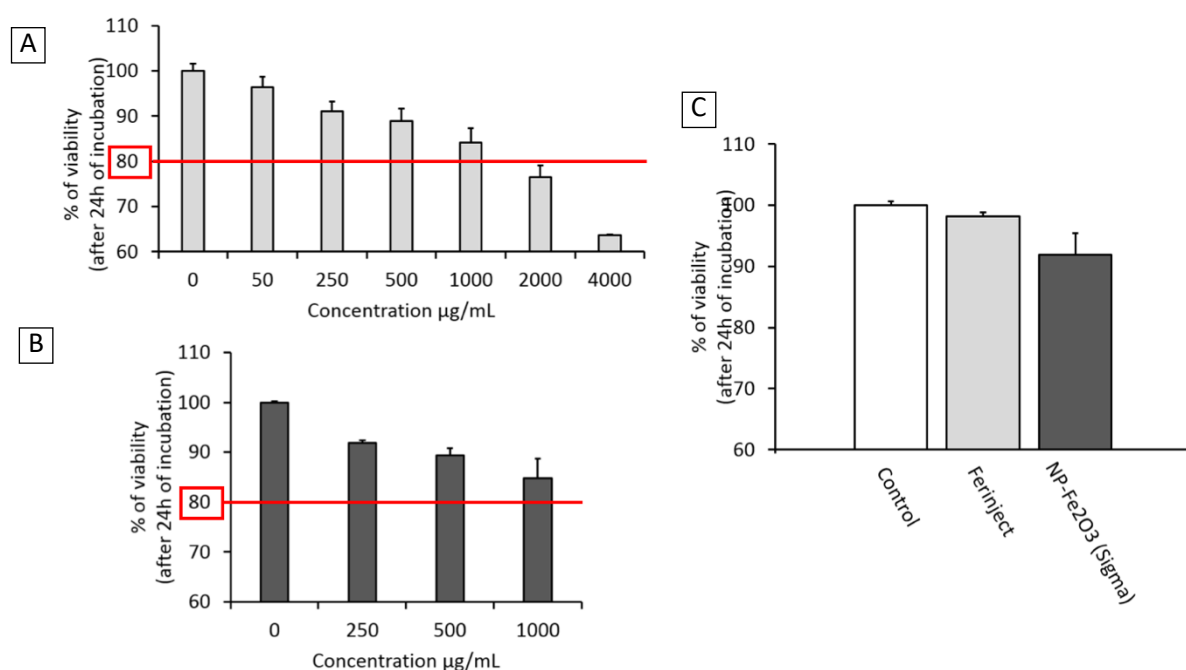


Figure 55. Test de viabilité via coloration au iodure de propidium (IP). A- Détermination de la dose de travail en Ferinject® sur les macrophages primaires. B- Détermination de la dose de travail en NP-Fe₂O₃ (Sigma) sur les macrophages primaires. C- Test de viabilité sur les lignées cellulaires de macrophages J774 en fonction de la dose de travail choisie (1mg/mL) pour chaque type de NP-Fe₂O₃.

3.3. Evaluation de l'accumulation du fer à l'intérieur des macrophages J774 et tests fonctionnels

L'accumulation d'une grande quantité de fer à l'intérieur des cellules a été confirmée pour les deux types de NP-Fe₂O₃ (Sigma et Ferinject®) via la coloration de Perls (Figure 56A) et

les dosages quantitatifs à la bathophénanthroline (Figure 56B). Le dosage du fer, a révélé une accumulation plus importante de fer à l'intérieur des macrophages J774 lorsque ils sont en contact 24h avec les NP-Fe₂O₃ (Sigma) par rapport au Ferinject® (73,5pg/mL contre 7,6pg/mL avec le Ferinject®). En revanche, Dans le cas des NP-Fe₂O₃, Il est parfois difficile de séparer les cellules des agrégats de NPs présents dans le milieu même après plusieurs rinçages. C'est pourquoi nous avons cherché à confirmer ces résultats par d'autres moyens tels que la microscopie électronique.

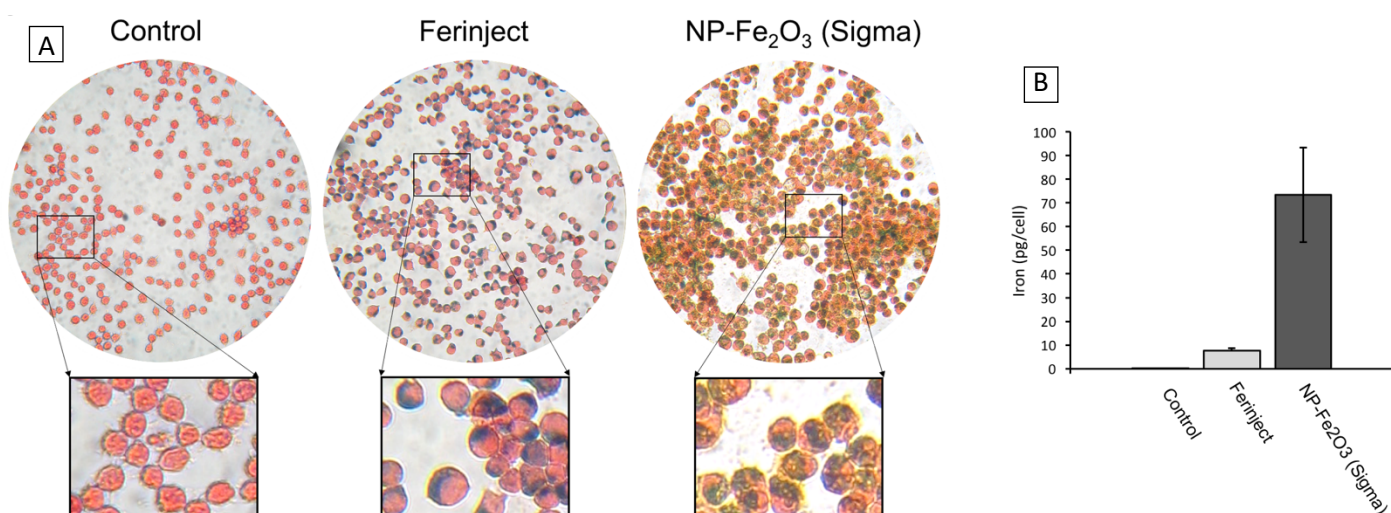


Figure 56. Validation de la présence de fer accumulé à l'intérieur des cellules J774 après incubation avec des NP-Fe₂O₃ (Sigma ou Ferinject®). A- Evaluation qualitative par Coloration de Perls. B- Dosage quantitatif du fer intracellulaire via la bathophénanthroline.

L'internalisation des NPs a également été validée par microscopie électronique à transmission (Figure 57A). Les techniques de microscopie EDX ont montré que l'accumulation de l'élément fer était bien associée aux NP-Fe₂O₃ emmagasinées et non sous forme dissoute (Figure 57B). En variant les temps d'incubation, nous avons confirmé une cinétique d'internalisation nettement plus rapide pour les NP-Fe₂O₃ (Sigma) par rapport au Ferinject® (Figure 57), validant ainsi les résultats obtenus lors des dosages à la bathophénanthroline.

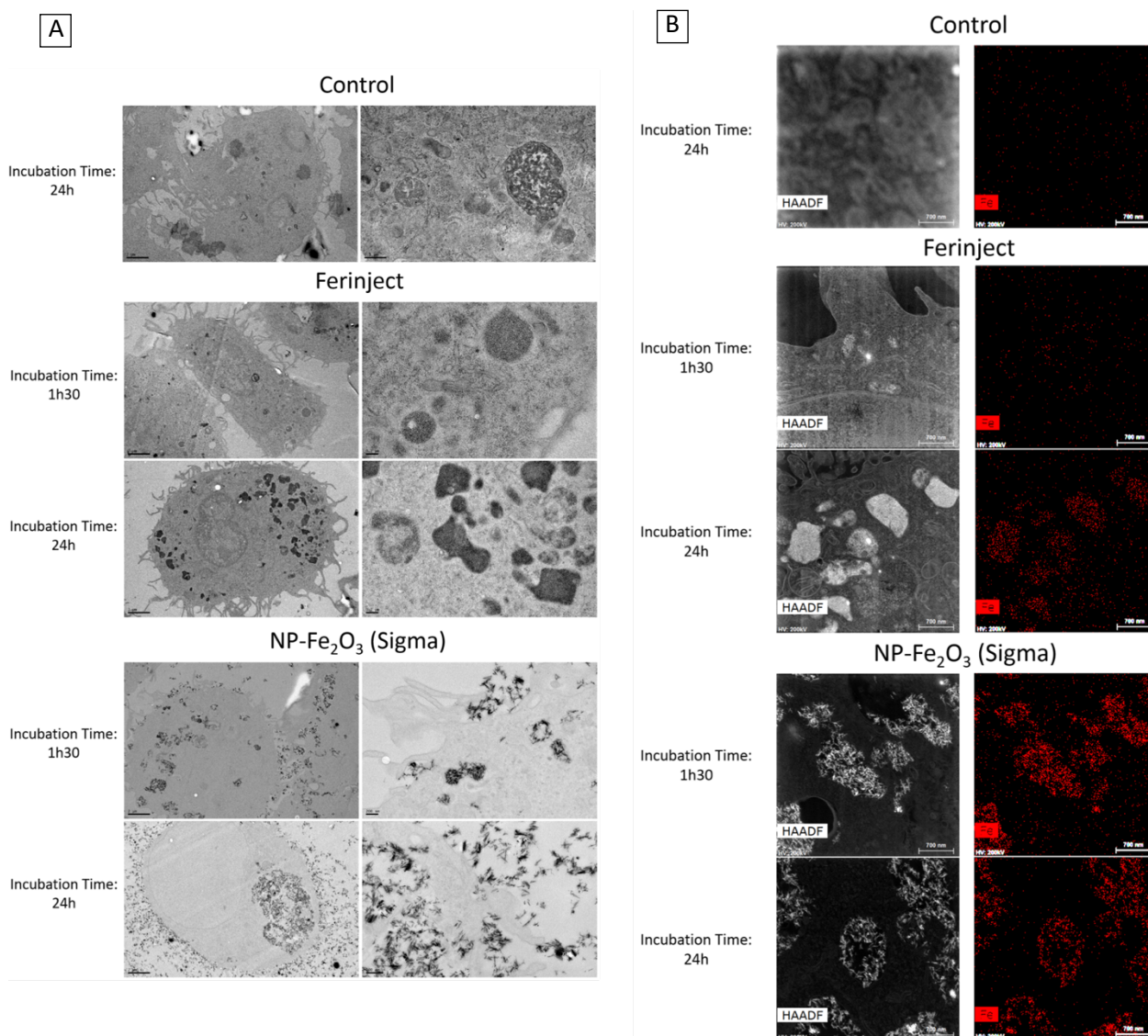


Figure 57. Validation de l'internalisation des différentes NP-Fe₂O₃ (Sigma et Ferinject®) par les macrophages J774. A- Comparaison de la capacité d'accumulation des NP-Fe₂O₃ par les macrophages en fonction du temps d'incubation (1h30 ou 24h). Barre d'échelle des images de droite = 2µm ; image de gauche = 200 nm. B- Validation par imagerie EDX que le fer emmagasiné par les macrophages J774 est bien associé à l'internalisation des NPs. Barre d'échelle 700 nm.

L'ensemble des résultats obtenus ont ainsi montré une accumulation importante de NP-Fe₂O₃ à l'intérieur des macrophages J774 et bien que les NP-Fe₂O₃ (Sigma) soient moins stables que le Ferinject® (phénomène d'agrégation), à ce stade de notre étude, elles semblent plus propice pour notre stratégie thérapeutique que le Ferinject®. Il reste néanmoins à

effectuer des études de fonctionnalité sur les macrophages J774 dans le but de vérifier que cette accumulation de fer plus importante n'induit pas plus de dommages que le Ferinject® sur la fonctionnalité des macrophages.

Les tests fonctionnels effectués sont les tests en lien avec le cytosquelette d'actine (phagocytose et observation des filaments d'actine) (respectivement Figures 58 et 59) et la capacité à détecter et répondre à des stimuli (test de capacité inflammatoire).

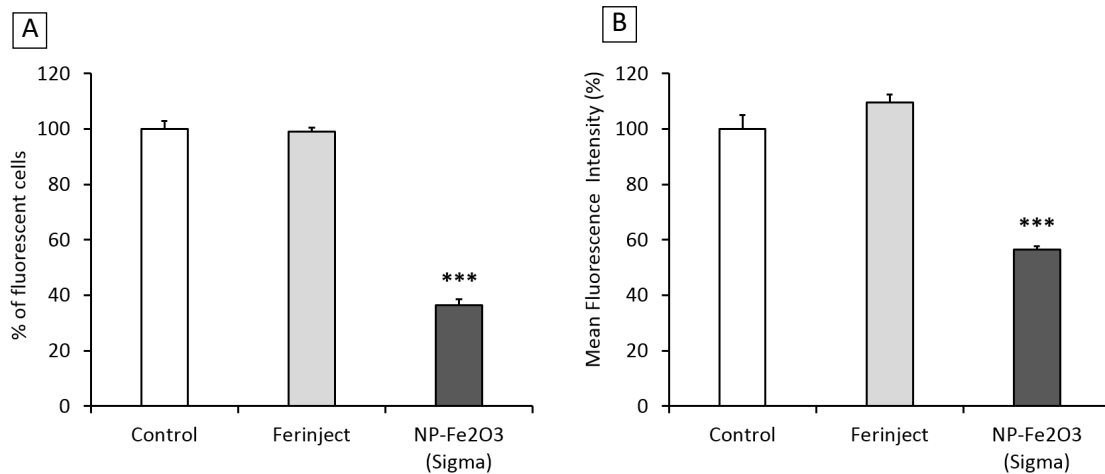


Figure 58. *Test de capacité phagocytaire. A- Estimation du pourcentage de cellules phagocytaires après avoir été en contact pendant 24h avec 1mg/mL de NP-Fe2O3 (Sigma ou Ferinject®). B- Evaluation de la capacité phagocytaire de la population cellulaire capable de phagocyter.*

Figure 5C

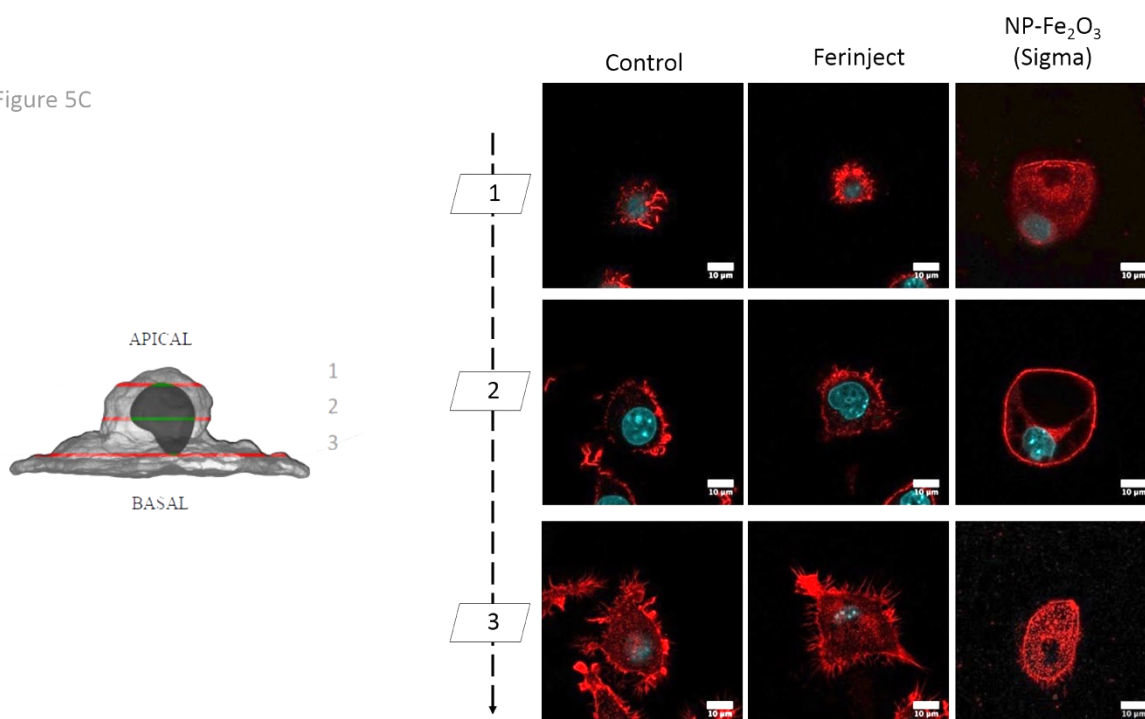


Figure 59. Visualisation du cytosquelette d'actine des cellules J774 en présence ou en absence de NP-Fe₂O₃ (Sigma ou Ferinject®).

Les résultats ont montré qu'à 1 mg/mL, le Ferinject® n'induit aucune modification sur la capacité phagocytaire et la conformation du cytosquelette d'actine des cellules J774. En revanche, concernant les NP-Fe₂O₃, nous observons un effet important sur la capacité phagocytaire. En effet, seulement 37% des macrophages mis en contact avec les NP-Fe₂O₃ sont capables de phagocyter (Figure 58A) et parmi la population de cellules phagocytaires nous observons une diminution de 40% de l'activité phagocytaire par rapport au contrôle (Figure 58B). De plus, lors des observations microscopiques, nous avons observé une modification de la conformation du cytosquelette d'actine ainsi qu'un changement global de la morphologie cellulaire. En présence de NP-Fe₂O₃ (Sigma), les cellules sont moins adhérentes, beaucoup plus rondes et possèdent de larges vésicules (Figure 59).

RESULTATS

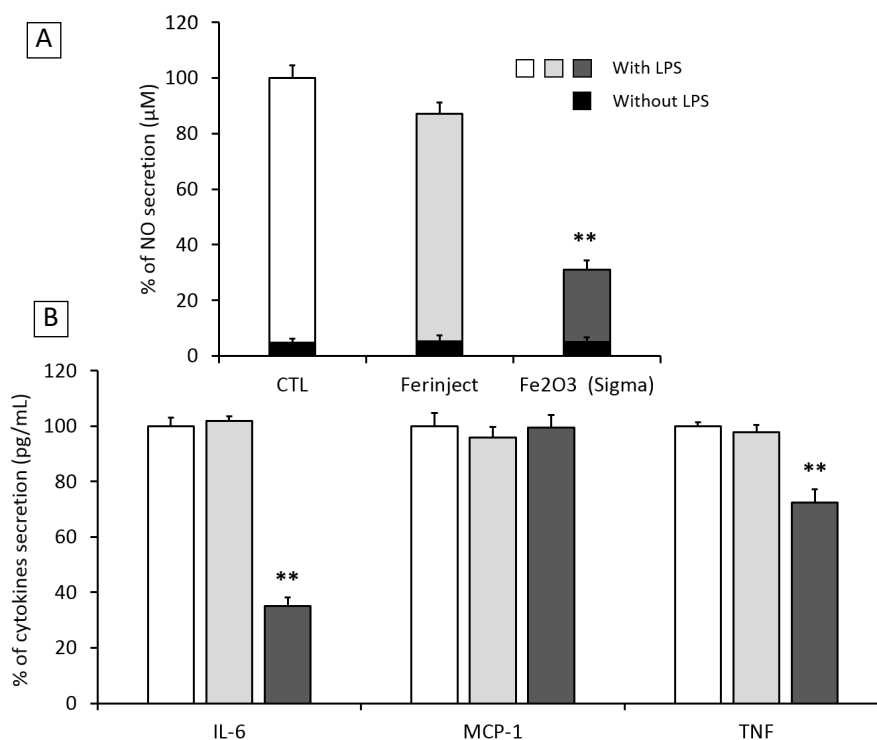


Figure 60. Dosage des médiateurs pro-inflammatoires après incubation avec des NP-Fe₂O₃ (Sigma ou Ferinject®) A- Dosage de la sécrétion de NO en présence ou en absence de LPS. B- Dosage des cytokines pro-inflammatoires. Blanc : CTL, gris clair : Ferinject®, gris foncé : Fe₂O₃ (Sigma)

Les tests effectués sur la capacité inflammatoire des macrophages ont montré que les deux types de NP-Fe₂O₃ ne semblent pas avoir d'effets intrinsèques évidents car la production de NO n'augmente pas (Figure 60A). En réponse au LPS, les deux types de NP-Fe₂O₃ induisent cependant une diminution de la production de NO par rapport au contrôle sans NPs. Cette diminution est très faible pour le Ferinject® (seulement de 10%) alors que les NP-Fe₂O₃ (Sigma) induisent une chute brutale (-69%) de la production de NO (Figure 60A). L'effet des NP-Fe₂O₃ est également observé lors des dosages de cytokines pro-inflammatoires. En effet, en présence de LPS, nous observons une baisse drastique de l'IL-6 (-65%) ainsi qu'une diminution de la sécrétion de TNF-α (-27%). La production de MCP-1 reste en revanche inchangée. En conclusion, à une même dose de travail, le Ferinject® n'a pas ou peu d'effets sur la réponse

inflammatoire contrairement aux NP-Fe₂O₃ (Sigma) (Figure 60B). Du fait de la forte perturbation de la fonctionnalité des macrophages, les NP-Fe₂O₃ (Sigma) ne semblent pas appropriées pour la suite de notre projet. Nous avons néanmoins cherché à comprendre les causes probables de la perturbation des fonctionnalités principales des macrophages J774 lorsque ces derniers sont en contact avec une grande quantité (1µg/mL) de NP-Fe₂O₃ (Sigma). Pour ce faire, nous avons effectué des tests du potentiel mitochondrial et du glutathion.

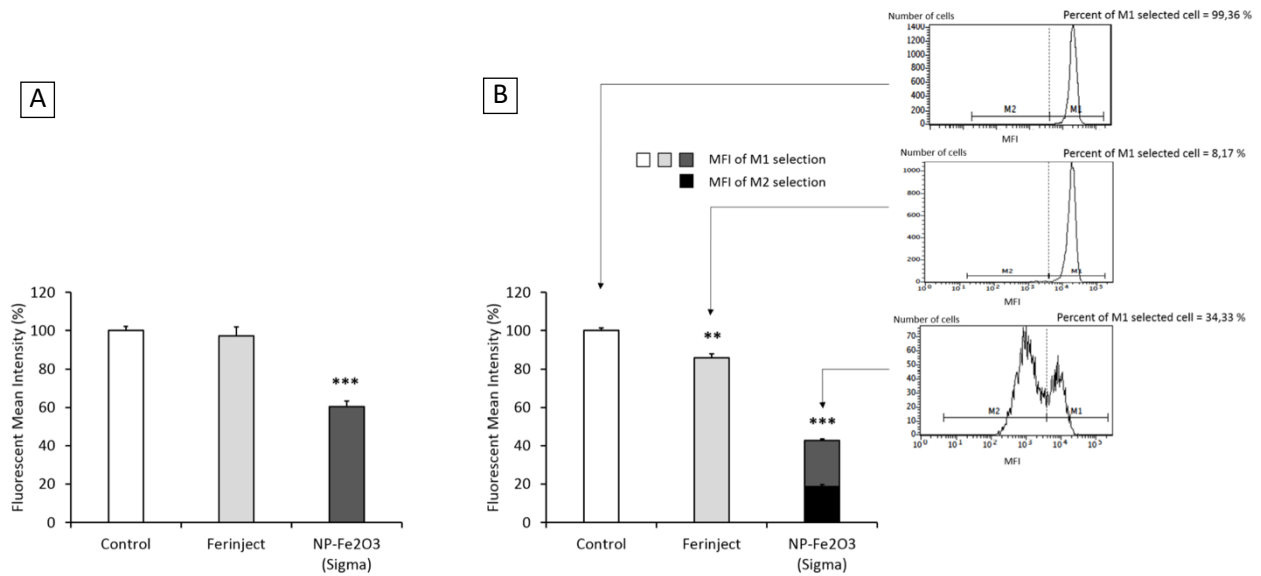


Figure 61. Les autres mécanismes intracellulaires affectés par les NP-Fe₂O₃ (Sigma). A- Test du potentiel mitochondrial. B- Quantification du glutathion.

Les résultats ont tout d’abord confirmé les effets des NP-Fe₂O₃ (Sigma) sur la physiologie des cellules J774 puisque, contrairement au Ferinject®, nous observons une diminution importante (-40%) du potentiel mitochondrial (Figure 61A) ainsi qu’une chute du glutathion (GSH) dont une partie diminue de jusqu’à un taux de 14,2 % par rapport au contrôle (Figure 61B). Par comparaison, le Ferinject® n’induit aucun effet sur le potentiel mitochondrial et seulement un effet très modéré (diminution de 11% du GSH) sur les J774. Les résultats suggèrent donc que les NP-Fe₂O₃ provoquent d’une part une diminution globale des sources d’énergie notamment par une diminution de l’activité mitochondriale responsable de la

production d'adénosine triphosphate (ATP), et d'autre part, elles altèrent les mécanismes de détoxification mis en place par les cellules, en particulier via le GSH qui permet d'éliminer de nombreux xénobiotiques (tels que les métaux) et limite l'accumulation de ROS.

Par conséquent, L'ensemble des tests fonctionnels confirment l'intérêt d'utiliser le Ferinject® comme source de NP-Fe₂O₃ par comparaison avec les NP-Fe₂O₃ (Sigma) bien qu'elles soient moins facilement internalisées. Ces travaux préalables ont permis de choisir le type de NP-Fe₂O₃ le plus adéquat pour notre stratégie thérapeutique. Nous avons donc poursuivi nos expériences sur les macrophages primaires uniquement avec le Ferinject®. Les résultats sont présentés dans la publication ci-dessous soumise en avril 2018 au journal *Nanoscale*.

Utility of macrophages in an antitumor strategy based on the vectorization of iron oxide nanoparticles

*Bastien Dalzon, *, Mélanie Guidetti, Solveig Reymond, Julien Vollaire, Véronique Collin-Faure, Daphna Fenel, † Guy Schoehn, † Josiane Arnaud, † Thierry Rabilloud, † Véronique Josserand, *, and Catherine Aude-Garcia, **

†Univ.Grenoble Alpes, CNRS, CEA, Laboratory of Chemistry and Biology of Metals, BIG-LCBM, 38000 Grenoble, France.

‡Univ. Grenoble Alpes, CNRS, IAB, 38000 Grenoble, France

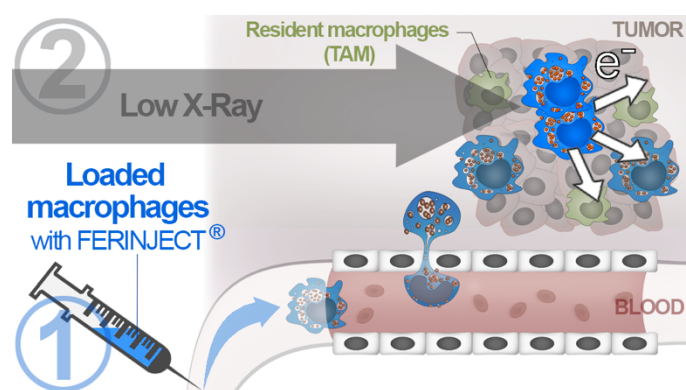
‡Univ.Grenoble Alpes, CNRS, CEA, INAC, SyMMES, RSRM, 38000 Grenoble, France

‡Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, IBS, 38000 Grenoble, France.

‡CHU Grenoble Alpes, Institut de Biologie et de Pathologie, IBP, 38000 Grenoble, France.

Keywords: cancer stem cells, high-Z-element, macrophages, trojan horse, iron oxide nanoparticles, X-Ray, small-animal imaging.

Abstract. Many solid tumors and their metastases are still resistant to current cancer treatments such as chemotherapy and radiotherapy. The presence of a small population of Cancer Stem Cells in tumors is held responsible for relapses. Moreover, the various physical barriers of the organism (e.g. blood brain barrier) prevent many drugs from reaching the targeted cells. In order to alleviate this constraint, we suggest a Trojan horse strategy consisting in the intravascular injection of macrophages loaded with therapeutic nanoparticles (an iron nanoparticle-based solution marketed under the name of FERINJECT®) to bring a high quantity of those in the tumor. The aim of this article is to assess the response of primary macrophages to FERINJECT® via functional assays in order to ensure that the macrophages loaded with these nanoparticles are still relevant for our strategy. Following this first step, we demonstrate that the loaded macrophages injected in blood circulation are able to migrate to the tumor site using small-animal imaging.



Anti-cancer strategy using NP-laden macrophages. Iron-laden macrophages are injected into the bloodstream .1) Macrophages derived from patients' circulating monocytes are cultivated with iron oxide nanoparticles (marketed under the name FERINJECT®). Then, loaded macrophages are injected into the bloodstream and are attracted by signals emitted by the tumor microenvironment. Subsequently, injected macrophages accumulate in the tumor. 2) Low-intensity radiations stimulate iron NP which in turn release toxic photo-electrons in the tumor, leaving the healthy surrounding tissues undamaged.

Cancer is the world's second leading cause of death, and was responsible for 8.8 million deaths in 2015. Nearly 1 in 6 deaths is due to cancer despite major progress in the development of anti-tumoral treatments such as surgery, chemotherapy, radiotherapy and immunotherapy. Solid tumors remain responsible for a high number of deaths due to the presence of cancer stem cells (CSCs) in the tumor, which are particularly resistant to current cancer treatments³³ and are consequently responsible for relapses and metastases which often turn out to be fatal. CSCs, like normal stem cells, are capable of both self-renewal and differentiation into multiple cells. The CSCs population is generally small, but the

number of CSCs depends on the type of tumor and the progression rate in the tumor varies from <0,1% to 30%.⁴⁶ However, they are responsible of the high cellular heterogeneity in the tumor,⁷ which is one of the main reasons accounting for resistance to chemotherapy. Resistance of CSCs is reinforced by the presence of protective mechanisms such as drug efflux transporters (e.g. ATP-binding cassette including P-glycoproteins) at their surface, which prevent the accumulation of drugs in cells.⁶ Moreover, contrary to non-CSCs, CSCs have a high DNA repair capacity and anti-apoptotic mechanisms which jeopardize the efficiency of most current anticancer strategies³⁸. CSCs are also resistant to current

radiotherapy⁹ because they often are in a quiescent state¹⁰.

To increase the efficiency of ionizing radiations in the treatment of solid and resistant tumors, several pre-clinical studies have combined High-Z-element nanoparticles (HZE-NP) with radiation therapy in order to increase the intensity of radiations without damaging the surrounding healthy tissues. This strategy allows to increase the contrast between healthy and cancerous tissues in the absorption of ionizing radiation.¹¹ The stimulation of HZE-NP liberates photoelectrons *in situ*. Their short-range allows these photoelectrons to kill mostly tumor cells with minimal damage to the surrounding tissue.^{12,13} In current clinical experiments HZE-NP are directly injected in the tumor and the most commonly used HZE-NP are gold NP.¹⁴ The three main constraints of this strategy are: 1) Injecting HZE-NP in the tumor can cause injuries and is therefore an invasive method. Moreover, some cancer cells have a low endocytosis capacity¹⁵ and HZE-NP can spread outside the tumor thus limiting their specificity regarding the tumor. 2) Metastases are not always detectable with current imaging technologies so that it is not possible to inject HZE-NP directly in non-detectable small tumors. 3) Gold is a rare and expensive material.¹⁶ 4) Persistent NP such as Gold NP may cause adverse effects after the tumor has been treated. Another method consists in intravascular administration of HZE-NP in the hope that they will spontaneously cross the blood vessels to reach the tumor thanks to the Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect. Indeed, tumors have a high vascularization assorted to a poor lymphatic drainage. This strategy has been considered in the case of many solid tumors but the overall results have revealed that less than 2% of injected NP reached the tumor and in the particular case of glioblastoma (GBM), because of the blood brain barrier, the ratio of NP in the tumor would be even lower.¹⁷ However, the use of nanoparticles to deliver drugs, unlike the use of

drugs only, improves the therapeutic effect. Additionally, the functionalization of particles using antibodies or ligands allows to increase the uptake and the specific targeting of the drug toward specific cells, such as cancer cells. This strategy is still controversial in comparison to unfunctionalized nanoparticles.^{18,19} Often, active targeting by functionalized particles is effective in cell culture but many studies have shown that *in vivo* functionalization is much less efficient²⁰ due to the destruction and/or inactivation of ligands at the surface of particles (opsonization) and the difficulty to cross the various barriers of the organism. This is why, in the present article, we suggest a new Trojan horse strategy in order to protect the particles, overcome the constraints mentioned above and treat resistant tumors, using primary macrophages to specifically carry HZE-NP to the tumor. Induction of inflammation in the tumor allows the recruitment of many circulating immune cells such as neutrophils, lymphocytes^{21,22} and monocytes/macrophages.²³ We chose to use monocytes/macrophages in order to transport NP-Fe₃O₄ for four reasons: 1) macrophages have a high phagocytic capacity and can store a high quantity of HZE NP-Fe₃O₄. 2) Macrophages are known to be present in tumors as Tumor-Associated Macrophages (TAM)^{24,25} 3) These cells are able to cross all body barriers and migrate toward the inflammatory tumor zone. 4) Monocytes are present in the blood circulation and are simple to harvest from the patient's blood and to differentiate into macrophages *in vitro*. Like titanium, gadolinium, quantum dots, *etc.*, iron is an HZE releasing photoelectrons when stimulated by X-Rays of the adequate wavelength (e.g. X-ray beams at 80 KeV cause iron to release photoelectrons within an average range of 80 μ m). Iron is a cheap and abundant metal, and iron oxide nanoparticles are easy to produce. Moreover, macrophages play an important role in iron homeostasis so that iron, unlike other metals, can easily be managed in high quantities by macrophages without inducing a strong risk of

disrupting their viability and their functionalities.²⁸ This is why, for our investigation, we chose iron oxide nanoparticles to investigate tumor treatment by a Trojan horse strategy. In this study, we tested directly NP-Fe₃O₄ source with marketing authorization^{27,28} such as FERINJECT[®]. The goal was to evaluate if the FERINJECT[®] impacted the macrophages in different ways.

Our strategy was divided into five parts. 1) we focused on FERINJECT[®]^{29,30} and we characterized nanoparticles using dynamic light scattering (DLS) and transmission electronic microscopy (TEM). 2) we evaluated the best working dose by performing viability assays. 3) we quantified the amount of particles and iron loaded within the cells. 4) We then assessed the effects of FERINJECT[®] on the functionality of macrophages *in vitro* in order to check whether our iron-loaded macrophages were still able to migrate toward the tumor (assessment of the sensitivity and motility). 5) Finally, by using non-invasive small-animal imaging we confirmed that the iron-loaded primary macrophages injected intravenously into mice were able to migrate toward the tumor.

Nanoparticle behavior. NP dissolution was characterized using DLS. In H₂O and DMEM, FERINJECT was considered monodisperse (percentage of dispersity <15%) and in DMEM supplemented with 1% or 10% SVF, FERINJECT[®] appeared as very polydisperse, i.e., the dispersity was not measurable (Table 1). FERINJECT[®] had a hydrodynamic diameter comprised between 21.6 nm and 25 nm in H₂O or DMEM mediums. After 24 hours of incubation at 37°C, 5% CO₂, in H₂O and DMEM, FERINJECT[®] was still considered monodisperse but with a higher percentage of dispersity. Overall, after incubation 24h at 37°C, the hydrodynamic diameter decreased very slightly (diameter of NP decreases by 1 to 3.4 nm), suggesting minimal dissolution (Table 1). Examination by Transmission Electron Microscopy (TEM) revealed that FERINJECT[®] NP have an irregular stick shape with a length between 18,9 nm and 23,9 nm. No aggregation is visualized in all conditions (Figure 1A-1B and Table 2). Thus, for DMEM with SVF, the high dispersity observed with DLS measurement is due to the proteins present in serum. The size measurement and the light tendency of dissolution of FERINJECT observed by TEM were similar to DLS characterization.

Results and discussion

Ferinject								
Medium	H2O		DMEM		DMEM+1%SVF		DMEM+10%SVF	
Time	0h	24h	0h	24h	0h	24h	0h	24h
Size (nm)	23,4 ±0,4	22,4 ±0,4	24,4 ±0,3	21,9 ±0,4	23,8 ±1,3	24,9 ±0,5	25,0 ±0,5	21,6 ±0,6
Dispersity (%)	8,8 ±6,9	11,7 ±6,9	8,5 ±2,4	12,2 ±3,3	multimodal	multimodal	multimodal	multimodal
n = 3								

Table 1: Characterization of FERINEJECT[®] by DLS at t0 and after 24h incubation in H₂O or DMEM with or without SVF.

RESULTATS

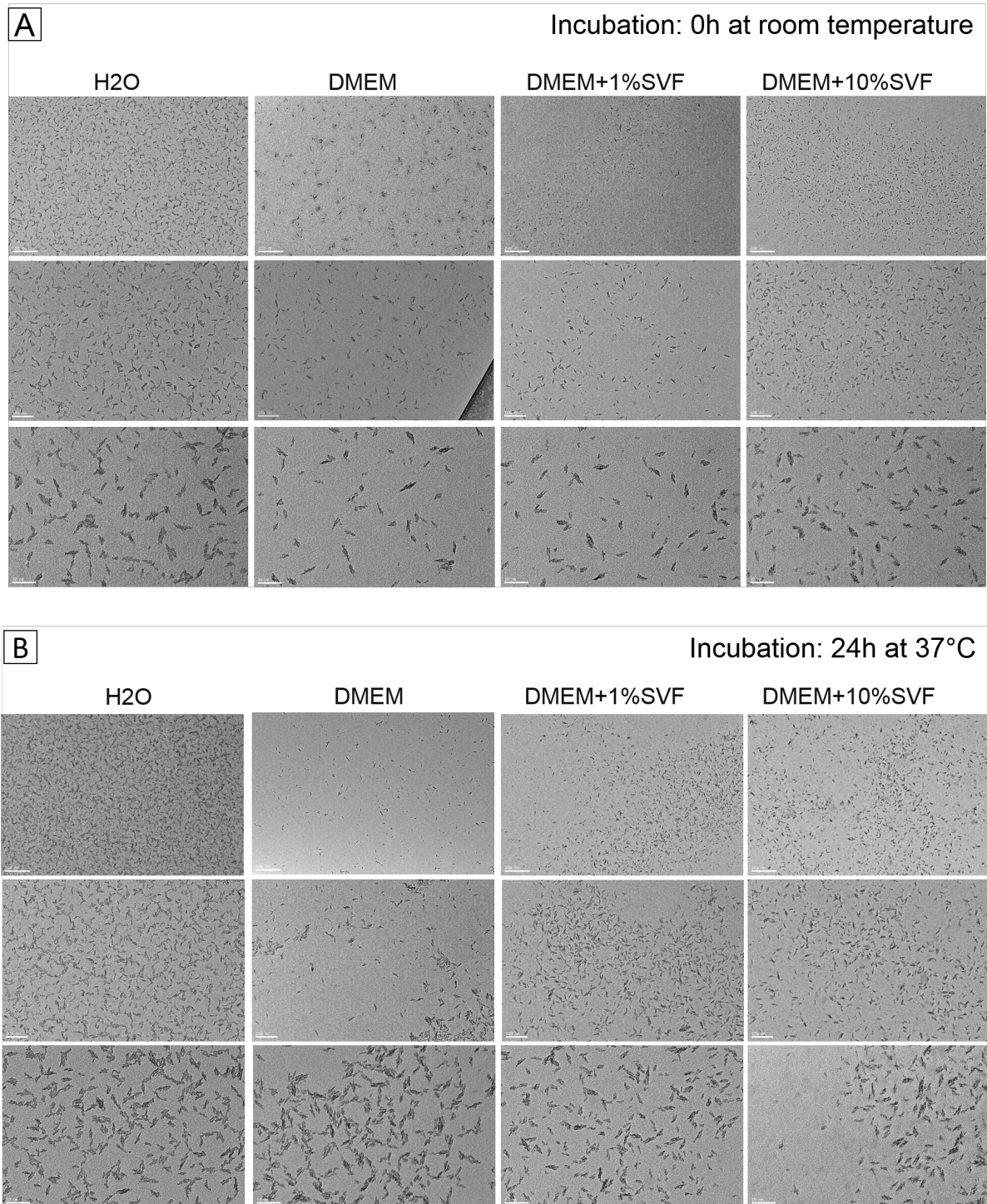


Figure 1: Characterization of NP-Fe O (FERINEJECT[®]) by TEM. Nanoparticles were incubated in H₂O or DMEM for two incubation periods in order to distinguish the shape, size and state of aggregation. A- 0h of incubation B- 24h of incubation at 37°C, 5%CO₂

Ferinject								
Medium	H2O		DMEM		DMEM+1%SVF		DMEM+10%SVF	
Time	0h	24h	0h	24h	0h	24h	0h	24h
Length (nm)	22,7 ±5,6	18.9 ±4,3	23,9 ±5,9	22,5 ±6,5	23,1 ±6,7	21.6 ±6,1	22,0 ±5,6	21.4 ±5,6
n = 3								

Table 2: Characterization of FERINEJECT® by TEM at t0 and after 24h incubation in H2O or DMEM with or without SVF.

Specificity of cell type regarding iron uptake. We wanted to assess the capacity of cancer cells such as GBM to engulf iron in high quantity when contact with 1mg/mL of FERINEJECT®. This assessment was achieved using ICP-MS and it proves that L9 and F98 GBM cells cannot store FERINEJECT® (only 0.36 and 0.15 pg/cell of iron was stored) (Figure 2A). The low internalization of FERINEJECT® is not

due to a high mortality of cells (Figure 2B). The lack of iron accumulation in typical tumor cells explain the importance of using macrophages in order to enhance the containment of iron into the tumor site besides the ability to target the tumor and cross the body barriers. Without macrophages, particles cannot accumulate into tumor and therefore may diffuse out of the tumor zone.

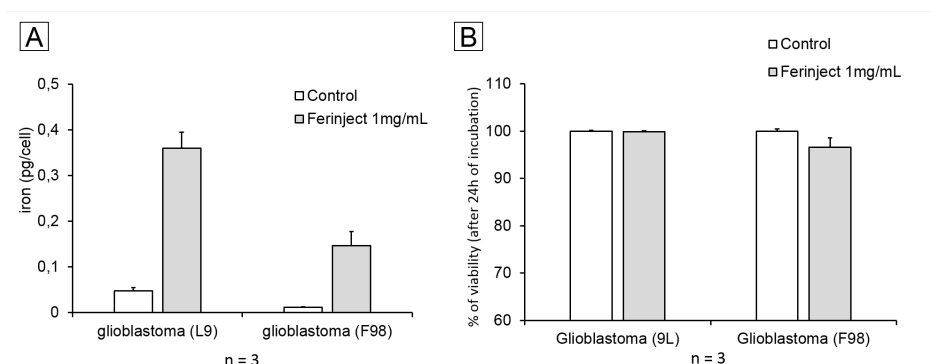


Figure 2: FERINEJECT® uptake by tumor cells. A- Quantity of the iron engulfed by tumor cells using ICP-MS method (condition with or without FERINEJECT® exposure). B Viability of glioblastoma L9 and F98 cells in contact with an increasing dose of FERINEJECT®. Viability was measured using propidium iodide (condition with or without FERINEJECT® exposure).

Working dose determination of FERINEJECT® on primary macrophages. For a therapeutic scheme, the concentration of FERINEJECT® must not induce a high lethality on primary macrophages. We considered a 20% of lethality to be the upper limit for the compromise between the cellular loading in NP and their viability. The results displayed in figure 3 show that FERINEJECT® is only slightly toxic to primary macrophages. LD20 was only reached at a

concentration of over 1mg/mL. Consequently, at this stage of our research, the FERINEJECT® could be used at this high concentration (1mg/mL) in order to store a maximum amount of iron into macrophages without killing them. We considered that 1mg/mL is a strong concentration in comparison to other articles studying the impact of zinc oxide,^{31,32} silver³³ and copper oxide³⁴ nanoparticles on macrophages.

RESULTATS

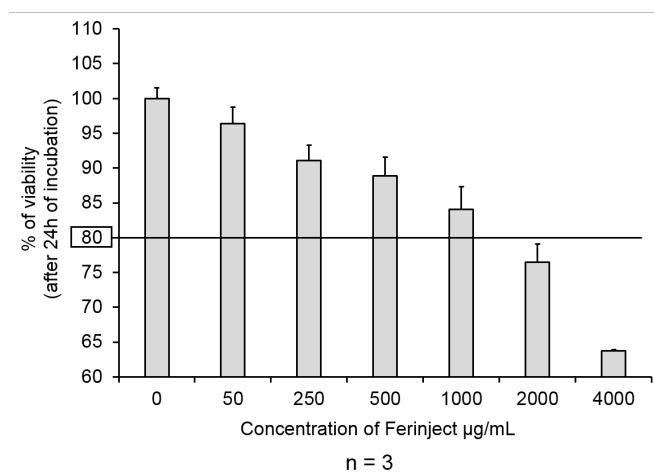


Figure 3: Viability of primary mouse macrophages. Cells were exposed for 24h to increasing doses of FERINEJECT[®]. Viability was measured using propidium iodide (1µg/mL).

Iron uptake by primary macrophages. We first performed qualitative experiments. Perls staining, commonly used in optical microscopy in order to reveal the presence of ferric elements inside the cells, revealed blue iron deposits in primary cells (Figure 4A). Iron loading in the cells was accurately quantify by the bathophenanthroline assay, which showed an important quantity of iron in the macrophages exposed to FERINEJECT[®], contrary to GBM cells (Figure 2A). Indeed, after 24 hours of incubation, 8,3 pg/cell of iron was internalized by primary macrophages (Figure 4B)

which is 23 times bigger than L9 cells and 56 times bigger than F98 cells. However, when cells were left in culture for an additional 24h incubation period in the absence of FERINEJECT[®], we observed a slight release of iron (decrease at 6,5 pg/cell) and this was even more marked after 72 hours of recovery (decrease at 2,7 pg/cell). Thus, the release of iron from macrophages proves that the treatment of tumor with low X-ray doses should not occur more than 24h after injection of loaded macrophages.

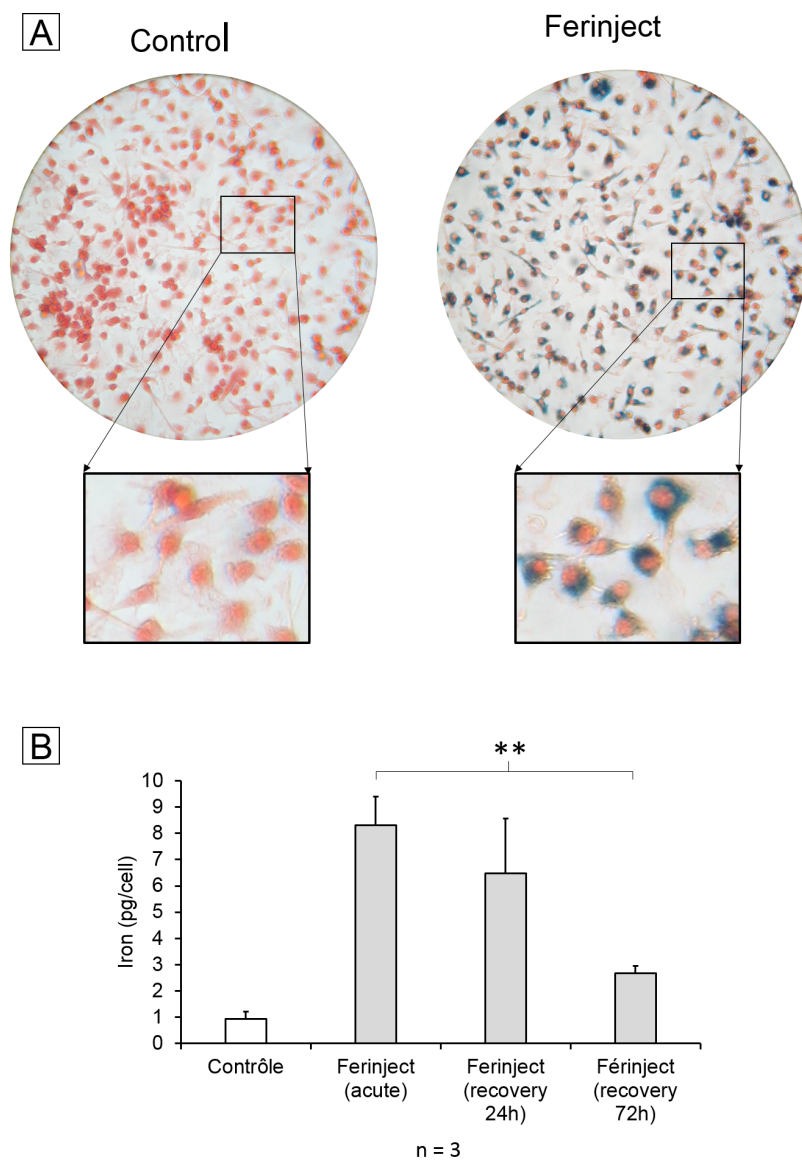


Figure 4: Presence of iron in primary macrophages. A-Perls staining: red staining: safranin cytosolic staining; blue staining: complex $KFe[Fe(CN)_6]$, named prussian blue. B- Quantitative assessment of the iron engulfed by primary macrophages using bathophenanthroline method. Statistical confidence (Student T-test) is indicate as follows $**p \leq 0,01$.

Functional studies of primary macrophages.

Functional studies were set up to determine if macrophages loaded with iron particles are still able to respond to stimuli and move towards inflammatory zones such as wounds, infections and, what is more important to our study, tumors. We tested the impact of FERINJECT® on the classical functions of macrophages such as the phagocytic ability, the modulation of the LPS-induced production of

cytokines and NO. Regarding phagocytosis, flow cytometry allows the investigation of two parameters such as the proportion of cells that remain phagocytic after being exposed to NP and the intensity of the phagocytic activity for phagocytosis-positive cells. When primary macrophages were exposed to FERINJECT®, the cell proportion and the intensity of the phagocytic intensity was unchanged in comparison to control without FERINJECT® (Figure 5A and 5B).

RESULTATS

The results did not show an effect of FERINJECT® on the phagocytosis capacity of primary macrophages. These results were confirmed with the visualization of the integrity of the F.actin cytoskeleton. We did not observe any differences between the cells incubated with FERINJECT® compared to controls without NP (Figure 6). Regarding the production of NO, we showed that, after stimulation with LPS, the secretion of NO is very slightly decreased in the presence of FERINJECT® i.e. by 11%, which is not statistically

significant (Figure 7A). Flow cytometric analysis revealed that FERINJECT® did not affect the production of IL-6 and TNF α pro-inflammatory cytokines. The secretion of IL-10 anti-inflammatory cytokines was not significantly modified too. However, MCP-1 pro-inflammatory secretion significantly decreased (by 26.6%) (Figure 7B). All these results, showed that FERINJECT® induce only a marginal effect on the functionality of macrophages. FERINJECT® appear to be a good candidate on the therapeutic strategy.

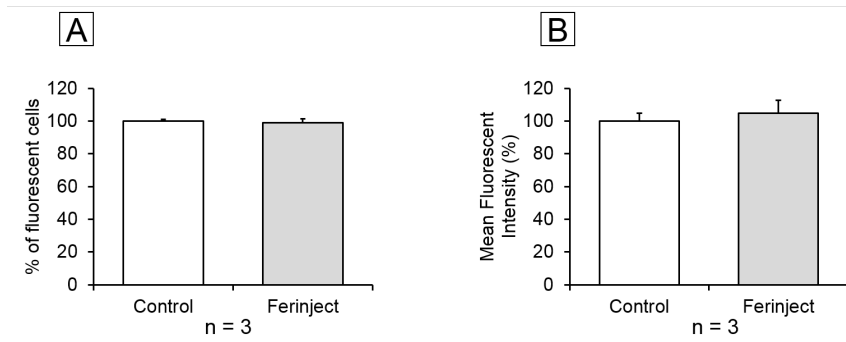


Figure 5: Phagocytic ability. A- Percent of cell able to phagocyte fluorescent FITC-labeled latex beads (positive cells). B- Phagocytic ability of positive cells.

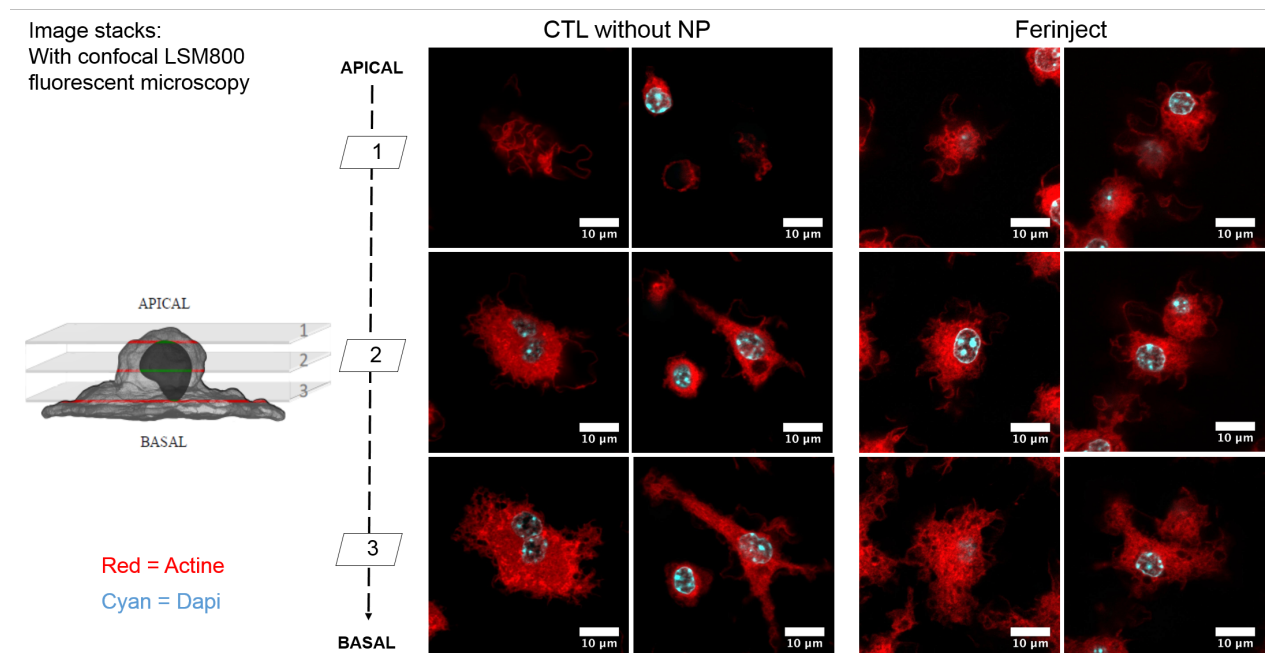


Figure 6: Confocal microscopy: observation of actin filaments with phalloïdin labelled in red (Atto 560), cell nucleus is colored by Dapi in blue. Upper section = apical microscopy view; middle section = center of cell; lower section = basal microscopy view.

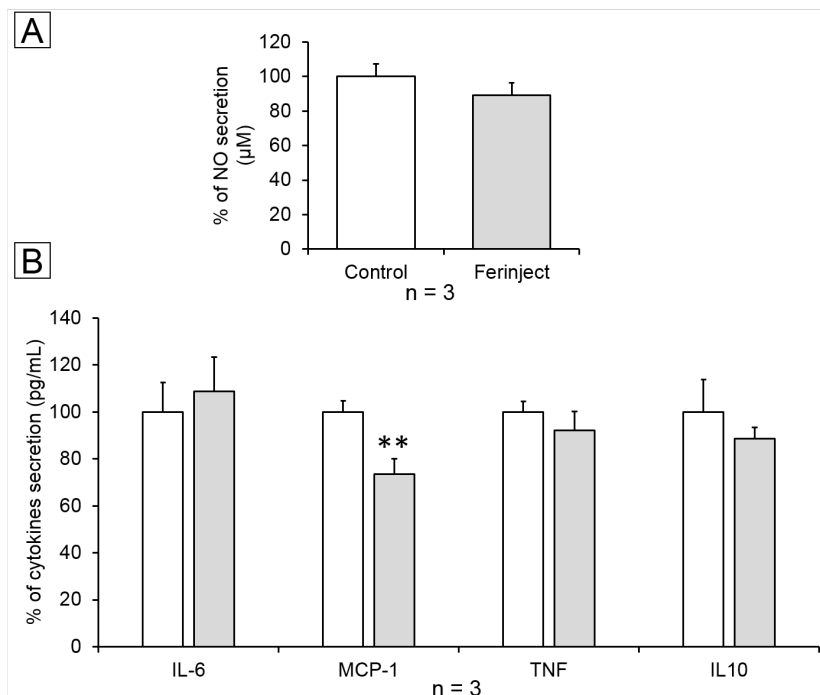


Figure 7: Inflammation ability. A- NO secretion with LPS stimulation. B- Secretion of inflammatory cytokines with LPS stimulation. Statistical confidence (Student T-test) is indicate as follows ** $p \leq 0,01$.

Transwell migration assay. We set up the Transwell migration assay to assess the ability of primary macrophages to migrate toward inflammatory stimuli. This assay confirmed the phagocytosis assays. FERINJECT® did not inhibit the motility of primary macrophages and did not prevent the ability of macrophages to respond to

inflammatory stimuli such as LPS. We showed that, for the two conditions (with and without exposure to FERINJECT®) macrophages were able to cross the membrane and adhere to the basal side of the membrane in a transwell assay. Moreover, the cells were still responsive to a chemotactic stimulus such as LPS. (Figure 8).

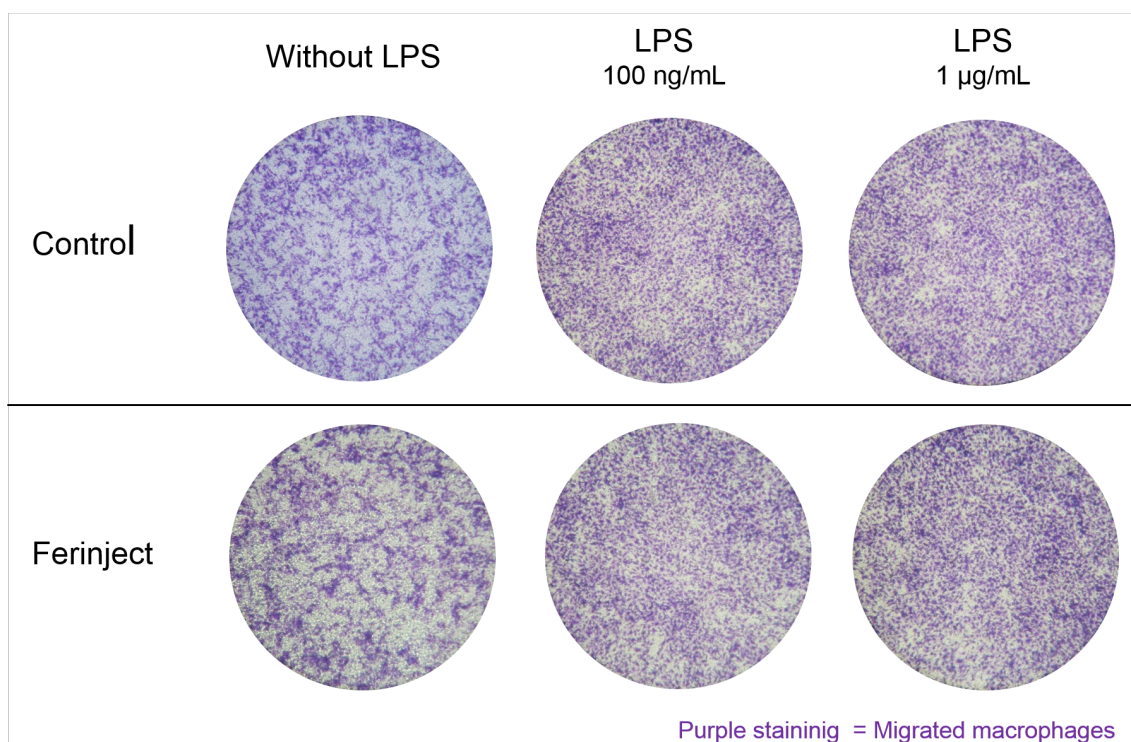


Figure 8: Migratory ability using 5nm pores Transwell membranes. Macrophages cross the membrane (basal side) was stained by crystal violet 0,1%.

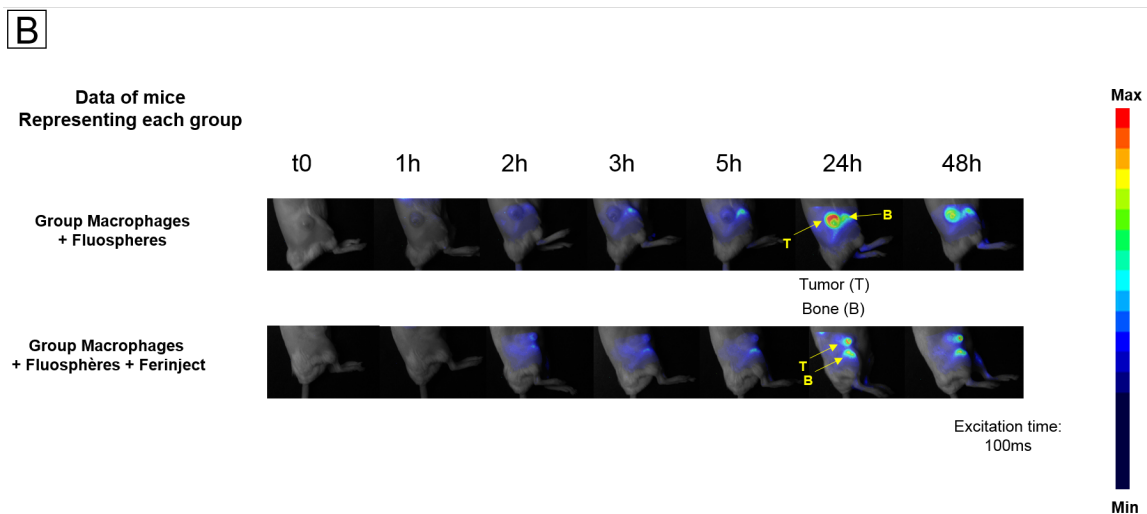
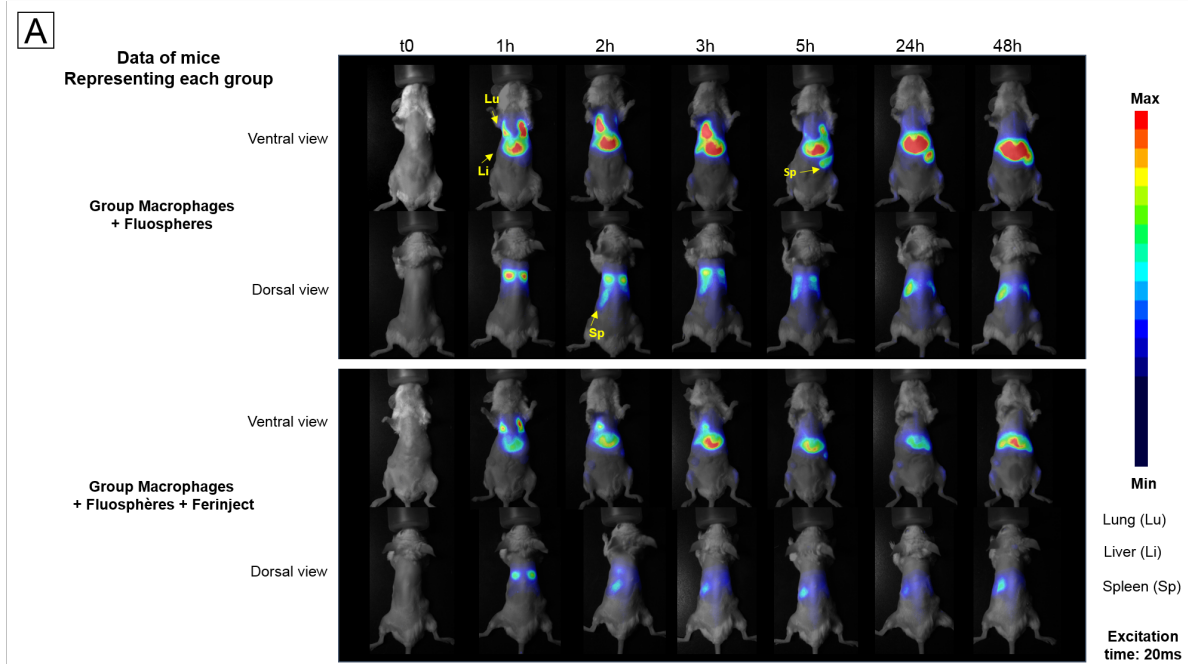
Small animal imaging. We wanted to approach real-use conditions to confirm that primary labeled macrophages injected into the blood stream were able to migrate specifically to the tumor zone. Small-animal imaging was used to determine the *in vivo* biodistribution of loaded macrophages and to assess their tumor uptake kinetics. Non-invasive fluorescence imaging was performed over a span of 48h and we showed that injected macrophages quickly accumulated (1h after injection) in macrophages-rich organs such as liver and lungs. Interestingly, at 24 hours post injection, the presence of labeled macrophages in lungs had drastically decreased. On the contrary, we observed an uptake of labeled macrophages in bones and a massive accumulation in the spleen after 5 hours (Figure 9A). Small-animal imaging revealed a moderate but significant recruitment of labeled macrophages to the tumor site 24h after injection (Figure 9B). These results were

similar for the two conditions, i.e. the macrophages loaded with Fluospheres only and the macrophages loaded with Fluospheres and FERINJECT®, thus proving that FERINJECT® did not alter the macrophages sensitivity to stimuli and their ability to migrate toward the tumor. However, the fluorescence signal in the tumor slightly decreased between 24h and 48h after injection, a factor which rises some insights into a potential clinical strategy. Indeed, we observed that the most optimal rate of macrophage accumulation in the tumor should occur at 24h after injection. After 48h, mouse organs were retrieved and imaged individually (Figure 9C). The results confirmed the massive and lasting accumulation of macrophages in detoxifying organs, the lungs and to a lesser extent in the lymph nodes. They also confirmed the very significant accumulation of loaded macrophages at the tumor site. The measurement of the *ex vivo* fluorescence signal in the tumor in

RESULTATS

comparison with the healthy contralateral skin showed a tumor/skin ratio of 9 for the macrophages loaded with fluospheres only and of 6.7 for the macrophages simultaneously loaded with fluospheres and FERINJECT® (Figure 9D). The recruitment of the macrophages in the tumor was slightly lower when charged by FERINJECT® but this difference may be interpreted by the fact that macrophages were more

heavily loaded in the fluorescent probe + FERINJECT® condition than in the fluospheres only condition. However, these results clearly illustrated the capacity of injected primary macrophages to be recruited by tumors and this promotes the concept of using iron particles loaded macrophages to treat solid and resistant tumors. Moreover, this strategy may also be applied to other types of particles and/or drugs.



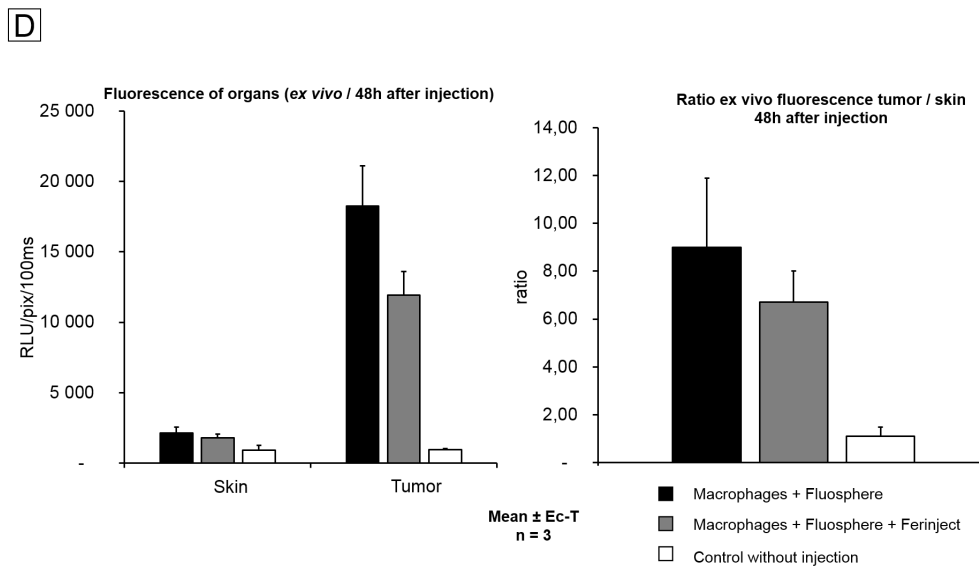
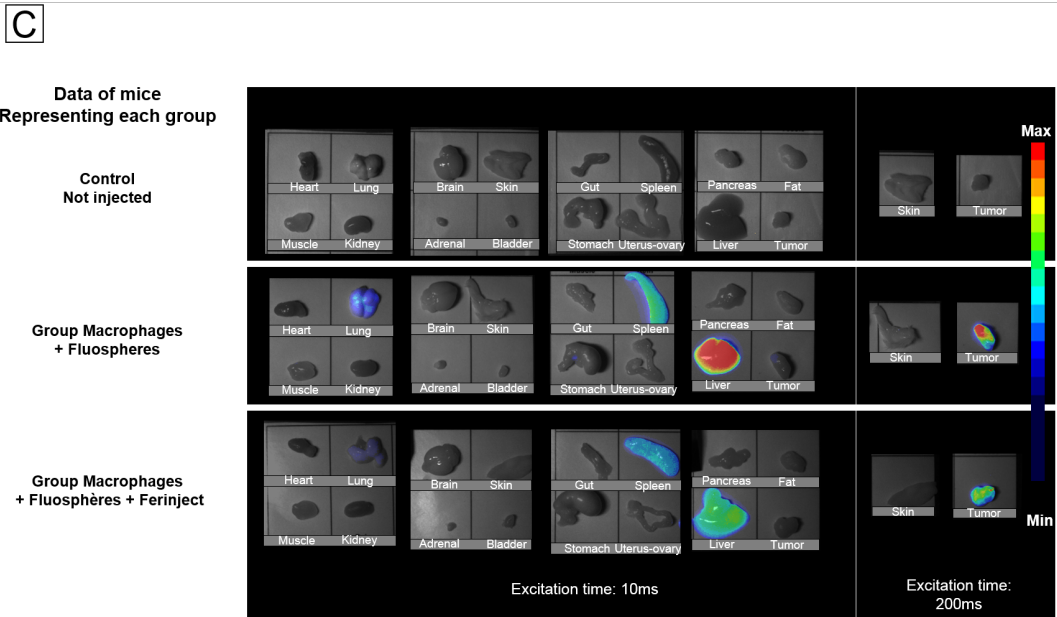


Figure 9: Small animal imagery, BalB/c mice with subcutaneous mammary tumor. A- whole body in vivo fluorescence imaging B- whole body in vivo fluorescence imaging, focus on the tumor site C- Ex vivo fluorescence imaging on isolated tissue samples 48h post injection D- Ex vivo fluorescence imaging on isolated tissue samples 48h post injection. (First graph) quantitative measurement of the fluorescence of tumor in comparison to contralateral skin, 48h after intravenous injection of labeled macrophages. (Second graph) ratio of fluorescence intensity between contralateral skin and tumor.

Conclusion. In summary, even if anticancer treatments are more and more effective, the mortality rate due to relapses of solid tumor remains too high and the concept of CSCs can explain the most of the therapeutic failures. The development of NP offers

new possibilities of targeted therapies but the targeting efficiency and their internalization by cancer cells are still controversial. In order to increase the specific accumulation of NP such as HZE-NP (e.g. NP-Fe₂O₃) at the tumor site, Trojan horse strategy

using macrophages is an attractive idea. The present results illustrated that FERINJECT[®] loaded at 1mg/mL did not alter (or very marginally) primary macrophages function. The recruitment of injected primary macrophages by tumor sites was successfully visualized by *in vivo* small-animal imaging. Finally, the results demonstrated that macrophages are promising tools to accumulate and maintain large amount of anticancerous particles (HZE nanoparticles). In the future, additional assays will have to be completed in order to enhance the attraction of injected macrophages to the tumor and the quantity of particles engulfed while limiting damages to macrophages. One possibility would be to inject macrophages preactivated *in vitro* by inflammatory stimuli. The second possibility would be to induce a better inflammatory signal²² in the tumor zone e.g. using a first wave of low-intensity X-rays. We consider this strategy as a very promising strategy against resistant tumors such as GBM. After assessing the capacity of tumors to attract injected macrophages loaded with particles, our next objective is to assess the capacity of loaded macrophages to migrate to GBM and thus cross the blood brain barrier which constitutes an additional constraint.

Finally, recent results published by Zanganeh *et al.*³⁵ have demonstrated that the injection in blood circulation of NP-Fe₂O₃ used to treat anemia proved to be useful tools to decrease tumor growth. The anti-tumor effect is due to a change in tumor microenvironment. Indeed, tumors are largely composed of anti-inflammatory M2 macrophages (TAM) which favor the development of the tumor. NP-Fe₂O₃ induce the inflammatory polarization of macrophages (M1 macrophages),³⁵ which become more efficient to detect and interrupt cancer development. Our Trojan horse strategy offers two main advantages: 1) the use of FERINJECT[®] will enhance the efficiency of radiotherapy thanks to the release of photoelectrons in the tumor. 2) The uptake

of FERINJECT[®] by injected macrophages will stimulate their ability to kill cancer cells. Contrary to strategies relying on other nanoparticles such as gold, this double effect of NP-Fe₂O₃ similar to FERINJECT[®] appears to be a major advantage in the development of NP-based anti-tumor strategies.

Material and methods

Nanoparticles. Iron carboxymaltose (FERINJECT[®], 50mg/mL) was purchased from Vifor Pharma (Bern, Switzerland). The hydrodynamic diameter and the particle size distribution were characterized by dynamic light scattering (DLS) after dilution in H₂O or culture medium DMEM after 0h or 24h of incubation at 37°C, 5% CO₂. Nanoparticles were diluted at 10 µg/mL for the measurement.

Transmission Electron Microscopy (TEM) for nanoparticle characterization. The negative Stain Mica-carbon Flotation Technique (MFT) was used: samples were absorbed to the clean side of a carbon film on mica, stained and transferred to a 400-mesh copper grid. The images were taken under low dose conditions ($<10 \text{ e}^-/\text{Å}^2$) at a magnification of 11Kx, 13Kx, 23Kx and 30Kx times with defocus values between 1.2 and 2.5 µm on a Tecnai 12 LaB6 electron microscope at 120 kV accelerating voltage using CCD Camera Gatan Orius 1000.

Cell culture. Primary mouse macrophages were obtained from bone marrows as described by Schleicher and Bogdan³⁶, Tarakanova *et al.*³⁷ and Triboulet *et al.*³⁸ Briefly, bone marrow was aseptically collected from the femur and tibiae of 6 weeks-old C57Bl6 mice sacrificed by cervical dislocation. The marrow plugs were dissociated by repeated flushing in the culture medium (DMEM supplemented with 20% v/v L929 cell culture

supernatant, 10% v/v fetal bovine serum, 5% v/v horse serum, 2mM glutamine and 1mM sodium pyruvate) and cells were plated on non-adherent cell culture T175 flasks (Greiner bio-one CellStar). An equal volume of medium was added after 4 days in culture. After 7 days of culture, the cells were scraped and replated at 1 million cells/ml in the same medium, except that the L929 supernatant was lowered to 10% v/v. Mature macrophages were obtained after an additional 3 days, and were viable and stable up to 2 weeks, provided that the culture medium was renewed every 3 days. For treatment with iron oxide nanoparticles, the following scheme was used: cells were first seeded at 1,000,000 cells/ml in 6-well plates (2 ml per well). They were exposed to nanoparticles on the following day and harvested after a further 24 hours in culture. For all assays, cell viability was measured using either trypan blue exclusion or using propidium iodide with a flow cytometer.

9L (from Sigma, catalog number: 94110705) and F98 glioma (from ATCC, catalog number: CRL-2397) were obtained from respectively Sigma (Darmstadt Germany) and ATCC (Middlesex UK). Both cell lines were grown in DMEM GlutaMAX high glucose with pyruvate, supplemented with 10 % fetal bovine serum and 1 % penicillin / streptomycin at 37°C, 5% CO₂. Both cell lines were grown in monolayer and trypsin was used during passing.

Perls Staining. Cells were incubated at 500,000 cells/mL for 24h at 37°C; 5%CO₂ in 6-well plates. They were then exposed to FERINJECT[®] 1mg/mL for 24h. Cells were rinsed twice with PBS and fixed with PFA 4% for 20 minutes at room temperature. Then, they were rinsed twice with PBS before adding 2mL of 10mg/mL potassium ferrocyanide (II) in 3% hydrochloric and cells were incubated for 15 min at 60°C to obtain a blue color reaction. After two rinses with PBS, cells were counterstain for five minutes

with safranine 2,5mg/mL and rinsed twice with PBS before microscopic examination.

Quantitative bathophenanthroline assay. Cells were incubated at 500,000 per mL for 24h at 37°C; 5%CO₂ in 6 well plates. Then, they were treated with 1mg/mL of FERINJECT[®] for 24h. Cells were recovered using centrifugation at 290g and were washed twice with PBS. Cell pellets were dissolved in 500µL of aqua regia (mix of HCL 3M and HNO₃ 2.5M) for two days. 180µL of the cell lysate were taken, to which 380µL of saturated ammonium acetate, 72µL of 380mg/mL sodium ascorbate and 144µL of 17mg/mL bathophenanthroline disulfonate were added in this order. The mixture was incubated at room temperature for 30 minutes. The absorbance was measured at 535 nm. The quantity of iron is calculated with a calibration range from 0 to 500 µg/mL of iron (Mohr's salt).

Quantitative ICP-MS method. Cellular uptake of FERINJECT[®] was measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). 500 000 cells were plated in 6-well plates. 24h later, the media was changed with media containing different concentrations of FERINJECT[®]. After 24h incubation, the wells were rinsed two times with PBS and trypsinized. The cells were counted and the samples centrifuged before removing the supernatants. Before ICP-MS measurement, the samples were mineralized in 500 µL nitric acid and diluted in ultrapure water containing internal standard (Gallium). Data depicts the average iron mass uptake per cell.

Phagocytosis assay. The phagocytic activity was measured using fluorescent latex beads (1µm diameter, green labelled, catalog number # L4655 from Sigma-Aldrich) and flow cytometry, as described by Abel *et al.*³⁹ and Triboulet *et al.*³⁸

NO production. The cells were grown to confluence in a 6 well plate. Then half of the wells were treated with 100 ng/mL lipopolysaccharide (LPS, from salmonella), and arginine monohydrochloride was added to all the wells (5 mM final concentration) to give a high concentration of substrate for the nitric oxide synthases. After 24 hours of incubation, the cell culture medium was recovered, centrifuged at 10,000 g for 10 minutes to remove cells and debris, and the nitrite concentration was read at 540 nm after adding an equal volume of Griess reagent (Griess' reagent for nitrite, catalog number #03553 from Sigma-Aldrich). It was then incubated at room temperature for 30 minutes. The absorbance was measured at 540 nm.

Cytokines. Tumor necrosis factor (TNF α), interleukin 6 (IL-6), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and interleukin 10 (IL10) concentrations were measured in the culture supernatant of cells exposed to NP and activated by LPS, using the Mouse Inflammation Cytometric Bead Array kit (BD Biosciences, Rungis, France)) according to the manufacturer' instructions. The measures were performed on a FacsCalibur flow cytometer and the data were analyzed using FCAP Array software.

F-Actin staining. Cells were cultured at 80 000 cells/mL on coverslips placed in 6-well plates and exposed to NP for 24h at 37°C, 5% CO₂. At the end of the exposure, cells were washed twice in PBS then, they were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 minutes at room temperature. Cells were permeabilized with Triton X100 at 0.1% diluted in PBS for 5 minutes at room temperature. They were washed twice in PBS and incubated with 500nM Phalloidin-Atto 550 (Sigma-Aldrich) for 20 minutes at room temperature in the dark. Finally, the cells attached to the coverslips were washed twice in PBS

and mounted with "Vectashield mounting medium for fluorescence with DAPI" (ThermoScientific, Waltham, Massachusetts USA). Pictures were obtained using LSM 800 confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany), lens 63x/1,4 oil and numerical zoom=2. Colors were added using FIJI software.

Transwell migration assay. Cells were seeded at 200,000 per Transwell filter (5 μ m, Sigma-Aldrich) in the upper compartment and incubated for 24h at 37°C, 5% CO₂. The next day, nanoparticles were added for 24h in both compartments of the transwells. At the end of incubation period, culture medium was removed from the upper compartment. Transwell filters were washed in two successive baths of PBS, fixed with cold ethanol 50% for 20 min and rinsed once with PBS1X. Cells having adhered to Transwell filters were coloured with 0,1% crystal violet for 15 to 30 min. Transwell filters were washed again in two successive baths of PBS. Cells which had not migrated across the Transwell filters were removed by wiping the upper side compartment with a cotton swab. Transwell filters were washed again in two successive baths of PBS. Cells having migrated were observed and counted by light microscopy.

Animal experiments. All animal experiments were conducted in agreement with the Principles of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health publication no. 86–23, revised 1985) and approved by the regional ethics committee.

Mammary tumor model. Female 10 weeks old BALB/c mice (Janvier, Le Genest-Isle, France) were anesthetized (isoflurane/air 4% for induction and 2% thereafter) and a suspension of 4T1 cells (ATCC®-CRL-2539™; 1x10⁶ in 200 μ L phosphate-buffered saline) were injected subcutaneously on the right flank. Ten days later tumor volumes had reached 156 \pm 54 mm³ and mice were distributed in 3 groups so

that the mean tumor volumes and standard deviations were similar in all groups. Then mice were injected intravenously by a suspension of macrophages (2.5×10^6 macrophages in 200 μ L phosphate-buffered saline) that had been pre-loaded overnight with Fluospheres 400 μ g/mL (Dark Red 0.2 μ m; Thermofisher) or Fluospheres 400 μ g/mL + FERINJECT 1mg/mL.

***In vivo* whole body fluorescence imaging.**

Fluorescence imaging was performed with a NIR 2D-fluorescence reflectance imaging device (Fluobeam[®]700, Fluoptics, France). The excitation was provided by a class 1 expanded laser source at 680 nm and the fluorescence signal was collected by a CCD through a high pass filter >700 nm. Mice were anesthetized (isoflurane/air 4% for induction and 2% thereafter) and whole body fluorescence imaging was performed before and 1, 2, 3, 5, 24 and 48h hours for the tumor model. For image analyses regions of interest were defined on the tumor site, contralateral site, liver, lung, spleen and femur bone. Results were expressed as tumor/contralateral skin site ratios. At the final time point, mice were euthanized and the organs were harvested for *ex-vivo* fluorescence imaging of the isolated organs.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail (T. Rabilloud): thierry.rabilloud@cea.fr

*E-mail (V. Josserand): veronique.josserand@univ-grenoble-alpes.fr

*E-mail (C. Aude-Garcia): catherine.aude-garcia@cea.fr

Author Contributions

B.D., C.A-G performed the DLS, phagocytosis, NO and cytokines experiments. In addition, B.D.

performed the F-Actin and Perls staining and migratory assay. M.G., J.V. and V.J. performed small animal imaging. S.R. and J.A. performed ICP-MS. In addition, S.R. performed viability assays. D.F. and G.S. performed TEM microscopy visualization. B.D., C.A-G. and V.J. designed and supervised the overall research. The manuscript was written by B.D., T.R and V.J. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Funding Sources

This work was supported by CEA transverse toxicology program.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

Small animal imaging experiments were performed on the OPTIMAL platform (Institute for Advanced Biosciences, Grenoble, France) and optical imaging systems were acquired thanks to France Life Imaging (French program “Investissement d’Avenir” grant; “Infrastructure d’avenir en Biologie Sante”, ANR-11-INBS-44 0006).

A sincere thank you to Maxime Petit (Université Toulouse 1-Capitole) for his diligent proofreading of the manuscript and Bernard Verrier (Institute of Biology and Protein Chemistry, IBCP, LBTI) for suggestions concerning the *in vivo* experiments.

ABBREVIATIONS

CSC, cancer stem cell; F-actin, actin’s filamentous form; HZE, High-Z-element; ICP-MS, inductively coupled plasma mass spectrometry; IL, interleukin; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; NP, nanoparticle.

REFERENCES

- (1) World Health Organization Programmes Cancer Page. www.who.int/cancer/en/ access Nov 10 2017
- (2) Visvader, J. E.; Lindeman, G. J. Cancer Stem Cells in Solid Tumours: Accumulating Evidence and Unresolved Questions. *Nature Reviews Cancer* **2008**, *8*, 755–768.
- (3) Beier, D.; Schulz, J. B.; Beier, C. P. Chemoresistance of Glioblastoma Cancer Stem Cells - Much More Complex than Expected. *Molecular Cancer* **2011**, *10*, 128.
- (4) Dean, M.; Fojo, T.; Bates, S. Tumour Stem Cells and Drug Resistance. *Nature Reviews Cancer* **2005**, *5*, 275–284.
- (5) Vinogradov, S.; Wei, X. Cancer Stem Cells and Drug Resistance: The Potential of Nanomedicine. *Nanomedicine* **2012**, *7*, 597–615.
- (6) Adams, J. M.; Strasser, A. Is Tumor Growth Sustained by Rare Cancer Stem Cells or Dominant Clones? *Cancer Research* **2008**, *68*, 4018–4021.
- (7) Nassar, D.; Blanpain, C. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **2016**, *11*, 47–76.
- (8) Skvortsov, S.; Debbage, P.; Lukas, P.; Skvortsova, I. Crosstalk between DNA Repair and Cancer Stem Cell (CSC) Associated Intracellular Pathways. *Seminars in Cancer Biology* **2015**, *31*, 36–42.
- (9) Rycaj, K.; Tang, D. G. Cancer Stem Cells and Radioresistance. *International Journal of Radiation Biology* **2014**, *90*, 615–621.
- (10) Pajonk, F.; Vlashi, E.; McBride, W. H. Radiation Resistance of Cancer Stem Cells: The 4 R's of Radiobiology Revisited. *STEM CELLS* **2010**, *28*, 639–648.
- (11) McMahon, S. J.; Mendenhall, M. H.; Jain, S.; Currell, F. Radiotherapy in the Presence of Contrast Agents: A General Figure of Merit and Its Application to Gold Nanoparticles. *Physics in Medicine and Biology* **2008**, *53*, 5635–5651.
- (12) Yamada, M.; Foote, M.; Prow, T. W. Therapeutic Gold, Silver, and Platinum Nanoparticles: Therapeutic Metal Nanoparticles. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2015**, *7*, 428–445.
- (13) Chang, M.-Y.; Shiau, A.-L.; Chen, Y.-H.; Chang, C.-J.; Chen, H. H.-W.; Wu, C.-L. Increased Apoptotic Potential and Dose-Enhancing Effect of Gold Nanoparticles in Combination with Single-Dose Clinical Electron Beams on Tumor-Bearing Mice. *Cancer Science* **2008**, *99*, 1479–1484.
- (14) Jain, S.; Hirst, D. G.; O'Sullivan, J. M. Gold Nanoparticles as Novel Agents for Cancer Therapy. *The British Journal of Radiology* **2012**, *85*, 101–113.
- (15) Chauhan, S. S.; Liang, X. J.; Su, A. W.; Pai-Panandiker, A.; Shen, D. W.; Hanover, J. A.; Gottesman, M. M. Reduced Endocytosis and Altered Lysosome Function in Cisplatin-Resistant Cell Lines. *British Journal of Cancer* **2003**, *88* (8), 1327–1334.
- (16) Cooper, D. R.; Bekah, D.; Nadeau, J. L. Gold Nanoparticles and Their Alternatives for Radiation Therapy Enhancement. *Frontiers in Chemistry* **2014**, *2*.
- (17) Bae, Y. H.; Park, K. Targeted Drug Delivery to Tumors: Myths, Reality and Possibility. *Journal of Controlled Release* **2011**, *153*, 198–205.
- (18) Lammers, T.; Kiessling, F.; Hennink, W. E.; Storm, G. Drug Targeting to Tumors: Principles, Pitfalls and (Pre-) Clinical Progress. *Journal of Controlled Release* **2012**, *161*, 175–187.
- (19) Nie, S. Understanding and Overcoming Major Barriers in Cancer Nanomedicine. *Nanomedicine* **2010**, *5*, 523–528.
- (20) Dalzon, B.; Lebas, C.; Jimenez, G.; Gutjahr, A.; Terrat, C.; Exposito, J.-Y.; Verrier, B.; Lethias, C. Poly(Lactic Acid) Nanoparticles Targeting A5β1 Integrin as Vaccine Delivery Vehicle, a Prospective Study. *PLOS ONE* **2016**, *11*, e0167663.
- (21) Moravan, M. J.; Olschowka, J. A.; Williams, J. P.; O'Banion, M. K. Cranial Irradiation Leads to Acute and Persistent Neuroinflammation with Delayed Increases in T-Cell Infiltration and CD11c Expression in C57BL/6 Mouse Brain. *Radiat. Res.* **2011**, *176*, 459–473.
- (22) Mason, M.; Maurice, C.; McNamara, M. G.; Tieu, M. T.; Lwin, Z.; Millar, B.-A.; Menard, C.; Laperriere, N.; Milosevic, M.; Atenafu, E. G.; *et al.* Neutrophil-lymphocyte Ratio Dynamics during Concurrent Chemo-Radiotherapy for Glioblastoma Is an Independent Predictor for Overall Survival. *Journal of Neuro-Oncology* **2017**, *132*, 463–471.
- (23) Lee, S. B.; Lee, H. W.; Singh, T. D.; Li, Y.; Kim, S. K.; Cho, S. J.; Lee, S.-W.; Jeong, S. Y.; Ahn, B.-C.; Choi, S.; *et al.* Visualization of Macrophage Recruitment to

- Inflammation Lesions Using Highly Sensitive and Stable Radionuclide-Embedded Gold Nanoparticles as a Nuclear Bio-Imaging Platform. *Theranostics* **2017**, *7*, 926–934.
- (24) Condeelis, J.; Pollard, J. W. Macrophages: Obligate Partners for Tumor Cell Migration, Invasion, and Metastasis. *Cell* **2006**, *124*, 263–266.
- (25) Chanmee, T.; Ontong, P.; Konno, K.; Itano, N. Tumor-Associated Macrophages as Major Players in the Tumor Microenvironment. *Cancers* **2014**, *6*, 1670–1690.
- (26) Ganz, T. Macrophages and Systemic Iron Homeostasis. *Journal of Innate Immunity* **2012**, *4*, 446–453.
- (27) Vifor Pharma Media Press releases Page. <http://www.viforpharma.com/en/media/press-releases/201307/1719021> (accessed Nov 11 2017)
- (28) Cada, D.; Levien, T.; Baker, D. Ferric Carboxymaltose. *Hospital Pharmacy* **2014**, *49*, 52–69.
- (29) Toblli, J.; Angerosa, M. Optimizing Iron Delivery in the Management of Anemia: Patient Considerations and the Role of Ferric Carboxymaltose. *Drug Design, Development and Therapy* **2014**, 2475.
- (30) Jahn, M. R.; Andreasen, H. B.; Fütterer, S.; Nawroth, T.; Schünemann, V.; Kolb, U.; Hofmeister, W.; Muñoz, M.; Bock, K.; Meldal, M.; *et al.* A Comparative Study of the Physicochemical Properties of Iron Isomaltoside 1000 (Monofer®), a New Intravenous Iron Preparation and Its Clinical Implications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2011**, *78*, 480–491.
- (31) Triboulet, S.; Aude-Garcia, C.; Armand, L.; Gerdil, A.; Diemer, H.; Proamer, F.; Collin-Faure, V.; Habert, A.; Strub, J.-M.; Hanau, D.; *et al.* Analysis of Cellular Responses of Macrophages to Zinc Ions and Zinc Oxide Nanoparticles: A Combined Targeted and Proteomic Approach. *Nanoscale* **2014**, *6*, 6102–6114.
- (32) Aude-Garcia, C.; Dalzon, B.; Ravanat, J.-L.; Collin-Faure, V.; Diemer, H.; Strub, J. M.; Cianferani, S.; Van Dorsselaer, A.; Carrière, M.; Rabilloud, T. A Combined Proteomic and Targeted Analysis Unravels New Toxic Mechanisms for Zinc Oxide Nanoparticles in Macrophages. *Journal of Proteomics* **2016**, *134*, 174–185.
- (33) Aude-Garcia, C.; Villiers, F.; Collin-Faure, V.; Pernet-Gallay, K.; Jouneau, P.-H.; Sorieul, S.; Mure, G.; Gerdil, A.; Herlin-Boime, N.; Carrière, M.; *et al.* Different *in Vitro* Exposure Regimens of Murine Primary Macrophages to Silver Nanoparticles Induce Different Fates of Nanoparticles and Different Toxicological and Functional Consequences. *Nanotoxicology* **2016**, *10*, 586–596.
- (34) Triboulet, S.; Aude-Garcia, C.; Armand, L.; Collin-Faure, V.; Chevallet, M.; Diemer, H.; Gerdil, A.; Proamer, F.; Strub, J.-M.; Habert, A.; *et al.* Comparative Proteomic Analysis of the Molecular Responses of Mouse Macrophages to Titanium Dioxide and Copper Oxide Nanoparticles Unravels Some Toxic Mechanisms for Copper Oxide Nanoparticles in Macrophages. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0124496.
- (35) Zanganeh, S.; Hutter, G.; Spittler, R.; Lenkov, O.; Mahmoudi, M.; Shaw, A.; Pajarinen, J. S.; Nejadnik, H.; Goodman, S.; Moseley, M.; *et al.* Iron Oxide Nanoparticles Inhibit Tumour Growth by Inducing Pro-Inflammatory Macrophage Polarization in Tumour Tissues. *Nature Nanotechnology* **2016**, *11*, 986–994.
- 36) Schleicher, U.; Bogdan, C. Generation, Culture and Flow-Cytometric Characterization of Primary Mouse Macrophages. In *Macrophages and Dendritic Cells*; Reiner, N. E., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2009; Vol. 531, pp. 203–224.
- (37) Tarakanova, V. L.; Leung-Pineda, V.; Hwang, S.; Yang, C.-W.; Matattal, K.; Basson, M.; Sun, R.; Piwnicka-Worms, H.; Sleckman, B. P.; Virgin, H. W. γ -Herpesvirus Kinase Actively Initiates a DNA Damage Response by Inducing Phosphorylation of H2AX to Foster Viral Replication. *Cell Host & Microbe* **2007**, *1*, 275–286.
- (38) Triboulet, S.; Aude-Garcia, C.; Carrière, M.; Diemer, H.; Proamer, F.; Habert, A.; Chevallet, M.; Collin-Faure, V.; Strub, J.-M.; Hanau, D.; *et al.* Molecular Responses of Mouse Macrophages to Copper and Copper Oxide Nanoparticles Inferred from Proteomic Analyses. *Molecular & Cellular Proteomics* **2013**, *12*, 3108–3122.
- (39) Abel, G.; Szöllösi, J.; Fachel, J. Phagocytosis of Fluorescent Latex Microbeads by Peritoneal Macrophages in Different Strains of Mice: A Flow Cytometric Study. *Eur. J. Immunogenet.* **1991**, *18*, 239–245

4. Conclusion

L'ensemble des résultats a permis, dans un premier temps, de choisir la concentration 1mg/mL en NP-Fe₂O₃ à la fois pour les NP-Fe₂O₃ (Sigma) et le Ferinject® comme dose de travail pour notre stratégie thérapeutique. L'internalisation des deux types de NP-Fe₂O₃ a été confirmée et quantifiée par plusieurs méthodes et nous avons choisi le Ferinject® comme type de nanoparticules le plus adéquat grâce à sa quasi absence d'effets à la fois sur les macrophages J774 et primaires, contrairement aux NP-Fe₂O₃ (Sigma) qui induisent de fortes perturbations (Figure 62).

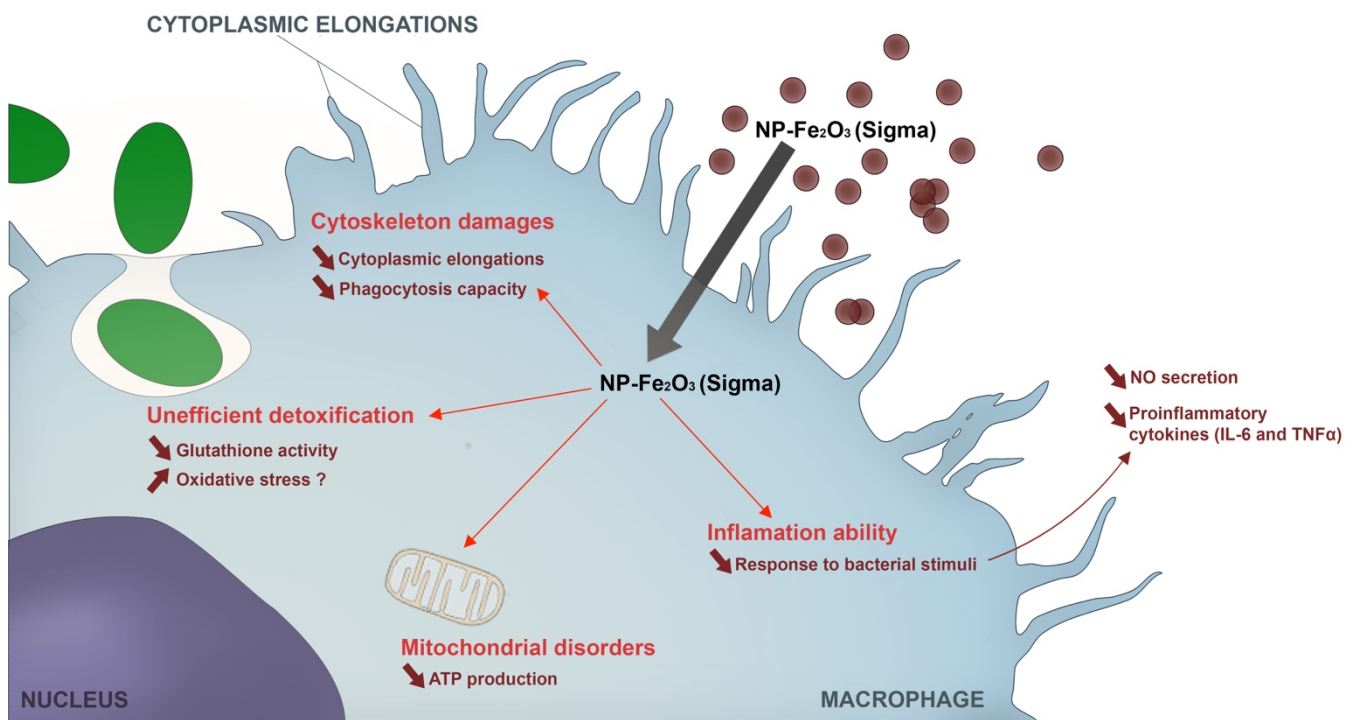


Figure 62. Schéma récapitulatif des principaux résultats obtenus lors de l'étude de l'effet des NP-Fe₂O₃ (Sigma) à une concentration élevée de 1mg/mL.

Les tests *in vitro* de migration cellulaire ont confirmé la capacité des macrophages à se mouvoir et à migrer contre un « signal » même après avoir ingéré une grande quantité de Ferinject®. Cette expérience clé nous a décidé à poursuivre nos essais sur un modèle *in vivo*. Après avoir testé plusieurs sondes possibles, nous avons choisi celle qui donnait le meilleur signal de détection (Fluosphère DarkRed 0.2µm) puis évalué la quantité nécessaire pour suivre les macrophages *in vivo* (Cf. annexe 1). Les méthodes d'imagerie du petit animal ont validé la possibilité d'utiliser des macrophages comme vecteurs de nanoparticules pour traiter des tumeurs. En effet, bien qu'ils aient été différenciés *in vitro* après injection dans la circulation sanguine, les macrophages sont toujours capables de migrer jusqu'à une zone tumorale. L'utilité d'utiliser du Ferinject® comme élément photoactivable par rapport à d'autres types de NPs est incontestable puisque le fer est un élément essentiel pour l'organisme. La quantité totale de fer dans notre corps est estimée entre 3 et 4g et l'apport journalier via l'alimentation se situe entre 10 et 20 mg de fer. Ainsi, l'apport en fer via notre stratégie thérapeutique sera donc faible par rapport à la grande quantité déjà existante dans l'organisme. De plus, le Ferinject® est particulièrement bien toléré par l'organisme du fait de son utilisation courante en médecine par voie intraveineuse et de l'absence d'enrobage de type Dextran connu pour certains effets toxiques et utilisé dans d'autres produits médicaux tels que les produits de contraste Endorem® (retiré du marché) et d'autres traitements anti-anémiques sous formes nanoparticulaires tels que le Ferrisat®, le Fercacyl®, etc. (Bailie et al., 2005; Martin and Vincent, 2011) Enfin, les risques d'accumulation à long terme seront limités puisque le Ferinject® est prévu pour être facilement métabolisable par l'organisme notamment par les macrophages résidents. (Toblli and Angerosa, 2014) Ces critères sont importants puisque l'imagerie du petit animal a malheureusement montré que dans les conditions actuelles, le ciblage de la tumeur par les macrophages n'est pas encore idéal et beaucoup peuvent se

retrouver dans des organes de détoxification ou s'accumuler plus ou moins temporairement dans les poumons voire les os. Le dépôt non spécifique de Ferinject® dans d'autres organes ne risque donc pas (ou peu) d'induire d'effets secondaires. Bien que des organes autres que la tumeur accumulent des macrophages chargés en NPs, la spécificité de traitement demeure puisque l'activation par rayonnement X de faible intensité ciblera uniquement la zone tumorale.

Enfin, plusieurs stratégies sont envisagées pour améliorer la spécificité de ciblage des macrophages injectés vers la zone tumorale. Il serait dans un premier temps intéressant de rendre la tumeur plus inflammatoire en effectuant par exemple une première irradiation au niveau de la tumeur avant d'injecter les macrophages dans la circulation sanguine. En effet, conformément aux résultats obtenus en imagerie du petit animal (Cf. annexe 1) et à ceux décrits par [Lee et al., 2017](#), les macrophages injectés étant également recrutés lors d'inflammations induites pourraient être plus facilement attirés par la tumeur (effet additif). Dans un second temps, les macrophages primaires que nous avons injectés ne sont pas polarisés M1 et pourraient donc être dans un état « endormi », limitant ainsi leur recrutement au niveau de la tumeur. Une activation préalable des macrophages lors de l'étape *in vitro* (différenciation et accumulation de NPs) pourrait éventuellement être un bon moyen d'augmenter la spécificité de ciblage. Dans le cas où le ciblage serait plus spécifique, cette stratégie pourrait s'élargir à d'autres types de NPs telles que les NPs renfermant des chimiothérapies, afin de restreindre davantage leur diffusion au niveau de la tumeur.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. Les études de toxicité des NPs

Dans de nombreuses études de toxicité, la plupart des résultats *in vitro* recueillis sur l'évaluation de l'effet des NPs ont été issus des lignées cellulaires continues. (Kong et al., 2011; Murugadoss et al., 2017) Notre étude des NP-SiO₂ n'échappe pas à cette règle puisque nous avons principalement utilisé des lignées cellulaires de macrophages RAW 264.7. Ce modèle a permis d'une part, de valider notre système expérimental et d'autre part, d'effectuer des expositions chroniques de longue durée. Cependant, du fait de leur imperfection (cellules immortalisées cancéreuses), les résultats demeurent préliminaires voire incomplets et ne donnent qu'une indication sur les possibles effets cytotoxiques des NPs. Cette évaluation nécessite donc d'être complétée, dans la mesure du possible, par des modèles plus complexes et plus proches de la réalité, comme par exemple des modèles cellulaires primaires (études *in vitro*), ou à l'aide d'expérimentations animales (études *in vivo*). (Yanicostas, 2018) C'est pourquoi, contrairement à de nombreuses études qui comparent uniquement l'effet des NP-SiO₂ sur différentes lignées cellulaires (Murugadoss et al., 2017), nous nous sommes focalisés sur un seul type cellulaire : les macrophages. En revanche, nous ne nous sommes pas contentés d'obtenir des résultats uniquement via les lignées cellulaires de macrophages mais nous avons également poursuivi notre évaluation sur des macrophages primaires. Les résultats obtenus nous ont déjà permis de montrer que la silice amorphe était moins toxique sur les macrophages primaires que sur les lignées cellulaires puisque la DL20 est atteinte à des concentrations beaucoup plus élevées. Or, d'autres études menées au laboratoire sur d'autres NPs (NP-Ag et NP-CuO) ont révélé des résultats inverses. En effet, la DL20 est atteinte beaucoup plus rapidement avec les macrophages primaires (5µg/mL) (Aude-Garcia et al., 2016; Triboulet et al., 2013) qu'avec les lignées cellulaires RAW 264.7 (20µg/mL pour les NP-

Ag (non publiées) et 10µg/mL pour les NP-CuO (Triboulet et al., 2013)). Cela prouve la grande variabilité entre les différents modèles d'étude ainsi que l'importance de travailler sur plusieurs modèles d'un même type cellulaire (comme dans notre étude, les macrophages) dans le cadre des études de toxicité et de dépasser les modèles cellulaires continus classiquement utilisés même s'ils sont plus faciles à utiliser et plus éthiques.

Pour des études de toxicité sur les NPs *in vitro*, le choix du type cellulaire demeure souvent complexe et dépend du mode d'exposition que l'on souhaite étudier. (Kong et al., 2011) Ainsi, l'inhalation des NPs peut impacter de manière directe les cellules pulmonaires. De même, l'ingestion de NPs risque d'induire des effets sur les cellules intestinales. Il semble donc évident d'étudier l'effet intrinsèque de ces NPs sur des lignées de cellules pulmonaires (A 549, H441, etc.) ou intestinales (Caco2, HT29, etc.). Néanmoins, ce type d'approche s'avère aujourd'hui incomplet et d'autres études transversales s'imposent afin de connaître plus précisément les effets potentiels des NPs sur un organe voire sur l'organisme entier. En effet, les NPs peuvent aussi induire une toxicité indirecte à plus ou moins long terme, notamment via des effet génotoxiques pouvant favoriser l'apparition de cancers et/ou via des effets immunotoxiques au sens large (englobant l'inflammation chronique par exemple) qui peuvent ensuite déclencher ou aggraver des pathologies sur les organes. C'est par exemple le cas dans des maladies telles que la silicose et l'asbestose où les macrophages sont mis en cause dans l'évolution de la maladie. Une déstabilisation locale du système immunitaire est aussi susceptible d'induire des pathologies plus généralisées puisque les macrophages ou les cellules dendritiques sont à la fois capables de migrer au niveau des ganglions lymphatiques et capables d'orchestrer le recrutement des autres cellules immunitaires innées et adaptatives. Ainsi, ces cellules peuvent provoquer des désordres immuns si leur activation est

anormale. Enfin, les NPs peuvent également modifier la flore commensale (microbiote) dont le déséquilibre peut aussi conduire à des pathologies. (Foster and McVey Neufeld, 2013; Guarner and Malagelada, 2003) C'est pour l'ensemble de ces raisons qu'il est important de ne pas se restreindre aux effets directs des NPs mais aussi de comparer l'ensemble des effets indirects susceptibles de créer un déséquilibre commensal ou immunitaire potentiellement nuisible à la physiologie d'un organe voire de l'organisme entier. Au laboratoire, nous avons fait le choix de nous intéresser aux effets immunotoxiques des NPs sur les macrophages puisqu'ils sont situés dans tout l'organisme et sont en première ligne pour subir les effets des diverses NPs auxquelles nous sommes exposés quotidiennement. Les macrophages sont donc un bon modèle d'étude puisque les résultats obtenus peuvent être transposés à de nombreux organes et peuvent donner des indications sur de potentiels effets systémiques. (Kong et al., 2011)

Comme beaucoup d'autres NPs (NP-TiO₂, NP-Fe₂O₃, NP-Al, NP-Ag, NP-Au, etc.), les NP-SiO₂ pénètrent dans l'organisme par inhalation ou par ingestion (via l'alimentation). L'étude de l'ingestion des NP-SiO₂ mérite un intérêt particulier dans la mesure où elle ne concerne pas seulement une catégorie socio-professionnelle mais l'ensemble de la population. En effet, on trouve ces particules dans de nombreux aliments sous le nom d'E551. Cet additif alimentaire est composé de NP-SiO₂ d'une vingtaine de nanomètres regroupées sous forme d'agrégats dont la taille est micrométrique. Il possède une structure proche des fumées de silice et sert d'antiagglomérant. Actuellement, nous estimons que la dose journalière de silicates ingérés par voie alimentaire est d'environ 35mg. (Powell et al., 2010) Cette quantité n'est certes pas négligeable mais c'est surtout la répétition quotidienne qui constitue un risque pour la santé.

Les études effectuées lors de cette thèse se sont concentrées sur l'inhalation mais elles sont transposables à un travail sur l'ingestion des NP-SiO₂. En effet, les macrophages sont présents dans de nombreux organes et en particulier dans les poumons et l'intestin (plaques de Peyer). (Jung et al., 2010) Une déstabilisation des fonctionnalités des macrophages pourrait donc avoir un impact similaire sur ces deux organes bien qu'ils soient différents et assurent des fonctions distinctes. Cet impact peut par exemple jouer un rôle sur la survenue de maladies inflammatoires chroniques comme les pneumoconioses ou les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Crohn et rectocolite hémorragique). Ces travaux d'immunotoxicologie sur les macrophages pourront donc servir à l'étude des effets des NP-SiO₂ en les comparant avec ceux réalisés par nos collaborateurs évaluant leurs effets cytotoxiques et génotoxiques sur les cellules intestinales ou pulmonaires (collaboration avec Marie Carrière, CEA, INAC, SyMMES). Ce type de travail a déjà été effectué à partir d'un autre type d'additif alimentaire nanoparticulaire à base de NP-TiO₂, le E171. (Dorier et al., 2015, 2017; Triboulet et al., 2015)

De nombreuses études se contentent d'effectuer des analyses de toxicité sur des temps d'exposition aiguë ne dépassant pas 24h et d'observer des effets toxiques sur des doses de NPs élevées qui ne correspondent pas toujours aux doses réelles d'exposition. Nous nous sommes donc efforcés de comparer différents scénarii d'exposition sur des lignées cellulaires RAW 264.7. L'exposition aiguë induisant une DL20 et des effets sur les fonctionnalités des macrophages a été comparée à des expositions chroniques à bas bruit dont la dose accumulée tous les jours équivaut à l'exposition aiguë. Enfin, nous avons ajouté la condition de récupération qui permet de vérifier si après une forte exposition, les cellules sont capables de reprendre leurs fonctions principales. Ces trois modes d'exposition donnent des informations

plus précises quant à la dangerosité ou non des NPs puisqu'ils permettent de vérifier l'effet des NPs dans des conditions d'exposition plus réelles et permettent d'évaluer la persistance des dommages. Ceci est une notion centrale dans le cas de certaines maladies inflammatoires comme l'asbestose et la silicose où la chronicité d'exposition du travailleur et la persistance des effets expliquent la gravité de la maladie. D'ailleurs, de façon générale, les grands problèmes de santé publique ne sont pas dus à des expositions aiguës mais plutôt à des expositions répétées à un produit.

Enfin, lorsqu'il s'agit de santé publique, il est important d'étudier les effets directs d'un composé sur la santé humaine en effectuant des expérimentations *in vitro*. Cependant, ces expériences sont encore trop éloignées des conditions réelles puisque nous ne vivons pas dans un environnement stérile et sommes constamment confrontés à d'autres éléments qui s'ajoutent aux NPs testées, ne serait-ce que par la pollution de l'air et de l'eau. C'est précisément parce que nous sommes chaque jour exposés à un mélange complexe et variable d'éléments particuliers et chimiques qu'il est nécessaire de faire des tests plus complets sur la toxicité croisée bien que cela nécessite d'abord de connaître les effets des éléments individuels sur le modèle d'étude utilisé. Peu de travaux sont actuellement effectués pour déterminer la multiplicité des effets en fonction de l'environnement, en imitant des conditions d'exposition réelles. En effet, il est impossible que l'organisme soit exposé à un seul type de NPs à un moment donné et encore moins tout au long d'une vie. Il serait donc intéressant de se focaliser non pas sur un seul type de NPs à la fois mais d'effectuer des co-expositions en fonction des normes autorisées pour différents types de NPs (en condition chronique, aiguë et récupération).

Du fait des nombreuses interrogations supplémentaires sur la manière d'évaluer de façon complète la toxicité des NPs, nous avons pensé qu'il était crucial de poursuivre nos expérimentations sur des études de toxicité croisée. Ces approches nouvelles pourraient servir à vérifier : 1) les possibilités d'effets de cheval de Troie. Cet effet consiste en la pénétration accrue d'un autre toxique adsorbé à la surface des NPs (corona) et dont la phagocytose favoriserait l'entrée à l'intérieur de la cellule. Cette possibilité est documentée dans le cas des silices amorphes qui adsorbent du cadmium qui est un polluant fréquemment rencontré. (De Simone et al., 2013; Guo et al., 2013) 2) L'autre piste à évoquer serait la possibilité d'effets synergiques toxiques indirects au contact d'autres molécules. Cet effet additif pourrait simplement s'expliquer par le fait que les NPs, même à des doses non-toxiques, accentuent la sensibilité des cellules à d'autres molécules. Ces réponses pourraient induire une sensibilité plus forte à d'autres produits ou composés naturels ou manufacturés. C'est par exemple le cas des nanoparticules à base de cuivre qui gagnent en toxicité lorsqu'elles sont combinées à certains pesticides (comme la rotenone). (Triboulet et al., 2013) ou aux styrènes. (Dalzon et al., 2017)

Ce phénomène de synergies toxiques (toxicités croisées) est un enjeu majeur en terme d'évaluation réelle du danger représenté par les nanomatériaux. En effet, même dans les cas où les nanoparticules seules induisent peu d'effets, de nombreux facteurs environnementaux peuvent augmenter la toxicité des nanoparticules. Les facteurs environnementaux incluent par exemple le tabagisme, les polluants atmosphériques, les habitudes alimentaires, les polluants de l'eau et certains médicaments. Cependant, au vu du nombre extrêmement élevé de combinaisons possibles, de telles études nécessitent de disposer de données précises sur les réponses induites dans les cellules cibles par les nanomatériaux. Nous sommes donc

encore très loin d'avoir résolu la question de la toxicité des NPs en général puisqu'il existe une infinité de type de NPs ainsi qu'une infinité de matériaux possibles avec des comportements différents dans le milieu biologique (corona, charge de surface, dissolution, etc.). De même, il existe également une infinité de combinaisons possibles qui doivent être testées via un vaste choix de modèles expérimentaux.

A noter qu'il est également compliqué de comparer *in vitro* les effets intrinsèques des NPs car chaque type de NP est différent et réagit rarement de la même façon *in vivo* et *in vitro*. Les NP-SiO₂ pyrogéniques sont par exemple suspectées d'être plus toxiques que les NP-SiO₂ précipitées. Néanmoins, étant donné qu'elles se trouvent toujours sous forme agrégée, elles sont donc globalement de plus grande taille, ce qui les empêche certainement d'atteindre les couches les plus profondes d'un organe (comme le poumon) contrairement aux NPs précipitées.

Même si nous n'observons pas ou peu d'effets sur les principaux tests phagocytaires et inflammatoires après exposition chronique, les NPs ne sont pas pour autant dépourvues d'effets. D'où l'importance d'effectuer des tests de toxicité croisée *in vitro* qui pourraient mettre en évidence des effets silencieux. Au laboratoire, plusieurs travaux ont débuté cette année et suggèrent que la toxicité des NPs de silice augmente en présence de bactéries même inactivées. La présence d'une toxicité croisée a donc été observée et les effets se situent en-dessous des concentrations classiques de la DL20. Ces effets synergiques entre les bactéries et les NP-SiO₂ ont également été observés avec les NP-Ag mais pas avec les NP-Fe₂O₃.

Enfin, dans ce manuscrit, les travaux présentés ont démontré un effet important sur les macrophages lorsqu'ils sont en contact avec des doses subtoxiques (DL20) de NP-SiO₂ amorphes. Cet effet a été remarqué pour chacune des NP-SiO₂ testées et concerne surtout les capacités inflammatoire et phagocytaire. Cependant, l'exposition aiguë de 20µg/mL ne reflète pas la réalité des normes d'exposition déjà établies. En effet, cette concentration est 20 fois plus élevée que la norme sécuritaire imposée. Elle peut néanmoins correspondre à une exposition accidentelle unique pouvant survenir dans un cadre professionnel, et ce d'autant plus que l'utilisation d'équipements de protection individuel (EPI) (comme les masques de protection) n'est pas toujours respecté bien que l'employeur soit tenu, sous peine de poursuites judiciaires de fournir ces équipements. En revanche, dans le cas d'une exposition chronique, la dose testée qui correspond aux normes imposées (1µg/mL/jour) est quant à elle beaucoup moins toxique mais son effet n'est pas inexistant. Nos études n'ont pas pu déterminer si la silice pyrogénique était plus toxique que la silice précipitée bien que des effets à long terme aient été observés dans le cas de la silice pyrogénique. Les résultats obtenus dans ce travail de thèse soulèvent plusieurs types de questionnements quant aux effets des NP-SiO₂ observés sur les macrophages. La réduction de la capacité phagocytaire et de la capacité à répondre à des stimuli bactériens peut nous faire suspecter une défaillance possible des macrophages à lutter contre les pathogènes et participer à l'homéostasie tissulaire via l'élimination des cellules altérées ou mortes. En revanche, l'effet intrinsèque des NP-SiO₂ légèrement pro-inflammatoire peut laisser penser qu'il peut induire des inflammations chroniques voire faciliter les maladies auto-immunes.

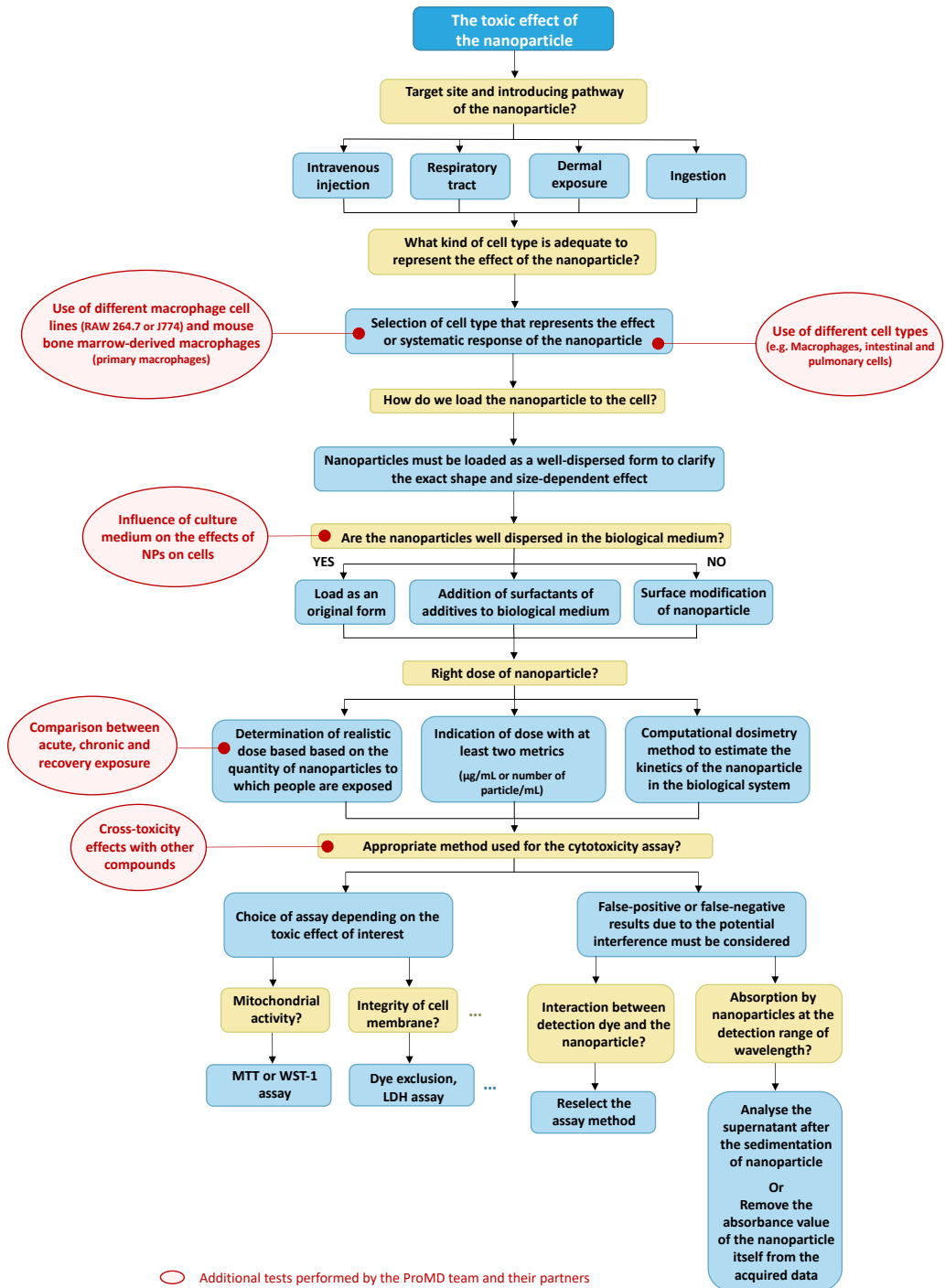


Figure 63. *Etude cytotoxique des NPs. En jaune : questions à prendre en compte lors de l'étude de cytotoxicité. En bleu : méthodes généralement envisagées. En rouge : méthodes supplémentaires effectuées par le laboratoire ProMD et ses collaborateurs. Adapté de Kong B. – Nanomed. 2011.*

2. Utilisation des NPs à haut numéro atomique pour traiter les cancers résistants

Nos travaux ont montré que la stratégie de cheval de Troie utilisant les macrophages pour vectoriser des NP-Fe₂O₃ pouvait être efficace puisque les macrophages injectés dans la circulation sanguine sont capables de migrer au niveau de la zone tumorale. Bien que la spécificité de ciblage doive être améliorée, nous avons observé lors de l'imagerie du petit animal, la présence d'une grande quantité de macrophages injectés dans la circulation sanguine au niveau des organes tels que le foie et les poumons et dans une moindre mesure au niveau des os et de certains ganglions comme les ganglions axillaires. Or, cette donnée accentue l'argument d'une faible spécificité de ciblage par cette stratégie de cheval de Troie, et pourrait s'avérer être un point négatif dans cette stratégie. Cependant, les métastases issues d'un cancer primaire comme les cancers du sein, les mélanomes, etc. sont souvent retrouvées au niveau du foie et des poumons ainsi qu'au niveau des os. L'intérêt de cette stratégie est donc d'être capable d'apporter ces macrophages chargés en NP-Fe₂O₃ (Ferinject®) au niveau de ces organes. Bien que le ciblage ne soit pas optimisé pour le moment, le ciblage thérapeutique peut très bien s'effectuer via le rayonnement X de faible intensité émis au niveau des zones cancéreuses (tumeur primaire et métastases chargées en NP-Fe₂O₃). Le surplus de Ferinject® présent dans les autres organes sera quant à lui progressivement éliminé par l'organisme et ne sera donc pas toxique.

Concernant la migration des macrophages dans les ganglions, ces résultats nous ont semblé intéressants après avoir discuté avec des collègues de l'IPHC de Strasbourg sur d'autres perspectives anticancéreuses, notamment pour traiter les lymphomes hodgkiniens

(LH). La maladie de Hodgkin est un type de cancer du système lymphatique qui se développe surtout chez les adolescents et les jeunes adultes. Cette maladie se caractérise par une prolifération incontrôlée de lymphocytes B anormaux (cellules de Reed-Sternberg). Ces cellules prolifèrent dans les ganglions lymphatiques, ce qui entraîne un grossissement des ganglions. Le LH est cependant bien traité aujourd'hui, notamment par chimiothérapies combinées à des radiothérapies. La rémission complète est de 90% environ mais 10% des malades sont résistants aux traitements. La solution pour ces malades est d'utiliser des radiothérapies à forte dose qui sont une source d'effets secondaires plus ou moins invalidants. C'est la raison pour laquelle, certains médecins cherchent à réduire l'intensité des radiothérapies par l'utilisation de nanoparticules photoactivables aux rayons X. Du fait de l'attractivité des macrophages vers les ganglions et les zones tumorales cette stratégie thérapeutique appliquée au lymphome de Hodgkin serait particulièrement intéressante. Là encore, bien que la spécificité de ciblage ne soit pas optimale, cette réinjection de macrophages sera suivie d'une irradiation nodulaire de faible intensité qui sera, elle, ciblée. Le ganglion malade sera donc le seul irradié épargnant ainsi les tissus sains avoisinants.

3. Point de vue personnel sur ce travail de thèse

Il me semble qu'étant donné l'essor des nanoparticules, leur production intensive et leur présence dans les produits de consommation de tous les jours, une forme de paranoïa concernant les nanotechnologies s'est installée. (Boliz A., 2012b; Le Hir P., 2016, 2017; N'Sondé V.) En cela, les nanotechnologies ont suivi le modèle d'autres technologies émergentes comme par exemple les ondes électromagnétiques des téléphones portables ou connexions Wi-Fi dont on ignore encore les effets sur la santé humaine. Cette méfiance ne

paraît pas toujours injustifiée lorsque l'on pense à d'autres scandales sanitaires ou environnementaux tels que l'amiante, les pesticides, les perturbateurs endocriniens, etc. Dans ces cas-là, il a souvent fallu attendre plusieurs dizaines d'années pour prouver leur dangerosité.

En ce qui concerne les nanomatériaux, bien que nous ayons une multitude de données concernant leurs effets sur la santé et l'environnement, nous n'avons malheureusement encore que trop peu de recul quant à leur dangerosité ou leur innocuité. Du fait de ce manque de recul, ces nanomatériaux suscitent des réactions très contrastées. Certains se disent « anti-nano » alors que d'autres sont « pro-nano ». Or, les convictions de chacun nécessitent davantage de nuances. Il semble impératif de comprendre que toutes les nanoparticules n'induisent pas les mêmes risques. De plus, toutes les NPs utilisées ne répondent pas forcément à des enjeux sociétaux. Leur utilité pourrait, dans certaines applications, être remise en question. C'est par exemple le cas des additifs alimentaires à base de NPs servant de colorant ou d'antimottant. De ce fait, la production globale de nanomatériaux pourrait sans aucun doute être réduite au strict nécessaire.

Du fait de la quasi-infinité de combinaisons possibles pouvant influencer la toxicité des nanoparticules (type de NPs, co-expositions, temps de contact, quantité, voies d'expositions, prédispositions et âge de chaque individu, etc.), je pense qu'il faut, comme en médecine, estimer la balance bénéfices/risques pour la société de l'intérêt d'utiliser des NPs. Comme en médecine, où un traitement n'est jamais anodin, l'émergence de nouvelles technologies n'est pas non plus sans conséquences. Les NPs ne doivent pas non plus être systématiquement considérées comme dangereuses mais elles doivent être limitées à des usages jugés

nécessaires et bénéfiques pour la société tels que l'utilisation dans les crèmes solaires comme agent de protection anti-UV (NP-TiO₂, NP-ZnO). Par rapport à d'autres molécules anti-UV organiques également utilisées, ces NPs ont un intérêt double puisqu'elles rendent les crèmes à la fois plus persistantes et plus photorésistantes. Elles permettent d'avoir un meilleur bénéfice pour la santé publique en limitant le nombre d'applications ainsi que les réactions allergiques. Il en va de même pour l'utilisation de NPs en galénique (NP-TiO₂), dans des stratégies thérapeutiques (NP-Fe₂O₃), en tant que conservateur (NP-Ag), etc. Enfin, il faut rester prudent lorsque l'on affirme que telle ou telle nanoparticule est dangereuse pour la santé humaine. En effet, certaines études n'hésitent pas à créer un effet de surcharge en administrant dans leurs expérimentations des doses excessives de NPs, la toxicité n'étant alors pas forcément propre aux nanoparticules mais plutôt à un problème de surcharge des systèmes biologiques induites par la quantité en tant que telle. ([European Commission and Directorate General for Health & Consumers, 2013](#)) Pour améliorer les recherches en nanotoxicologies, les différentes études doivent être standardisées (ISO/TC 229) et être régulièrement comparées pour chaque type de NPs testé et chaque procédé expérimental (temps d'incubation, concentration, modèle d'étude, etc.). La nanotoxicologie a donc de longs jours devant elle et il est important de faciliter la divulgation des résultats et leurs vulgarisations auprès des profanes. Il serait également judicieux de favoriser et accroître les collaborations entre les personnes possédant des domaines d'expertises variés et complémentaires (physiciens, chimistes, biologistes, statisticiens voire philosophes) afin de répondre au mieux aux enjeux sociétaux et aux attentes de la population générale. ([Kourany, 2010](#))

MATERIEL ET METHODES

Cette brève partie décrit les matériels et méthodes des résultats non présentés dans les trois articles scientifiques mais qui sont néanmoins mentionnés dans ce manuscrit.

1. Mesure du glutathion réduit intracellulaire (GSH)

Le GSH intracellulaire est une molécule de détoxification qui sert notamment à détoxifier des xénobiotiques tels que les métaux (mercure, plomb, cadmium, fer, etc.). Son groupement thiol permet de créer des liaisons fortes avec ces métaux et d'assurer par la suite leur excrétion à l'extérieur de la cellule puis de l'organisme. Le GSH a également un rôle antioxydant.

Dans notre cas, le GSH intracellulaire a été mesuré à l'aide d'une méthode utilisant le monochlorobimane (MCB). Cette molécule, comme d'autres xénobiotiques, est capable d'entrer dans les cellules et de se fixer sur le glutathion réduit afin de former un complexe covalent GSH-MCB. Le MCB étant une molécule qui émet une fluorescence bleue (450nm) après excitation UV, le complexe GSH-MCB ainsi formé émet une fluorescence proportionnelle à la quantité de GSH intracellulaire. Cela est mesurable par cytométrie en flux (FACSMelody, BD- Biosciences).

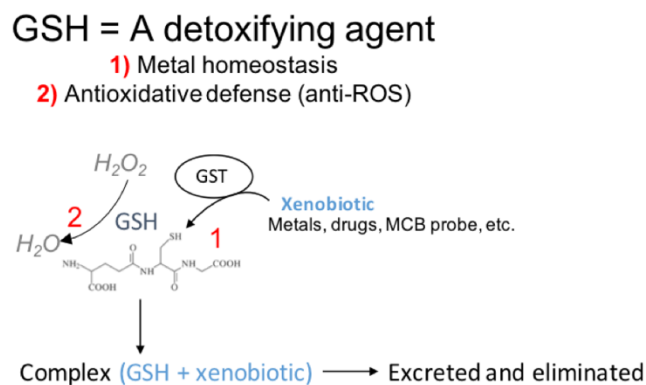


Figure 64. Schéma explicatif du fonctionnement du GSH.

Les cellules sont incubées en plaque 6 puits à une concentration de 500 000 cellules/mL pendant 24h à 37°C, 5% CO₂. Elles sont ensuite exposées aux nanoparticules pendant une période supplémentaire de 24h. Après incubation, les cellules sont récoltées et rincées avec 10mL de PBS chaud (37°C) et centrifugées pendant 5 minutes à 290g afin d'éliminer le surnageant. Les cellules sont suspendues avec 2mL de MCB chaud (37°C) dont la concentration finale est de 75µM. Elles sont ensuite incubées pendant 5 minutes à 37°C puis 5 minutes à 4°C. Après cette étape, les cellules sont à nouveau centrifugées pendant 5 minutes à 290g puis resuspendues dans 400µL de PBS froid (4°C) comprenant de l'iodure de propidium (IP) à 1µg/mL. Les cellules sont analysées en cytométrie en flux (FACSMelody) avec un laser d'excitation de 405nm et un filtre d'émission de 448nm +/- 45nm. L'IP permet de discriminer les cellules mortes des vivantes afin de ne se focaliser que sur les vivantes lors de la mesure du GSH.

2. Détermination et localisation de l'élément fer intracellulaire apporté par les NPs via microscopie électronique à transmission couplée à la microanalyse EDX

2.1. Préparation des échantillons

L'observation des cellules en microscopie électronique nécessite plusieurs étapes de préparation des échantillons. En effet, après avoir été incubées 24h en présence ou en absence de NP-Fe₂O₃ (Sigma ou Ferinject®) dans des chambres Lab-Tek (numéro de catalogue : 154526, Thermofisher Scientific), les cellules J774 sont, dans un premier temps, fixées 30 minutes à température ambiante dans un mélange composé de milieu de culture DMEM, de paraformaldéhyde 0,4%, de glutaraldéhyde 0,2% et de tampon PHEM 0,2M à pH7,2. Les cellules subissent ensuite une étape de post-fixation pendant 1h à température

ambiante avec un mélange de tétr oxyde d'osmium 1% et de ferrocyanure de potassium 1,5% préparé en tampon PHEM 0,1M. Après trois rinçages en eau, les cellules sont ensuite incubées dans une solution d'acétate d'uranyle 0,5% + éthanol 30% pendant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Dans un second temps, les cellules sont progressivement déshydratées à la suite de plusieurs incubations successives de 10 minutes environ à l'éthanol à une concentration augmentant progressivement (50%, 70%, 80%, 95% 100%). Enfin, les cellules sont incluses en résine avec de l'Epoxy Embedding Medium Kit (numéro de catalogue : 45359, Sigma-Aldrich) afin d'effectuer des coupes ultrafines de 80nm d'épaisseur via le microtome (Leica EM UC7). Pour ce faire, les lames utilisées sont des couteaux-diamants 35° (DiATOME). Les coupes sont collectées sur des grilles de cuivre (maillage 100) possédant un recouvrement de film Formvar®/carbone. Les échantillons ainsi préparés sont ensuite colorés dans de l'acétate d'uranyle 5% pendant 10 minutes puis dans du citrate de plomb 2% pendant 5 minutes. Les images en TEM ont été prises grâce au microscope FEI Tecnai G2 Spirit BioTwin (voltage 120 KV) et en utilisant une caméra Orius SC1000 CCD (Gatan Inc.). Nous avons ensuite effectué d'autres images en TEM-EDX à partir du microscope électronique FEI Tecnai Osiris S/TEM – EDX.

2.2. Microscopie S/TEM – EDX

En microscopie électronique à transmission (TEM), l'échantillon est excité par un faisceau d'électrons. Deux modes d'observation sont possibles : le mode TEM où toute la zone analysée est éclairée par le faisceau et le mode STEM (microscopie électronique à balayage par transmission) qui utilise un faisceau focalisé et effectue un balayage point par point pour obtenir l'image. Différentes interactions entre les électrons incidents et l'échantillon à

observer vont se produire afin de générer plusieurs types de signaux permettant d'une part, d'avoir une image de l'échantillon et d'autre part, d'avoir une analyse chimique des composants de l'échantillon. Il s'agit de l'analyse EDX (Energy Dispersive X-Ray). Les différents signaux détectés sont décrits dans les paragraphes ci-dessous.

2.2.1. La diffusion élastique

Suivant le type de matériau (atomes) qu'ils rencontrent, certains électrons incidents changent de direction et ils sont diffractés sans perte d'énergie. Ces électrons sont ainsi appelés « électrons rétrodiffusés » et permettent, avec la présence d'électrons secondaires, d'obtenir une image en TEM. Le choc élastique est plus important lorsque le faisceau d'électrons rencontre des atomes à haut numéro atomique, ce qui dévie davantage les électrons et augmente ainsi le contraste de l'image. En microscopie TEM à champ clair, l'écran de détection recueille uniquement les électrons non-diffractés qui traversent l'échantillon en ligne droite. Les autres électrons déviés par la présence d'éléments lourds dans l'échantillon ne sont pas détectés, ce qui crée des zones sombres dans l'image. La microscopie à champ sombre utilise quant à elle un processus inverse puisque l'image est uniquement formée par les électrons diffractés. Les zones denses apparaissent donc claires alors que les zones dans lesquelles les électrons ne sont pas diffractés deviennent sombres.

2.2.2. La diffusion inélastique

Dans ce cas précis, les électrons incidents qui rencontrent un atome de l'échantillon vont transférer une partie de leur énergie et conduire à l'émission d'un électron secondaire. Ces

électrons secondaires ont un rôle dans l'obtention de l'image mais ce phénomène sert également à déterminer la composition chimique de l'échantillon.

2.2.3. Les émissions de photons X

A la suite de l'éjection d'un électron secondaire via diffusion inélastique, l'atome se retrouve dans un état excité instable. Afin de revenir à un état stable, un électron situé sur une couche électronique plus éloignée est transféré à une couche plus profonde. L'énergie $E_{\text{couche profonde}} - E_{\text{couche moins profonde}}$ est alors libérée par l'intermédiaire d'un photon X dont la longueur d'onde est spécifique à l'élément chimique (Figure 64).

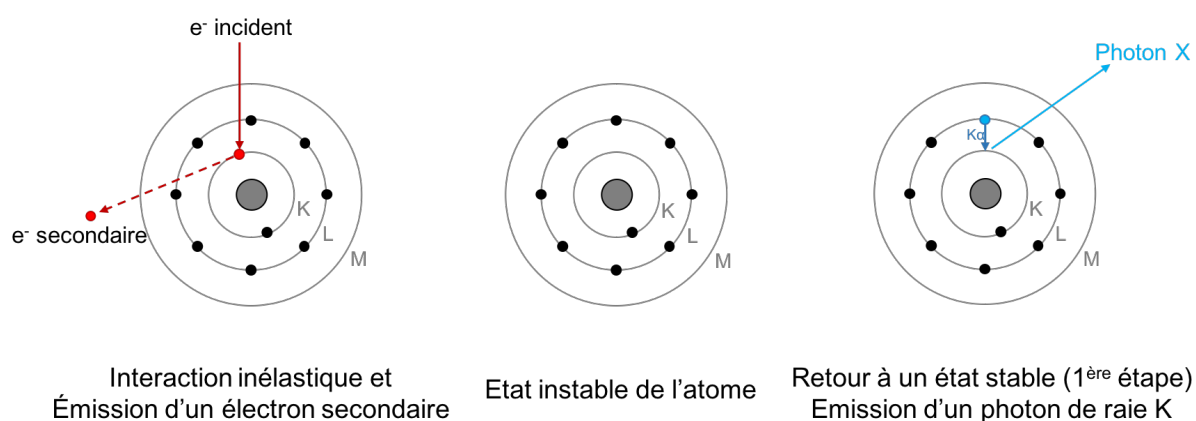


Figure 65. Emission d'un photon X suite à l'excitation d'un atome.

Ces photons X émis peuvent ensuite être analysés par un détecteur EDX qui fournit à la fois un spectre de l'ensemble des photons X émis par l'échantillon et une cartographie sous forme d'image de la zone analysée. Dans le cadre des travaux sur les NP-Fe₂O₃, nous nous sommes restreints à révéler seulement la présence d'éléments fer. Les résultats sont présentés dans la partie Résultats – Projet 2 concernant l'évaluation de l'effet des NP-Fe₂O₃ sur les macrophages J774.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Aderem, A., and Underhill, D.M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* *17*, 593–623.
- Albanese, A., and Chan, W.C.W. (2011). Effect of Gold Nanoparticle Aggregation on Cell Uptake and Toxicity. *ACS Nano* *5*, 5478–5489.
- Ali, R.A., Wuescher, L.M., and Worth, R.G. (2015). Platelets: essential components of the immune system. *Curr. Trends Immunol.* *16*, 65–78.
- ANSES (2017). Dioxyde de titane - Les travaux de l'Agence. <https://www.anses.fr/fr/content/dioxyde--titane>.
- Arstila, T.P. (1999). A Direct Estimate of the Human T Cell Receptor Diversity. *Science* *286*, 958–961.
- Arvizo, R.R., Bhattacharyya, S., Kudgus, R.A., Giri, K., Bhattacharya, R., and Mukherjee, P. (2012). Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: past, present and future. *Chem. Soc. Rev.* *41*, 2943.
- Aude-Garcia, C., Villiers, F., Collin-Faure, V., Pernet-Gallay, K., Jouneau, P.-H., Sorieul, S., Mure, G., Gerdil, A., Herlin-Boime, N., Carrière, M., et al. (2016). Different *in vitro* exposure regimens of murine primary macrophages to silver nanoparticles induce different fates of nanoparticles and different toxicological and functional consequences. *Nanotoxicology* *10*, 586–596.
- Averette, K.M., Pratt, M.R., Yang, Y., Bassilian, S., Whitelegge, J.P., Loo, J.A., Muir, T.W., and Bradley, K.A. (2009). Anthrax Lethal Toxin Induced Lysosomal Membrane Permeabilization and Cytosolic Cathepsin Release Is Nlrp1b/Nalp1b-Dependent. *PLoS ONE* *4*, e7913.
- Bae, Y.H., and Park, K. (2011). Targeted drug delivery to tumors: Myths, reality and possibility. *J. Controlled Release* *153*, 198–205.
- Bailie, G.R., Clark, J.A., Lane, C.E., and Lane, P.L. (2005). Hypersensitivity reactions and deaths associated with intravenous iron preparations. *Nephrol. Dial. Transplant.* *20*, 1443–1449.
- Bals, R. (2000). Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir. Res.* *1*.
- Barenholz, Y. (Chezy) (2012). Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *J. Controlled Release* *160*, 117–134.
- Beck, G., and Habicht, G.S. (1996). Immunity and the invertebrates. *Sci. Am.* *275*, 60–63, 66.
- Belkaid, Y., and Hand, T.W. (2014). Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Cell* *157*, 121–141.
- Bertrand Honnert, and Raymond Vincent (2007). Production et utilisation industrielle des particules nanostructurées.
- Bhattacharjee, S., Haan, L.H.J.D., Evers, N.M., Jiang, X., Marcelis, A.T.M., Zuilhof, H., Rietjens, I.M.C.M., and Alink, G.M. (2010). Role of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity of organic monolayer-coated silicon nanoparticles towards macrophage NR8383 cells. *Part. Fibre Toxicol.* *7*, 25.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., and Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense: World Allergy Organ. *J.* *5*, 9–19.
- Bleyzac, P., Exbrayat, J.-M., and Fellah, J.S. (2005). Émergence du système immunitaire adaptatif: Hypothèses en présence. *Médecine/Sciences* *21*, 210–215.
- Bobo, D., Robinson, K.J., Islam, J., Thurecht, K.J., and Corrie, S.R. (2016). Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm. Res.* *33*, 2373–

2387.

Boczkowski, J., and Hoet, P. (2010). What's new in nanotoxicology? Implications for public health from a brief review of the 2008 literature. *Nanotoxicology* 4, 1–14.

Bolis A. (2012a). La France oblige les industriels à déclarer les nanoparticules dans leurs produits. *Le Monde*.

Bolis A. (2012b). Nanoparticules : l'ingrédient qui s'est discrètement invité à notre table. *Le Monde*.

Branton, M.H., and Kopp, J.B. (1999). TGF-beta and fibrosis. *Microbes Infect.* 1, 1349–1365.

Brunner, T.J., Wick, P., Manser, P., Spohn, P., Grass, R.N., Limbach, L.K., Bruinink, A., and Stark, W.J. (2006). In Vitro Cytotoxicity of Oxide Nanoparticles: Comparison to Asbestos, Silica, and the Effect of Particle Solubility †. *Environ. Sci. Technol.* 40, 4374–4381.

Busquets, M.A., Estelrich, J., and Sánchez-Martín, M.J. (2015). Nanoparticles in magnetic resonance imaging: from simple to dual contrast agents. *Int. J. Nanomedicine* 1727.

Buzea, C., Pacheco, I.I., and Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases* 2, MR17-71.

Cambou, J., and Proy, D. (2011). Situation in France: The Position of a Federation of Environmental Protection NGOs. In *Nanoethics and Nanotoxicology*, P. Houdy, M. Lahmani, and F. Marano, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 463–474.

Canton, J., Neculai, D., and Grinstein, S. (2013). Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 621–634.

Carvalho, T.C., Peters, J.I., and Williams III, R.O. (2011). Influence of particle size on regional lung deposition – What evidence is there? *Int. J. Pharm.* 406, 1–10.

Casals, E., Vázquez-Campos, S., Bastús, N.G., and Puentes, V. (2008). Distribution and potential toxicity of engineered inorganic nanoparticles and carbon nanostructures in biological systems. *TrAC Trends Anal. Chem.* 27, 672–683.

Champion, J.A., and Mitragotri, S. (2006). Role of target geometry in phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 4930–4934.

Champion, J.A., Katare, Y.K., and Mitragotri, S. (2007). Particle shape: A new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers. *J. Controlled Release* 121, 3–9.

Chanmee, T., Ontong, P., Konno, K., and Itano, N. (2014). Tumor-Associated Macrophages as Major Players in the Tumor Microenvironment. *Cancers* 6, 1670–1690.

Chen, G.Y., and Nuñez, G. (2010). Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 826–837.

Chen, H., Zhao, R., Wang, B., Cai, C., Zheng, L., Wang, H., Wang, M., Ouyang, H., Zhou, X., Chai, Z., et al. (2017). The effects of orally administered Ag, TiO₂ and SiO₂ nanoparticles on gut microbiota composition and colitis induction in mice. *NanoImpact* 8, 80–88.

Chen, S., Yuan, J., Yao, S., Jin, Y., Chen, G., Tian, W., Xi, J., Xu, Z., Weng, D., and Chen, J. (2015). Lipopolysaccharides may aggravate apoptosis through accumulation of autophagosomes in alveolar macrophages of human silicosis. *Autophagy* 11, 2346–2357.

Choi, G.-H., Seo, S.-J., Kim, K.-H., Kim, H.-T., Park, S.-H., Lim, J.-H., and Kim, J.-K. (2012). Photon activated therapy (PAT) using monochromatic Synchrotron x-rays and iron oxide nanoparticles in a

mouse tumor model: feasibility study of PAT for the treatment of superficial malignancy. *Radiat. Oncol.* 7, 184.

Conly, J.M., Stein, K., Worobetz, L., and Rutledge-Harding, S. (1994). The contribution of vitamin K2 (menaquinones) produced by the intestinal microflora to human nutritional requirements for vitamin K. *Am. J. Gastroenterol.* 89, 915–923.

Corraliza, I. (2014). Recruiting specialized macrophages across the borders to restore brain functions. *Front. Cell. Neurosci.* 8.

Dalzon, B., Diemer, H., Collin-Faure, V., Cianfèrani, S., Rabilloud, T., and Aude-Garcia, C. (2016). Culture medium associated changes in the core proteome of macrophages and in their responses to copper oxide nanoparticles. *PROTEOMICS* 16, 2864–2877.

Dalzon, B., Aude-Garcia, C., Collin-Faure, V., Diemer, H., Béal, D., Dussert, F., Fenel, D., Schoehn, G., Cianfèrani, S., Carrière, M., et al. (2017). Differential proteomics highlights macrophage-specific responses to amorphous silica nanoparticles. *Nanoscale* 9, 9641–9658.

Davis, G.S. (1986). The Pathogenesis of Silicosis. *Chest* 89, 166S–169S.

Davis, J.M. (1989). Mineral fibre carcinogenesis: experimental data relating to the importance of fibre type, size, deposition, dissolution and migration. *IARC Sci. Publ.* 33–45.

Davis, M.M., and Bjorkman, P.J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334, 395–402.

De Angelis, I., Barone, F., Zijno, A., Bizzarri, L., Russo, M.T., Pozzi, R., Franchini, F., Giudetti, G., Ubaldi, C., Ponti, J., et al. (2013). Comparative study of ZnO and TiO₂ nanoparticles: physicochemical characterisation and toxicological effects on human colon carcinoma cells. *Nanotoxicology* 7, 1361–1372.

De Simone, U., Manzo, L., Profumo, A., and Coccini, T. (2013). *In Vitro* Toxicity Evaluation of Engineered Cadmium-Coated Silica Nanoparticles on Human Pulmonary Cells. *J. Toxicol.* 2013, 1–10.

Devouassoux, G. (2000). [Polynuclear basophils, the key to allergic reactions. Modulations by chemokines]. *Rev. Mal. Respir.* 17, 629–640.

Dogan, B., Scherl, E., Bosworth, B., Yantiss, R., Altier, C., McDonough, P.L., Jiang, Z.-D., DuPont, H.L., Garneau, P., Harel, J., et al. (2013). Multidrug Resistance Is Common in Escherichia coli Associated with Ileal Crohn's Disease: *Inflamm. Bowel Dis.* 19, 141–150.

Dorier, M., Brun, E., Veronesi, G., Barreau, F., Pernet-Gallay, K., Desvergne, C., Rabilloud, T., Carapito, C., Herlin-Boime, N., and Carrière, M. (2015). Impact of anatase and rutile titanium dioxide nanoparticles on uptake carriers and efflux pumps in Caco-2 gut epithelial cells. *Nanoscale* 7, 7352–7360.

Dorier, M., Béal, D., Marie-Desvergne, C., Dubosson, M., Barreau, F., Houdeau, E., Herlin-Boime, N., and Carrière, M. (2017). Continuous *in vitro* exposure of intestinal epithelial cells to E171 food additive causes oxidative stress, inducing oxidation of DNA bases but no endoplasmic reticulum stress. *Nanotoxicology* 1–11.

Dow Corning corporation (2012). Silica Fume.

Dunkelberger, J.R., and Song, W.-C. (2010). Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 20, 34–50.

Eggersdorfer, M.L., and Pratsinis, S.E. (2014). Agglomerates and aggregates of nanoparticles made in

the gas phase. *Adv. Powder Technol.* *25*, 71–90.

Eming, S.A., Martin, P., and Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Sci. Transl. Med.* *6*, 265sr6-265sr6.

Erdman, L.K., Cosio, G., Helmers, A.J., Gowda, D.C., Grinstein, S., and Kain, K.C. (2009). CD36 and TLR Interactions in Inflammation and Phagocytosis: Implications for Malaria. *J. Immunol.* *183*, 6452–6459.

European Commission, and Directorate General for Health & Consumers (2013). Opinion on Titanium Dioxide (nano form): COLIPA n° S75. (Luxembourg: European Commission).

Fang, F.C. (2004). Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat. Rev. Microbiol.* *2*, 820–832.

Faraday, M. (1857). The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* *147*, 145–181.

Fletcher, A., Phillips, D., and Barrow, I. (1994). Determination of crystalline silica in silica fume. *Talanta* *41*, 1663–1668.

Foster, J.A., and McVey Neufeld, K.-A. (2013). Gut–brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci.* *36*, 305–312.

Freire, J.M., Domingues, M.M., Matos, J., Melo, M.N., Veiga, A.S., Santos, N.C., and Castanho, M.A.R.B. (2011). Using zeta-potential measurements to quantify peptide partition to lipid membranes. *Eur. Biophys. J.* *40*, 481–487.

Fröhlich, E., and Fröhlich, E. (2016). Cytotoxicity of Nanoparticles Contained in Food on Intestinal Cells and the Gut Microbiota. *Int. J. Mol. Sci.* *17*, 509.

Fu, P.P., Xia, Q., Hwang, H.-M., Ray, P.C., and Yu, H. (2014). Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species. *J. Food Drug Anal.* *22*, 64–75.

Fubini, B., and Hubbard, A. (2003). Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic. Biol. Med.* *34*, 1507–1516.

Fubini, B., Bolis, V., and Giamello, E. (1987). The surface chemistry of crushed quartz dust in relation to its pathogenicity. *Inorganica Chim. Acta* *138*, 193–197.

Ganz, T. (2002). Epithelia: Not just physical barriers: Figure 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 3357–3358.

Ganz, T. (2012). Macrophages and Systemic Iron Homeostasis. *J. Innate Immun.* *4*, 446–453.

Gatoo, M.A., Naseem, S., Arfat, M.Y., Mahmood Dar, A., Qasim, K., and Zubair, S. (2014). Physicochemical Properties of Nanomaterials: Implication in Associated Toxic Manifestations. *BioMed Res. Int.* *2014*, 1–8.

Giles, J. (2003). What is there to fear from something so small?: Nanotechnology. *Nature* *426*, 750–750.

Ginhoux, F., and Guilliams, M. (2016). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* *44*, 439–449.

Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Basu, S.K., and Brown, M.S. (1979). Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *76*, 333–337.

Gomez Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M.F., Geissmann, F., et al. (2014). Tissue-resident macrophages originate from

- yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 518, 547–551.
- Goodman, C.M., McCusker, C.D., Yilmaz, T., and Rotello, V.M. (2004). Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. *Bioconjug. Chem.* 15, 897–900.
- Gordon, S. (2016). Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity* 44, 463–475.
- Gougerot-Pocidallo, M.-A., Elbim, C., Dang, P.M.C., and El Benna, J. (2006). [Primary immune deficiencies in neutrophil functioning]. *Presse Medicale Paris Fr.* 133, 871–878.
- Griffitt, R.J., Luo, J., Gao, J., Bonzongo, J.-C., and Barber, D.S. (2008). EFFECTS OF PARTICLE COMPOSITION AND SPECIES ON TOXICITY OF METALLIC NANOMATERIALS IN AQUATIC ORGANISMS. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1972.
- Guarner, F., and Malagelada, J.-R. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet* 361, 512–519.
- Guo, M., Xu, X., Yan, X., Wang, S., Gao, S., and Zhu, S. (2013). In vivo biodistribution and synergistic toxicity of silica nanoparticles and cadmium chloride in mice. *J. Hazard. Mater.* 260, 780–788.
- Gurr, J.-R., Wang, A.S.S., Chen, C.-H., and Jan, K.-Y. (2005). Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 213, 66–73.
- Hamilton, R.F., Thakur, S.A., and Holian, A. (2008). Silica binding and toxicity in alveolar macrophages. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 1246–1258.
- Hausmann, M., Kiessling, S., Mestermann, S., Webb, G., Spöttl, T., Andus, T., Schölmerich, J., Herfarth, H., Ray, K., Falk, W., et al. (2002). Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* 122, 1987–2000.
- He, X., and Hwang, H.-M. (2016). Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment. *J. Food Drug Anal.* 24, 671–681.
- He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C., and Yin, C. (2010). Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials* 31, 3657–3666.
- Heidland, A., Klassen, A., Sebekova, K., and Bahner, U. (2009). Beginning of modern concept of inflammation: the work of Friedrich Daniel von Recklinghausen and Julius Friedrich Cohnheim. *J. Nephrol.* 22 Suppl 14, 71–79.
- Heiligtag, F.J., and Niederberger, M. (2013). The fascinating world of nanoparticle research. *Mater. Today* 16, 262–271.
- Hibbs Jr., J.B. (2002). Infection and Nitric Oxide. *J. Infect. Dis.* 185, S9–S17.
- Hickey, W.F. (1999). Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. *Semin. Immunol.* 11, 125–137.
- Hoet, P.H., Brüske-Hohlfeld, I., and Salata, O.V. (2004). Nanoparticles - known and unknown health risks. *J. Nanobiotechnology* 2, 12.
- Holmgren, J., and Czerkinsky, C. (2005). Mucosal immunity and vaccines. *Nat. Med.* 11, S45–S53.
- Hsiao, I.-L., and Huang, Y.-J. (2011). Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO₂ nanoparticles toward human lung epithelial cells. *Sci. Total Environ.* 409, 1219–1228.
- IARC. (2012). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 100 C, arsenic, metals, fibres, and dusts: this publication represents the views and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which met in Lyon, 17 - 24 March 2009

(Lyon: IARC).

INRS (1997). Silice cristalline. Fiche Toxicol. N°232 1–9.

INRS (2013). Dioxyde de titane. Fiche Toxicol. N°291.

INRS (2018). Nanomatériaux, nanoparticules. Santé Sécurité Au Trav. 1–38.

Jahn, M.R., Andreasen, H.B., Fütterer, S., Nawroth, T., Schünemann, V., Kolb, U., Hofmeister, W., Muñoz, M., Bock, K., Meldal, M., et al. (2011). A comparative study of the physicochemical properties of iron isomaltoside 1000 (Monofer®), a new intravenous iron preparation and its clinical implications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 78, 480–491.

Jarcho, S. (1971). Augustus volney waller on blood vessels and inflammation-II. *Am. J. Cardiol.* 28, 712–714.

Javurek, A.B., Suresh, D., Spollen, W.G., Hart, M.L., Hansen, S.A., Ellersieck, M.R., Bivens, N.J., Givan, S.A., Upendran, A., Kannan, R., et al. (2017). Gut Dysbiosis and Neurobehavioral Alterations in Rats Exposed to Silver Nanoparticles. *Sci. Rep.* 7.

Jiang, J., Oberdörster, G., Elder, A., Gelein, R., Mercer, P., and Biswas, P. (2008a). Does nanoparticle activity depend upon size and crystal phase? *Nanotoxicology* 2, 33–42.

Jiang, W., Kim, B.Y.S., Rutka, J.T., and Chan, W.C.W. (2008b). Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat. Nanotechnol.* 3, 145–150.

Jung, C., Hugot, J.-P., and Barreau, F. (2010). Peyer’s Patches: The Immune Sensors of the Intestine. *Int. J. Inflamm.* 2010, 1–12.

Jurašin, D.D., Ćurlin, M., Capjak, I., Crnković, T., Lovrić, M., Babič, M., Horák, D., Vinković Vrček, I., and Gajović, S. (2016). Surface coating affects behavior of metallic nanoparticles in a biological environment. *Beilstein J. Nanotechnol.* 7, 246–262.

Kamp, D.W., Graceffa, P., Pryor, W.A., and Weitzman, S.A. (1992). The role of free radicals in asbestos-induced diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 12, 293–315.

Kaufmann, S.H.E. (2008). Immunology’s foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nat. Immunol.* 9, 705–712.

Kobayashi, E.H., Suzuki, T., Funayama, R., Nagashima, T., Hayashi, M., Sekine, H., Tanaka, N., Moriguchi, T., Motohashi, H., Nakayama, K., et al. (2016). Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat. Commun.* 7, 11624.

Koehler, A.R. (2015). Toxicity of Engineered Nanomaterials.

Koeneman, B.A., Zhang, Y., Westerhoff, P., Chen, Y., Crittenden, J.C., and Capco, D.G. (2010). Toxicity and cellular responses of intestinal cells exposed to titanium dioxide. *Cell Biol. Toxicol.* 26, 225–238.

Koh, T.J., and DiPietro, L.A. (2011). Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev. Mol. Med.* 13.

Kong, B., Seog, J.H., Graham, L.M., and Lee, S.B. (2011). Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. *Nanomed.* 6, 929–941.

Kourany, J.A. (2010). *Philosophy of science after feminism* (Oxford ; New York: Oxford University Press).

Kroll, A., Pillukat, M.H., Hahn, D., and Schnekenburger, J. (2009). Current in vitro methods in

- nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72, 370–377.
- Kühl, A.A., Erben, U., Kredel, L.I., and Siegmund, B. (2015). Diversity of Intestinal Macrophages in Inflammatory Bowel Diseases. *Front. Immunol.* 6.
- Labouta, H.I., El-Khordagui, L.K., Kraus, T., and Schneider, M. (2011). Mechanism and determinants of nanoparticle penetration through human skin. *Nanoscale* 3, 4989.
- Lamprecht, A., Schäfer, U., and Lehr, C.M. (2001). Size-dependent bioadhesion of micro- and nanoparticulate carriers to the inflamed colonic mucosa. *Pharm. Res.* 18, 788–793.
- Landén, N.X., Li, D., and Stähle, M. (2016). Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 3861–3885.
- Laux, P., Tentschert, J., Riebeling, C., Braeuning, A., Creutzenberg, O., Epp, A., Fessard, V., Haas, K.-H., Haase, A., Hund-Rinke, K., et al. (2018). Nanomaterials: certain aspects of application, risk assessment and risk communication. *Arch. Toxicol.* 92, 121–141.
- Le Hir P. (2016). Des nanoparticules dans nos assiettes. *Le Monde*.
- Le Hir P. (2017). Alerte sur les dangers du dioxyde de titane E171, un additif alimentaire très courant. *Le Monde*.
- Lee, S.B., Lee, H.W., Singh, T.D., Li, Y., Kim, S.K., Cho, S.J., Lee, S.-W., Jeong, S.Y., Ahn, B.-C., Choi, S., et al. (2017). Visualization of Macrophage Recruitment to Inflammation Lesions using Highly Sensitive and Stable Radionuclide-Embedded Gold Nanoparticles as a Nuclear Bio-Imaging Platform. *Theranostics* 7, 926–934.
- Lefebvre, T., and Raynal, C. (2002). De l'Institut Pasteur à Radio Luxembourg. L'histoire étonnante du Tho-Radia. *Rev. Hist. Pharm.* 90, 461–480.
- Légifrance (2009). LOI n° 2009-967 du 3 août 2009 de programmation relative à la mise en œuvre du Grenelle de l'environnement. Article 42.
<https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000020949548>
- Légifrance (2010). LOI n° 2010-788 du 12 juillet 2010 portant engagement national pour l'environnement. Article 185.
<https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000022470434&categorieLien=id>
- Lieleg, O., and Ribbeck, K. (2011). Biological hydrogels as selective diffusion barriers. *Trends Cell Biol.* 21, 543–551.
- Lin, J., Zhang, H., Chen, Z., and Zheng, Y. (2010). Penetration of Lipid Membranes by Gold Nanoparticles: Insights into Cellular Uptake, Cytotoxicity, and Their Relationship. *ACS Nano* 4, 5421–5429.
- Lissner, D., Schumann, M., Batra, A., Kredel, L.-I., Kühl, A.A., Erben, U., May, C., Schulzke, J.-D., and Siegmund, B. (2015). Monocyte and M1 Macrophage-induced Barrier Defect Contributes to Chronic Intestinal Inflammation in IBD: *Inflamm. Bowel Dis.* 1.
- Lu, Z., Rong, K., Li, J., Yang, H., and Chen, R. (2013). Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 24, 1465–1471.
- Lund, L.G., and Aust, A.E. (1991). Iron-catalyzed reactions may be responsible for the biochemical and biological effects of asbestos. *BioFactors Oxf. Engl.* 3, 83–89.
- Lundqvist, M., Stigler, J., Elia, G., Lynch, I., Cedervall, T., and Dawson, K.A. (2008). Nanoparticle size

and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 14265–14270.

Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., and Hori, K. (2000). Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *65*, 271–284.

Martin, C., and Vincent, J.-L. (2011). *Sepsis grave et choc septique* (Paris: Springer Paris : Imprint : Springer).

Ministère de l'économie (2018). Contrôle de la présence de nanoparticules dans les produits alimentaires et les cosmétiques par la DGCCRF. https://www.economie.gouv.fr/dgccrf/contrôle-presence-nanoparticules-dans-produits-alimentaires-et-cosmetiques-par-dgccrf#_ftn1

Migdal, C., and Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Médecine/Sciences* *27*, 405–412.

Miserocchi, G., Sancini, G., Mantegazza, F., and Chiappino, G. (2008). Translocation pathways for inhaled asbestos fibers. *Environ. Health* *7*.

Mittal, M., Siddiqui, M.R., Tran, K., Reddy, S.P., and Malik, A.B. (2014). Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxid. Redox Signal.* *20*, 1126–1167.

Mohammad Mansour (2015). Develop a strategic Forecast of silica sand based on supply chain decomposition. *Int. J. Eng.* *9*, 9–27.

Mohan, R.D., Krishna, R.P., and Venkat, R.B. (2012). Process for the preparation of iron (iii) carboxymaltose complex (Google Patents).

Monteiro-Riviere, N.A., Wiench, K., Landsiedel, R., Schulte, S., Inman, A.O., and Riviere, J.E. (2011). Safety Evaluation of Sunscreen Formulations Containing Titanium Dioxide and Zinc Oxide Nanoparticles in UVB Sunburned Skin: An In Vitro and In Vivo Study. *Toxicol. Sci.* *123*, 264–280.

Moore, K.J., Sheedy, F.J., and Fisher, E.A. (2013). Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 709–721.

Moore, R.A., Gaskell, H., Rose, P., and Allan, J. (2011). Meta-analysis of efficacy and safety of intravenous ferric carboxymaltose (Ferinject) from clinical trial reports and published trial data. *BMC Blood Disord.* *11*.

Morgan, M.J., and Liu, Z. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res.* *21*, 103–115.

Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 958–969.

Mossman, B.T., and Churg, A. (1998). Mechanisms in the Pathogenesis of Asbestosis and Silicosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *157*, 1666–1680.

Mowat, A.M., Scott, C.L., and Bain, C.C. (2017). Barrier-tissue macrophages: functional adaptation to environmental challenges. *Nat. Med.* *23*, 1258–1270.

Mrugala, M.M. (2013). Advances and challenges in the treatment of glioblastoma: a clinician's perspective. *Discov. Med.* *15*, 221–230.

Murray, P.J., and Wynn, T.A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 723–737.

- Murugadoss, S., Lison, D., Godderis, L., Van Den Brule, S., Mast, J., Brassinne, F., Sebaihi, N., and Hoet, P.H. (2017). Toxicology of silica nanoparticles: an update. *Arch. Toxicol.* *91*, 2967–3010.
- Nakane, H. (2012). Translocation of particles deposited in the respiratory system: a systematic review and statistical analysis. *Environ. Health Prev. Med.* *17*, 263–274.
- Nakatsuji, T., Kao, M.C., Zhang, L., Zouboulis, C.C., Gallo, R.L., and Huang, C.-M. (2010). Sebum Free Fatty Acids Enhance the Innate Immune Defense of Human Sebocytes by Upregulating β -Defensin-2 Expression. *J. Invest. Dermatol.* *130*, 985–994.
- Navegantes, K.C., de Souza Gomes, R., Pereira, P.A.T., Czaikoski, P.G., Azevedo, C.H.M., and Monteiro, M.C. (2017). Immune modulation of some autoimmune diseases: the critical role of macrophages and neutrophils in the innate and adaptive immunity. *J. Transl. Med.* *15*.
- Nel, A. (2006). Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science* *311*, 622–627.
- Nemmar, A. (2002). Passage of Inhaled Particles Into the Blood Circulation in Humans. *Circulation* *105*, 411–414.
- N'Sondé V. Médicaments : des nanos dans l'Effergal et le Nurofen.
- Oberdörster, G. (2001). Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* *74*, 1–8.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., and Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environ. Health Perspect.* *113*, 823–839.
- Papagrigrakis, M.J., Yapijakis, C., Synodinos, P.N., and Baziotopoulou-Valavani, E. (2006). DNA examination of ancient dental pulp incriminates typhoid fever as a probable cause of the Plague of Athens. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* *10*, 206–214.
- Parisi, L., Gini, E., Baci, D., Tremolati, M., Fanuli, M., Bassani, B., Farronato, G., Bruno, A., and Mortara, L. (2018). Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders? *J. Immunol. Res.* *2018*, 1–25.
- Peiser, L., and Gordon, S. (2001). The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. *Microbes Infect.* *3*, 149–159.
- Peretz, A., Checkoway, H., Kaufman, J.D., Trajber, I., and Lerman, Y. (2006). Silica, silicosis, and lung cancer. *Isr. Med. Assoc. J. IMAJ* *8*, 114–118.
- Petersen, N., Kirkegaard, T., and Jøttel, M. (2014). Lysosomal Stability Assay. *BIO-Protoc.* *4*.
- Petros, R.A., and DeSimone, J.M. (2010). Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* *9*, 615–627.
- Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., and Nowack, B. (2012). Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *J. Nanoparticle Res.* *14*.
- Ponce Del Castillo, A.M. (2010). La réglementation européenne en matière de nanotechnologies. *Courr. Hebd. CRISP* *2065*, 5.
- Powell, J.J., Faria, N., Thomas-McKay, E., and Pele, L.C. (2010). Origin and fate of dietary nanoparticles and microparticles in the gastrointestinal tract. *J. Autoimmun.* *34*, J226–J233.
- Rabinovitch, M. (1995). Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol.* *5*, 85–87.
- Rather, L.J. (1971). Disturbance of function (functio laesa): the legendary fifth cardinal sign of

- inflammation, added by Galen to the four cardinal signs of Celsus. *Bull. N. Y. Acad. Med.* *47*, 303–322.
- Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I.S., and Hoekstra, D. (2004). Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.* *377*, 159–169.
- Retief, F.P., and Cilliers, L. (1998). The epidemic of Athens, 430-426 BC. *South Afr. Med. J. Suid-Afr. Tydskr. Vir Geneesk.* *88*, 50–53.
- Ricaud M. (2007). Les silices amorphes. INRS - Point Connaiss. ED 5030 1–6.
- Rieder, F., Brenmoehl, J., Leeb, S., Scholmerich, J., and Rogler, G. (2007). Wound healing and fibrosis in intestinal disease. *Gut* *56*, 130–139.
- Riemer, J., Hoepken, H.H., Czerwinska, H., Robinson, S.R., and Dringen, R. (2004). Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. *Anal. Biochem.* *331*, 370–375.
- des Rieux, A., Fievez, V., Théate, I., Mast, J., Pr at, V., and Schneider, Y.-J. (2007). An improved in vitro model of human intestinal follicle-associated epithelium to study nanoparticle transport by M cells. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* *30*, 380–391.
- van Rijt, S.H., Bein, T., and Meiners, S. (2014). Medical nanoparticles for next generation drug delivery to the lungs. *Eur. Respir. J.* *44*, 765–774.
- Rogers, D.F. (2007). Physiology of airway mucus secretion and pathophysiology of hypersecretion. *Respir. Care* *52*, 1134-1146; discussion 1146-1149.
- Rondina, M.T., Weyrich, A.S., and Zimmerman, G.A. (2013). Platelets as Cellular Effectors of Inflammation in Vascular Diseases. *Circ. Res.* *112*, 1506–1519.
- Rosin, D.L., and Okusa, M.D. (2011). Dangers within: DAMP responses to damage and cell death in kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *22*, 416–425.
- Rubio-Perez, J.M., and Morillas-Ruiz, J.M. (2012). A Review: Inflammatory Process in Alzheimer’s Disease, Role of Cytokines. *Sci. World J.* *2012*, 1–15.
- Santaolalla, R., Fukata, M., and Abreu, M.T. (2011). Innate immunity in the small intestine: *Curr. Opin. Gastroenterol.* *27*, 125–131.
- Satzer, P., Svec, F., Sekot, G., and Jungbauer, A. (2016). Protein adsorption onto nanoparticles induces conformational changes: Particle size dependency, kinetics, and mechanisms. *Eng. Life Sci.* *16*, 238–246.
- Sauer, U.G., Kneuer, C., Tentschert, J., W achter, T., Schroeder, M., Butzke, D., Luch, A., Liebsch, M., Grune, B., and G tz, M.E. (2011). A knowledge-based search engine to navigate the information thicket of nanotoxicology. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* *59*, 47–52.
- Sbarra, A.J., and Karnovsky, M.L. (1959). The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* *234*, 1355–1362.
- Schaefer, L. (2014). Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns. *J. Biol. Chem.* *289*, 35237–35245.
- Schreiver, I., Hesse, B., Seim, C., Castillo-Michel, H., Villanova, J., Laux, P., Dreijack, N., Penning, R., Tucoulou, R., Cotte, M., et al. (2017). Synchrotron-based v-XRF mapping and μ -FTIR microscopy enable to look into the fate and effects of tattoo pigments in human skin. *Sci. Rep.* *7*.
- Sciau, P. (2012). Nanoparticles in Ancient Materials: The Metallic Lustre Decorations of Medieval Ceramics. In *The Delivery of Nanoparticles*, A.A. Hashim, ed. (InTech), p.

- Selders, G.S., Fetz, A.E., Radic, M.Z., and Bowlin, G.L. (2017). An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. *Regen. Biomater.* 4, 55–68.
- Selsted, M.E., and Ouellette, A.J. (2005). Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat. Immunol.* 6, 551–557.
- Sepehri, M., Sejersen, T., Qvortrup, K., Lerche, C.M., and Serup, J. (2017). Tattoo Pigments Are Observed in the Kupffer Cells of the Liver Indicating Blood-Borne Distribution of Tattoo Ink. *Dermatology* 233, 86–93.
- Singh, P., and Nanda, A. (2014). Enhanced sun protection of nano-sized metal oxide particles over conventional metal oxide particles: An *in vitro* comparative study. *Int. J. Cosmet. Sci.* 36, 273–283.
- Smijs, T., and Pavel (2011). Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 95.
- Sokolov, S.V., Tschulik, K., Batchelor-McAuley, C., Jurkschat, K., and Compton, R.G. (2015). Reversible or Not? Distinguishing Agglomeration and Aggregation at the Nanoscale. *Anal. Chem.* 87, 10033–10039.
- Srikrishna, G., and Freeze, H.H. (2009). Endogenous damage-associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer. *Neoplasia N. Y. N* 11, 615–628.
- Stamler, J.S., Lamas, S., and Fang, F.C. (2001). Nitrosylation. *Cell* 106, 675–683.
- Strambeanu, N., Demetrovici, L., and Dragos, D. (2015). Natural Sources of Nanoparticles. In *Nanoparticles' Promises and Risks*, M. Lungu, A. Neculae, M. Bunoiu, and C. Biris, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 9–19.
- Thibodeau, M. (2003). Silica-Induced Caspase Activation in Mouse Alveolar Macrophages Is Dependent upon Mitochondrial Integrity and Aspartic Proteolysis. *Toxicol. Sci.* 76, 91–101.
- Thibodeau, M.S., Giardina, C., Knecht, D.A., Helble, J., and Hubbard, A.K. (2004). Silica-Induced Apoptosis in Mouse Alveolar Macrophages Is Initiated by Lysosomal Enzyme Activity. *Toxicol. Sci.* 80, 34–48.
- Tinkle, S.S., Antonini, J.M., Rich, B.A., Roberts, J.R., Salmen, R., DePree, K., and Adkins, E.J. (2003). Skin as a Route of Exposure and Sensitization in Chronic Beryllium Disease. *Environ. Health Perspect.* 111, 1202–1208.
- Toblli, J., and Angerosa, M. (2014). Optimizing iron delivery in the management of anemia: patient considerations and the role of ferric carboxymaltose. *Drug Des. Devel. Ther.* 2475.
- Travis, J. (2009). On the Origin of The Immune System. *Science* 324, 580–582.
- Triboulet, S., Aude-Garcia, C., Carrière, M., Diemer, H., Proamer, F., Habert, A., Chevallet, M., Collin-Faure, V., Strub, J.-M., Hanau, D., et al. (2013). Molecular Responses of Mouse Macrophages to Copper and Copper Oxide Nanoparticles Inferred from Proteomic Analyses. *Mol. Cell. Proteomics* 12, 3108–3122.
- Triboulet, S., Aude-Garcia, C., Armand, L., Gerdil, A., Diemer, H., Proamer, F., Collin-Faure, V., Habert, A., Strub, J.-M., Hanau, D., et al. (2014). Analysis of cellular responses of macrophages to zinc ions and zinc oxide nanoparticles: a combined targeted and proteomic approach. *Nanoscale* 6, 6102–6114.
- Triboulet, S., Aude-Garcia, C., Armand, L., Collin-Faure, V., Chevallet, M., Diemer, H., Gerdil, A., Proamer, F., Strub, J.-M., Habert, A., et al. (2015). Comparative Proteomic Analysis of the Molecular

- Responses of Mouse Macrophages to Titanium Dioxide and Copper Oxide Nanoparticles Unravels Some Toxic Mechanisms for Copper Oxide Nanoparticles in Macrophages. *PLOS ONE* *10*, e0124496.
- Uboldi, C., Giudetti, G., Broggi, F., Gilliland, D., Ponti, J., and Rossi, F. (2012). Amorphous silica nanoparticles do not induce cytotoxicity, cell transformation or genotoxicity in Balb/3T3 mouse fibroblasts. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* *745*, 11–20.
- Vance, M.E., Kuiken, T., Vejerano, E.P., McGinnis, S.P., Hochella, M.F., Rejeski, D., and Hull, M.S. (2015). Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J. Nanotechnol.* *6*, 1769–1780.
- Vaught et al. (2015). Efferocytosis Creates a Tumor Microenvironment Supportive of Tumor Survival and Metastasis. *Cancer Cell Microenviron.*
- VeilleNanos (2012). Encadrement des nanomatériaux : après les ONG, des Etats membres font pression sur la Commission européenne. Et bientôt les députés européens ? <http://veillenanos.fr/wakka.php?wiki=ComEurPressionEmFin2012#CW>
- Verma, A., and Stellacci, F. (2010). Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions. *Small* *6*, 12–21.
- Vignais, P.V. (2002). The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *59*, 1428–1459.
- Wagner, J.C., Sleggs, C.A., and Marchand, P. (1960). Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province. *Br. J. Ind. Med.* *17*, 260–271.
- Wang, B., Zhang, Y., Mao, Z., Yu, D., and Gao, C. (2014). Toxicity of ZnO nanoparticles to macrophages due to cell uptake and intracellular release of zinc ions. *J. Nanosci. Nanotechnol.* *14*, 5688–5696.
- Warheit, D.B., McHugh, T.A., and Hartsky, M.A. (1995). Differential pulmonary responses in rats inhaling crystalline, colloidal or amorphous silica dusts. *Scand. J. Work. Environ. Health* *21 Suppl 2*, 19–21.
- Weller, P.F., and Spencer, L.A. (2017). Functions of tissue-resident eosinophils. *Nat. Rev. Immunol.* *17*, 746–760.
- Wright, H.L., Moots, R.J., Bucknall, R.C., and Edwards, S.W. (2010). Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology* *49*, 1618–1631.
- Wu, H.-C., and Chang, D.-K. (2010). Peptide-Mediated Liposomal Drug Delivery System Targeting Tumor Blood Vessels in Anticancer Therapy. *J. Oncol.* *2010*, 1–8.
- Wu, J., Yang, S., Luo, H., Zeng, L., Ye, L., and Lu, Y. (2006). Quantitative evaluation of monocyte transmigration into the brain following chemical opening of the blood–brain barrier in mice. *Brain Res.* *1098*, 79–85.
- Wu, J., Liu, W., Xue, C., Zhou, S., Lan, F., Bi, L., Xu, H., Yang, X., and Zeng, F.-D. (2009). Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicol. Lett.* *191*, 1–8.
- Wynn, T.A., and Vannella, K.M. (2016). Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* *44*, 450–462.
- Yan, L., Zhang, S., Chen, P., Liu, H., Yin, H., and Li, H. (2012). Magnetotactic bacteria, magnetosomes and their application. *Microbiol. Res.* *167*, 507–519.

- Yanicostas C. (2018). La faiblesse des alternatives à l'expérimentation animale. *Libération* 1–7.
- Yin, H., Too, H.P., and Chow, G.M. (2005). The effects of particle size and surface coating on the cytotoxicity of nickel ferrite. *Biomaterials* 26, 5818–5826.
- Yu, H., Ha, T., Liu, L., Wang, X., Gao, M., Kelley, J., Kao, R., Williams, D., and Li, C. (2012). Scavenger receptor A (SR-A) is required for LPS-induced TLR4 mediated NF- κ B activation in macrophages. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1823, 1192–1198.
- Yue, Z.-G., Wei, W., Lv, P.-P., Yue, H., Wang, L.-Y., Su, Z.-G., and Ma, G.-H. (2011). Surface Charge Affects Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Chitosan-Based Nanoparticles. *Biomacromolecules* 12, 2440–2446.
- Zanganeh, S., Hutter, G., Spitler, R., Lenkov, O., Mahmoudi, M., Shaw, A., Pajarinen, J.S., Nejadnik, H., Goodman, S., Moseley, M., et al. (2016). Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues. *Nat. Nanotechnol.* 11, 986–994.
- Zani, I., Stephen, S., Mughal, N., Russell, D., Homer-Vanniasinkam, S., Wheatcroft, S., and Ponnambalam, S. (2015). Scavenger Receptor Structure and Function in Health and Disease. *Cells* 4, 178–201.
- Zdolsek, J.M., Olsson, G.M., and Brunk, U.T. (1990). Photooxidative damage to lysosomes of cultured macrophages by acridine orange. *Photochem. Photobiol.* 51, 67–76.
- Zhao, L., Seth, A., Wibowo, N., Zhao, C.-X., Mitter, N., Yu, C., and Middelberg, A.P.J. (2014). Nanoparticle vaccines. *Vaccine* 32, 327–337.
- Zimmerman, B.T., Canono, B.P., and Campbell, P.A. (1986). Silica decreases phagocytosis and bactericidal activity of both macrophages and neutrophils in vitro. *Immunology* 59, 521–525.
- Zvyagin, A.V., Zhao, X., Gierden, A., Sanchez, W., Ross, J.A., and Roberts, M.S. (2008). Imaging of zinc oxide nanoparticle penetration in human skin in vitro and in vivo. *J. Biomed. Opt.* 13, 064031.

ANNEXES

Annexe 1 : Résultats supplémentaires sur l'imagerie du petit animal

1. Choix de la sonde servant au suivi des macrophages et de sa dose de travail

Plusieurs types de marqueurs ont été évalués afin de suivre les macrophages primaires injectés en imagerie du petit animal. Dans notre cas, nous en avons testé quatre et parmi eux, nous en avons validé un seul. Les différents types de sondes évalués sont présentés ci-dessous :

Dans un premier temps, le fer étant détectable par des techniques photoacoustiques (PA), nous avons évalué s'il était envisageable de suivre les macrophages chargés en Ferinject® par cette méthode. Bien que le Ferinject® soit détectable via la méthode photoacoustique, il est en revanche mesurable seulement à de fortes concentrations (50µg/mL à 12,5µg/mL) (Figure Sup.1). Le Ferinject® n'est donc pas détectable aux concentrations utilisées dans notre stratégie thérapeutique (1mg/mL). Cette technique a donc été abandonnée.

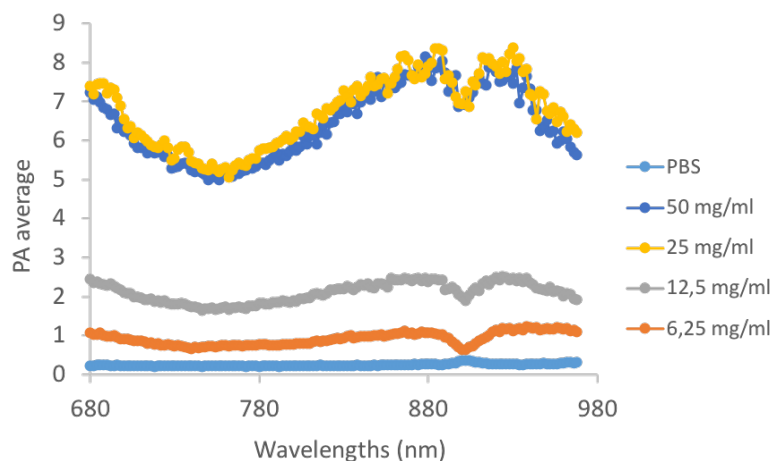


Figure supplémentaire 1 – Annexe 1. Détection du Ferinject® par méthode photoacoustique.

Dans un second temps, les essais de transfection et les tests de sondes nanoparticulaires envisagés étant infructueux, nous nous sommes focalisés sur des particules fluorescentes de 200nm de diamètre nommées « Fluosphères Dark-red » vendues par ThermoFisher-Scientifique. Ces particules émettent un signal fluorescent dans le proche infrarouge détectable par les outils d'imagerie présents dans la plateforme d'imagerie Optimal (Figure Sup.2).

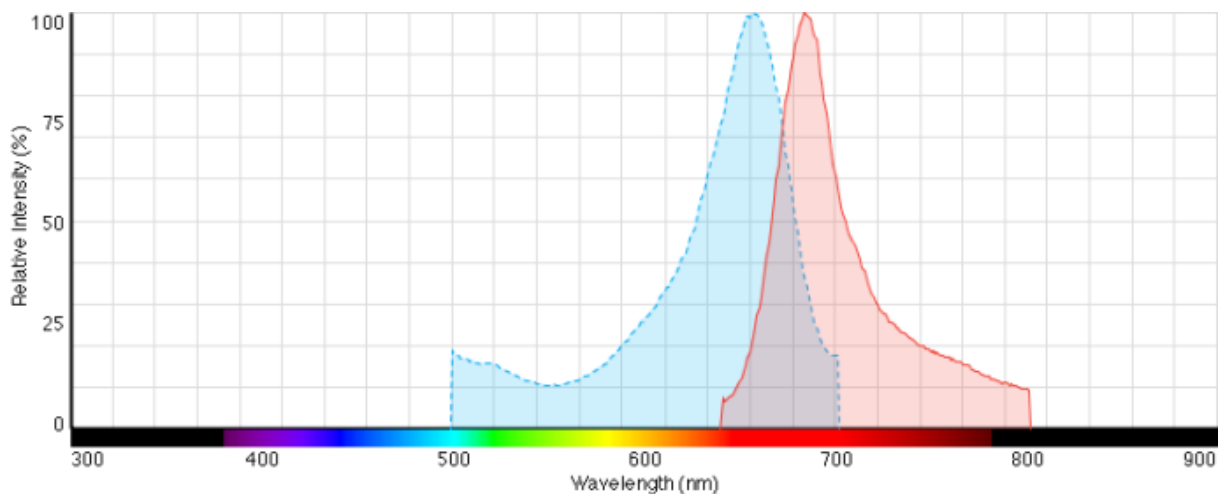


Figure supplémentaire 2 – Annexe 1. Longueur d'onde d'émission et d'excitation des FluoSphères™ Carboxylate-Modified Microspheres, 0.2 µm, darkred fluorescent (660/680), 2% solids.

Cette sonde a montré de bons résultats concernant à la fois l'intensité du signal fluorescent, la stabilité des particules au cours du temps et les effets modérés sur la fonctionnalité des macrophages, même à de fortes concentrations d'incubation. Le choix de la concentration d'incubation de cette sonde a été décidé à partir d'un juste compromis entre les tests fonctionnels réalisés et l'intensité du signal obtenu. En effet, plus l'intensité du signal est élevée et plus la détection des macrophages sera précise. Cependant, si les fonctions des

macrophages sont trop altérées, les macrophages injectés risquent d'être moins aptes à migrer vers la zone d'intérêt (tumeur ou inflammation). De la même manière que pour le Ferinject®, les résultats des tests de viabilité, de phagocytose et de capacité inflammatoire présentés ci-dessous (Figures Sup. 3 et 4) ont permis de choisir la concentration de travail en fluosphères.

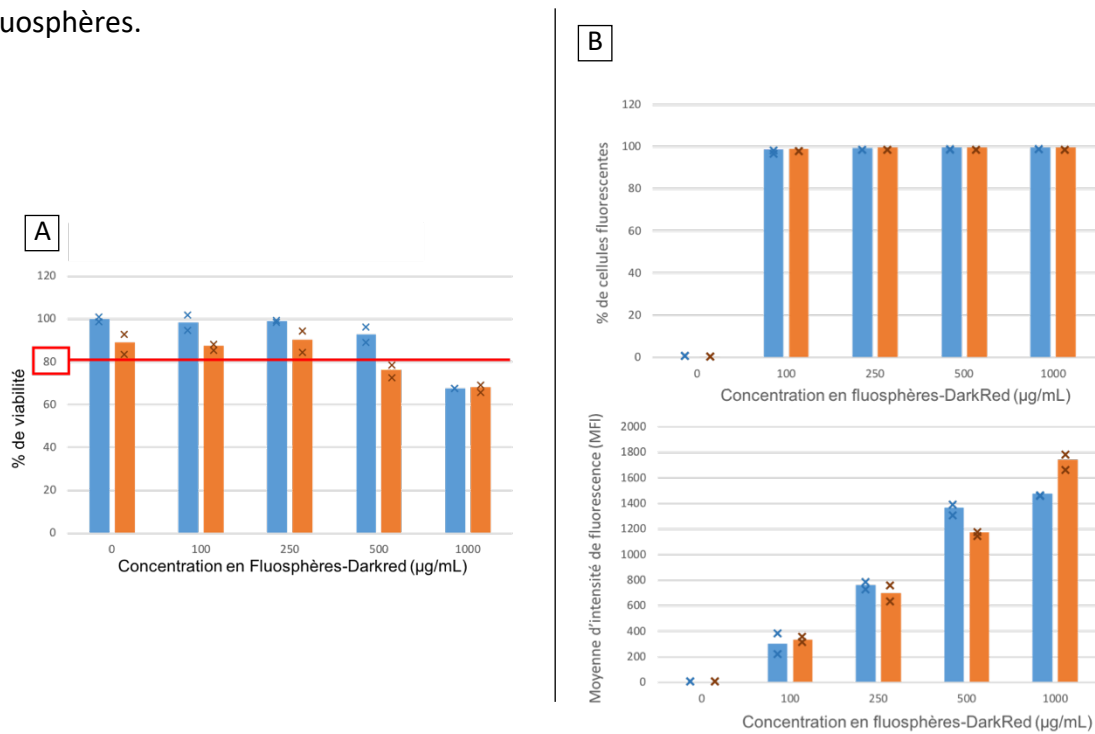


Figure supplémentaire 3 – Annexe 1. Premiers tests effectués in vitro sur les macrophages primaires avec les fluosphères Darkred. A- Test de viabilité en fonction de la concentration en fluosphères (0 à 1mg/mL) apportée. Cytomètre en flux FACScalibur, Iodure de propidium (1µg/mL). B- Estimation de la fluorescence des macrophages après incubation avec des fluosphères à des concentrations variables (0 à 1mg/mL) pendant 24h. Cytomètre en flux Facscalibur, excitation 635nm (FL4).

Après ces premiers tests, nous avons estimé que la concentration maximale testée (1mg/mL) génère une mortalité trop élevée >20% pour notre stratégie thérapeutique, même si l'intensité de fluorescence est globalement plus importante que pour les autres concentrations testées. Les tests fonctionnels ont ensuite été effectués pour les concentrations 0 à 500µg/mL de fluosphères (Figure Sup. 4).

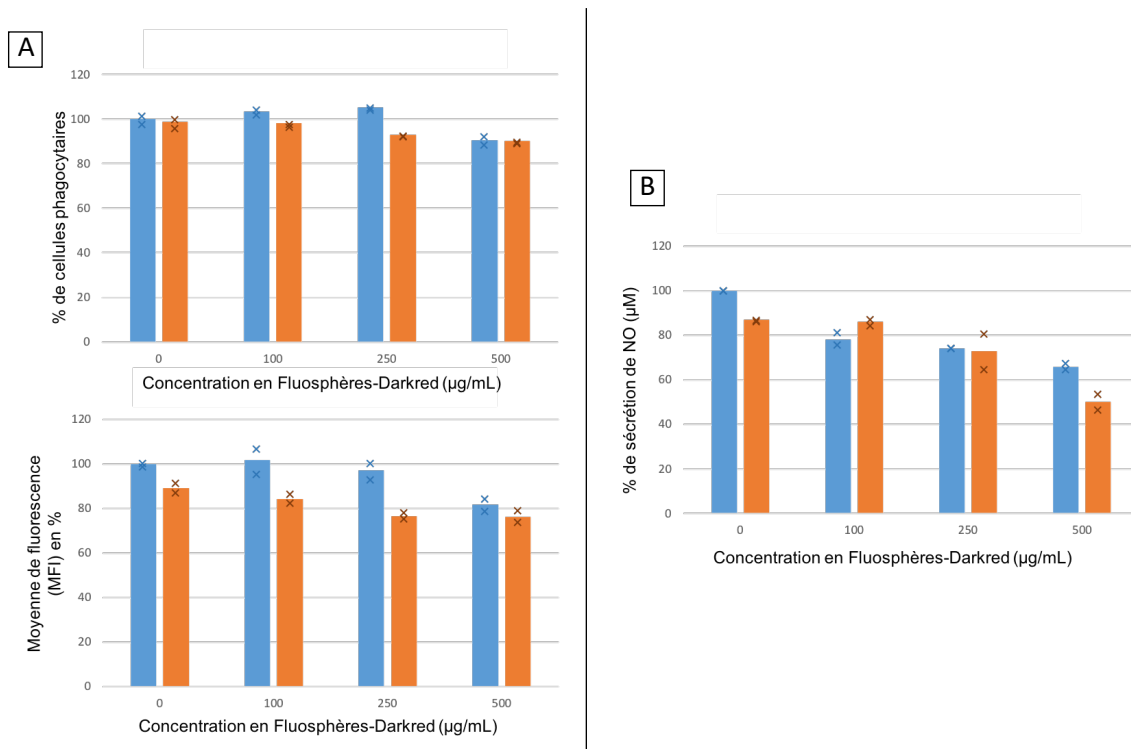


Figure supplémentaire 4 – Annexe 1. Tests effectués in vitro sur les macrophages primaires avec les fluosphères Darkred. A- Test de phagocytose en fonction de la concentration en fluosphères (0 à 500µg/mL) apportée. B- Test de capacité inflammatoire en réponse au LPS après incubation avec des concentrations variables en fluosphères pendant 24h (0 à 500µg/mL).

L'ensemble des tests fonctionnels de phagocytose et de capacité inflammatoire ont permis de montrer que la concentration en fluosphères de 500µg/mL induit des effets importants sur les macrophages primaires puisque nous observons d'une part, une légère diminution de la capacité phagocytaire et d'autre part, un impact important sur la production de NO. En effet, a cette concentration et en l'absence de Ferinject®, nous observons une diminution de 35% des NO sécrétés et cet effet s'intensifie en présence de Ferinject® car la concentration en NO diminue jusqu'à 50% par rapport au contrôle dépourvu de fluosphères et de Ferinject®.

A 250µg/mL, les effets des fluosphères sont beaucoup plus modérés, notamment en présence de Ferinject®. Cependant, l'équipe d'imagerie du petit animal de la plateforme Optimal a observé une détection trop faible pour suivre les macrophages *in vivo*. C'est pourquoi nous avons dû faire un compromis entre l'intensité de fluorescence nécessaire au suivi des macrophages et l'altération des principales fonctionnalités des macrophages. La concentration choisie en fluosphères est de 400µg/mL.

2. Tropisme et biodistribution des macrophages injectés après induction d'une zone inflammatoire sous-cutanée via injection de LPS

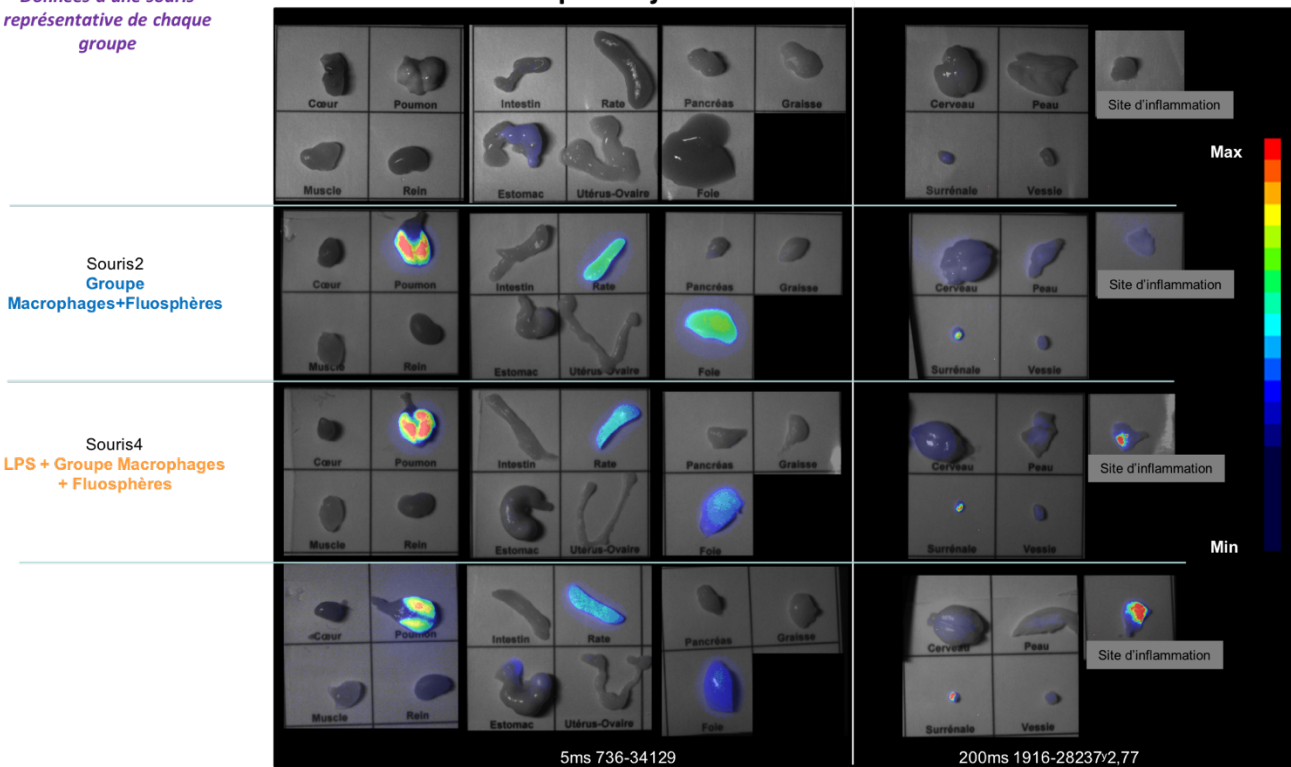
Ces travaux se sont déroulés de la même manière que les expériences avec les souris possédant une tumeur sous-cutanée implantée. Ils ont permis de valider notre concept, à savoir la capacité des macrophages injectés dans la circulation sanguine à pouvoir migrer jusqu'au niveau de zones fortement inflammatoires avant de poursuivre sur l'expérimentation avec tumeurs. L'ensemble des résultats présentés ci-dessous (Figure Sup. 5) montrent une accumulation de fluorescence au niveau du site inflammatoire induit par le LPS. Ces résultats auraient néanmoins pu être meilleurs si nous avions attendu plus longtemps la mise en place de l'inflammation. En effet, l'injection des macrophages, conformément au protocole décrit en fin de cette annexe, a été effectuée seulement 30 minutes après induction de l'inflammation. Or, les signes d'une inflammation n'étaient pas visibles (rougeur et gonflement). Il aurait donc fallu attendre au moins 12 ou 24 heures avant d'injecter les macrophages.

A

Imagerie de fluorescence ex vivo des tissus isolés 24h post injection

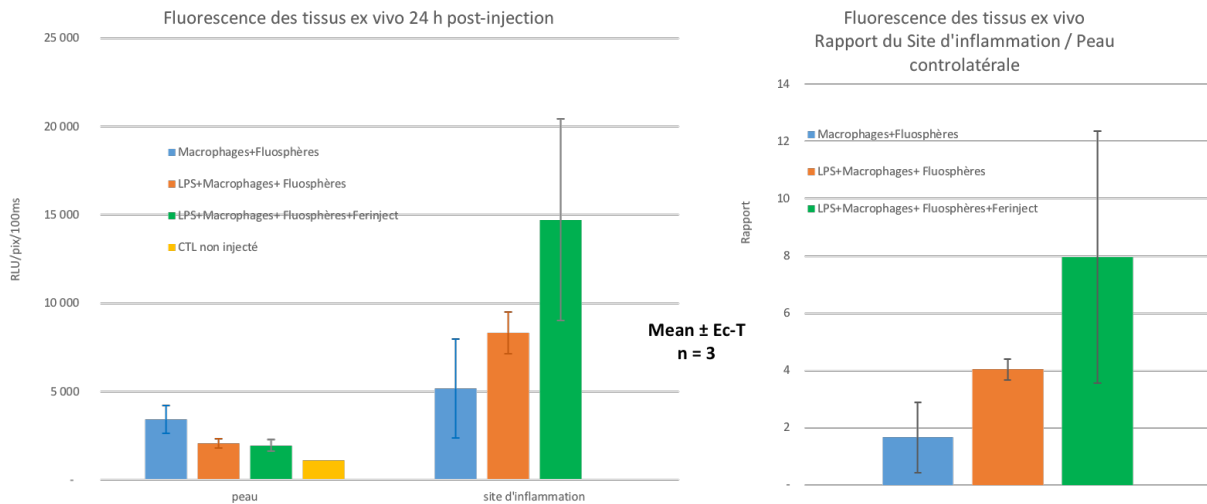


Données d'une souris
représentative de chaque
groupe



B

Imagerie de fluorescence ex vivo des tissus isolés 24h post injection



Remarque: A noter dans le groupe sans LPS qu'une des 3 souris du groupe présente une légère contamination du signal au niveau de la peau controlatérale et augmente donc légèrement la moyenne du rapport qui s'élève à $1,7 \pm 1,2$ au lieu de 1.

Figure supplémentaire 5 – Annexe 1. Estimation de l'accumulation des macrophages au niveau de la zone inflammatoire et d'autres organes A- Biodistribution des macrophages. B- Evaluation quantitative du tropisme des macrophages sur le site inflammatoire.

Dans les trois groupes, nous observons en imagerie de fluorescence *in vivo* une accumulation massive au niveau des poumons, du foie et de la rate. Un signal est observé également au niveau des os. Le signal de fluorescence au niveau du site d'inflammation est très inférieur à ces signaux. A 24h post injection des macrophages, nous observons en imagerie de fluorescence une importante rétention au niveau des poumons, du foie et de la rate mais également au niveau des ganglions lymphatiques dans les trois groupes.

A 24h post injection des macrophages, l'imagerie de fluorescence sur les tissus isolés indique un signal fluorescent dans la zone inflammatoire qui est supérieur à celui de la peau controlatérale dans les deux groupes LPS. Cette différence est plus marquée dans le groupe LPS + fluosphères + Ferinject® et conduit à des rapports de fluorescence de 4,6 à 12,9 (moyenne $8,0 \pm 4,4$) dans ce groupe et de 3,7 à 4,4 (moyenne = $4,0 \pm 0,4$) dans le groupe LPS + fluosphères.

3. Mode opératoire effectué pour l'imagerie du petit animal – Zone inflammatoire localisée

Six souris Balb/C de six semaines ont été anesthésiées (isoflurane / air 4% puis 2%) et dépilées un jour avant induction de l'inflammation et observation par imagerie de fluorescence. L'inflammation a été induite par injection intradermique de 20µL de lipopolysaccharides (LPS) 125µg/mL à deux endroits proches l'un de l'autre sur le flanc droit. Après avoir attendu 30 minutes, la suspension de macrophages a été injectée dans la circulation sanguine. La quantité théorique injectée de macrophages était de 10×10^6

macrophages dans 200µL de PBS. Les macrophages ont été préalablement chargés pendant 24h en fluosphères (400µg/mL) ou en fluosphères (400µg/mL) + (Ferinject® 1mg/mL).

Annexe 2 : Les différents réglages du cytomètre en flux (FACScalibur)

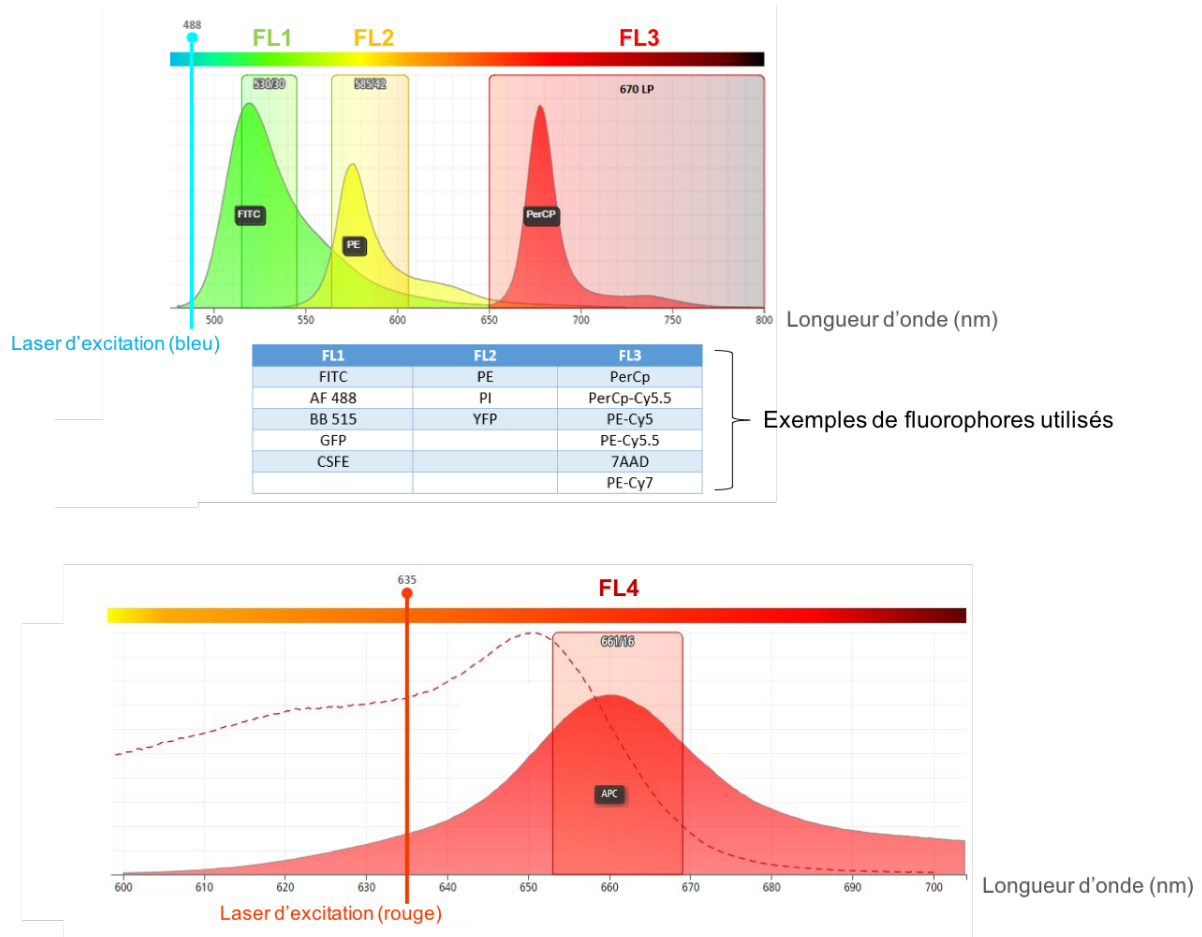


Figure supplémentaire 1 – Annexe 2. Possibilités de laser d’excitation (488nm et 635nm) et de filtres d’émission (FL1, FL2, FL3 et FL4). Avec exemples de fluorophores utilisables.

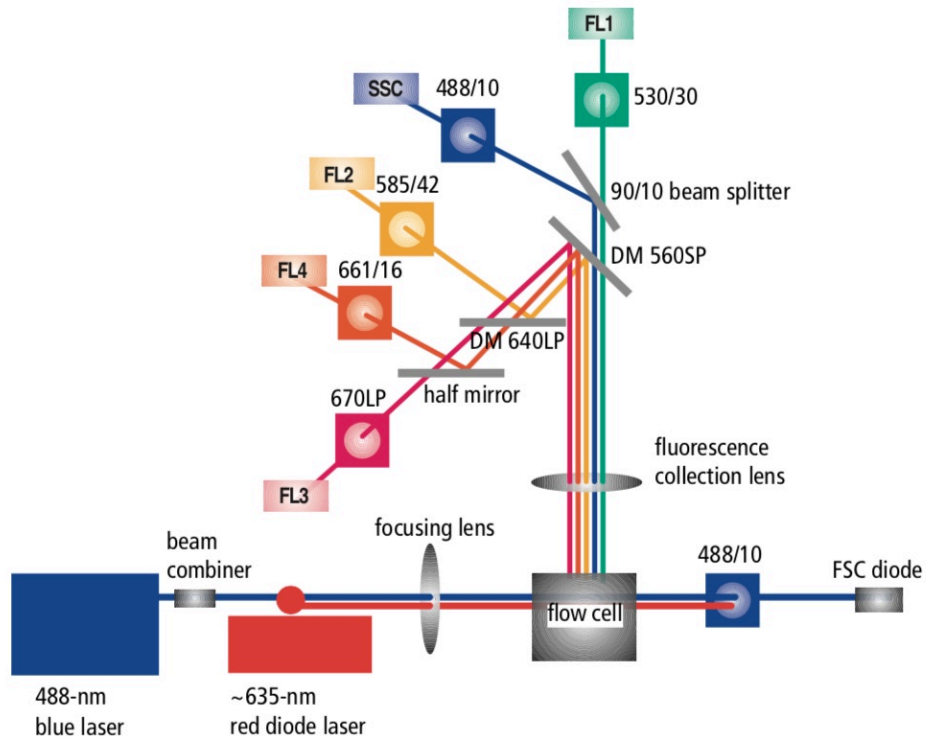


Figure supplémentaire 2 – Annexe 2. Représentation schématique des optiques du FACScalibur.

Annexe 3 : Communications scientifiques

1. Autres communications écrites publiées

- Aude-Garcia C., **Dalzon B.**, Ravanat JL., Collin-Faure V., Diemer H., Strub JM., Cianferani S., Van Dorsselaer A., Carrière M., Rabilloud T., J Proteomics, **(2016)**

A combined proteomic and targeted analysis unravels new toxic mechanisms for zinc oxide nanoparticles in macrophages

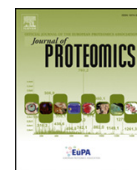
- **Dalzon B.**, Lebas C., Jimenez G., Gutjahr., Terrat C., Exposito J-Y., Verrier B., Lethias C., PLoS One, **(2016)**

Poly(lactic acid) nanoparticles targeting $\alpha 5\beta 1$ integrin as vaccine delivery vehicle, a prospective study



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Proteomics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jprot

A combined proteomic and targeted analysis unravels new toxic mechanisms for zinc oxide nanoparticles in macrophages



Catherine Aude-Garcia^{a,b,c}, Bastien Dalzon^{a,b,c}, Jean-Luc Ravanat^{d,e}, Véronique Collin-Faure^{a,b,c},
Hélène Diemer^{f,g}, Jean Marc Strub^{f,g}, Sarah Cianferani^{f,g}, Alain Van Dorsselaer^{f,g},
Marie Carrière^{d,e}, Thierry Rabilloud^{a,b,c,*}

^a CEA Grenoble, iRTSV/CBM, Laboratory of Chemistry and Biology of Metals, Grenoble, France

^b Univ. Grenoble Alpes, Laboratory of Chemistry and Biology of Metals, Grenoble, France

^c CNRS UMR 5249, Laboratory of Chemistry and Biology of Metals, Grenoble, France

^d Univ. Grenoble Alpes, INAC, SCIB, F-38000 Grenoble, France

^e CEA, INAC-SCIB/LAN, F-38000 Grenoble, France

^f Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique (LSMBO), Université de Strasbourg, IPHC, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France

^g CNRS, UMR7178, 67037 Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 August 2015

Received in revised form 16 November 2015

Accepted 9 December 2015

Available online 19 December 2015

Keywords:

Nanoparticles

Macrophages

Zinc oxide

Zirconium dioxide

Proteomics

Glutathione biosynthesis

Phagocytosis

DNA damage

Heme oxygenase

Methylglyoxal

Mitochondria

ABSTRACT

The cellular responses of the J774 macrophage cell line to zinc oxide and zirconium oxide nanoparticles have been studied by a comparative quantitative, protein level based proteomic approach. The most prominent results have been validated by targeted approaches. These approaches have been carried out under culture conditions that stimulate mildly the aryl hydrocarbon receptor, thereby mimicking conditions that can be encountered in vivo in complex environments. The comparative approach with two nanoparticles allows to separate the common responses, which can be attributed to the phagocytosis event per se, from the response specific to each type of nanoparticles.

The zinc-specific responses are the most prominent ones and include mitochondrial proteins too, but also signaling molecules such as MyD88, proteins associated with methylglyoxal detoxification (glyoxalase 2, aldose reductase) and deoxyribonucleotide hydrolases. The in cellulo inhibition of GAPDH by zinc was also documented, representing a possible source of methylglyoxal in the cells, leading to an increase in methylglyoxal-modified DNA bases. These observations may be mechanistically associated with the genotoxic effect of zinc and its selective effects on cancer cells.

Biological significance: The responses of the murine J774 macrophage cell lines to two types of metallic oxide nanoparticles (zinc oxide and zirconium dioxide) were studied by a comparative 2D gel based approach. This allows sorting of shared responses from nanoparticle-specific responses.

Zinc oxide nanoparticles induced specifically a strong decrease in the mitochondrial function, in phagocytosis and also an increase in the methylglyoxal-associated DNA damage, which may explain the well known genotoxicity of zinc.

In conclusion, this study allows highlighting of pathways that may play an important role in the toxicity of the zinc oxide nanoparticles.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Metal oxide nanoparticles are more and more used in the industry for various purposes, which pose the problem of assessing the hazard they can cause to humans and to the environment. This poses in turn the problem of assessing the danger represented by the metal oxide

nanoparticles, and this danger appears to vary widely with the chemical nature of the metal oxide [1]. In this context, zinc oxide appears among the toxic nanoparticles, although it has obvious industrial interests, e.g. as a biocide [2], or used in tyres and in sunscreens [3]. The toxicity of zinc oxide is indeed known for decades, as it is one causative agent of metal fume fever [4,5].

There has been quite active research to determine the toxic mechanisms of these nanoparticles, and many papers imply the oxidative stress pathway, [6,7], leading to DNA damage and genotoxicity in vitro [8–11] but also in vivo [12,13], although this is still a controversial issue [14].

* Corresponding author at: Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, UMR CNRS-CEA-UJF 5249, iRTSV/LCBM, CEA Grenoble, 17 rue des martyrs, F-38054 Grenoble Cedex 9, France.

E-mail address: thierry.rabilloud@cea.fr (T. Rabilloud).

Among the several cell types that are relevant to be studied for the *in vitro* assessment of the toxicity of nanoparticles and of their toxic mechanism, macrophages represent an important cell type, because of their critical role in immunity and in inflammation, and the inflammation parameters have been investigated for several nanomaterials (e.g. in [15]).

In this respect, macrophages are also very sensitive to their environment, for example via the aryl hydrocarbon receptor (AHR). This receptor has a wide variety of ligands, either from anthropogenic sources such as dioxins [16] or natural ones such as tryptophan derivatives [17–20]. Binding of these ligands to the AHR receptor induces important protein expression changes in several cell types [21] and has profound effects on immune cells [22]. Because of the variety of situations leading to stimulation of the AHR, many of which being likely to occur in complex environments such as natural and urban ones, it is of interest to investigate the response of macrophages to nanoparticles under conditions where the AHR is mildly stimulated. Such conditions can be reached quite simply by changing the culture medium of the cells. Because of its high content in aromatic amino acids, DMEM stimulates the AHR [20], leading to the well-described immunosuppressive effects associated to AHR stimulation in macrophages [19,23].

Proteomics studies are rather uncommon in the field of nanotoxicology [24], although recent studies have investigated the effects of silver nanoparticles on colon cell lines [25] or of copper oxide on lung epithelial cells [26]. Despite their relatively scarce use, all proteomic studies have shown a potential to unravel interesting cellular responses, e.g. mitochondrial responses [25,27], cytoskeletal responses [26], or metabolic ones [28], metabolic responses being also demonstrated by targeted studies [29]. This is why, in addition to our previous work [28,30] carried out in RPMI, a medium that does not stimulate the AHR [20], we have undertaken a proteomic study of the responses of macrophages to zinc oxide nanoparticles in AHR-stimulating conditions, i.e. in DMEM-cultured cells, zirconium oxide being used as a negative, non toxic control [27].

2. Material and methods

2.1. Nanoparticles

Zinc oxide (catalog number# 721077) and zirconium oxide (catalog number# 643025) were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). Zirconium oxide was coated with PVP 40 (purchased from Sigma) as previously described [27]. Zinc oxide was used as provided by the manufacturer. The characterization of the nanoparticles has been described previously [27,28,30]. The hydrodynamic diameter and the particle size distribution were characterized by dynamic light scattering (DLS) after dilution in complete culture medium using a Wyatt Dynapro Nanostar instrument. We also verified previously that PVP alone had no effects on the cells [30].

2.2. Cell culture

The mouse macrophage cell line J774A1 was purchased from the European Cell Culture Collection (Salisbury, UK). The cells were cultured in DMEM (containing 1 mM pyruvate) + 10% fetal bovine serum. Cells were seeded every two days at 200,000 cells/ml and harvested at 1,000,000 cells/ml. For treatment with nanoparticles, the following scheme was used: cells were first seeded at 500,000 cells/ml in T175 flasks (50 ml per flask). They were exposed to zinc oxide nanoparticles (or to the equivalent concentration of zinc acetate) on the following day and harvested after a further 24 h in culture. Cell viability was measured by trypan blue exclusion.

Under these culture conditions, the LD20 was determined to be 8 µg/ml for zinc oxide, 600 µM for methylglyoxal, and could not be reached for zirconium oxide even at 100 µg/ml. Thus, zinc oxide was used at its LD20 concentrations, while zirconium oxide was used at

10 µg/ml to provide a control for phagocytosis of a non toxic particle in the same size range and density (and thus particle number) as the more toxic zinc oxide nanoparticles.

2.3. F-actin staining

J774 cells were cultured on coverslips placed in 6-well plates and exposed to NPs for 24 h at 37 °C. At the end of the exposure time, cells were washed twice for 5 min at 4 °C in PBS, fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min at room temperature. After two washes (5 min/4 °C in PBS), they were permeabilized in Triton X100 0.1% for 5 min at room temperature. After two more washes in PBS, 500 nM Phalloidin-Atto 550 (Sigma) was added to the cells and let for 20 min at room temperature in the dark. Coverslip-attached cells were washed, placed on microscope slides (Thermo Scientific) using a Vectashield mounting medium containing DAPI (Eurobio) and imaged using a Leica TCS SP2 SE confocal microscope. The images were processed using the Leica confocal software.

2.4. Phagocytosis activity measurement

The phagocytic activity was measured after treatment with either zinc oxide and zirconium oxide nanoparticles using fluorescent latex beads (1 µm diameter, green labeled, catalog number L4655 from Sigma) and flow cytometry, essentially as described in [27,31].

2.5. Mitochondrial transmembrane potential measurement

After exposure to the nanoparticles for 24 h, the mitochondrial transmembrane potential of the cells was assessed by JC-carboxyanine probes fluorescence [32], using the water soluble JC-10 probe [33]. Briefly, cells were treated with 10 µM JC-10 in complete culture medium for 30 min at 37 °C. Cells were then harvested, rinsed twice in PBS + 1 mg/ml glucose and analyzed by flow cytometry on a FACScalibur instrument (Beckton Dickinson). First the live cells were selected on the basis of the size and granularity, then the fluorescence of these live cells was measured using excitation at 488 nm and emission of the J-aggregates at 590 nm.

2.6. GAPDH assay

The cell extracts for enzyme assays were prepared by lysing the cells for 20 min at 0 °C in Hepes 20 mM pH 7.5, MgCl₂ 2 mM, KCl 50 mM, EGTA 1 mM, SB 3-14 0.15% w/v, followed by centrifugation at 15,000 g for 15 min to clear the extract. The protein concentration was determined by a dye-binding assay [34]. The GAPDH activity was assayed by a coupled assay using Nitro blue tetrazolium as the final acceptor and phenazine methosulfate as a relay [35].

For the zinc inhibition studies, the cell extracts were first diluted in the assay buffer (final protein concentration 0.2 mg/ml), and supplemented with defined concentrations of zinc acetate. The resulting solutions were incubated at 37 °C for 30 min to allow zinc binding. The substrates and cofactors were then added and the activity measured spectrophotometrically [35].

2.7. Detection of dG-MG adducts

Quantitative measurement of methylglyoxal dGuo adducts (dG-MG) were performed by isotope dilution high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) [36] subsequently to DNA extraction and digestion performed as previously described [37]. The methyl glyoxal dG adducts and the corresponding isotopically labeled internal standards were prepared by reacting methylglyoxal with dG and ¹⁵N₅-dG, respectively [38]. Detection of the dG-MG adducts was performed in the so-called mrm mode using an Accela HPLC system interfaced with a Quantum Ultra mass

spectrometry, as described elsewhere [38] with minor modifications. Separation was performed using an Uptishere ODB 3 μm octadecyl silica gel column $150 \times 2 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$ obtained from Interchim (Montluçon, France) using a linear gradient of methanol from 0 to 30% in 30 min in 2 mM ammonium formate, the flow rate being 0.2 ml/min. Under these conditions, the two isomers of dG-MG (as well as the isotopically labeled internal standards) are eluted at 24.3 and 25.9 min, whereas, dG is eluted at 14.2 min. Transitions $340 \rightarrow 224$ and $345 \rightarrow 229$ (positive ionization mode) were used to detect dG-MG and the M + 5 isotopically labeled internal standard (collision energy 33 eV), respectively. In addition, transition $270 \rightarrow 154$ (collision energy 15) was used to detect unmodified 2'-deoxyguanosine (dG) and thus results are expressed as the number of dG-MG adducts per million normal nucleosides.

2.8. Proteomics

The 2D gel based proteomic experiments were essentially carried out as previously described [27]. However, detailed material and methods are provided.

2.8.1. General strategy

All experiments were carried out at least on independent biological triplicates. As the experimental setup involves a comparison of several treatments with the same control group, an additional independent set of samples from untreated cells was also compared to the same control reference group, thereby realizing a true null experiment between the test control group and the reference control group. All the proteins showing the same type of variation (increase or decrease, $p < 0.05$) in all groups (including the test control group) compared to the reference control group were discarded from the results.

2.8.2. Sample preparation

The cells were collected by scraping, and then washed three times in PBS. The cells were then washed once in TSE buffer (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, sucrose 0.25 M, EDTA 1 mM), and the volume of the cell pellet was estimated. The pellet was resuspended in its own volume of TSE buffer. Then 4 volumes (relative to the cell suspension just prepared) of concentrated lysis buffer (urea 8.75 M, thiourea 2.5 M, CHAPS 5% w/v, TCEP-HCl, 6.25 mM, spermine base 12.5 mM) were added and the solution was let to extract at room temperature for 1 h. The nucleic acids were then pelleted by ultracentrifugation (270,000 g at room temperature for 1 h), and the protein concentration in the supernatant was determined by a dye-binding assay [34]. Carrier ampholytes (Pharmalytes pH 3–10) were added to a final concentration of 0.4% (w/v), and the samples were kept frozen at -20°C until use.

2.8.3. Isoelectric focusing

Home-made 160 mm long 4–8 linear pH gradient gels [39] were cast according to published procedures [40]. Four mm-wide strips were cut, and rehydrated overnight with the sample, diluted in a final volume of 0.6 ml of rehydration solution (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 0.4% carrier ampholytes (Pharmalytes 3–10) and 100 mM dithiodiethanol [41,42]).

The strips were then placed in a Multiphor plate (GE Healthcare), and IEF was carried out with the following electrical parameters: 100 V for 1 h, then 300 V for 3 h, then 1000 V for 1 h, then 3400 V up to 60–70 kVh. After IEF, the gels were equilibrated for 20 min in Tris 125 mM, HCl 100 mM, SDS 2.5%, glycerol 30% and urea 6 M [43]. They were then transferred on top of the SDS gels and sealed in place with 1% agarose dissolved in Tris 125 mM, HCl 100 mM, SDS 0.4% and 0.005% (w/v) bromophenol blue. By combining the electrosensitized flow reduction afforded by the urea-glycerol mixture to a better blocking of thiols, it has been shown [42,44] that this procedure affords better final results than the classical one using iodoacetamide during the equilibration procedure only [43].

2.8.4. SDS electrophoresis and protein detection

Ten percent gels ($160 \times 200 \times 1.5 \text{ mm}$) were used for protein separation. The Tris taurine buffer system [45] was used and operated at an ionic strength of 0.1 and a pH of 7.9. The final gel composition is thus Tris 180 mM, HCl 100 mM, acrylamide 10% (w/v), bisacrylamide 0.27%. The upper electrode buffer is Tris 50 mM, taurine 200 mM, SDS 0.1%. The lower electrode buffer is Tris 50 mM, glycine 200 mM, SDS 0.1%. The gels were run at 25 V for 1 h, then 12.5 W per gel until the dye front has reached the bottom of the gel. Detection was carried out by a tetrathionate silver staining [46].

2.8.5. Image analysis

The gels were scanned after silver staining on a flatbed scanner (Epson perfection V750), using a 16 bits grayscale image acquisition. The gel images were then analyzed using the Delta 2D software (v 3.6). Spots that were never expressed above 100 ppm of the total spots were first filtered out. Then, significantly-varying spots were selected on the basis of their Student *t*-test *p*-value between the treated and the control groups. Spots showing a *p*-value lower than 0.05 were selected. This strategy is used to avoid the use of arbitrary thresholds, which can result in discarding statistically-valid relevant changes and including non-valid changes [47]. The multiple testing problem was addressed using the Storey–Tishirani approach [48], as classical statistical filters (e.g. Bonferroni or Benjamini–Hochberg) yield to over-rejection of valid results [49]. Furthermore, we checked that all the spots that we found through the *t*-test had also a $p < 0.05$ in a non parametric Mann–Whitney *U*-test.

2.8.6. Mass spectrometry

The spots selected for identification were excised from silver-stained gels and destained with ferricyanide/thiosulfate on the same day as silver staining in order to improve the efficiency of the identification process [50,51]. In gel digestion was performed with an automated protein digestion system, MassPrep Station (Waters, Milford, USA). The gel plugs were washed twice with 50 μL of 25 mM ammonium hydrogen carbonate (NH_4HCO_3) and 50 μL of acetonitrile. The cysteine residues were reduced by 50 μL of 10 mM dithiothreitol at 57°C and alkylated by 50 μL of 55 mM iodoacetamide. After dehydration with acetonitrile, the proteins were cleaved in gel with 10 μL of 12.5 ng/ μL of modified porcine trypsin (Promega, Madison, WI, USA) in 25 mM NH_4HCO_3 . The digestion was performed overnight at room temperature. The generated peptides were extracted with 30 μL of 60% acetonitrile in 0.1% formic acid. Acetonitrile was evaporated under vacuum before nanoLC–MS/MS analysis.

NanoLC–MS/MS analysis was performed using a nanoACQUITY Ultra-Performance-LC (Waters Corporation, Milford, USA) coupled to the Synapt™ High Definition Mass Spectrometer™ (Waters Corporation, Milford, USA). The system was fully controlled by MassLynx 4.1 SCN639 (Waters Corporation, Milford, USA).

The nanoLC system was composed of ACQUITY UPLC® CSH130 C18 column ($250 \text{ mm} \times 75 \mu\text{m}$ with a $1.7 \mu\text{m}$ particle size, Waters Corporation, Milford, USA) and a Symmetry C18 precolumn ($20 \text{ mm} \times 180 \mu\text{m}$ with a $5 \mu\text{m}$ particle size, Waters Corporation, Milford, USA). The solvent system consisted of 0.1% formic acid in water (solvent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (solvent B). 4 μL of sample were loaded into the enrichment column during 3 min at 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ with 99% of solvent A and 1% of solvent B. Elution of the peptides was performed at a flow rate of 300 nL/min with an 8–35% linear gradient of solvent B in 9 min.

The tandem mass spectrometer was equipped with a Z-spray ion source and a lock mass system. The capillary voltage was set at 2.8 kV and the cone voltage at 35 V. Mass calibration of the TOF was achieved using fragment ions from Glu-fibrino-peptide B on the [50;2000] *m/z* range. Online correction of this calibration was performed with Glu-fibrino-peptide B as the lock-mass. The ion $(\text{M} + 2\text{H})^{2+}$ at *m/z* 785.8426 was used to calibrate MS data and the fragment ion

(M + H)⁺ at m/z 684.3469 was used to calibrate MS/MS data during the analysis.

For tandem MS experiments, the system was operated with automatic switching between MS (0.5 s/scan on m/z range [150;1700]) and MS/MS modes (0.5 s/scan on m/z range [50;2000]). The two most abundant peptides (intensity threshold 20 counts/s), preferably doubly and triply charged ions, were selected on each MS spectrum for further isolation and CID fragmentation using collision energy profile. Fragmentation was performed using argon as the collision gas.

Mass data collected during analysis were processed and converted into .pkl files using ProteinLynx Global Server 2.3 (Waters Corporation, Milford, USA). Normal background subtraction type was used for both MS and MS/MS with 5% threshold and polynomial correction of order 5. Smoothing was performed on MS/MS spectra (Savitsky–Golay, 2 iterations, window of 3 channels). Deisotoping was applied for MS (medium deisotoping) and for MS/MS (fast deisotoping).

For protein identification, the MS/MS data were interpreted using a local Mascot server with MASCOT 2.4.1 algorithm (Matrix Science, London, UK) against UniProtKB/SwissProt (version 2014_11, 547,085 sequences). The research was carried out in all species. Spectra were searched with a mass tolerance of 15 ppm for MS and 0.05 Da for MS/MS data, allowing a maximum of one trypsin missed cleavage. Carbamidomethylation of cysteine residues and oxidation of methionine residues were specified as variable modifications. Protein identifications were validated with at least two peptides with Mascot ion score above 30.

3. Results

3.1. Nanoparticles behavior

The characterization of the primary nanoparticles has been published previously.

[28]. However, as we used DMEM in this work instead of RPMI in the previous one, we checked the hydrodynamic size and thus the aggregation state of the nanoparticles in serum-containing DMEM. The particles formed aggregates of 218 ± 90 nm upon dilution in the medium, and the size of these aggregates decreased to 140 ± 16 nm after 24 h at 37 °C in the serum-containing culture medium. This decrease in size has been previously observed in the same complete culture medium [52] and is consistent with the well-known dissolution of zinc oxide nanoparticles in culture media [52].

3.2. Proteomic results

The results of the proteomic analysis are shown on Fig. 1 and Table 1. Out of the ca. 2550 spots reproducibly detected on the gels, 98 protein species were found modified in a statistically significant manner in at least one condition compared to the control. The *t*-test distributions of the various comparisons and a Venn diagram showing the overlap of changes between the different conditions (zinc oxide nanoparticles, zinc ion or zirconium oxide nanoparticles) are shown in Supplementary Fig. 1. Only a few protein species were quantitatively modulated by zirconium oxide, while many more were modulated by zinc oxide and zinc ion. Quite interestingly, 10 protein species were modulated by all three treatments, 17 by both zinc oxide and zinc ion, 31 by zinc oxide only and 26 by zinc ion only. This result goes against the dogma that zinc oxide toxicity is purely due to extracellular dissolution of zinc oxide [53] and support previous work showing differential effects of zinc oxide and zinc ions [54,55].

In several cases (e.g. cytochrome bc1, ERP29, RhoGDI-2) one protein species was found statistically altered, generally the most acidic spot, while the more abundant, basic spot was found unmodified or weakly and insignificantly modified in abundance. In only a few cases (ETHE1, ETFA, hnRNP-K), several spots were found significantly changed in their abundance.

The modulated protein species could be sorted in several functional classes, which led us to investigate whether the biological/biochemical functions corresponding to these classes were also altered upon treatment with the nanoparticles.

3.3. Validation studies

3.3.1. Cytoskeleton and trafficking

Interesting changes were seen on some proteins involved in the actin cytoskeleton (dynactin, septin, Rho GDI, myosin) and in vesicular trafficking in the lysosomal pathway (e.g. NSF attachment factor, dynein). This led us to investigate both the actin cytoskeleton per se and the phagocytic activity of the cells. The results, displayed on Figs. 2 and 3a, show the alteration brought by the metal oxide nanoparticles and/or by zinc ion.

Examination of the actin cytoskeleton by confocal microscopy (Fig. 2) showed major alterations of this cellular component. First, the presence of nanoparticles in the medium induced the formation of numerous intracellular vesicles (arrows), which can be associated with the phagocytosis of the nanoparticles. The phenomenon was also observed with zinc ion, and can be related to the well-known formation of so-called zincosomes [56,57]. This vesicle formation took place at the expense of the actin cortical layer, which is thinner in the nanoparticle-treated or zinc ion-treated cells compared to the control ones. The surface ruffles were also decreased in the treated cells compared to control cells. However, the cells treated with zinc, either zinc oxide nanoparticles or zinc ion, clearly showed a different, much rounder overall shape, thereby showing a major alteration of the actin cytoskeleton.

In line with these findings, the phagocytic activity (Fig. 3A), a major natural function of macrophages, was not altered by zirconium oxide but strongly reduced by zinc treatment (ion or nanoparticle).

3.3.2. Mitochondria

One of the most prominent classes of modulated proteins consisted in mitochondrial proteins. The decrease of proteins of the mitochondrial protein production apparatus (e.g. ribosomal proteins) led us to hypothesize that the production of the mitochondrial respiratory complexes would also be decreased in turn, resulting in a change in the mitochondrial transmembrane potential. The results, displayed in Fig. 3B, show that it is indeed the case, with a major effect of zinc oxide nanoparticles and almost no effect of zirconium oxide or of zinc ion.

3.3.3. The methylglyoxal pathway

Interestingly, three proteins involved in the detoxification of methylglyoxal (two aldose reductases and hydroxyacylglutathione hydrolase) were induced by zinc oxide nanoparticles, together with two proteins involved in the degradation of altered deoxyribonucleotides arising from DNA damage (deoxyribonucleotidase and deoxyribonucleotide N-hydrolase). As methylglyoxal production is known to increase when the carbohydrate metabolism is altered, we first investigated the inhibition of GAPDH by zinc. Zinc is known to inhibit purified GAPDH [58], and we first checked that the same effect occurs in complete cytosolic extracts, i.e. with the zinc buffering effects of the other cellular proteins. The results, displayed in Table 2, show that GAPDH in total extracts is inhibited at rather high zinc concentrations, in the range of the concentrations that we used in the present study. This led open the possibility that treatment with zinc oxide led to increased methylglyoxal production. If this hypothesis is true, zinc and methylglyoxal should show a synergistic toxicity, which we investigated. The results, displayed on Fig. 4A, show that it is indeed the case, even if the effect seems moderate.

As methylglyoxal is known to bind to proteins and to the guanine nucleotide [59], the latter having putative long term consequences on DNA stability, we then investigated whether treatment of the cells

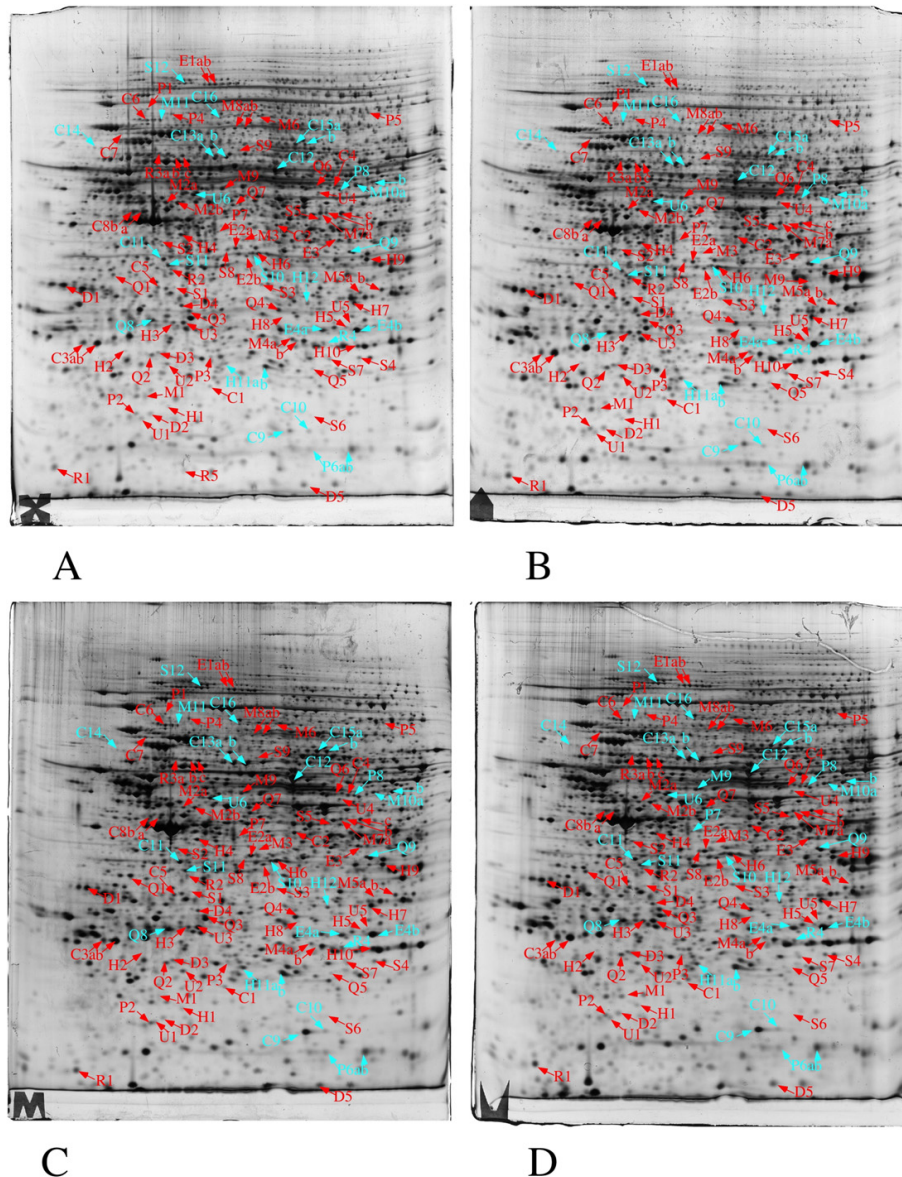


Fig. 1. Proteomic analysis of total cell extracts by 2D electrophoresis. Total cell extracts of J774A1 cells were separated by two-dimensional gel electrophoresis. The first dimensions covered a 4–8 pH range and the second dimension a 15–200 kDa range. Total cellular proteins (150 μ g) were loaded on the first dimension gel. A: gel obtained from control cells. B: gel obtained from cells treated with cationic zinc oxide (8 μ g/ml, 24 h). C: gel obtained from cells treated with zirconium oxide (10 μ g/ml, 24 h). D: gel obtained from cells treated with zinc acetate (100 μ M, 24 h). The red arrows point to spots that show reproducible and statistically significant changes between the control and nanoparticle-treated cells and to the control neighbor spots in some cases. The blue arrows point to spots that show reproducible and statistically significant changes between the control and zinc ion-treated cells and to the control neighbor spots in some cases. Spot numbering according to Table 1.

with zinc oxide increased the level of methylglyoxal-modified nucleotides in DNA. The results, displayed on Fig. 4B, show that zinc oxide doubles the amount of modified bases compared to the control, while zirconium oxide was without effect and methylglyoxal itself quadrupled the amount of these bases at the highest non toxic concentration. Interestingly, the effect of zinc ion on base modification was higher than the one of zinc oxide nanoparticles at equivalent zinc concentration.

4. Discussion

Zinc oxide is known for a long time for being mildly toxic, and has long been recognized as one of the causative agent for the professional disease called metal fume fever [4]. The threshold for the onset of the disease lies around 50–100 mg of zinc oxide per cubic meter of air. Using the classical respiration parameters (10 m³ of air inhaled per 8 h day, alveolar penetration rate of 20–50% for nanoparticles) and the

Table 1
Differentially-expressed proteins identified in the proteomic screen.

Spot number	Protein name	Swissprot Acc. N°	Mw	nb unique peptides	Seq coverage	ZnO/ctrl fold/t-test	ZrO2/ctrl fold/t-test	Zn ion fold/t-test
<i>Energy</i>								
E1a	Neutral alpha-glucosidase AB	Q8BHN3	106,913	6	6%	0.58/0.03	0.85/0.34	0.80/0.18
E1b	Neutral alpha-glucosidase AB	Q8BHN3	106,913	21	30%	0.83/0.41	0.85/0.44	0.88/0.53
E2a	Transaldolase	Q93092	37,389	16	44%	1.19/0.02	0.81/0.02	1.21/0.01
E2b	Transaldolase	Q93092	37,389	13	34%	1.33/0.20	1.32/0.01	1.39/0.01
E3	Sorbitol dehydrogenase	Q64442	38,249	4	12%	1.39/0.01	0.73/0.06	0.62/0.03
E4a	Phosphoglycerate mutase 1	Q9DBJ1	28,805	8	55%	1.04/0.52	0.86/0.01	0.90/0.04
E4b	Phosphoglycerate mutase 1	Q9DBJ1	28,805	9	57%	0.96/0.63	0.91/0.33	0.84/0.02
<i>Mitochondria</i>								
M1	39S mito. ribosomal protein L12	Q9DB15	21,401	3	17%	0.84/0.05	0.83/0.08	0.96/0.78
M2a	Cytochrome b-c1 complex subunit 1*	Q9CZ13	52,852	7	22%	0.81/0.04	0.67/0.01	0.80/0.01
M2b	Cytochrome b-c1 complex subunit 1	Q9CZ13	52,852	17	48%	1.01/0.93	0.75/0.04	0.84/0.20
M3	Stomatin-like protein 2, mitochondrial	Q99JB2	38,385	2	9%	0.41/0.04	0.61/0.05	0.68/0.12
M4a	Persulfide dioxygenase ETHE1	Q9DCM0	27,739	2	11%	0.76/0.07	0.64/0.02	0.63/0.04
M4b	Persulfide dioxygenase ETHE1*	Q9DCM0	27,739	2	10%	0.61/0.01	0.55/0.01	0.60/0.01
M5a	ETFA*	Q99LCS	35,080	3	11%	0.39/0.01	0.29/0.01	0.25/0.01
M5b	ETFA*	Q99LCS	35,080	4	16%	0.74/0.01	0.80/0.01	0.74/0.01
M6	Methylmalonyl-CoA mutase	P16332	82,846	6	12%	0.58/0.01	0.71/0.27	1.04/0.85
M7a	Glycine amidino transferase	Q9D964	48,298	4	12%	0.66/0.03	0.82/0.19	0.71/0.01
M7b	Glycine amidino transferase	Q9D964	48,298	4	14%	0.50/0.01	0.75/0.06	0.60/0.01
M7c	Glycine amidino transferase	Q9D964	48,298	11	33%	0.73/0.04	0.80/0.02	0.91/0.16
M8a	hsp75, mitochondrial*	Q9CQN1	73,783	13	20%	0.61/0.02	0.86/0.04	0.65/0.01
M8b	hsp75, mitochondrial	Q9CQN1	73,783	19	30%	0.63/0.13	1.01/0.80	0.80/0.03
M9	Oxoglutarate DH, E2 sub.	Q9D2G2	41,470	9	24%	0.99/0.96	0.95/0.49	0.87/0.04
M10a	Glutamate dehydrogenase1	P26443	55,912	17	38%	1.08/0.70	1.19/0.07	1.29/0.03
M10b	Glutamate dehydrogenase1	P26443	55,912	23	53%	0.87/0.35	0.89/0.45	0.84/0.24
M11	Respiratory complex I, 75 kDa sub.	Q91VD9	77,211	5	7%	0.88/0.55	0.91/0.54	0.72/0.01
<i>Cytoskeleton/trafficking</i>								
C1	Dynactin subunit 3	Q9Z0Y1	20,979	3	15%	1.49/0.02	1.24/0.17	1.51/0.02
C2	Septin-2	P42208	41,526	9	35%	1.37/0.05	1.11/0.39	1.23/0.11
C3a	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	Q61599	22,852	2	19%	1.36/0.03	1.02/0.88	0.98/0.91
C3b	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	Q61599	22,852	5	36%	1.12/0.30	0.97/0.85	1.04/0.36
C4	Septin-11	Q8C1B7	49,695	3	9%	1.58/0.01	1.05/0.96	0.87/0.25
C5	Alpha-soluble NSF attachment protein	Q9DB05	33,191	15	70%	1.25/0.01	1.08/0.15	1.31/0.04
C6	Dynein 1 intermediate chain 2	O88487	68,393	3	6%	0.83/0.02	1.41/0.01	1.29/0.02
C7	Sorting nexin 2	Q9CWX8	58,472	3	7%	0.83/0.02	0.87/0.13	0.86/0.035
C8a	ER resident protein 44	Q9D1Q6	46,854	6	17%	0.73/0.06	0.82/0.08	0.73/0.01
C8b	ER resident protein 44	Q9D1Q6	46,854	7	23%	0.68/0.03	0.89/0.07	0.74/0.01
C9	Cofilin-1	P18760	18,560	6	50%	1.12/0.46	1.20/0.05	1.29/0.03
C10	arp5-like protein	Q9D898	16,941	6	41%	1.02/0.87	1.27/0.11	1.45/0.04
C11	Actin capping protein alpha 1	P47753	32,940	13	62%	1.17/0.43	0.97/0.33	1.09/0.05
C12	Coronin 1A	O89053	50,989	15	38%	1.05/0.70	1.16/0.07	1.20/0.04
C13a	TCP-1 chaperone, sub. epsilon	P80316	59,626	10	21%	0.92/0.59	0.95/0.48	0.84/0.18
C13b	TCP-1 chaperone, sub. epsilon	P80316	59,626	12	23%	1.27/0.13	0.94/0.66	0.84/0.02
C14	Importin subunit alpha-5	Q60960	60,195	3	6%	1.09/0.75	1.68/0.36	2.39/0.04
C15a	wdr-1 protein	O88342	66,406	5	7%	0.97/0.67	1.09/0.44	1.20/0.03
C15b	wdr-1 protein	O88342	66,406	12	19%	1.12/0.52	1.12/0.38	1.15/0.25
C16	Rho activating protein 25	Q8BYW1	73,383	10	17%	0.98/0.94	1.04/0.48	0.78/0.04
<i>DNA</i>								
D1	Proliferating cell nuclear antigen	P17918	28,786	13	66%	1.08/0.46	0.67/0.01	0.72/0.99
D2	2'-deoxynucleotide N-hydrolase 1	Q80VJ3	18,977	4	29%	1.26/0.01	0.82/0.08	1.10/0.61
D3	5'(3')-deoxyribonucleotidase,	Q9JMJ4	23,077	7	50%	1.39/0.05	1.09/0.20	1.24/0.01
D4	Replication protein A 32 kDa subunit	Q62193	29,718	4	23%	1.20/0.04	0.86/0.06	1.04/0.51
<i>Production</i>								
P1	Peptide chain release fact. Sub. ERF3A*	Q8R050	68,626	4	6%	1.41/0.02	1.76/0.01	1.50/0.03
P2	Transl. init. factor 1A, X-chromosome	Q8BMJ3	16,461	6	44%	1.50/0.01	0.85/0.20	1.24/0.45
P3	BAG family chaperone regulator 2*	Q91YN9	23,474	5	22%	1.48/0.04	1.45/0.01	1.37/0.03
P4	Acyllamino-acid-releasing enzyme	Q8R146	81,581	4	7%	1.37/0.01	1.04/0.76	0.97/0.72
P5	Threonine-tRNA ligase*	Q9D0R2	83,358	7	10%	0.67/0.01	0.64/0.02	0.73/0.03
P6a	Prolyl isomerase A	P17742	17,972	8	59%	0.86/0.65	0.81/0.12	0.64/0.02
P6b	Prolyl isomerase A	P17742	17,972	11	67%	0.98/0.83	0.93/0.47	0.83/0.11
P7	Activator of hsp90	Q8BK64	38,117	12	49%	1.39/0.11	1.13/0.07	1.42/0.02
P8	Tryptophan-tRNA ligase	P32921	54,360	29	69%	1.24/0.09	0.78/0.01	0.65/0.01
<i>Quality control</i>								
Q1	Thioredoxin-like protein 1	Q8CDN6	32,237	7	36%	1.33/0.02	0.95/0.64	1.20/0.08
Q2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K	P61087	22,407	7	53%	1.10/0.38	0.88/0.01	0.99/0.92
Q3	Proteasome activator complex subunit 2	P97372	27,058	16	72%	1.30/0.03	0.85/0.50	0.93/0.57
Q4	Proteasome subunit alpha type-1	Q9R1P4	29,547	17	83%	1.53/0.02	0.92/0.37	1.46/0.01
Q5	COMM domain-containing protein 4	Q9CQ02	21,765	2	10%	1.67/0.01	1.13/0.32	0.97/0.85
Q6	Proteasome non-ATPase reg. subunit 12	Q9D8W5	52,897	10	25%	1.57/0.01	1.59/0.03	1.10/0.35

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Spot number	Protein name	Swissprot Acc. N°	Mw	nb unique peptides	Seq coverage	ZnO/ctrl fold/t-test	ZrO ₂ /ctrl fold/t-test	Zn ion fold/t-test
Q7	Proteasome reg. subunit 7	P46471	48,636	21	51%	1.19/0.04	0.96/0.23	0.90/0.01
Q8	Proteasome subunit alpha type-3	O70435	28,387	3	12%	1.06/0.62	1.03/0.60	1.20/0.01
Q9	Proteasome non-ATPase reg. Subunit 7	P26516	36,540	10	42%	1.13/0.38	0.80/0.12	1.35/0.02
RNA								
R1	Transcription elongation factor B	P62869	13,170	4	47%	1.25/0.03	1.09/0.48	1.16/0.11
R2	Rprd1B	Q9CSU0	36,901	5	18%	1.58/0.05	1.03/0.90	1.29/0.04
R3a	hnRNP-K	P61979	50,979	6	15%	0.99/0.92	1.24/0.13	0.93/0.40
R3b	hnRNP-K	P61979	50,979	10	29%	1.25/0.01	1.08/0.15	1.08/0.01
R3c	hnRNP-K	P61979	50,979	18	51%	1.07/0.48	1.15/0.07	1.16/0.01
R4	Protein cn166	Q9CQE8	28,069	2	9%	1.29/0.30	1.14/0.07	0.79/0.02
Signaling								
S1	MyD88	P22366	33,754	3	8%	1.37/0.03	0.70/0.04	1.34/0.01
S2	Prostaglandin reductase 2	Q8VDQ1	38,015	5	16%	2.38/0.04	1.17/0.27	1.34/0.01
S3	Phosphatidylinositol transfer protein alpha	P53810	31,893	4	20%	0.60/0.04	0.64/0.06	1.03/0.93
S4	Acyl-protein thioesterase 2	Q9WTL7	24,737	3	15%	1.46/0.04	1.04/0.61	0.76/0.36
S5	Dual specificity MAP kinase kinase 1	P31938	43,440	3	7%	1.07/0.12	1.19/0.03	1.14/0.23
S6	Regulator of G-protein signaling 10	Q9CQE5	21,152	2	12%	2.14/0.03	1.00/0.98	1.03/0.80
S7	MOB kinase activator 1B	Q921Y0	25,081	3	16%	1.27/0.01	0.83/0.06	0.94/0.87
S8	S/T phosphatase PP1-g catalytic subunit	P63087	36,957	4	14%	0.84/0.42	0.58/0.01	0.80/0.06
S9	Inositol-3-phosphate synthase 1	Q9JHU9	60,932	8	15%	0.56/0.05	0.80/0.19	0.64/0.04
S10	Protein phosphatase 1a catal. sub.	P62137	37,514	10	39%	0.98/0.85	1.10/0.15	0.82/0.23
S11	Protein phosphatase 2a catal. sub.	P63330	35,595	14	63%	1.01/0.93	0.96/0.13	1.15/0.01
S12	Major vault protein	Q9EQK5	95,924	10	12%	1.06/0.62	1.03/0.82	0.70/0.01
Homeostasis								
H1	Ferritin heavy chain	P09528	21,067	3	17%	1.72/0.01	0.74/0.06	
H2	Catechol O-methyltransferase	O88587	29,487	4	23%	1.81/0.04	1.64/0.51	1.47/0.01
H3	Glutamate-cysteine ligase reg. subunit	O09172	30,535	6	30%	1.83/0.01	1.25/0.15	0.47/0.04
H4	Glutaredoxin-3	Q9CQM9	37,779	12	38%	1.28/0.05	0.97/0.87	1.34/0.02
H5	Glyoxalase 2	Q99KB8	34,084	3	11%	1.33/0.05	1.27/0.07	0.98/0.82
H6	Aldose reductase-related protein 2	P45377	36,121	6	25%	1.39/0.04	0.99/0.96	1.48/0.05
H7	S-formylglutathione hydrolase	Q9R0P3	31,320	6	38%	1.29/0.01	0.79/0.01	1.17/0.03
H8	Heme oxygenase 1*	P14901	32,911	5	25%	6.5/0.01	2.1/0.01	0.42/0.01
H9	Aldose reductase	P45376	35,732	20	60%	1.27/0.05	0.98/0.84	18.4/0.01
H10	Flavin/biliverdin reductase	Q923D2	22,197	13	82%	1.40/0.01	1.20/0.07	0.95/0.32
H11a	Protein DJ-1	Q99LX0	20,021	9	69%	1.01/0.62	1.11/0.07	1.25/0.13
H11b	Protein DJ-1	Q99LX0	20,021	10	71%	1.26/0.11	0.91/0.14	1.15/0.02
H12	Protein nmrl1	Q8K2T1	34,377	16	57%	1.06/0.41	1.01/0.86	0.89/0.10
H13	Alcohol dehydrogenase	Q9JII6	36,587	15	56%	1.09/0.72	1.20/0.02	0.79/0.03
Unclassified								
U1	Hippocalcin-like protein 1	P62748	22,339	7	34%	1.49/0.01	0.98/0.76	
U2	Pycard	Q9EPB4	21,459	6	43%	1.31/0.04	0.96/0.56	1.13/0.24
U3	Chloride intracellular channel protein 4	Q9QYB1	28,731	15	65%	1.22/0.34	1.34/0.04	1.19/0.13
U4	Ufm1-specific protease 2	Q99K23	52,516	2	6%	1.54/0.01	1.22/0.18	1.56/0.01
U5	Nitrilase homolog 1*	Q8VDK1	35,705	2	7%	1.70/0.04	1.81/0.02	0.94/0.77
U6	RuvB-like protein 2	Q9WMT5	51,171	14	38%	0.96/0.72	0.97/0.80	1.63/0.04

The proteins modulated by zinc oxide are indicated in bold, those modulated by zinc ion are indicated in italics, and those modulated by both treatments are indicated in bold italics. The proteins modulated by the three treatments (zinc oxide, zinc ion and zirconium oxide) are indicated by a star.

number of macrophages in the lungs, this translates into our exposure system to a 5–10 ppm concentration range in the medium, and we took the 8 µg/ml threshold as this corresponds to the LD20 concentration, i.e. a concentration where cell lethality begins to appear while the number of dead cells will not hamper the subsequent proteomic analysis.

Another toxic mechanism in lungs lies in the lung overload phenomenon (recently reviewed in [60]), occurring when a sufficient amount of inert, particulate material has been ingested by the alveolar macrophages. Transposed to in vitro systems [61], this impairment phenomenon begins to appear at 0.4 µg/mm², while 0.2 µg/mm² shows no effect. As the 8 ppm dose that we used corresponds to a 0.22 µg/mm² dose, this phenomenon can be excluded. The fact that the 10 µg/ml dose of zirconium oxide did not produce any functional or toxic effect of macrophages also excludes this generic toxic mechanism, so that the effects observed in the case of zinc oxide can be attributed to the intrinsic properties of this nanoparticle.

The main interest to perform a comparative study is to sort out what is common in the cellular responses and what is specific to each type of nanoparticles. In this frame, the changes common to both nanoparticles can be related to the modification of the cellular functioning induced by

the phagocytosis event per se, as we already know that these precise nanoparticles are actively phagocytized by the cells [27,28]. The quantitative changes in the protein species induced by phagocytosis represent only a very small proportion of the total changes observed. Apart from heme oxygenase, they include a few proteins linked to signaling, as a phosphatidylinositol transfer protein, a phosphodiesterase, the dual specificity MAP kinase, the MOB kinase activator, and a few mitochondrial proteins, such as the stomatin like protein, one protein species for the electron transfer protein and one protein species for persulfide dioxygenase. Such a limited response is not surprising in a professional phagocyte, which is from the start well-equipped to phagocytize particles.

There are few protein species that are quantitatively modified by zirconium oxide only. They include one protein species of transaldolase and one protein species of cytochrome bc1 subunit 1, suggesting a mild alteration of metabolism. The changes in the amount of dual specificity map kinase 1 or PCNA are more difficult to interpret directly, but may be linked to a change in cell proliferation. The mild effects of zirconium oxide are likely linked to the fact that zirconium oxide does not have surface redox properties and does not dissolve to liberate toxic ions intracellularly, as zinc oxide does for example.

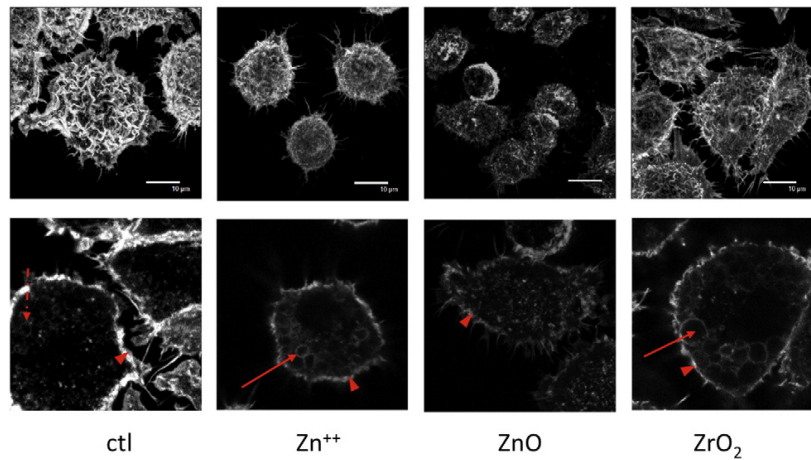


Fig. 2. Confocal imaging of the F-actin cytoskeleton. In the top row, 3D reconstructions of the F-actin cytoskeleton are shown, allowing visualization of the surface ruffles of the cells. The bottom row shows one confocal plane inside the cells. The arrows point to the internal vesicles in the cells, while the arrowheads point to the cortical actin layer. Ctrl: control cells. ZnO: cells treated with 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zinc oxide. Zn ion: cells treated with 100 μM zinc acetate. ZrO₂: cells treated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zirconium oxide.

Zinc oxide induces indeed profound changes in the cellular responses, detected at the proteome level, but also as shown by the validation experiments.

Among such changes, the cytoskeleton/trafficking category is one of the most prominent, which is in line with the observed changes at the cytoskeletal and phagocytosis levels in the validation experiments. In this respect, the changes observed on RhoGDI2 are worth commenting in further details. RhoGDI2 is observed as two spots on the 2D gels (C3a and C3b) and only the acidic one is increased in response to zinc oxide. In the cell, RhoGDIs sequester the Rho and Rac GTPases in an inactive form [62], and this sequestration is released by the phosphorylation of RhoGDI [63,64]. Thus, the increase of the acidic, phosphorylated protein species of RhoGDI2 likely translates into an increase in free, active Rac and Rho, showing the response of the cell to the effects of zinc on the actin cytoskeleton. This example illustrates the benefits of carrying out proteomics at the protein species level to explain the biological outcomes that are observed. Interestingly, this change in modified RhoGDI abundance was not observed with zinc ion, but other quantitative modulations affecting proteins involved in the actin cytoskeleton

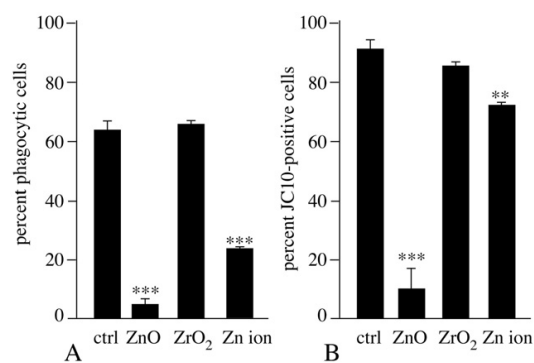


Fig. 3. Phagocytic activity and mitochondrial transmembrane potential of J774 cells upon treatment with nanoparticles. 3A: assay of the phagocytic activity index (3 independent experiments). 3B: percentage of JC10-positive cells in the cultures, i.e. cells with a normal mitochondrial potential (3 independent experiments). Fluorescence measurements were carried out on a FACScalibur cell sorter. Statistical confidence (Student *t*-test) is indicated as follows: ***p* \leq 0.01; ****p* \leq 0.001. Ctrl: control cells. ZnO: cells treated with 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zinc oxide. ZrO₂: cells treated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zirconium oxide. Zn ion: cells treated with 100 μM zinc acetate.

dynamics (e.g. capping proteins, cofilin or wdr1 protein) may lead to the similar outcome that we observed.

The protein regulating glutathione neosynthesis, GCLM, is also induced by zinc oxide and zinc ion, which is not surprising as glutathione is an important part in the cellular responses to thiophilic metals such as zinc [65], copper [66] and silver [67]. The heme oxygenase-ferritin pathway, the biliverdin reductase and the formylglutathione hydrolase also belong to these protective proteins increased in response to zinc oxide, but not necessarily in response to zinc ion.

Several perturbations can also be seen in various signaling pathways. One of the striking examples is the decrease in inositol phosphate synthase, which is rate limiting for all inositol-containing molecules, so that the phosphoinositol-dependent signaling pathways may be impacted. In the same trend, RGS10, which is increased upon zinc oxide treatment of the cells, plays a role in macrophages functions and crosstalks with the inositol-dependent pathways [68].

Rather interestingly, we also observed an increase in the Myd88 protein, which is a key relay in TLR-dependent signaling. There is a close interplay between zinc and Myd88 [69,70], so that the increase in the amount of Myd88 might correspond to an attempt of the cells to keep the pathway functional in the presence of high zinc levels.

Last but not least in the signaling area, a major increase in prostaglandin reductase was also observed. Via the PPAR-gamma pathway [71], this enzyme is linked to the energy metabolism.

Indeed, perturbations at the mitochondrial level are among the most striking alterations induced by zinc oxide. They are well documented on some mitochondrial dehydrogenases [72,73] and further documented here at the level of the transmembrane potential, extending to

Table 2

GAPDH activity measured in control cell extracts and in extracts prepared from cells treated for 24 h with either 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zinc oxide or 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zirconium oxide. In the right column, the GAPDH activity is measured in a control cell extract preincubated for 30 min with the indicated concentrations of zinc ions prior to enzyme measurement. The activities are expressed in units/mg protein, the unit being defined as 1 μm of substrate converted per minute.

Condition	GAPDH	condition	GAPDH
Ctrl	16 \pm 2	0 μM Zn	16.5 \pm 1
ZrO ₂	13.5 \pm 2.5	100 μM Zn	11.5 \pm 0.6
ZnO	7.5 \pm 2.5	150 μM Zn	7.2 \pm 0.8
Zn ion	13.8 \pm 0.75	200 μM Zn	4.9 \pm 1.5

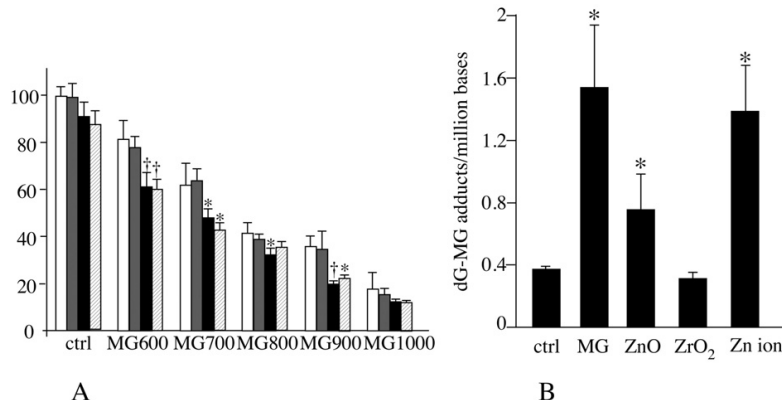


Fig. 4. Zinc oxide and methylglyoxal. In panel A, J774 cells were treated for 24 h as indicated (6 h pre-incubation with nanoparticles + 18 h in presence of variable concentrations of methylglyoxal indicated in μM). The viability was measured by the trypan blue exclusion assay. White bars: control cells (no nanoparticles added). Gray bars: cells treated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zirconium oxide. Black bars: cells treated with 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zinc oxide. Hatched bars: cells treated with 100 μM zinc acetate. In panel B, the amount of methylglyoxal-modified guanine was measured after treatment of the cells for 24 h by the indicated compounds. Ctrl: control cells. MG: cells treated with 600 μM methylglyoxal. ZrO₂: cells treated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zirconium oxide. ZnO: cells treated with 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zinc oxide. Zn ion: cells treated with 100 μM zinc acetate. For both panels, measurements were carried out on biological triplicates. Statistical confidence (Student *t*-test vs. control) is indicated as follows: * $p \leq 0.05$; † $p \leq 0.01$.

macrophages the results already described on neurons [74] and on purified mitochondrial complexes [75].

Apart from its impact on mitochondria, zinc also impacts the central glycolytic metabolism at several levels [28,29,74,76], with obvious consequences in terms of cellular energetics, thus explaining the protective effects of pyruvate and oxaloacetate [76,77]. However, the further consequences of this impairment of the central glycolytic metabolism are generally not investigated.

Through our proteomic screen, we observed quantitative changes in some proteins (DNA repair proteins, glyoxalase 2, aldose reductase) that could be linked to this metabolic impairment via methylglyoxal. Methylglyoxal is produced from glyceraldehyde 3-phosphate by a natural phosphate elimination (Fig. 5), mechanistically related to the well-known phosphoserine elimination, which is also divalent ion-catalyzed [78]. There is thus a competition between this reaction and

the GAPDH-catalyzed glyceraldehyde 3-phosphate oxidation, so that the levels of methylglyoxal increase when the GAPDH activity decreases. In complex cellular extracts, GAPDH is inhibited at rather high zinc concentrations because of the general metal ion buffering capacity of proteins [79], but such high intracellular concentrations can be reached at still subtoxic zinc levels [28]. Moreover, we observed a decrease in the GAPDH activity in cells pretreated with zinc oxide, converging to a putative increase of the intracellular methylglyoxal levels. As the most deleterious effect of methylglyoxal resides in its ability to modify DNA bases, and especially guanine, we measured the amount of methylglyoxal-modified guanine in zinc oxide-treated cells and found a significant increase.

This raises the question of a possible carcinogenic effect of zinc, which has not been documented in vivo so far for mammals, and which is still controversial. A genotoxic effect of zinc has already been

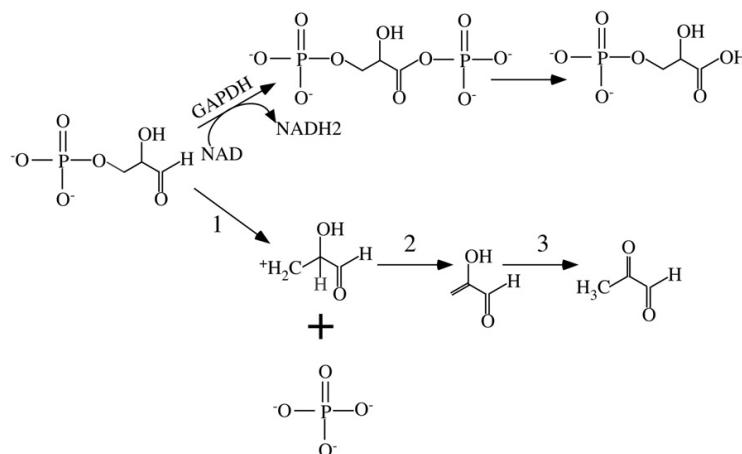


Fig. 5. Generation of methylglyoxal from glyceraldehyde phosphate. In the physiological, GAPDH-catalyzed reaction (top pathway) the oxidation catalyzed by the GAPDH destroys the terminal aldehyde function of the glyceraldehyde, so that even chemical hydrolysis of the 1,3 diphosphoglycerate will yield a non toxic carboxylic acid. In the bottom pathway, the labile bonds or atoms are shown in blue. The phosphoester is prone to asymmetric bond cleavage, with generation of an unstable carbocation (1). The hydrogen in the alpha position of the terminal carbonyl function is highly labile, which drives the overall reaction to a beta elimination of phosphoric acid (2). The beta elimination product being an enol, it isomerizes to the dicarbonyl compound (3) yielding to methylglyoxal. As in the case of phosphoserine, where the same beta elimination reaction can take place, divalent cations, which bind to the phosphate, catalyze the elimination reaction. Thus, high levels of intracellular zinc have a dual effect in inhibiting the GAPDH-catalyzed pathway and driving the beta elimination pathway at the same time.

documented *in vitro* [7–11,28,80], but also *in vivo* [12,13], although other studies do not reach the same conclusion (e.g. [14]), and our results may shed new light in this area. In fact, most of the genotoxicity studies primarily investigate the DNA strand break damages on the eukaryotic cells, either *ex vivo* or *in vitro*, using comet assays or more robust tests such as the micronuclei assay. The damages to bases are investigated by mutation reversal assays, generally carried out in bacteria. However, the results obtained on bacteria are valid on eukaryotic cells only if the metabolisms are comparable, and this explains while the so-called metabolic activation of many organic chemicals must be carried out with liver fractions to generate the active metabolites that are not directly produced by the bacteria but are in mammalian systems. In the case of zinc, the metabolism is quite different between bacteria and eukaryotic cells. First, bacteria do not internalize nanoparticles, and they do not present the highly active intracellular zinc dissolution that takes place in lysosomes [57,81]. Second, the general zinc ion metabolism is fairly different between bacteria and mammalian cells [56], especially phagocytes that store high amounts of zinc [82]. Thus, the glycation base damages that we demonstrate here as a result of zinc exposure are likely to be undetected in bacterial systems and will not induce massive strand breaks detectable by chromosomal aberrations or micronuclei tests.

Going into more details, the glycation base damages are known to be repaired by the nucleotide excision system [83], a system which end-products are dNMPs, including the ones bearing the damaged bases. The pool of dNMPs is sanitized in the cells by specialized enzymes, such as deoxyribonucleotidase or nucleotide N-hydrolase. We found an increase of deoxyribonucleotidase in response to both zinc oxide and zinc ion, while nucleotide N-hydrolase was increased only in response to zinc oxide. This may correlate, at least in part, with the lower amount of methylglyoxal-modified guanine found in the case of exposure to zinc oxide in comparison with exposure to the equivalent concentration of zinc ion. Furthermore, it must be kept in mind that methylglyoxal lesions are overcome by specialized polymerases [84]. However, these specialized polymerases introduce errors at other places in the DNA, so that zinc induces an overall burden of the DNA repair system at large. This may induce in turn an increased sensitivity to other DNA-damaging molecules, which then appear as the primary carcinogens.

This example of the methylglyoxal pathway, which is clearly linked to glycolytic metabolism, clearly poses the question of the influence of the cellular metabolism on the responses and sensitivities of cells to zinc. In this regard, it may be interesting to compare the results described here with those obtained on zinc ion and on the same zinc oxide nanomaterial [28], using a slightly different macrophage cell line (RAW264 instead of J774) but also a different medium (previously RPMI 1640 instead of high glucose DMEM). Interestingly, only a few proteins were found modulated in the same way between the two conditions (transaldolase, major vault protein, two proteasome regulators, GCLM, NSF attachment protein, sorting nexin 2 and RuvB-like 2 protein). At a higher level, the actin cytoskeleton at large and the proteasome system are altered in both cases, but this is detected through different proteins. However, more proteins involved in the central metabolism, mitochondria, and nucleotide metabolism are modulated in J774 cells grown in high glucose DMEM. We already mentioned that DMEM has a higher tryptophan content than RPMI, and this is known to have a pleiotropic effect on macrophages through the aryl hydrocarbon receptor [19,22,23]. As this receptor is stimulated by many ligands [17,18], so that its activation may be relatively common in complex environments [21], the use of DMEM can be seen as an easy way to investigate this type of condition [20] without resorting to toxin agonists such as dioxins. However, high glucose DMEM is also twice richer in glucose than RPMI1640, and this may lead to a more active metabolism in cells grown in the richer medium. A more active metabolism could also explain the higher impact of the methylglyoxal pathway, and the higher impact on mitochondria observed with the richer medium.

These combined effects of zinc on the DNA and on glycolysis may indeed explain why cancer cells, which are more dependent on glycolysis through the Warburg effect, are also in turn more sensitive to zinc than normal cells [85,86]. This cross effect between glucose and zinc through the central metabolism may also be interesting to keep in mind when dealing with metabolic disorders.

Last but not least, it may be interesting to discuss the difference that are observed here between the responses to zinc oxide and those to zinc ion, while highly similar responses have been seen in other systems [53]. Taking into account the fact that previous work made on systems in which macrophages are important have also concluded to differences between the effects of zinc ion and zinc oxide, [54,55], it is tempting to correlate these discrepancies with the phagocytic activity of the cells. In the case of T lymphocytes [53], which are very weakly endocytic, the zinc oxide is not internalized in the cells, and the only zinc which enters the cells is zinc ion coming from the outside and thus from the dissolution of the nanomaterial in the culture medium. In the case of macrophages, which are highly phagocytic, an important proportion of zinc is internalized directly in endosomes then in lysosomes, where it dissolves quickly [55,81]. This may result in both a different kinetic of zinc increase in the cell, and a different subcellular localization of zinc. In fact, zinc coming directly from the outside of the cell in ionic form comes from the periphery to the center, while zinc coming from the intracellular dissolution comes from the center of the cell (the perinuclear region where the lysosomes are grouped) to more peripheral localizations. These different dynamics may explain why different impacts are seen in phagocytic cells in response to zinc oxide and zinc ion.

5. Concluding remarks

Overall, this work underlines the interest but also the difficulties of protein species-based proteomics, as shown by the example of RhoGDI2. What we do observe on 2D gels is a quantitative modulation of a few spots, and after identification, we can get protein names on them. From the comparison of the theoretical pI and Mr of the proteins with the observed ones for the spots of interest we can often know if we are dealing with protein fragments or with intact proteins. However, even if we know that we are dealing with intact proteins, we seldom can know if we are dealing with a minor or a major form, with an active or an inactive form [67]. 2D blotting can provide useful information in terms of description of the landscape of protein species, but is not problem-free (antibodies cross-reactivities, maps realignments between 2D blots and stained patterns). Thus, an often-useful approach is to pick spots in the neighborhood of the quantitatively modified ones, as post-translationally modified spots are usually not far apart from each other. This is how we picked other forms of cytochrome bc1, ERP29 or RhoGDI2, just to name a few.

However, even a complete description of the protein species landscape usually does not give indication about the possible functional implications of the changes that we observed in our proteomic screens, and this is why we tested as much as possible the functional implications of the proteomic-derived findings in our case for understanding the toxicity of nanoparticles and in highlighting new mechanisms underlying this toxicity (e.g. the methylglyoxal pathway). The relative number of protein species modulated by two nanoparticles of different toxicities correlates with the toxicity, with much more protein species changing in response to zinc oxide compared to zirconium dioxide. For zinc oxide, strong responses are shown for mitochondrial and cytoskeletal proteins, as well as in the methylglyoxal-detoxifying pathway, the latter suggesting a mechanism for zinc oxide genotoxicity.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2015.12.013>.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

TR and VCF performed the proteomics experiments with nanoparticles. CAG performed the phagocytosis, mitochondria and the confocal microscopy experiments, and helped in drafting the manuscript. BD performed the nanomaterial characterization in culture medium, and part of the phagocytosis experiments. JLR and MC performed the dG-MG assay, helped in designing the whole study and in drafting the manuscript, and critically revised the manuscript. HD, JMS, SC and AVD performed and interpreted the mass spectrometry identification in the proteomics experiments, and helped in drafting the manuscript.

TR conceived and designed the whole study, took part in the proteomics experiments, performed the enzyme assays and drafted the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

Acknowledgments

The authors warmly thank Didier Grunwald and Isabelle Testard for their help in the confocal microscopy experiments. The financial support of the CEA toxicology program (Nanostress grants) and of ANSES (PNREST-2011-25 Innimmunotox project) is also gratefully acknowledged. This work is a contribution to the Labex Serenade (n° ANR-11-LABX-0064) funded by the "Investissements d'Avenir" French Government program of the French National Research Agency (ANR) through the A*MIDEX project (n° ANR-11-IDEX-0001-02).

References

- H.Y. Zhang, Z.X. Ji, T. Xia, H. Meng, C. Low-Kam, R. Liu, et al., Use of metal oxide nanoparticle band gap to develop a predictive paradigm for oxidative stress and acute pulmonary inflammation, *ACS Nano* 6 (2012) 4349–4368.
- G. Applerot, J. Lellouche, N. Perkas, Y. Nitzan, A. Gedanken, E. Banin, ZnO nanoparticle-coated surfaces inhibit bacterial biofilm formation and increase antibiotic susceptibility, *RSC Adv.* 2 (2012) 2314–2321.
- M.J. Osmond, M.J. McCall, Zinc oxide nanoparticles in modern sunscreens: an analysis of potential exposure and hazard, *Nanotoxicology* 4 (2010) 15–41.
- P. Drinker, R.M. Thomson, J.L. Finn, Metal fume fever: IV. Threshold doses of zinc oxide, preventive measures, and the chronic effects of repeated exposures, *J. Ind. Hyg.* 9 (1927) 331–345.
- L.C. Rohrs, Metal-fume fever from inhaling zinc oxide, *AMA Arch. Ind. Health* 16 (1957) 42–47.
- C.C. Huang, R.S. Aronstam, D.R. Chen, Y.W. Huang, Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles, *Toxicol. in Vitro* 24 (2010) 45–55.
- V. Sharma, D. Anderson, A. Dhawan, Zinc oxide nanoparticles induce oxidative stress and genotoxicity in human liver cells (HepG2), *J. Biomed. Nanotechnol.* 7 (2011) 98–99.
- S. Hackenberg, A. Scherzed, A. Technau, M. Kessler, K. Froelich, C. Ginzkey, et al., Cytotoxic, genotoxic and pro-inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles in human nasal mucosa cells in vitro, *Toxicol. in Vitro* 25 (2011) 657–663.
- V.A. Senapati, A. Kumar, G.S. Gupta, A.K. Pandey, A. Dhawan, ZnO nanoparticles induced inflammatory response and genotoxicity in human blood cells: a mechanistic approach, *Food Chem. Toxicol.* (2015).
- J. Heim, E. Felder, M.N. Tahir, A. Kaltbeitzel, U.R. Heinrich, C. Brochhausen, et al., Genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles, *Nanoscale* 7 (2015) 8931–8938.
- A. Zijno, I. De Angelis, B. De Berardis, C. Andreoli, M.T. Russo, D. Pietraforte, et al., Different mechanisms are involved in oxidative DNA damage and genotoxicity induction by ZnO and TiO₂ nanoparticles in human colon carcinoma cells, *Toxicol. in Vitro* 29 (2015) 1503–1512.
- D. Ali, S. Alarifi, S. Kumar, M. Ahamed, M.A. Siddiqui, Oxidative stress and genotoxic effect of zinc oxide nanoparticles in freshwater snail *Lymnaea luteola* L., *Aquat. Toxicol.* 124–125 (2012) 83–90.
- E.R. Carmona, C. Inostroza-Blancheteau, L. Rubio, R. Marcos, Genotoxic and oxidative stress potential of nanosized and bulk zinc oxide particles in *Drosophila melanogaster*, *Toxicol. Ind. Health* (2015).
- J.Y. Kwon, S.Y. Lee, P. Koedrith, J.Y. Lee, K.M. Kim, J.M. Oh, et al., Lack of genotoxic potential of ZnO nanoparticles in vitro and in vivo tests, *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 761 (2014) 1–9.
- J. Palomaki, P. Karisola, L. Pylkkanen, K. Savolainen, H. Alenius, Engineered nanomaterials cause cytotoxicity and activation on mouse antigen presenting cells, *Toxicology* 267 (2010) 125–131.
- M.S. Denison, L.M. Vella, The hepatic Ah receptor for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: species differences in subunit dissociation, *Arch. Biochem. Biophys.* 277 (1990) 382–388.
- J. Adachi, Y. Mori, S. Matsui, H. Takigami, J. Fujino, H. Kitagawa, et al., Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 31475–31478.
- S. Heath-Pagliuso, W.J. Rogers, K. Tullis, S.D. Seidel, P.H. Ceniñ, A. Brouwer, et al., Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites, *Biochemistry* 37 (1998) 11508–11515.
- C.A. Opitz, U.M. Litzenger, F. Sahn, M. Ott, I. Tritschler, S. Trump, et al., An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor, *Nature* 478 (2011) 197–203.
- M. Veldhoen, K. Hirota, J. Christensen, A. O'Garra, B. Stockinger, Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells, *J. Exp. Med.* 206 (2009) 43–49.
- C. Esser, A. Rannug, The aryl hydrocarbon receptor in barrier organ physiology, immunology, and toxicology, *Pharmacol. Rev.* 67 (2015) 259–279.
- C. Esser, A. Rannug, B. Stockinger, The aryl hydrocarbon receptor in immunity, *Trends Immunol.* 30 (2009) 447–454.
- H. Cohly, J. Stephens, A. Markhov, M. Angel, W. Campbell, K. Ndebele, et al., Cell culture conditions affect LPS inducibility of the inflammatory mediators in J774A.1 murine macrophages, *Immunol. Investig.* 30 (2001) 1–15.
- T. Rabilloud, P. Lescuyer, Proteomics in mechanistic toxicology: history, concepts, achievements, caveats, and potential, *Proteomics* 15 (2015) 1051–1074.
- T. Verano-Braga, R. Miethling-Graff, K. Wojdyła, A. Rogowska-Wrzesinska, J.R. Brewer, H. Erdmann, et al., Insights into the cellular response triggered by silver nanoparticles using quantitative proteomics, *ACS Nano* 8 (2014) 2161–2175.
- M.J. Edelmann, L.A. Shack, C.D. Naske, K.B. Walters, B. Nanduri, SILAC-based quantitative proteomic analysis of human lung cell response to copper oxide nanoparticles, *PLoS One* 9 (2014), e114390.
- S. Triboulet, C. Aude-Garcia, M. Carriere, H. Diemer, F. Proamer, A. Habert, et al., Molecular responses of mouse macrophages to copper and copper oxide nanoparticles inferred from proteomic analyses, *Mol. Cell. Proteomics* 12 (2013) 3108–3122.
- S. Triboulet, C. Aude-Garcia, L. Armand, A. Gerdil, H. Diemer, F. Proamer, et al., Analysis of cellular responses of macrophages to zinc ions and zinc oxide nanoparticles: a combined targeted and proteomic approach, *Nanoscale* 6 (2014) 6102–6114.
- C. Filippi, A. Pryde, P. Cowan, T. Lee, P. Hayes, K. Donaldson, et al., Toxicology of ZnO and TiO₂ nanoparticles on hepatocytes: impact on metabolism and bioenergetics, *Nanotoxicology* 9 (2015) 126–134.
- S. Triboulet, C. Aude-Garcia, L. Armand, V. Collin-Faure, M. Chevallet, H. Diemer, et al., Comparative proteomic analysis of the molecular responses of mouse macrophages to titanium dioxide and copper oxide nanoparticles unravels some toxic mechanisms for copper oxide nanoparticles in macrophages, *PLoS One* 10 (2015), e0124496.
- G. Abel, J. Szollosi, J. Fachel, Phagocytosis of fluorescent latex microbeads by peritoneal macrophages in different strains of mice: a flow cytometric study, *Eur. J. Immunogenet.* 18 (1991) 239–245.
- M. Reers, T.W. Smith, L.B. Chen, J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential, *Biochemistry* 30 (1991) 4480–4486.
- L. Donaghy, E. Kraffe, N. Le Goic, C. Lambert, A.K. Volety, P. Soudant, Reactive oxygen species in unstimulated hemocytes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: a mitochondrial involvement, *PLoS One* 7 (2012), e46594.
- M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- K.M. Mayer, F.H. Arnold, A colorimetric assay to quantify dehydrogenase activity in crude cell lysates, *J. Biomol. Screen.* 7 (2002) 135–140.
- J.L. Ravanat, Chromatographic methods for the analysis of oxidatively damaged DNA, *Free Radic. Res.* 46 (2012) 479–491.
- J.L. Ravanat, T. Douki, P. Duez, E. Gremaud, K. Herbert, T. Hofer, et al., Cellular background level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: an isotope based method to evaluate artefactual oxidation of DNA during its extraction and subsequent work-up, *Carcinogenesis* 23 (2002) 1911–1918.
- B. Yuan, H. Cao, Y. Jiang, H. Hong, Y. Wang, Efficient and accurate bypass of N2-(1-carboxyethyl)-2'-deoxyguanosine by DinB DNA polymerase in vitro and in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 8679–8684.
- E. Gianazza, F. Celentano, S. Magenes, C. Etori, P.G. Righetti, Formulations for immobilized pH gradients including pH extremes, *Electrophoresis* 10 (1989) 806–808.
- T. Rabilloud, C. Valette, J.J. Lawrence, Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension, *Electrophoresis* 15 (1994) 1552–1558.
- T. Rabilloud, C. Adessi, A. Giraudel, J. Lunardi, Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients, *Electrophoresis* 18 (1997) 307–316.
- S. Luche, H. Diemer, C. Tastet, M. Chevallet, A. Van Dorsselaer, E. Leize-Wagner, et al., About thiol derivatization and resolution of basic proteins in two-dimensional electrophoresis, *Proteomics* 4 (2004) 551–561.
- A. Gorg, W. Postel, J. Weser, S. Gunther, J.R. Strahler, S.M. Hanash, et al., Elimination of point streaking on silver stained two-dimensional gels by addition of iodoacetamide to the equilibration buffer, *Electrophoresis* 8 (1987) 122–124.
- I. Olsson, K. Larsson, R. Palmgren, B. Bjellqvist, Organic disulfides as a means to generate streak-free two-dimensional maps with narrow range basic immobilized pH gradient strips as first dimension, *Proteomics* 2 (2002) 1630–1632.
- C. Tastet, P. Lescuyer, H. Diemer, S. Luche, A. van Dorsselaer, T. Rabilloud, A versatile electrophoresis system for the analysis of high- and low-molecular-weight proteins, *Electrophoresis* 24 (2003) 1787–1794.

- [46] P. Sinha, J. Poland, M. Schnolzer, T. Rabilloud, A new silver staining apparatus and procedure for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis of proteins after two-dimensional electrophoresis, *Proteomics* 1 (2001) 835–840.
- [47] A.G. Herrmann, J.L. Searcy, T. Le Bihan, J. McCulloch, R.F. Deighton, Total variance should drive data handling strategies in third generation proteomic studies, *Proteomics* 13 (2013) 3251–3255.
- [48] J.D. Storey, R. Tibshirani, Statistical significance for genomewide studies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 9440–9445.
- [49] A.P. Diz, A. Carvajal-Rodriguez, D.O. Skibinski, Multiple hypothesis testing in proteomics: a strategy for experimental work, *Mol. Cell. Proteomics* 10 (2011) (M110 004374).
- [50] F. Gharahdaghi, C.R. Weinberg, D.A. Meagher, B.S. Imai, S.M. Mische, Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity, *Electrophoresis* 20 (1999) 601–605.
- [51] S. Richert, S. Luche, M. Chevallet, A. Van Dorselaer, E. Leize-Wagner, T. Rabilloud, About the mechanism of interference of silver staining with peptide mass spectrometry, *Proteomics* 4 (2004) 909–916.
- [52] T. Meissner, K. Oelschlagel, A. Potthoff, Implications of the stability behavior of zinc oxide nanoparticles for toxicological studies, *Int. Nano Lett.* 4 (2014) 1–13 (C7–116).
- [53] S. Tuomela, R. Autio, T. Buerki-Thurnherr, O. Arslan, A. Kunzmann, B. Andersson-Willman, et al., Gene expression profiling of immune-competent human cells exposed to engineered zinc oxide or titanium dioxide nanoparticles, *PLoS One* 8 (2013).
- [54] W.S. Cho, R. Duffin, C.A. Poland, A. Duschl, G.J. Oostingh, W. MacNee, et al., Differential pro-inflammatory effects of metal oxide nanoparticles and their soluble ions in vitro and in vivo; zinc and copper nanoparticles, but not their ions, recruit eosinophils to the lungs, *Nanotoxicology* 6 (2012) 22–35.
- [55] W.S. Cho, R. Duffin, S.E.M. Howie, C.J. Scotton, W.A.H. Wallace, W. MacNee, et al., Progressive severe lung injury by zinc oxide nanoparticles; the role of Zn²⁺ dissolution inside lysosomes, *Part. Fibre Toxicol.* 8 (2011).
- [56] D.J. Eide, Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc, *Biochim. Biophys. Acta* 2006 (1763) 711–722.
- [57] G. Wellenreuther, M. Cianci, R. Tucoulou, W. Meyer-Klaucke, H. Haase, The ligand environment of zinc stored in vesicles, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380 (2009) 198–203.
- [58] B. Krotkiewska, T. Banas, Interaction of Zn²⁺ and Cu²⁺ ions with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from bovine heart and rabbit muscle, *Int. J. Biochem.* 24 (1992) 1501–1505.
- [59] F.W. Chaplen, Incidence and potential implications of the toxic metabolite methylglyoxal in cell culture: a review, *Cytotechnology* 26 (1998) 173–183.
- [60] P. Borm, F.R. Cassee, G. Oberdorster, Lung particle overload: old school – new insights? *Part. Fibre Toxicol.* 12 (2015) 10.
- [61] L.C. Renwick, K. Donaldson, A. Clouter, Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 172 (2001) 119–127.
- [62] R. Garcia-Mata, E. Boulter, K. BurrIDGE, The ‘invisible hand’: regulation of RHO GTPases by RHOGDIs, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12 (2011) 493–504.
- [63] C. DerMardirossian, A. Schnelzer, G.M. Bokoch, Phosphorylation of RhoGDI by Pak1 mediates dissociation of Rac GTPase, *Mol. Cell* 15 (2004) 117–127.
- [64] C. DerMardirossian, G. Rocklin, J.Y. Seo, G.M. Bokoch, Phosphorylation of RhoGDI by Src regulates Rho GTPase binding and cytosol–membrane cycling, *Mol. Biol. Cell* 17 (2006) 4760–4768.
- [65] J. Seagrave, R.A. Tobey, C.E. Hildebrand, Zinc effects on glutathione metabolism relationship to zinc-induced protection from alkylating agents, *Biochem. Pharmacol.* 32 (1983) 3017–3021.
- [66] J.H. Freedman, M.R. Ciriolo, J. Peisach, The role of glutathione in copper metabolism and toxicity, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 5598–5605.
- [67] G. Veronesi, C. Aude-Garcia, I. Kieffer, T. Gallon, P. Delangle, N. Herlin-Boime, et al., Exposure-dependent Ag⁽⁺⁾ release from silver nanoparticles and its complexation in AgS₂ sites in primary murine macrophages, *Nanoscale* 7 (2015) 7323–7330.
- [68] S. Yang, Y.P. Li, RGS10-null mutation impairs osteoclast differentiation resulting from the loss of [Ca²⁺]_i oscillation regulation, *Genes Dev.* 21 (2007) 1803–1816.
- [69] A. Brieger, L. Rink, H. Haase, Differential regulation of TLR-dependent MyD88 and TRIF signaling pathways by free zinc ions, *J. Immunol.* 191 (2013) 1808–1817.
- [70] H. Chang, C.C. Ho, C.S. Yang, W.H. Chang, M.H. Tsai, H.T. Tsai, et al., Involvement of MyD88 in zinc oxide nanoparticle-induced lung inflammation, *Exp. Toxicol. Pathol.* 65 (2013) 887–896.
- [71] W.L. Chou, L.M. Chuang, C.C. Chou, A.H. Wang, J.A. Lawson, G.A. FitzGerald, et al., Identification of a novel prostaglandin reductase reveals the involvement of prostaglandin E2 catabolism in regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 18162–18172.
- [72] A.M. Brown, B.S. Kristal, M.S. Efron, A.I. Shestopalov, P.A. Ullucci, K.F. Sheu, et al., Zn²⁺ inhibits alpha-ketoglutarate-stimulated mitochondrial respiration and the isolated alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 13441–13447.
- [73] I.G. Gazaryan, B.F. Krasnikov, G.A. Ashby, R.N. Thorneley, B.S. Kristal, A.M. Brown, Zinc is a potent inhibitor of thiol oxidoreductase activity and stimulates reactive oxygen species production by lipoamide dehydrogenase, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 10064–10072.
- [74] K.E. Dineley, T.V. Votyakova, I.J. Reynolds, Zinc inhibition of cellular energy production: implications for mitochondria and neurodegeneration, *J. Neurochem.* 85 (2003) 563–570.
- [75] P.L. Martino, G. Capitanio, N. Capitanio, S. Papa, Inhibition of proton pumping in membrane reconstituted bovine heart cytochrome c oxidase by zinc binding at the inner matrix side, *Biochim. Biophys. Acta* 2011 (1807) 1075–1082.
- [76] C.T. Sheline, M.M. Behrens, D.W. Choi, Zinc-induced cortical neuronal death: contribution of energy failure attributable to loss of NAD⁽⁺⁾ and inhibition of glycolysis, *J. Neurosci.* 20 (2000) 3139–3146.
- [77] E.V. Berry, N.J. Toms, Pyruvate and oxaloacetate limit zinc-induced oxidative HT-22 neuronal cell injury, *Neurotoxicology* 27 (2006) 1043–1051.
- [78] M.F. Byford, Rapid and selective modification of phosphoserine residues catalysed by Ba²⁺ ions for their detection during peptide microsequencing, *Biochem. J.* 280 (Pt 1) (1991) 261–265.
- [79] H. Haase, S. Hebel, G. Engelhardt, L. Rink, The biochemical effects of extracellular Zn⁽²⁺⁾ and other metal ions are severely affected by their speciation in cell culture media, *Metallomics* 7 (2015) 102–111.
- [80] V. Sharma, R.K. Shukla, N. Saxena, D. Parmar, M. Das, A. Dhawan, DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells, *Toxicol. Lett.* 185 (2009) 211–218.
- [81] S.A. James, B.N. Feltis, M.D. de Jonge, M. Sridhar, J.A. Kimpton, M. Altissimo, et al., Quantification of ZnO nanoparticle uptake, distribution, and dissolution within individual human macrophages, *ACS Nano* 7 (2013) 10621–10635.
- [82] K. Subramanian Vignesh, J.A. Landero Figueroa, A. Porollo, J.A. Caruso, G.S. Deepe Jr., Zinc sequestration: arming phagocyte defense against fungal attack, *PLoS Pathog.* 9 (2013), e1003815.
- [83] D. Tamae, P. Lim, G.E. Wuenschell, J. Termini, Mutagenesis and repair induced by the DNA advanced glycation end product N2-1-(carboxyethyl)-2'-deoxyguanosine in human cells, *Biochemistry* 50 (2011) 2321–2329.
- [84] B. Yuan, C. You, N. Andersen, Y. Jiang, M. Moriya, T.R. O'Connor, et al., The roles of DNA polymerases kappa and iota in the error-free bypass of N2-carboxyalkyl-2'-deoxyguanosine lesions in mammalian cells, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 17503–17511.
- [85] T. Sliwinski, A. Czechowska, M. Kolodziejczak, J. Jajte, M. Wisniewska-Jarosinska, J. Blasiak, Zinc salts differentially modulate DNA damage in normal and cancer cells, *Cell Biol. Int.* 33 (2009) 542–547.
- [86] L.C. Costello, R.B. Franklin, Cytotoxic/tumor suppressor role of zinc for the treatment of cancer: an enigma and an opportunity, *Expert. Rev. Anticancer. Ther.* 12 (2012) 121–128.

RESEARCH ARTICLE

Poly(Lactic Acid) Nanoparticles Targeting $\alpha 5\beta 1$ Integrin as Vaccine Delivery Vehicle, a Prospective Study

Bastien Dalzon^{1,2}, Célia Lebas^{1,2}, Gina Jimenez^{1,2,3}, Alice Gutjahr^{1,2}, Céline Terrat^{1,2}, Jean-Yves Exposito^{1,2*}, Bernard Verrier^{1,2}, Claire Lethias^{1,2}

1 Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Fédération de Recherche, SFR BioSciences (Unité Mixte de Service 3444/US8) Gerland-Lyon Sud, Université de Lyon 1, Lyon, France, **2** Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche, 7 passage du Vercors, Lyon, France, **3** Institut NeuroMyogène, CNRS UMR-5310 INSERM-U1217, Université de Lyon 1, Lyon, France

✉ These authors contributed equally to this work.

* jy.exposito@ibcp.fr



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Dalzon B, Lebas C, Jimenez G, Gutjahr A, Terrat C, Exposito J-Y, et al. (2016) Poly(Lactic Acid) Nanoparticles Targeting $\alpha 5\beta 1$ Integrin as Vaccine Delivery Vehicle, a Prospective Study. PLoS ONE 11(12): e0167663. doi:10.1371/journal.pone.0167663

Editor: Hélder A. Santos, Helsingin Yliopisto, FINLAND

Received: September 8, 2016

Accepted: November 17, 2016

Published: December 14, 2016

Copyright: © 2016 Dalzon 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: GJ is supported by an AFM doctoral fellowship, AG by an ANRT PhD fellowship in collaboration with InvivoGen, whereas JYE and BV are supported by grants from the Fondation Pierre Bergé - Sidaction, two FP7 European grants CUT'HIVAC (No. 241904) and ADITEC (No. 280873) and HIVERA support. The funders had no role in study design, data collection and analysis,

Abstract

Biodegradable polymeric nanoparticles are vehicles of choice for drug delivery and have the ability to encapsulate and present at their surface different molecules of interest. Among these bio-nanocarriers, poly(lactic acid) (PLA) nanoparticles have been used as adjuvant and vehicle for enhanced vaccine efficacy. In order to develop an approach to efficient vaccine delivery, we developed nanoparticles to target $\alpha 5\beta 1$ positive cells. We first overproduced, in bacteria, human fibronectin FNIII9/10 recombinant proteins possessing an integrin $\alpha 5\beta 1$ binding site, the RGDS sequence, or a mutated form of this site. After having confirmed the integrin binding properties of these recombinant proteins in cell culture assays, we were able to formulate PLA nanoparticles with these FNIII9/10 proteins at their surface. We then confirmed, by fluorescence and confocal microscopy, an enhanced cellular uptake by $\alpha 5\beta 1^+$ cells of RGDS-FNIII9/10 coated PLA nanoparticles, in comparison to KGES-FNIII9/10 coated or non-coated controls. As a first vaccination approach, we prepared PLA nanoparticles co-coated with p24 (an HIV antigen), and RGDS- or KGES-FNIII9/10 proteins, followed by subcutaneous vaccine administration, in mice. Although we did not detect improvements in the apparent humoral response to p24 antigen in the serum of RGDS/p24 nanoparticle-treated mice, the presence of the FNIII proteins increased significantly the avidity index of anti-p24 antibodies compared to p24-nanoparticle-injected control mice. Future developments of this innovative targeted vaccine are discussed.

Introduction

During recent decades, attempts to develop cheap, efficient, easy-to-use, and non-toxic vaccines with less side effects have included the use of new adjuvants, new supporting materials, and new targeting strategies [1]. Among the carriers developed, biodegradable and

decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have read the journal's policy and the authors of this manuscript have the following competing interests: BV is a shareholder of Adjuvatis, a company dedicated to particle development. AG is a student, and part of her salary is from Invivogen. AG performed vaccine injections and participated in sampling. This does not alter the authors' adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

biocompatible poly(lactic acid) (PLA) nanoparticles have been used to support and to enhance the potential of antigens. Hence, this Food and Drug Administration (FDA) approved biomaterial has been shown to act as a perfect vehicle to carry antigens and to play a safe and non-toxic adjuvant function, either alone or with the loading of pattern recognition receptor (PRR) ligands to increase its potency [2–6].

One of the scientific approaches to efficiently target specific cells is to build a nanomaterial harboring cell-specific ligands on its surface. This is one of the strategies that pathogens use to infect host cells to target available receptors via their external binding ligands. Arg-Gly-Asp (RGD) containing ligands have been used by a large number of viruses [7], this tripeptide motif being the ligand of various integrins associated with membrane rafts that are sites of cellular entry for these pathogens [8]. RGD peptides are also used for the diagnosis and development of cancer therapy projects [9]. Hence, the tripeptide RGD is one of the most useful ligands to target cells presenting at their surface RGD-binding integrins such as $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha V\beta 1$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$, $\alpha V\beta 6$, $\alpha V\beta 8$, $\alpha II\beta 3$, $\alpha M\beta 2$, and $\alpha L\beta 2$, and is widely used in drug delivery therapy [10–11].

Among the known integrin-ligand interactions, the fibronectin and its interaction with $\alpha 5\beta 1$ integrin, via an RGDS sequence has been the subject of numerous studies [12–13]. The RGDS sequence is located in the C-terminal region of FNIII domain 10 (FNIII10), and its interaction with RGD-binding integrins is enhanced by the synergy site Pro-His-Ser-Arg-Asn (PHSRN), located in the FNIII-9 domain [13]. This integrin-fibronectin interaction plays important roles during development, as, for example, during cardiovascular development [14–15]. In adults, the expression of these proteins is less pronounced. The $\alpha 5\beta 1$ integrin is present in microfold (M) cells of the digestive track, in dermal dendritic cells [16], and more generally is present in a wide range of tissues as a cell receptor for cellular (extracellular matrix) fibronectin. Its overexpression has also been identified in numerous tumors, or during tissue regeneration, such as skin healing [17–18]. Because of these properties, fibronectin or recombinant fragments of this protein have already been used in the design of biomaterials [19–20].

To take advantage of the adjuvant function and carrier capacity of PLA nanoparticles, we designed these vehicles to target $\alpha 5\beta 1$ positive cells. For this, we overproduced, in bacteria, the FNIII9/10 domains of human fibronectin in its wild-type form, including the RGDS sequence, or in a mutated form with the fibronectin-ligand sequence replaced by KGES, which prevents its binding to $\alpha 5\beta 1$ integrin receptors. After coating the nanoparticle surface with these recombinant proteins, we showed that RGDS-PLA nanoparticles were more efficiently taken up by cells harboring $\alpha 5\beta 1$ integrin receptors on their cell surface than uncoated or mutated KGES-coated nanoparticles. As a first approach, a subcutaneous vaccine model was developed to take advantage of the presence of dendritic cells presenting $\alpha 5\beta 1$ integrin receptors on their surface in skin and to a less extent in subcutaneous tissues, and their potential to migrate to peripheral draining lymph nodes [21–22]. Mice were injected with different types of nanoparticles, coated with p24, an HIV antigen, and with or without RGDS- or KGES-FNIII9/10 recombinant proteins, and the antigenic potential of these formulations was estimated.

Materials and Methods

Cell lines and reagents

The human fibrosarcoma cell line HT-1080 (ATCC[®] CCL-121[™]) was maintained as recommended by the ATCC. The integrin blocking antibodies were purchased from Millipore (Molsheim, France) and included a monoclonal anti- α (MAB1956, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), an anti- $\beta 1$ (MAB1959, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and an anti- $\alpha 2$ (MAB1950, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). HIV-1 p24 protein was produced and purified by PX[®]Therapeutics (Protein[®]eXpert, Grenoble, France).

Recombinant proteins

DNA matrices used to generate, by PCR, the sequence encoding FNIII domains 9 and 10 of human fibronectin were a gift from Dr Helen J Mardon ([12]; nucleotides 4599–5162, NCBI reference sequence NM_212482.2). Oligonucleotide sequences were: 5'-TATGAATTCAGA AAACAGGTCTTGATTCCCCAAC-3' (forward), and 5'-TATCTGCAGTTCAGTTCGG TAATTAATGG-3' (reverse), where the *Eco* RI and *Pst* I restriction endonuclease sites used for cloning are in bold. PCR was carried out with the proofreading *pfu* DNA polymerase, and the *Eco* RI-*Pst* I fragments were cloned into a pT7/7 derivative that allows the production in bacteria of recombinant proteins with a 6-His tag at their C-terminus. Recombinant protein was expressed in the BL21(DE3) *Escherichia coli* strain, and soluble peptides were purified, as previously described [23], except that the final dialysis was done against 20 mM phosphate buffer pH7. Endotoxins were removed from purified proteins using an affinity column (Pierce™ high capacity endotoxin removal resin; Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France) following the manufacturer's instructions. Proteins were next dialyzed against PBS (pH 7.4), and the endotoxin level was determined using Endosafe®-PTSTM (Charles River, Ecully, France), which consists of a spectrophotometer and a FDA licensed reagent cartridge based on the limulus amebocyte lysate (LAL).

PLA nanoparticles

PLA, BODIPY® 500/510 C₄, C₉ (0.2%, ThermoFisher Scientific, Villebon sur Yvette, France) (5-Butyl-4,4-Difluoro-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene-3-Nonanoic Acid) and Coumarin 6 (0.2%; Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) PLA nanoparticle batches were provided by Adjuvatis (Lyon, France). Blank and fluorescent modified PLA nanoparticles were made by nanoprecipitation, as previously described [24–26]. PLA nanoparticle batches were characterized for their hydrodynamic diameter and their zeta potential in PBS solution using a Zetasizer NanoZS (Malvern, Orsay, France) at 25°C. Negative staining for transmission electron microscopy (TEM) analysis was done for PLA nanoparticles coated with different concentrations of RGDS-protein as previously described [27]. TEM observations were done with a Philips CM120 transmission electron microscope at the "Centre Technologique des Microstructures" (Lyon, France), and images were captured using a Gatan Orius 200 2Kx2K Camera. Particle size distribution was determined using Image J software.

PLA nanoparticles coated with recombinant proteins

For the formulation assays, equal volumes of PLA nanoparticles (1%) and recombinant proteins in PBS were mixed, and the resultant solution was kept for 2 h at room temperature with moderate overhead stirring. Protein adsorption on the surface of these negatively charged particles is a combination of hydrophobic and electrostatic interactions. To make PLA nanoparticles coated with both p24 and RGDS- or KGES-FNIII-9/10 proteins, the same experimental procedure was followed except that proteins were added sequentially. Hence, PLA nanoparticles coated with p24 were mixed with one of the fibronectin fragments, and the solution again underwent a moderate overhead stirring for 2h at room temperature. To estimate the protein adsorption yield at the surface of nanoparticles, the solution was centrifuged at 8,000 x g for 10 min at 4°C, and the concentration in the supernatant of unbound proteins was determined using the Coomassie (Bradford) protein assay kit. Briefly, 150 μ L of standard of bovine serum albumin (BSA) or working sample were mixed with 150 μ L of Coomassie reagent, and the microplate was incubated 10 min at room temperature. The absorbance was measured at 595 nm on a plate reader. The working range was comprised between 1 and 25 μ L. Thermodynamic diameter and zeta potential of all formulations were performed as indicated above.

Cell adhesion and cell inhibition assays

Cell adhesion assays were carried out as previously described [23]. Briefly, different concentrations of recombinant proteins were coated in triplicate on Maxisorp 96 well plates, and after saturation with BSA, 40,000 HT-1080 cells were added to the wells and the microplates incubated at 37°C for 45 min. Non-adherent cells were removed and the remaining were fixed using the buoyancy method [28]. After staining cells with crystal violet, and cell lysis with 2% sodium dodecyl sulfate, cell adhesion to its substratum was quantified by measuring the optical density at 560 nm in a microplate reader (Multiskan FC; Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France). For inhibition assays, function-blocking anti-integrin antibodies were added to the cell suspension before addition in protein-coated wells.

Flow cytometric analysis

For these experiment, 5×10^5 cells were grown overnight at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum. Cells were then washed twice with PBS, and Coumarin 6-PLA nanoparticles coated or not with fibronectin recombinant proteins diluted in PBS were added (20,000 nanoparticles/cell from a PLA/protein batch of 0.5% /10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). After different times of contact, cells were washed twice in PBS, removed from the plates with 0.25% trypsin/0.05% EDTA, and fixed with 3% paraformaldehyde (PFA). Flow cytometric acquisitions were performed on a LSR II cytometer (BD Biosciences, New Jersey, USA) on the platform "AniRA cytométrie" of the SFR BioSciences (UMS3444/US8). Five thousand events per sample were acquired by FACS, and data analysis was done using the Flowjo 7 software (Tree Star, Ashland). This experiment was done twice without replicates for each assay.

Fluorimetric analysis

HT-1080 cells resuspended in DMEM with 10% FBS (4×10^5 cells/mL) were distributed in 96-well plates (100 μL per well), and incubated overnight at 37°C, 5% CO₂. After washing twice with PBS, different concentrations of Coumarin 6-PLA nanoparticles coated or not with recombinant proteins and diluted in PBS, were added, and the plates incubated at 37°C 5% CO₂. Cells were then washed twice in PBS, resuspended in 100 μL PBS, and fluorescence quantification performed on a TECAN Infinite[®] M1000 pro, a multi-mode microplate reader (TECAN, Lyon, France). For integrin inhibition assays, a supplemental step was added before contact of the PLA nanoparticles with cells, and consisted of the addition of an anti- $\alpha 5$ blocking antibody (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). This experiment was done in triplicate.

Confocal microscopy analysis

HT-1080 cells ($10^5/\text{mL}$) were seeded on glass coverslips and incubated overnight at 37°C 5% CO₂. Then, BODIPY 500/510-PLA nanoparticles (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) coated with RGDS- or KGES-F-NIII9/10 recombinant proteins were added and the cells incubated 15 min at 37°C, 5% CO₂. To stain the cell membranes, CellMask™ deep Red plasma membrane Stain (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Life Technologies) was added for the last 5 min. After three washing steps with PBS, cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde for 20 min. After three further washing steps, z-stacks from cells were acquired using a LSM 710 confocal microscope ("Centre Technologique des Microstructures" (Lyon, France)), and the data collected analyzed using the Macro Particle_in cell_3D file from ImageJ software. With this program it was possible to distinguish between the intracellular and membrane regions, and to estimate endocytosed and membrane-bound nanoparticles [29]. This experiment was carried out once.

Mice vaccination assays

Twenty-eight 6-week-old female BALB/c mice were purchased from Charles River laboratories (Ecully, France). This experiment was done at the "Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris, Ecole Normale Supérieure de Lyon, France), following approval by the local ethics committee for animal experimentation (CECCAPP: Comité d'Evaluation Commun au Centre Léon Bérard, à l'Animalerie de transit de l'ENS, au PBES et au laboratoire P4; CECCAPP _ENS_2014_040), and according to institutional guidelines. Euthanasia of mice was carried out by CO₂ exposures. Mice were subcutaneously immunized by injection in the right hind upper leg on days 0, 14 and 28, and sera, vaginal lavages and fecal pellets were collected one day before each injection, and on day 42. Sera, vaginal lavages and fecal pellets were obtained and treated as previously described [30]. Seven groups of 4 mice were determined for this experimental vaccination. For three groups, the 100 μ L injections corresponded to PLA nanoparticles (0.25%) coated with RGDS- or KGES-FNIII-9/10 proteins (10 μ g/mL) or p24 (100 μ g/mL). The two vaccine prospective groups corresponded to 5 mice per group and these were injected with PLA nanoparticles (0.25%) that were co-coated with p24 (100 μ g/mL) and RGDS- or KGES-FNIII-9/10 molecules (10 μ g/mL). Finally, to evaluate the immunogenicity of the fibronectin recombinant fragments alone, the two last two groups were immunized with RGDS or KGES proteins (10 μ g/mL) and 0.6% of a vaccine Alhydrogel[®] adjuvant corresponding to an aluminium hydroxide wet gel suspension (Invivogen, Toulouse, France). Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) were performed to evaluate fibronectin and p24 specific IgA, IgM and IgG, on days 0, 13, 27, and 42 in sera, vaginal lavages and fecal preparations. Recombinant proteins p24, RGDS- or KGES-FNIII-9/10 recombinant proteins (100 μ L of 1 μ g/mL) were coated overnight at 4°C on 96-well Nunc maxisorp plates. After protein solution removal, wells were saturated for non-specific binding with 10% non-fat dried milk diluted in PBS for 1 h at 37°C. The plates were again washed three times with PBS/0.05% Tween-20. Serial dilutions in Dulbecco's PBS (DPBS)/1% BSA of sera, vaginal lavages and feces samples were added into wells (duplicate), and the plates were incubated 1 h at 37°C. After a further washing step, anti-mouse IgA, IgG or IgM coupled to horseradish peroxidase (HRP) at a 1:10,000 dilution (from Southern Biotech, Nanterre, France; Reference numbers, 1030–05, 1040–05 and 1020–05) was added and the plates were incubated 1 h at 37°C. Plates were washed three times with PBS/0.05% Tween-20, and HRP reaction were done by adding 100 μ L of tetramethylbenzidine substrate (BD biosciences, Paris, France) per well. After the addition of 1N H₂SO₄ to stop the reaction, the optical densities (OD) at 450 nm and 630 nm were measured in a microplate reader. To estimate the avidity of the immunoglobulins, we have tested antibody/antigen binding resistance to 8 M urea using a published method [31]. A prerequisite step was to have serum dilutions giving an OD at 450 nm of between 1 and 1.5. The protein p24 (100 μ L of 1 μ g/mL) was coated overnight at 4°C on 96-well Nunc maxisorp plates. After protein solution removal, wells were saturated for non-specific binding with 10% non-fat dried milk diluted in PBS for 1 h at 37°C. After three washing steps with PBS/0.05% Tween-20, serum samples diluted in DPBS/0.05% Tween-20 were added to the wells (duplicate), and the plates were incubated 1 h at 37°C. The plates were then washed three times with PBS/0.05% Tween-20 or PBS/0.05% Tween-20/urea 8 M. The last steps were performed as for the ELISA assays. According to Mann et al. [31], the avidity index corresponds to OD₄₅₀ of urea-treated samples/OD₄₅₀ of PBS/0.05% Tween-20 samples.

Statistical analyses

Each result shown is from an experiment representative of at least three independently repeated experiments. Statistical analysis of the different assays was performed using the two-

tailed paired Student's t test. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant (asterisks in figures).

Results

Wild-type recombinant protein used in this study consisted of FNIII domains 9 and 10 of the human fibronectin that are involved in RGD-dependent binding to $\alpha 5\beta 1$ integrin. The tripeptide RGD sequence is located in the FNIII-10 domain and its interaction with the $\alpha 5\beta 1$ integrin strongly reinforced by the synergy sequence PHSRN present in the FNIII-9 repeat [32–34]. C-terminal His-tagged RGDS-FNIII9/10 and the mutant KGES-FNIII9/10 recombinant proteins were overexpressed in soluble form in bacteria and purified to homogeneity on a Nickel-agarose affinity column. For their further use as bioagents, the potent pro-inflammatory endotoxins were removed until an acceptable level was reached for medical use (< 5 EU/mL; 1.9 to 2.5 EU/ml for the protein stocks used in this study) (Fig 1). To test the functional integrity of these recombinant proteins, cell adhesion and inhibition assays were performed. As shown in S1A Fig, $\alpha 5\beta 1$ -expressing HT-1080 cells [35] adhered to RGDS-FNIII9/10 but not to KGES-FNIII9/10 coated plates. The RGD-mediated interaction was significantly reduced when HT-1080 cells were preincubated with anti- $\alpha 5$ or anti- $\beta 1$ integrin blocking antibodies before the cell-adhesion assays (S1B Fig). These results are comparable to previous studies, and confirm the structural integrity of the integrin-binding domain [34, 36–37].

With the aim to develop a nanocarrier vaccine delivery system, we first carried out a dose-formulation pilot study of PLA nanoparticle-recombinant protein interactions in PBS

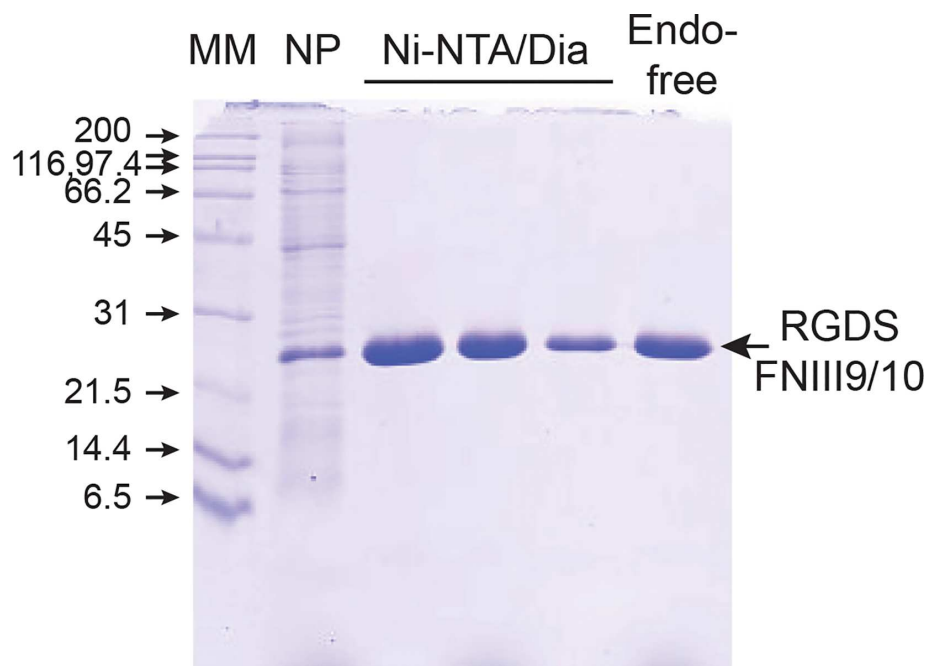


Fig 1. Purification of endotoxin-free RGDS-FNIII9/10 recombinant protein. After production in BL21(DE3) (NP, unpurified soluble protein fraction), His-tagged proteins were purified on a Ni-NTA chromatography column and dialyzed (Dia) against 20 mM phosphate buffer pH7. The last step was the removal of endotoxin (Endo) from the recombinant protein stock. Protein fractions were analyzed by SDS-PAGE (15%). Comparable data were obtained for KGES-FNIII9/10 recombinant protein (data not shown). MM, Molecular mass markers.

doi:10.1371/journal.pone.0167663.g001

Table 1. Characterization of PLA nanoparticles in PBS solution.

PLA (0.5%) $\mu\text{g/mL}$ protein	blank	RGDS-FNIII9/10			KGES-FNIII9/10		
	0	10	20	30	10	20	30
hydrodynamic diameter (nm)	193 \pm 4	207 \pm 12	238 \pm 14	340 \pm 17	206 \pm 13	223 \pm 12	241 \pm 13
Polydispersity Index	0.059 \pm 0.01	0.089 \pm 0.02	0.127 \pm 0.02	0.328 \pm 0.01	0.052 \pm 0.004	0.091 \pm 0.01	0.122 \pm 0.02
% coated protein*	-	98.6	96	87.1	100	95.3	91.4

(*) Low levels of non-adsorbed protein molecules might be underestimated due to the working range (1–25 $\mu\text{g/mL}$) of the Coomassie protein assay.

doi:10.1371/journal.pone.0167663.t001

solution. Hydrodynamic diameters and the corresponding polydispersity index (PDI), plus percentages of proteins coated in the different nanoparticle formulations are presented in Table 1. Blank PLA nanoparticles had a hydrodynamic diameter of 193 nm and a PDI of 0.059 characteristic of a monodispersed biomaterial size distribution. DLS analyses indicated a slight increase in the hydrodynamic diameter of PLA nanoparticles after 2 hours of contact with 10 $\mu\text{g/mL}$ of RGDS- (207 nm) or KGES-FNIII9/10 (206 nm) proteins while their PDI values were not affected. Increasing by two or three times the protein concentration led to an increase in the PLA nanoparticle hydrodynamic diameter. Comparable results were observed for the PDI, with the polydispersity increasing with the protein concentrations. Protein adsorption at the surface of the PLA nanoparticles was efficient, almost 100% for most of the experiments (Table 1). It should be noted that for protein concentrations higher than 20 $\mu\text{g/mL}$, a large heterogeneity in the results was obtained (hydrodynamic diameter, PDI), regardless of the recombinant peptide used. To better appreciate the status (form, monodispersity, agglomeration and aggregation) of the decorated PLA nanoparticles, TEM analysis was performed using the RGDS-FNIII9/10 nanomaterial (Fig 2). At the lowest RGDS-FNIII9/10 protein concentration (10 $\mu\text{g/mL}$), the nanoparticles were spherical in shape and presented a unimodal size distribution with an average diameter of 200 nm \pm 45 nm. At twice the concentration (20 $\mu\text{g/mL}$), the PLA nanoparticles appeared agglomerated and at the highest concentration, large particle aggregates were observed.

To analyze the influence of the recombinant proteins on nanoparticle cell-uptake, we chose the concentration (10 $\mu\text{g/mL}$) of proteins for which no aggregates were observed by TEM

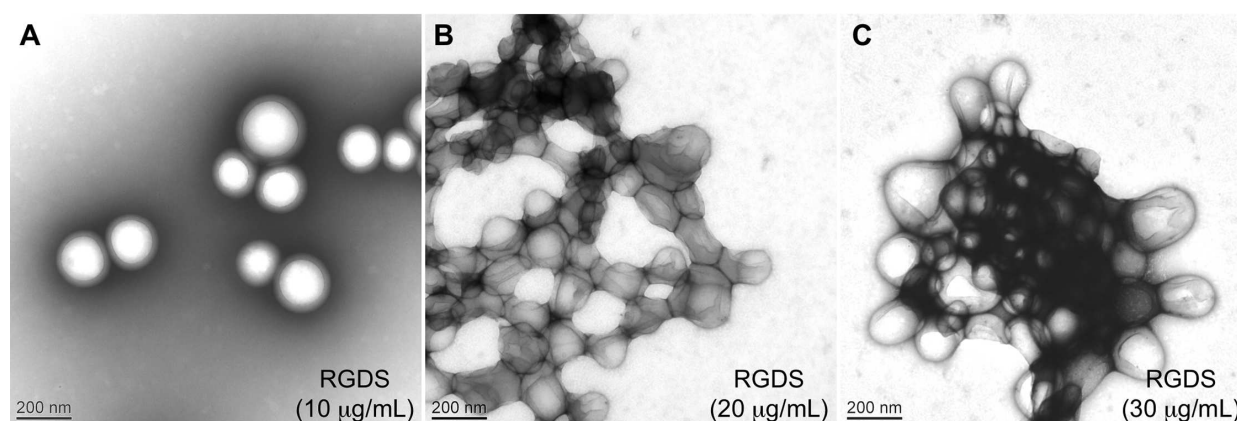


Fig 2. Transmission electron microscopy images of PLA-nanoparticles coated with RGDS-FNIII-9/10. Images were made after 2 h of incubation at room temperature in a PBS solution of PLA nanoparticles (0.5%) with 10 $\mu\text{g/mL}$ (A), 20 $\mu\text{g/mL}$ (B) and 30 $\mu\text{g/mL}$ (C) of RGDS-FNIII-9/10 recombinant protein.

doi:10.1371/journal.pone.0167663.g002

analysis. The PBS culture condition was chosen to avoid any interference with fibronectin fragments present in fetal bovine serum. For the following experiments, uncoated or RGDS- or KGES-FNIII9/10 coated PLA nanoparticle batches containing vital-dye (Coumarin 6) were used. As a first step, over two hours we evaluated the interaction and kinetics of internalization of the different sets of Coumarin 6-PLA nanoparticles on HT-1080 cells. Flow cytometric data shown in Fig 3 indicate that all cells were stained 6 min after the deposition of the PLA

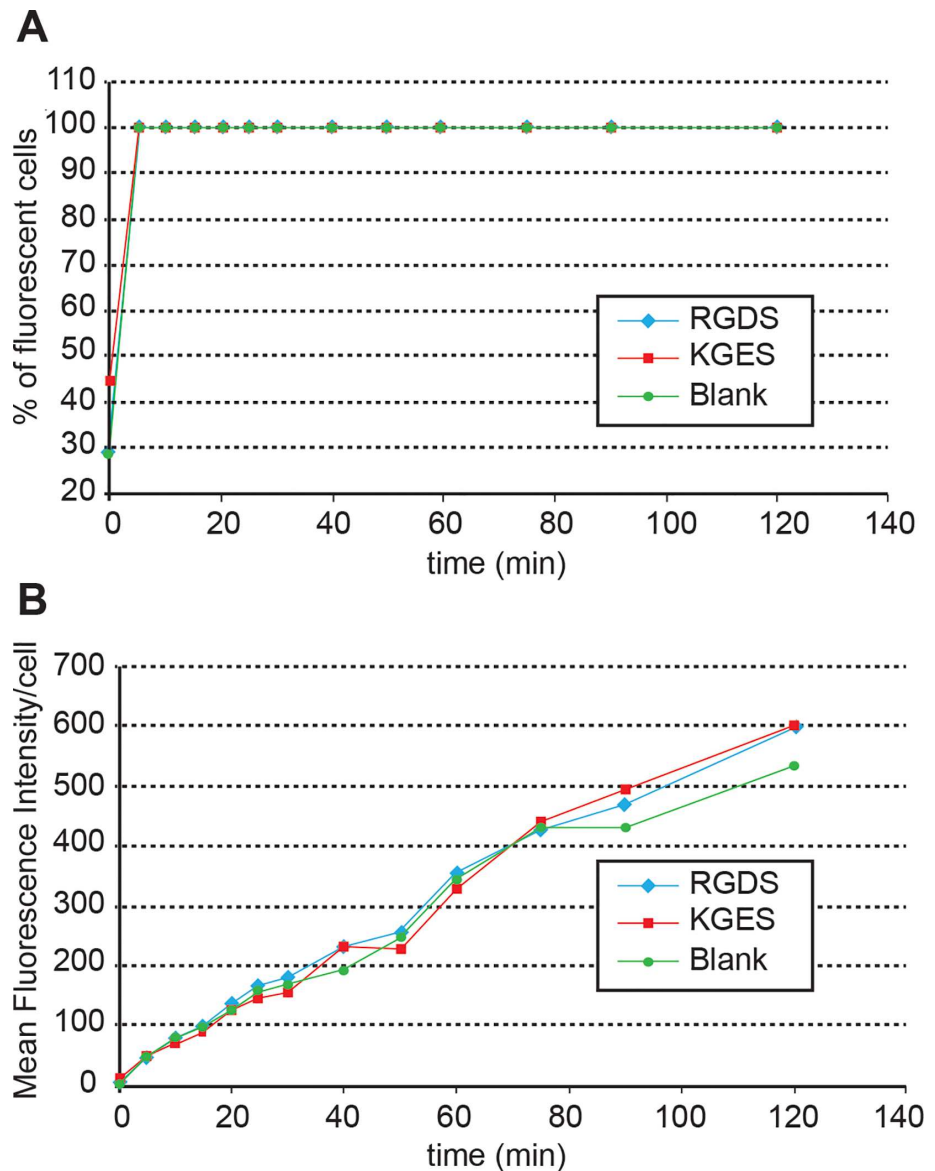


Fig 3. Time-scale analysis of the cellular uptake of PLA nanoparticles coated or not, with recombinant proteins. After different times of contact between Coumarin 6-PLA nanoparticle/protein batches (0.5%/ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and HT-1080 cells (20,000 nanoparticles/cell), the percentage of fluorescent cells (A) and the mean fluorescence intensity/cell (B) were monitored by flow cytometry.

doi:10.1371/journal.pone.0167663.g003

nanoparticles in the cell culture (Fig 3A), and that the amount of fluorescence/cell increased progressively during this period throughout the different assays (Fig 3B). In a second step and to avoid the trypsinization used for flow cytometric analysis, cell staining intensity was determined using a TECAN multi-well reader. In this experiment, different concentrations of PLA-nanoparticles batches were added to culture assays, and the cells were incubated for 90 min. As shown in Fig 4A, RGDS-FNIII9/10 coated PLA-nanoparticles bound more or were more endocytosed by HT-1080 than KGES-FNIII9/10 particles (twice) and blank nanocarriers (8 times), but the difference was only highly significant ($P < 0.005$) at the highest concentration (1 million PLA nanoparticles/cell). A time course study carried out at this concentration confirmed a significant difference in the integrin-binding coated PLA nanoparticles versus the others assays, after 60 min (Fig 4B). The specificity of the RGDS-FNIII9/10 coated PLA-nanoparticles for integrin $\alpha 5\beta 1$ was tested using anti- $\alpha 5\beta 1$ or anti $\alpha 203B21$ blocking antibodies (S2 Fig). A significant ($P < 0.005$) decrease in fluorescence intensity (4 times) for HT-1080 cells was obtained using anti- $\alpha 5$ antibody versus vehicle sample, while the uptake of RGDS-FNIII9/10 coated PLA-nanoparticles was even greater in the presence of anti- $\alpha 2$ blocking antibody. To analyze more precisely whether the difference in cell staining intensity observed between RGDS and KGES nanoparticle experiments was due to an increase in binding to the plasma membrane or to a more efficient endocytosis of the nanocarriers, a confocal microscopy analysis was carried out on HT-1080 cells after 15 min of contact with BODIPY-PLA nanoparticles. A series of z-stack confocal microscopy images of cells (from the ventral or attached side to the dorsal side) in contact with RGDS- or KGES-FNIII-9/10 PLA nanoparticles is shown in Fig 5A, and the estimated number of nanoparticles either at the surface or inside the cells is presented in Fig 5B. A significant increase in cellular endocytosis was observed with $\alpha 5\beta 1$ -binding RGDS- versus KGES-coated PLA nanoparticles.

In order to test the potential and the interest of RGDS nanoparticles *in vivo*, we carried out a vaccination approach in a mouse model, by using p24, an HIV capsid protein as antigen, and its co-coating with RGDS- or KGES-FNIII-9/10 to PLA nanoparticles. The characteristics of the different sets of PLA nanoparticles (hydrodynamic diameter, PDI, zeta potential, percentage of protein coating) are shown in S1 Table. The hydrodynamic diameter of PLA nanoparticles coated with p24 was slightly larger (223 nm instead of 210 nm for the blank particles). A still acceptable PDI (< 0.1), and an increase in the hydrodynamic diameter were observed after the addition of RGDS (237 nm) or KGES (238 nm) recombinant proteins. The immunogenic potential of the different formulations were determined after subcutaneous injections in BALB/c female mice, and anti-p24 and anti-FNIII-9/10 antibodies (IgA, IgG and IgM) were titrated from sera, vaginal lavage fluids and feces on days 0, 13, 27, and 41. As shown in Fig 6, there was no significant difference in the anti-p24 IgG serum titer in mice injected with PLA nanoparticles coated with p24, alone or in the presence of RGDS- or KGES-FNIII-9/10, although the integrin-binding recombinant protein was significantly more efficient (IgG titer) than its mutated counterpart. No immunostimulatory switch towards mucosal immunity was determined for seric IgA, or for vaginal and fecal IgG or IgA. Titers of anti-human fibronectin in PLA-injected mice were not negligible (S3 Fig), but they were 10-fold lower than those obtained for p24.

Discussion

In this study, we developed a biomaterial vehicle to target more efficiently cells presenting the $\alpha 5\beta 1$ integrin at their surface. Hence, in cell culture assays, the presence of the RGDS sequence on the surface of PLA-nanoparticles mediated a stronger uptake of these nanocarriers as judged by fluorimetric and confocal microscopy analyses. We observed no apparent advantage

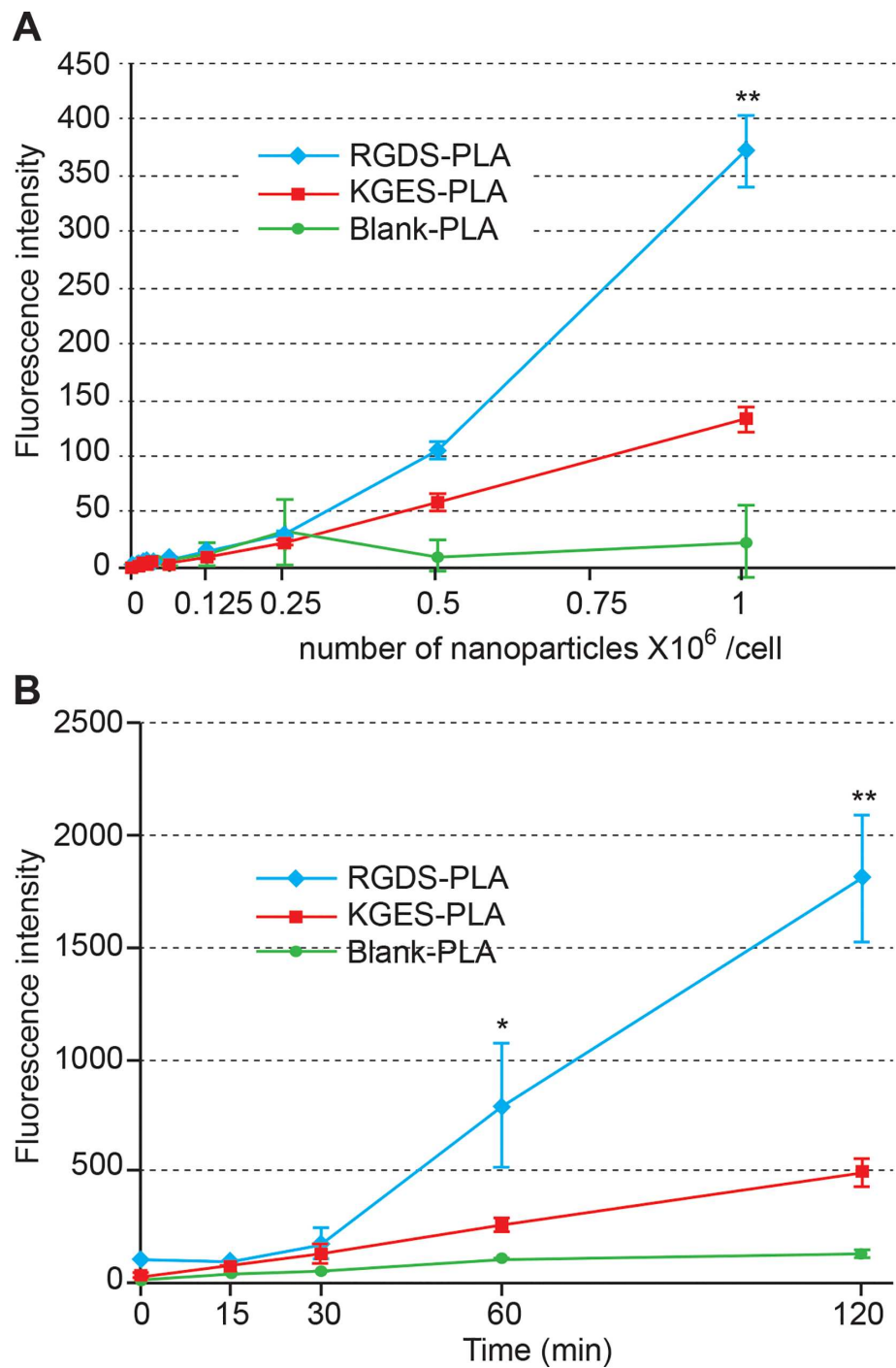


Fig 4. Fluorimetric analysis of the cellular uptake of PLA-nanoparticles. (A) Dose-dependent cellular uptake of PLA nanoparticles after 90 min of incubation at 37°C. (B) Time-scale of cellular uptake of PLA nanoparticles (10^6)

nanoparticles/cell). Fluorescence intensity was measured on a multi-mode microplate TECAN Infinite[®] M1000 pro reader. Bars represent the S.D. of triplicate assays. Significant (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$) difference versus vehicle assay.

doi:10.1371/journal.pone.0167663.g004

to using wild-type or mutated fibronectin recombinant proteins to improve the humoral response potential of an antigen coating on the surface of these PLA nanoparticles after subcutaneous injections in mice. However, the presence of fibronectin proteins on the surface of p24-PLA nanoparticles increased the quality of the humoral immune response, as judged by the avidity index analysis.

Adhesion and anti-integrin inhibition assays confirmed that the recombinant proteins expressed in *E. coli* maintained their structural properties, allowing their binding to $\alpha 5\beta 1$ integrin. However, nanoparticle aggregation was observed at the highest recombinant protein concentrations used, and might correspond to the interaction between FNIII molecules and two or less PLA particles, probably due to lateral domain interaction between two FNIII9/10 molecules. It should be noted that the interaction of FNIII1/2 with the N-terminal domain of fibronectin has been suggested to be an important factor in fibronectin fibrillogenesis [38]. Interaction between fibronectin FNIII2/3 and FNIII12-14 domains has also been demonstrated [39].

Several experiments were done to test the potential of wild type or mutated fibronectin fragments to favor $\alpha 5\beta 1$ integrin cellular-uptake after association with PLA nanoparticles. Based on other studies [40–42], a first approach to analyze the cellular uptake of the different sets of nanoparticles was to use flow cytometry to monitor the fluorescence intensity of cells. Cellular-uptake of nanoparticles was a fast process in our experimental procedure (Fig 3A). However, the presence of RGDS-FNIII9/10 on the surface of the nanoparticles did not seem to increase the efficiency of their uptake by $\alpha 5\beta 1$ HT-1080 cells (Fig 3B), in comparison to vehicle or KGES-FNIII9/10 assays. Apart from a structural modification of the RGDS protein on the surface of these nanoparticles, several factors might interfere with the flow cytometry experiment. It has been shown that, in cell culture assays, the percentage of nanoparticles in contact with cells is less than 0.33% [43]. Moreover, the trypsin treatment of cells before their flow cytometric analysis might have perturbed the plasma membrane and influenced their cellular uptake. Another limitation of this method is that we cannot differentiate nanoparticles that are within the cells to those present on their surface.

We therefore used a fluorimetric method that did not require a trypsin step, and used a broad concentration of PLA nanoparticles to better analyze the impact of the surface-coated RGDS-FNIII9/10 recombinant protein on the efficiency of cellular uptake. The data confirm that, for concentrations higher than 500,000 nanoparticles/cell, the presence of the RGDS sequence favors the cellular uptake of nanoparticles. However, the exact location of the nanoparticles (across the plasma membrane or inside the cell) could not be resolved, although the presence of anti $\alpha 5$ antibodies drastically inhibited cellular uptake (S2 Fig) and suggests that this fibronectin fragment maintains its functionality at the surface of the nanoparticles. The use of confocal microscopy permitted us to confirm that nanoparticles decorated with RGDS protein are more efficiently taken up by HT-1080 cells than uncoated or KGES PLA nanoparticles.

Our attempt to administer RGDS nanomaterial as a subcutaneous vaccine adjuvant and delivery vehicle did not improve the production of anti-p24 antigen antibodies, but as this was a pilot experiment, we did not investigate the cellular immune response, and we could not exclude the possibility that this response had been improved, as cross-presentation could have been enhanced, through a better uptake of FNIII-PLA nanoparticles by antigen-presenting

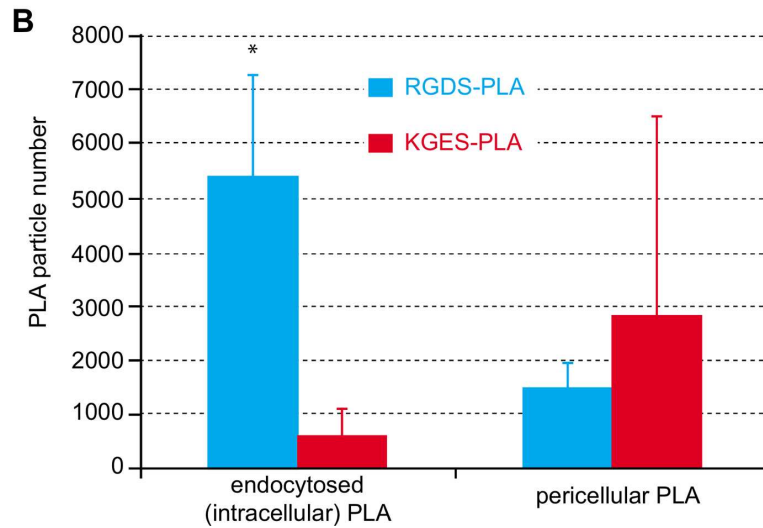
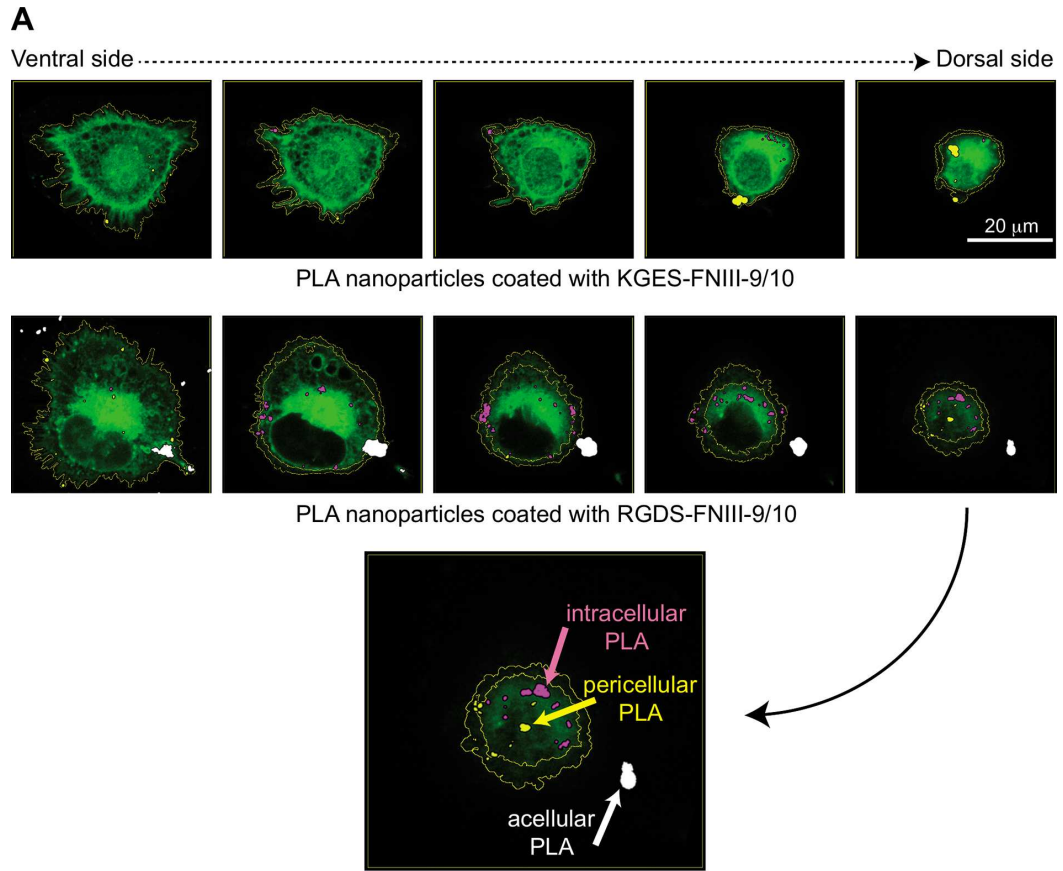


Fig 5. Confocal microscopy analysis of cellular uptake of PLA-nanoparticles. (A) Z-stack images of cells incubated with BODIPY PLA nanoparticles coated with KGES- or RGDS-FNIII-9/10 recombinant proteins. Intracellular, pericellular and acellular PLA-nanoparticles are stained in pink, yellow and white, respectively. The green staining represents the CellTracker™ Red CMTPX. (B) Distribution of intracellular and pericellular PLA nanoparticles determined from Z-stack analysis. Significant (*, $P < 0.05$) difference versus KGES assay.

doi:10.1371/journal.pone.0167663.g005

cells. The quality of the humoral immune response presented in Fig 7 suggested that the presence of such fibronectin FNIII domains favored the migration of PLA nanoparticles to the lymph nodes, therefore enhancing the quality of antibodies, in terms of avidity. Additional experiments are ongoing to explore such a hypothesis. An additional point, which deserves attention, concerns the induction of anti-FNIII antibodies (S3 Fig). This could provoke the induction of auto-antibodies that would be detrimental to the use of these integrin targeting approaches for prophylactic vaccines. However, the induction of such antibodies could be due to the 15% divergence between mouse and human sequences.

After 41 days of vaccination, the serum avidity index of mice treated with RGDS/p24 nanoparticles seemed to be higher, but not statistically significant, than that corresponding to KGES/p24 samples. We can hypothesize that this apparent loss of function of the RGDS sequence *in vivo*, may be related to different aspects of the experimental procedures, through

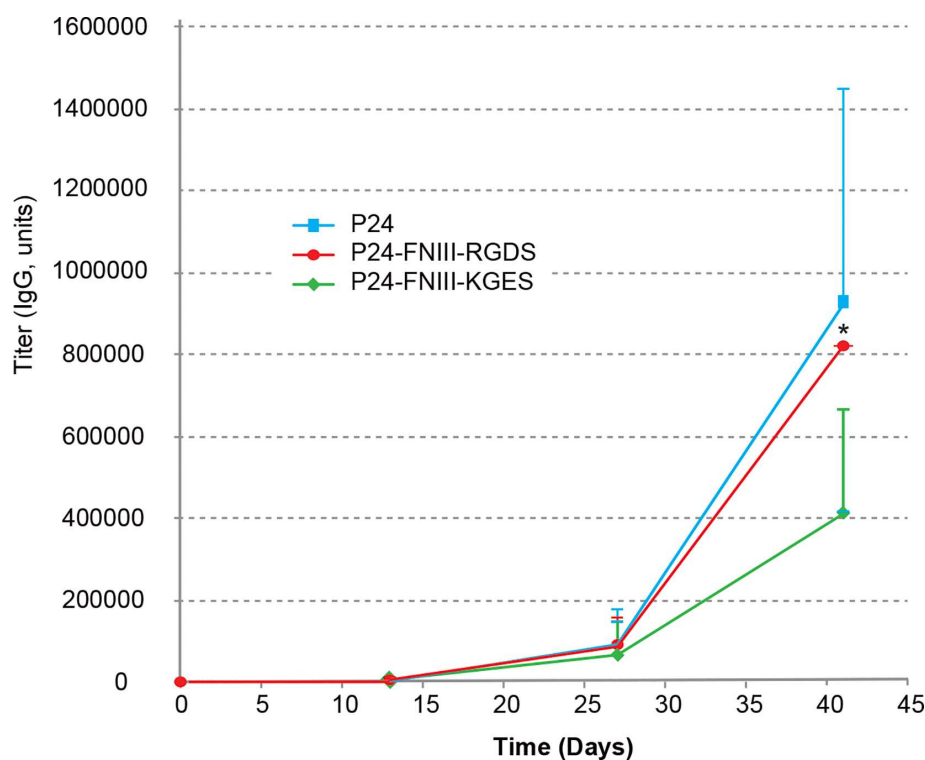


Fig 6. p24 specific IgG responses in mouse sera after injection of PLA nanoparticles coated with p24 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or co-coated with p24 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and RGDS or KGES recombinant proteins (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Data represent the p24 specific IgG titer at D0, D13, D27 and D42. The IgG values represent the average of 4 (p24) or 5 (p24 + RGDS or KGES) mouse assays. Error bars are means + SD. Significant (*, $P < 0.05$) difference versus KGES assay.

doi:10.1371/journal.pone.0167663.g006

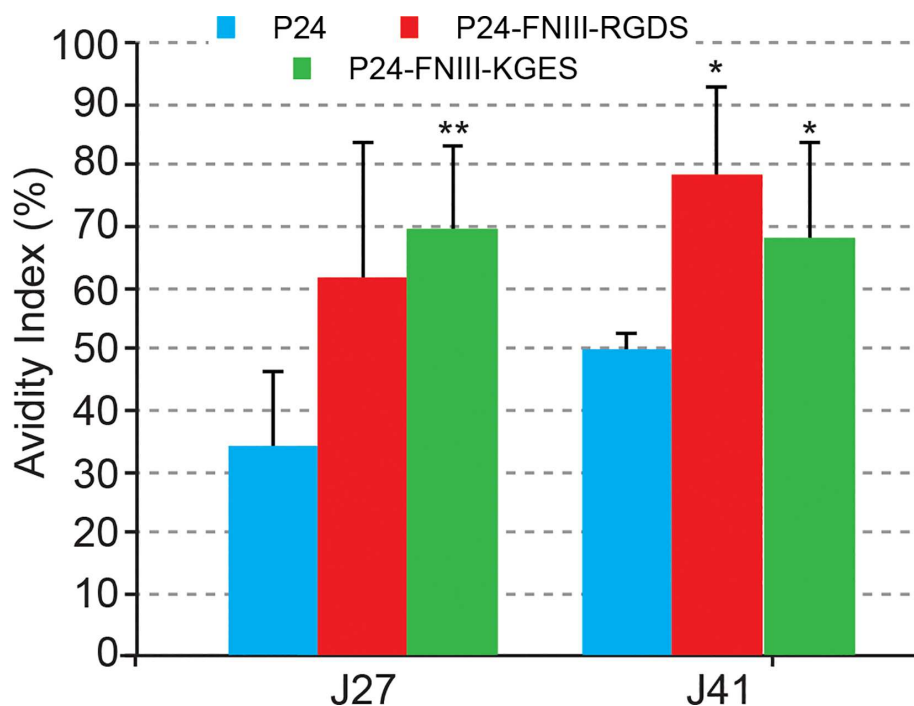


Fig 7. Anti-p24 antibody avidity index. Serum samples of mice after 27 and 41 days of immunization with p24, RGDS/p24 or KGES/p24 PLA nanoparticles were used to estimate the avidity index as a percentage. The average index corresponded to the OD_{450} of urea-treated samples divided by OD_{450} of PBS/0.05% Tween-20 samples. Significant (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$) difference versus p24 assay.

doi:10.1371/journal.pone.0167663.g007

the choice of immunization route or the number of mice used in this study. Indeed, a dermal injection procedure instead of the subcutaneous approach used in this study may favor the targeting of dendritic cells as they will be denser when reached through such a route, and favor a better cellular immune response [44–45]. In line with this observation, we also propose to test other delivery procedures, such as mucosal administration. Lastly, we cannot exclude, at the biochemical level, that the co-coating of fibronectin fragments with p24 antigen could also interfere with the binding of the RGDS sequence with related integrins, perhaps by sterically preventing the RGDS-integrin interaction. It should be noted that we used 10 times less of fibronectin recombinant protein than the p24 antigen (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ versus 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). New vaccine approaches with different fibronectin/p24 protein ratios could potentially improve the use of the RGDS sequence. More experiments need to be performed to develop such new innovative targeted vaccines, but cell culture experiments and mouse immunization results clearly suggest their future potential.

Conclusion

In this study, we have developed PLA nanoparticles capable of targeting cells presenting $\alpha 5\beta 1$ integrins at their surface, by adsorbing RGDS-FNIII repeats from fibronectin on their surface. Hence, the presence of the RGDS sequence facilitates nanoparticle uptake by $\alpha 5\beta 1$ -positive cells, as demonstrated by confocal microscopy analysis. Subcutaneous injections of mice with PLA nanoparticles co-coated with an antigen (p24 HIV capsid protein, here) and RGDS-

recombinant proteins did not elevate the anti-24 IgG titer in the serum in comparison to a vaccine made of p24-PLA nanoparticles, but the avidity index of the antibodies was significantly increased.

Supporting Information

S1 Fig. HT-1080 cell adhesion to RGDS- and KGES-FNIII-9/10 recombinant proteins. (A) Dose-dependent adhesion of HT-1080 cells to recombinant proteins. Wells from microplates were coated with increasing concentrations of RGDS- or KGES-FNIII-9/10 recombinant proteins, and cell adhesion was monitored after 45 min of contact with "adhesive" surface at 37°C and crystal violet staining. (B) Inhibition of HT-1080 cell adhesion to RGDS-FNIII-9/10 recombinant protein in the presence of anti-integrin antibodies. HT-1080 cells were incubated with or without antibodies before plating in wells coated with RGDS-FNIII-9/10 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Bars represent S.D. of triplicate assays. Significant (**, $P < 0.005$) difference versus control assay without anti-integrin antibodies is indicated. (EPS)

S2 Fig. Inhibition assays of PLA nanoparticles endocytosis. The experimental procedure was performed as in Fig 4, except that anti-integrin $\alpha 2$ or $\alpha 5$ was added to the cells before the addition of PLA nanoparticles coated with RGDS-FNIII-9/10. Fluorescence intensity was measured on a multi-mode microplate TECAN Infinite[®] M1000 pro reader. Bars represent the S. D. of triplicate assays. Significant (**, $P < 0.005$) difference versus control assay. (EPS)

S3 Fig. KGES-FNIII9/10 specific IgG responses in mouse sera after injection of PLA nanoparticles coated with RGDS or KGES recombinant proteins (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Data represent the KGES-FNIII9/10 specific IgG titer on D0, D13, D27 and D42. The IgG values represent the average of 4 mouse assays. Error bars are means + SD. (EPS)

S1 Table. Characteristics of PLA nanoparticle batches used for subcutaneous injections (a new set of nanoparticle solutions was prepared before each injection). (DOCX)

Acknowledgments

We dedicate this article to the memory of our dear friend Christophe Terzian, who died June 18, 2016, and for his fruitful discussions and useful advices during this study.

Author Contributions

Conceptualization: BD CLeb GJ JYE BV CLet.

Formal analysis: JYE BV CLet.

Funding acquisition: JYE BV.

Investigation: BD CLeb GJ AG CT.

Validation: JYE BV CLet.

Writing – original draft: JYE BV CLet.

Writing – review & editing: JYE BV CLet.

References

1. Bobbala S, Hook S. Is There an Optimal Formulation and Delivery Strategy for Subunit Vaccines? *Pharm Res.* 2016; 33: 2078–2097. doi: [10.1007/s11095-016-1979-0](https://doi.org/10.1007/s11095-016-1979-0) PMID: [27380191](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27380191/)
2. Guillon C, Mayol K, Terrat C, Compagnon C, Primard C, Charles MH, et al. Formulation of HIV-1 Tat and p24 antigens by PLA nanoparticles or MF59 impacts the breadth, but not the magnitude, of serum and faecal antibody responses in rabbits. *Vaccine.* 2007; 25: 7491–7501. doi: [10.1016/j.vaccine.2007.08.060](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.08.060) PMID: [17904700](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17904700/)
3. Pavot V, Rochereau N, Primard C, Genin C, Perouzel E, Lioux T, et al. Encapsulation of Nod1 and Nod2 receptor ligands into poly(lactic acid) nanoparticles potentiates their immune properties. *J Control Release.* 2013; 167: 60–67. doi: [10.1016/j.jconrel.2013.01.015](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.01.015) PMID: [23352911](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23352911/)
4. Saini V, Jain V, Sudheesh MS, Dixit S, Gaur RL, Sahoo MK, et al. Humoral and cell-mediated immune-responses after administration of a single-shot recombinant hepatitis B surface antigen vaccine formulated with cationic poly(l-lactide) microspheres. *J Drug Target.* 2010; 18: 212–222. doi: [10.3109/10611860903386920](https://doi.org/10.3109/10611860903386920) PMID: [19883203](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19883203/)
5. Thomas C, Rawat A, Hope-Weeks L, Ahsan F. Aerosolized PLA and PLGA nanoparticles enhance humoral, mucosal and cytokine responses to hepatitis B vaccine. *Mol Pharm.* 2011; 8: 405–415. doi: [10.1021/mp100255c](https://doi.org/10.1021/mp100255c) PMID: [21189035](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21189035/)
6. Pavot V, Berthet M, Rességuier J, Legaz S, Handké N, Gilbert SC, et al. Poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) particles as versatile carrier platforms for vaccine delivery. *Nanomedicine (Lond).* 2014; 9: 2703–2718.
7. Hussein HA, Walker LR, Abdel-Raouf UM, Desouky SA, Montasser AK, Akula SM. Beyond RGD: virus interactions with integrins. *Arch Virol.* 2015; 160: 2669–2681. doi: [10.1007/s00705-015-2579-8](https://doi.org/10.1007/s00705-015-2579-8) PMID: [26321473](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26321473/)
8. Shi F, Sottile J. Caveolin-1-dependent $\beta 1$ integrin endocytosis is a critical regulator of fibronectin turnover. *J Cell Sci.* 2008; 121: 2360–2371. doi: [10.1242/jcs.014977](https://doi.org/10.1242/jcs.014977) PMID: [18577581](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18577581/)
9. Danhier F, Le Breton A, Pr at V. RGD-based strategies to target $\alpha(v)\beta(3)$ integrin in cancer therapy and diagnosis. *Mol Pharm.* 2012; 9: 2961–2973. doi: [10.1021/mp3002733](https://doi.org/10.1021/mp3002733) PMID: [22967287](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22967287/)
10. Wang F, Li Y, Shen Y, Wang A, Wang S, Xie T. The functions and applications of RGD in tumor therapy and tissue engineering. *Int J Mol Sci.* 2013; 14: 13447–13462. doi: [10.3390/ijms140713447](https://doi.org/10.3390/ijms140713447) PMID: [23807504](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23807504/)
11. Pike DB, Ghandehari H. HPMA copolymer-cyclic RGD conjugates for tumor targeting. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010; 62: 167–183. doi: [10.1016/j.addr.2009.11.027](https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.027) PMID: [19951733](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19951733/)
12. Mardon HJ, Grant KE. The role of the ninth and tenth type III domains of human fibronectin in cell adhesion. *FEBS Lett.* 1994; 340: 197–201. PMID: [8131845](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8131845/)
13. Feng Y, Mrksich M. The synergy peptide PHSRN and the adhesion peptide RGD mediate cell adhesion through a common mechanism. *Biochemistry.* 2004; 43: 15811–15821. doi: [10.1021/bi049174+](https://doi.org/10.1021/bi049174+) PMID: [15595836](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15595836/)
14. George EL, Georges-Labouesse EN, Patel-King RS, Rayburn H, Hynes RO. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development.* 1993; 119: 1079–1091. PMID: [8306876](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8306876/)
15. Mittal A, Pulina M, Hou SY, Astrof S. Fibronectin and integrin $\alpha 5$ play requisite roles in cardiac morphogenesis. *Dev Biol.* 2013; 381: 73–82. doi: [10.1016/j.ydbio.2013.06.010](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.06.010) PMID: [23791818](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23791818/)
16. Jancic C, Chuluyan HE, Morelli A, Larregina A, Kolkowski E, Saracco M, et al. Interactions of dendritic cells with fibronectin and endothelial cells. *Immunology.* 1998; 95: 283–290. PMID: [9824488](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9824488/)
17. Li B, Pozzi A, Young PP. TNF α accelerates monocyte to endothelial transdifferentiation in tumors by the induction of integrin $\alpha 5$ expression and adhesion to fibronectin. *Mol Cancer Res.* 2011; 9: 702–711. doi: [10.1158/1541-7786.MCR-10-0484](https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0484) PMID: [21536688](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21536688/)
18. Kenny FN, Connelly JT. Integrin-mediated adhesion and mechano-sensing in cutaneous wound healing. *Cell Tissue Res.* 2015; 360: 571–582. doi: [10.1007/s00441-014-2064-9](https://doi.org/10.1007/s00441-014-2064-9) PMID: [25487407](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25487407/)
19. Pereira M, Sharma RI, Penkala R, Gentzel TA, Schwarzbauer JE, Moghe PV. Engineered cell-adhesive nanoparticles nucleate extracellular matrix assembly. *Tissue Eng.* 2007; 13: 567–578. doi: [10.1089/ten.2006.0228](https://doi.org/10.1089/ten.2006.0228) PMID: [17518603](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17518603/)
20. Garg A, Tisdale AW, Haidari E, Kokkoli E. Targeting colon cancer cells using PEGylated liposomes modified with a fibronectin-mimetic peptide. *Int J Pharm.* 2009; 366: 201–210. doi: [10.1016/j.ijpharm.2008.09.016](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.09.016) PMID: [18835580](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18835580/)
21. Swetman Andersen CA, Handley M, Pollara G, Ridley AJ, Katz DR, Chain BM. $\beta 1$ -Integrins determine the dendritic morphology which enhances DC-SIGN-mediated particle capture by dendritic cells. *Int Immunol.* 2006; 18: 1295–1303. doi: [10.1093/intimm/dx1062](https://doi.org/10.1093/intimm/dx1062) PMID: [16807379](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16807379/)

22. Waithman J, Gebhardt T, Bedoui S. Skin tumor immunity: Site does matter for antigen presentation by DCs. *Eur J Immunol*. 2016; 46: 543–546. doi: [10.1002/eji.201646293](https://doi.org/10.1002/eji.201646293) PMID: [26842676](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26842676/)
23. Eleftheriou F, Exposito JY, Garrone R, Lethias C. Cell adhesion to tenascin-X mapping of cell adhesion sites and identification of integrin receptors. *Eur J Biochem*. 1999; 263: 840–848. PMID: [10469149](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10469149/)
24. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm*. 1989; 55: R1–R4.
25. Primard C, Rochereau N, Luciani E, Genin C, Delair T, Paul S, et al. Traffic of poly(lactic acid) nanoparticulate vaccine vehicle from intestinal mucus to sub-epithelial immune competent cells. *Biomaterials*. 2010; 31: 6060–6068. doi: [10.1016/j.biomaterials.2010.04.021](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.04.021) PMID: [20471085](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20471085/)
26. Legaz S, Exposito JY, Borel A, Candusso MP, Megy S, Montserret R, et al. A purified truncated form of yeast Gal4 expressed in *Escherichia coli* and used to functionalize poly(lactic acid) nanoparticle surface is transcriptionally active *in cellulose*. *Protein Expr Purif*. 2015; 113: 94–101. doi: [10.1016/j.pep.2015.05.009](https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.05.009) PMID: [26002116](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26002116/)
27. Legaz S, Exposito JY, Lethias C, Viginier B, Terzian C, Verrier B. Evaluation of polylactic acid nanoparticles safety using *Drosophila* model. *Nanotoxicology*. 2016; 16: 1–8.
28. Goodwin AE, Pauli BU. A new adhesion assay using buoyancy to remove non-adherent cells. *J Immunol Methods*. 1995; 187: 213–219. PMID: [7499880](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7499880/)
29. Torrano AA, Blechinger J, Osseforth C, Argyo C, Reller A, Bein T, et al. A fast analysis method to quantify nanoparticle uptake on a single cell level. *Nanomedicine (Lond)*. 2013; 8: 1815–1828.
30. Pavot V, Rochereau N, Rességuier J, Gutjahr A, Genin C, Tiraby G, et al. Cutting edge: New chimeric NOD2/TLR2 adjuvant drastically increases vaccine immunogenicity. *J Immunol*. 2014; 193: 5781–5785. doi: [10.4049/jimmunol.1402184](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402184) PMID: [25392526](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25392526/)
31. Mann JF, McKay PF, Fiserova A, Klein K, Cope A, Rogers P, et al. Enhanced immunogenicity of an HIV-1 DNA vaccine delivered with electroporation via combined intramuscular and intradermal routes. *J Virol*. 2014; 88: 6959–6969. doi: [10.1128/JVI.00183-14](https://doi.org/10.1128/JVI.00183-14) PMID: [24719412](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24719412/)
32. Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*. 1984; 309: 30–33. PMID: [6325925](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6325925/)
33. Obara M, Kang MS, Yamada KM. Site-directed mutagenesis of the cell-binding domain of human fibronectin: separable, synergistic sites mediate adhesive function. *Cell*. 1988; 53: 649–657. PMID: [3286012](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3286012/)
34. Redick SD, Settles DL, Briscoe G, Erickson HP. Defining fibronectin's cell adhesion synergy site by site-directed mutagenesis. *J Cell Biol*. 2000; 149: 521–527. PMID: [10769040](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10769040/)
35. Grenz H, Carbonetto S, Goodman SL. $\alpha 3 \beta 1$ integrin is moved into focal contacts in kidney mesangial cells. *J Cell Sci*. 1993; 105: 739–751. PMID: [8408301](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8408301/)
36. Aota S, Nomizu M, Yamada KM. The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function. *J Biol Chem*. 1994; 269: 24756–24761. PMID: [7929152](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7929152/)
37. Burrows L, Clark K, Mould AP, Humphries MJ. Fine mapping of inhibitory anti- $\alpha 5$ monoclonal antibody epitopes that differentially affect integrin-ligand binding. *Biochem J*. 1999; 344 Pt 2: 527–533.
38. Vakonakis I, Staunton D, Rooney LM, Campbell ID. Interdomain association in fibronectin: insight into cryptic sites and fibrillogenesis. *EMBO J*. 2007; 26: 2575–2583. doi: [10.1038/sj.emboj.7601694](https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601694) PMID: [17464288](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17464288/)
39. Johnson KJ, Sage H, Briscoe G, Erickson HP. The compact conformation of fibronectin is determined by intramolecular ionic interactions. *J Biol Chem*. 1999; 274: 15473–15479. PMID: [10336438](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10336438/)
40. Kankaanpää P, Tiitta S, Bergman L, Puranen AB, von Haartman E, Lindén M, et al. Cellular recognition and macropinocytosis-like internalization of nanoparticles targeted to integrin $\alpha 2 \beta 1$. *Nanoscale*. 2015; 7: 17889–17901. doi: [10.1039/c5nr06218g](https://doi.org/10.1039/c5nr06218g) PMID: [26462719](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26462719/)
41. Stolzoff M, Ekladius I, Colby AH, Colson YL, Porter TM, Grinstaff MW. Synthesis and Characterization of Hybrid Polymer/Lipid Expansile Nanoparticles: Imparting Surface Functionality for Targeting and Stability. *Biomacromolecules*. 2015; 16: 1958–1966. doi: [10.1021/acs.biomac.5b00336](https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00336) PMID: [26053219](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26053219/)
42. Kim H, Choi JH, Kang SR, Oh BK, Lee W, Kwon OS, et al. Size-Dependent Cellular Uptake of Trans-Activator of Transcription Functionalized Nanoparticles. *J Biomed Nanotechnol*. 2016; 12: 536–545. PMID: [27280251](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27280251/)
43. Ahmad Khanbeigi R, Kumar A, Sadouki F, Lorenz C, Forbes B, Dailey LA, et al. The delivered dose: Applying pharmacokinetics to in vitro investigations of nanoparticle internalization by macrophages. *J Control Release*. 2012; 162: 259–266. doi: [10.1016/j.jconrel.2012.07.019](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.07.019) PMID: [22824784](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22824784/)
44. Liard C, Munier S, Arias M, Joulin-Giet A, Bonduelle O, Duffy D, et al. Targeting of HIV-p24 particle-based vaccine into differential skin layers induces distinct arms of the immune responses. *Vaccine*. 2011; 29: 6379–6391. doi: [10.1016/j.vaccine.2011.04.080](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.04.080) PMID: [21554912](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21554912/)

45. Liard C, Munier S, Joulin-Giet A, Bonduelle O, Hadam S, Duffy D, et al. Intradermal immunization triggers epidermal Langerhans cell mobilization required for CD8 T-cell immune responses. *J Invest Dermatol.* 2012; 132: 615–625. doi: [10.1038/jid.2011.346](https://doi.org/10.1038/jid.2011.346) PMID: [22170490](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22170490/)

2. Communications affichées

- Présentation poster lors du forum Ecotox 2016 organisé par la Fondation Rovaltain (Alixan)

Dalzon B., Aude-Garcia C., Rabilloud T.

Etude de la réponse des macrophages aux nanoparticules de silice

Distinction : Prix du meilleur poster scientifique

- Présentation d'un poster lors du congrès international Nanosafe 2016 (Grenoble)

Dalzon B., Aude-Garcia C., Rabilloud T.

Investigation of iron oxide nanoparticles effects on macrophages in the frame of a metal-activated radiotherapy scheme

- Présentation d'un poster lors de la journée de l'Ecole Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant (EDCSV) 2017 (Grenoble).

Dalzon B., Aude-Garcia C., Carrière M., Rabilloud T.

Etude de la réponse des macrophages aux nanoparticules de silice



STUDY OF MACROPHAGE RESPONSES TO SILICA OXIDE NANOPARTICLES (NP-SiO₂)

Dalzon B., Aude-Garcia C., Rabilloud T.
Laboratoire de Biologie et Chimie des Métaux (LCBM) - CEA/BIG/CNRS/UGA/Grenoble



The French National Research Program for Environmental and Occupational Health of Anses (2015/1032)

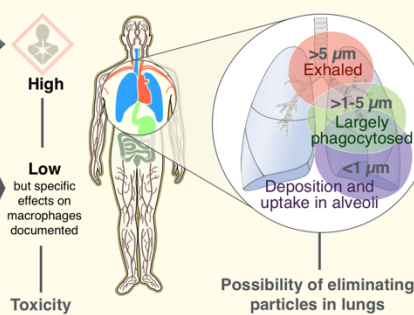
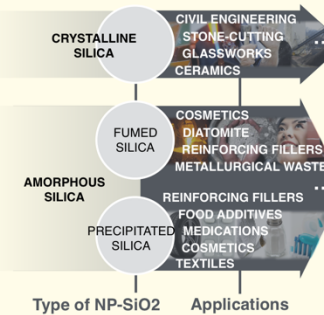
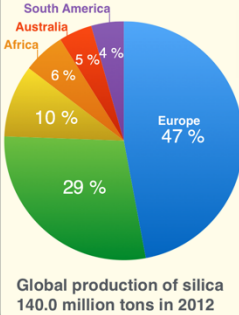
OBJECTIVE

Comparing the effect of different types of NP-SiO₂ on macrophages functionalities

INTRODUCTION

Description of NP-SiO₂ and associated toxicity

NP-SiO₂ have a high exposure potential for workers and the global population because of their use in numerous applications and consumer products.



1) Type and size of NP-SiO₂ impact lung toxicity : Crystalline = silicosis and lung cancer amorphous = short inflammation.

2) NP-SiO₂ accumulated in lung are only eliminated by alveolar macrophages.

Triggers phagocytosis and inflammation

STRATEGIES

Dose study

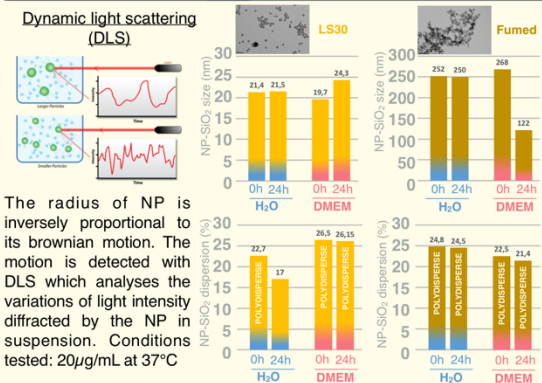
- 1) In Europe : the maximum dose of silica exposure approved for workers is 5mg/m³ in alveoli per day. By estimating the number of alveoli in lungs and the average number of macrophages per alveolus, this maximum dose approved corresponds to 1 to 2 μg of silica / million of macrophages. i.e. 1 and 2 μg/mL for cell culture models for **chronic exposure** for 10 to 20 days (final dose: 20 μg/mL).
- 2) For **acute exposure**, we estimate the lethal dose 20 (LD20) at 20 μg/mL. It is necessary to work at LD20 to study proteomics and functional effects.
- 3) We determine macrophages' **capacity to recover** their regular functional abilities several days after silica exposure.

Choice of models

- Cell Type**
- 1) RAW murine macrophage cell lines (easier cell culture conditions).
 - 2) Primary mouse macrophages (more realistic conditions).
- NP Type**
- 3) Precipitated silica ludox colloidal silica (LS30) (Sigma-Aldrich ref: 420808).
 - 4) Fumed silica (Sigma-Aldrich ref: S5505).

RESULTS

NP-SiO₂ Characterization



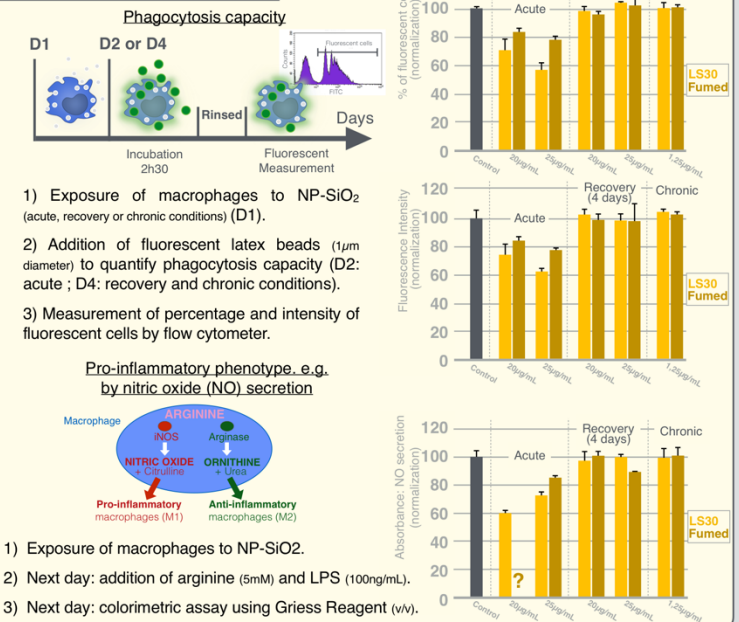
LD20 assessment

viability assessment with propidium iodide (PI)

PI (1μg/mL) is an exclusion dye. It crosses only damaged cell membranes (dead cells) and it binds DNA into the nucleus. It cannot penetrate viable cells. LD 20 is assessed by flow cytometer.

- 1) RAW murine macrophage cell lines
 - LS30: LD20 = 15 μg/mL to 20 μg/mL.
 - Fumed silica: LD20 = 25 μg/mL.
- 2) Primary mouse macrophages
 - LS30: LD20 = 150 μg/mL.
 - Fumed silica: LD20 = 50 μg/mL.

Functional studies



CONCLUSION

- LS30 NP-SiO₂ has the same behavior in water and culture medium contrary to fumed silica. In culture conditions fumed NP-SiO₂ size decreases, certainly due to a dissociation of aggregates. In culture conditions, we conclude that the hydrodynamic size of NPs is 24nm for LS30 and 122nm for fumed silica.
- Raw cell lines: similar LD20 for precipitated and fumed NP-SiO₂ (low concentration). Primary macrophages: less sensitive to NP-SiO₂ (LD20 = higher concentration).
- At LD20 (acute exposure): overall functionality (phagocytosis and NO assays) of macrophages is reduced (between 15% and 40%). Macrophages are more affected by LS30 than by fumed NP-SiO₂. At recovery condition: persistent effects observed for fumed silica. Not effects observed in chronic conditions.

PERSPECTIVES

- Other functional assays will be implemented: migration, pro-inflammatory cytokines, urea production, reactive oxygen species (ROS), metallothionein assays, etc.
- Proteomic studies is currently under way to confirm these results and develop other functional assays.
- Chronic exposure (1μg/mL): Tests will be performed over an extended period of time (20 days) to get closer to occupational exposure conditions and LD20.

INVESTIGATION OF IRON OXIDE NANOPARTICLES (NP-Fe₂O₃) EFFECTS ON MACROPHAGES IN THE FRAME OF A METAL-ACTIVATED RADIOTHERAPY SCHEME



Bastien Dalzon¹, Catherine Aude Garcia¹, Thierry Rabilloud¹
 (1) CEA-Grenoble, 17, rue des Martyrs, 38000 Grenoble



OBJECTIVE & CONTEXT

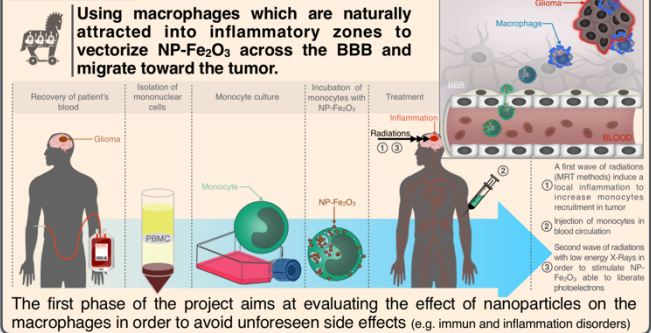
To develop strategies to cure solid tumors resistant to current treatments.

Despite major advances in cancer therapy, solid tumors still have a high lethality rate, due to two major problems :

1. Presence of **cancer stem cells** (CSCs) which play an essential part in the aggressiveness of tumors, the possibility of relapse and the development of metastases. They are resistant to both radiation and chemotherapy.
2. Cases of brain tumor (glioma): additional constraint of the **blood brain barrier** (BBB) which is highly impermeable to chemotherapy. Radiotherapy requires high-intensity X-rays which damage healthy surrounding tissues.

We offer to use X-ray therapy to activate NP-Fe₂O₃ able to release highly toxic photoelectrons within the tumor.

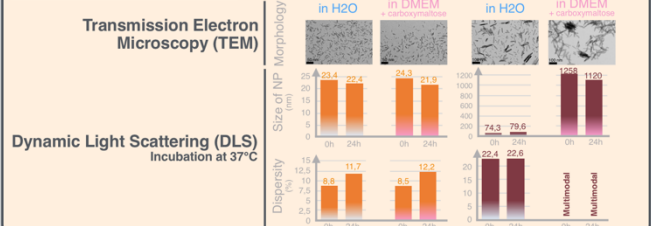
STRATEGY



CHOICE OF MODELS

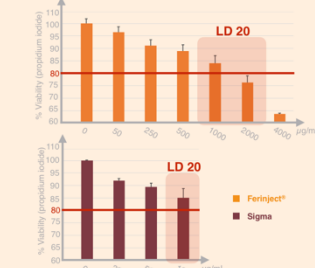
- Cell Type**
- 1) **J774** murine macrophage cell lines (easier culture conditions)
 - 2) **Primary mouse macrophages** (more realistic conditions)
- We chose to compare two distinct types of NP-Fe₂O₃**
- NP Type**
- 3) **Ferinject®** (Vifor Pharma)
 - Type of NP: ferric carboxymaltose (23 nm)
 - Marketing status: authorized for human use to treat anemia (IV)
 - 4) **NP-Fe₂O₃ (Sigma-Aldrich, Ref: 720704)**
 - Type of NP: iron oxide (< 110 nm with aggregates)
 - coated with carboxymaltose by our team (patented by Symed Labs Limited: EP 2496595 A2)
 - Marketing status: no medical use
- Exposure**
- 5) Incubation of macrophages with NP during 24h at 37°C

Fe₂O₃ Characterization



RESULTS ON MACROPHAGES

Choice of working dose of Fe₂O₃ Primary macrophages: assessment of the LD20

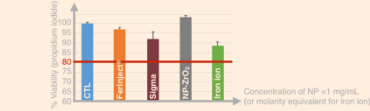


We have established that the lethal dose 20 (LD20) is the most appropriate for two reasons:

1. The effect of NPs is sufficient obvious to assess the functional impact and proteomic expression on macrophages without the artifacts due to dead cells.
2. Above LD20 the number of cells able to migrate is not sufficient for our therapeutic strategy.

LD20 is the working dose and it is assessed on primary macrophages because they represent more realistic conditions than J774. The working dose is estimated at 1 mg/mL.

J774 cells: assessment of the mortality with Fe₂O₃



The mortality observed with J774 cells is not higher than the one observed with primary macrophages. The estimated working dose (1mg/mL) can also be used with J774 for functional assays.

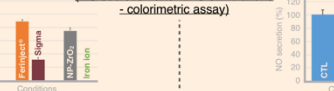
J774 lines

Primary cells

Main functional macrophage assays Maintien of phagocytosis capacity assay using fluorescent latex beads - flow cytometer



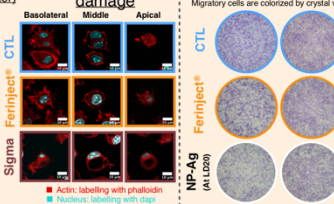
Inflammatory abilities (NO secretion after LPS stimulations - colorimetric assay)



Further functional assays Inflammatory abilities (Pro-inflammatory cytokines secretion after LPS stimulations - flow cytometer)



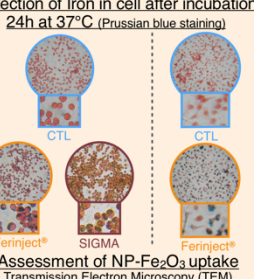
Migration ability (Transwell migration assay)



J774 lines

Primary cells

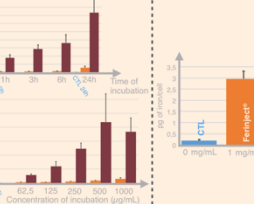
Ability of macrophage to uptake NP-Fe₂O₃ Detection of Iron in cell after incubation 24h at 37°C (Prussian blue staining)



Assessment of NP-Fe₂O₃ uptake Transmission Electron Microscopy (TEM)



Quantitative assays of iron in cells (Colorimetric bathophenanthroline method)



CONCLUSION

At the same working dose: cell effects of sigma and Ferinject®

Sigma particles disrupt the macrophages' functions (e.g. drastic drop of phagocytosis capacity and inflammatory response). Respiratory failure and disturbance may explain these functional damages. Conversely, for **Ferinject®** no damages are observed.

Macrophage dysfunctions depend on both the size and the material of the particles. Phagocytosis capacity is altered by the size and material (amorphous <100nm with aggregates NP-ZrO₂ and **soluble iron**) whereas nitric oxide secretion is only inhibited by **soluble iron**.

Given the aggregation of **Sigma** and their effects on macrophages, **Ferinject®** is chosen to pursue functional studies on primary macrophages. No functional effects of **Ferinject®** are observed on primary macrophages even if the secretion of MCP1 (pro-inflammatory cytokine and chemoattractant factor) decreases.

Ferinject® is uptaken by macrophages (J774 and primary macrophages) but to far less than **Sigma**. The high phagocytosis of **Sigma** explains the damages on the functionality.

Ferinject® is the best potential tool for this therapeutic strategy.

PERSPECTIVES

In vitro

Assessment of the leakage of iron over time after incubation (24h to 72h) because cells possess ferroportins (proteins specialized in the release of iron). We have chosen to use Prussian blue and bathophenanthroline methods.

Checking that the iron dose stored by macrophages is sufficient to amplify low energy X-Ray therapy using co-culture of cell tumors and macrophages pre-incubated with **Ferinject®**.

In vivo

Assessment of the capacity of primary mouse macrophages (injected in blood circulation) to migrate toward the tumor using small animal imaging (with non-invasive photoacoustic method).



STUDY OF MACROPHAGE RESPONSES TO SILICA OXIDE NANOPARTICLES (NP-SiO₂)

Daizon B., Aude-Garcia C., Rabilloud T.
Laboratoire de Biologie et Chimie des Métaux (LCBM) - CEA/BIG/CNRS/UGA/Grenoble

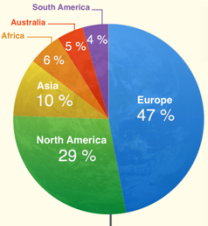


Funded in part by the French National Research Program for Environmental and Occupational Health of Anses (2015/1/032) and by the CEA toxicology program.

OBJECTIVE Comparing the effect of different types of NP-SiO₂ on macrophages functionalities

CONTEXT Description of NP-SiO₂ and associated toxicity

NP-SiO₂ have a high exposure potential for workers and the global population because of their use in numerous applications and consumer products.



Global production of silica 140 million tons in 2012

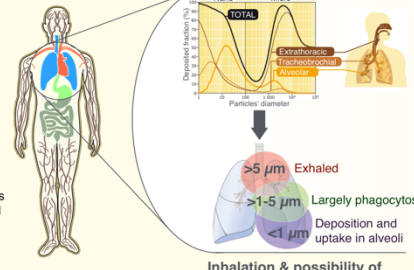
Type of NP-SiO₂

- CRYSTALLINE SILICA**: CIVIL ENGINEERING, STONE-CUTTING, GLASSWORK, CERAMICS
- FUMED SILICA**: COSMETICS, DIATOMITE, REINFORCING FILLERS, METALLURGICAL WASTE
- AMORPHOUS SILICA**: REINFORCING FILLERS, FOOD ADDITIVE, MEDICATIONS, COSMETICS, TEXTILES
- PRECIPITATED SILICA**

Applications

Toxicity

- High
- Low but specific effects on macrophages documented



Inhalation & possibility of eliminating particles in lungs

Consequences

- Type and size NP-SiO₂ impact on pulmonary toxicity: Crystalline type = silicosis and lung cancer; amorphous type = short inflammation
- NP-SiO₂ accumulated in lungs are only eliminated by alveolar macrophages

Triggers phagocytosis and inflammation

STRATEGIES Exposure pathway & dose study

- In Europe: the maximum dose of silica exposure approved for workers is 5 mg/m³ in alveoli per day. By estimating the number of alveoli in lungs and the average number of macrophages per alveolus. This maximum dose approved corresponds to 1 to 2 μg of silica / million of macrophages. i.e. 1 and 2 μg/mL for cell culture models for **chronic exposure** for 20 days (final dose: 20 μg/mL).
- For **acute exposure**, we estimate the lethal dose 20 (LD20) at 20 μg/mL for precipitated silica and at 25 μg/mL for fumed silica for 24h. It is necessary to work at LD20 to study proteomics and functional effects.
- We determine macrophages' **capacity to recover** their regular functional abilities three days after exposure to silica.

Choice of models

Cell Type

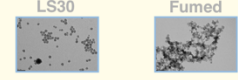
- RAW murine macrophage cell lines (easiest cell culture conditions).
- Primary mouse macrophages (more realistic conditions).

NP Type

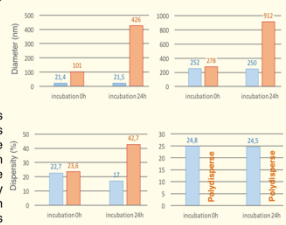
- Precipitated silica Ludox colloidal silica (LS30) (Sigma-Aldrich ref: 420808).
- Fumed silica (Sigma-Aldrich ref: S5505).

RESULTS NP-SiO₂ characterization

Transmission Electron Microscopy (TEM)



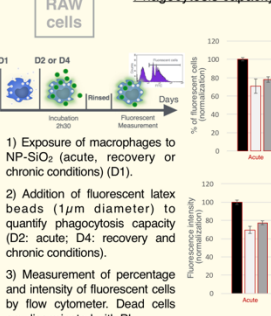
Dynamic light scattering (DLS)



The radius of NP is inversely proportional to its brownian motion. The motion is detected with DLS which analyses the variations of light intensity diffracted by NP in suspension. Conditions tested: 20μg/mL at 37°C

RAW cells

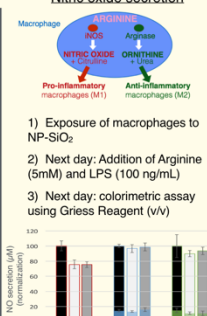
Phagocytosis capacity



- Exposure of macrophages to NP-SiO₂ (acute, recovery or chronic conditions) (D1).
- Addition of fluorescent latex beads (1μm diameter) to quantify phagocytosis capacity (D2: acute; D4: recovery and chronic conditions).
- Measurement of percentage and intensity of fluorescent cells by flow cytometer. Dead cells are discriminated with PI

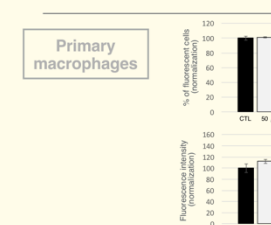
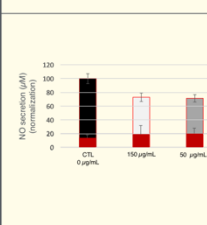
Functional studies

Nitric oxide secretion

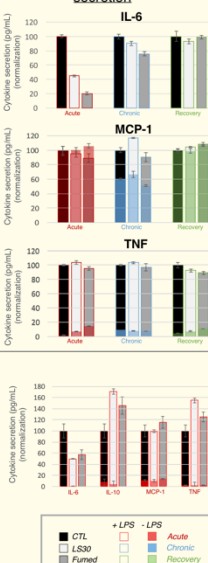


- Exposure of macrophages to NP-SiO₂
- Next day: Addition of Arginine (5mM) and LPS (100 ng/mL)
- Next day: colorimetric assay using Griess Reagent (v/v)

Primary macrophages

Pro-inflammatory cytokines secretion



CONCLUSION

- DLS**: in water, diameter of LS30 is about 21 nm and the size of fumed silica is 250 nm. However, In culture medium, the two types of SiO₂ have a similar agglomeration behavior.
- DL20**: cell lines: similar LD20 for LS30 and fumed NP-SiO₂ (low concentration in between 20 and 25 μg/mL). Primary macrophages are less affected by NP-SiO₂ toxicity (LD 20 between 50μg/mL for fumed silica and 150μg/mL for LS30. We suppose that immortalization and/or cell division can increase silica toxicity).
- Functional studies**
 - Cytoskeleton damages: decrease of the phagocytosis capacity.
- Acute exposure**:
 - Inflammation disorders: decrease of the ability to secrete NO and pro-inflammatory IL-6 after contact with bacterian stimuli (LPS). NP-SiO₂ alone induce a slight increase of inflammation through TNF secretions (RAW cells).
- Chronic exposure**: IL-6 secretion decreases too but the effects are moderate in comparison to acute exposure.
- Recovery exposure**: Macrophages find their global functionalities when they are no longer in contact with NP-SiO₂.
- Special case for primary macrophages**: LD20 is very different for fumed silica and LS30. Primary macrophages are more sensible to fumed silica than LS30. Even if we increase the concentration of fumed silica, the % mortality does not increase. However, functionalities are more damaged (e.g phagocytosis capacity).

PERSPECTIVES

- Other assays** will be implemented to understand the causes of functional damages: relation with toxicity and silica uptake, cytoskeleton visualisation, mitochondrial potential, metallothionein, stability of lysosomes, etc.
- Proteomic studies** are currently under way to confirm these results and develop other functional assays.
- Assessment of cross toxicity** with DNA alkylating agents such as styrene oxide.

3. Communications orales

- Présentation Flash lors du forum Ecotox (Fondation Rovaltain, Alixan - 2016)
- Séminaire de laboratoire (LCBM/BIG/CEA, Grenoble – 2017)
- Séminaire Jeune Chercheur (BIG/CEA, Grenoble – 2018)

RESUME

De par leurs propriétés, les nanoparticules suscitent des sentiments très contrastés. Elles sont considérées comme prometteuses dans de nombreux champs d'application, notamment dans le domaine médical. Beaucoup d'approches thérapeutiques utilisent aujourd'hui des nanoparticules comme par exemple, pour soigner les cancers. Cependant, les nanoparticules sont également vues comme une source potentielle de danger pour la santé humaine, en particulier lorsque l'on considère les crises sanitaires historiques liées à l'inhalation répétée de particules de silice cristalline ou de fibres d'amiante qui provoque de graves maladies telles que la silicose et l'asbestose. Les macrophages alvéolaires sont aujourd'hui connus pour jouer un rôle central dans l'évolution de ces deux maladies. Nous nous sommes donc intéressés aux aspects à la fois positifs et négatifs des nanoparticules. Dans un premier projet, afin de répondre à un problème de santé publique, nous avons étudié l'effet de différents types de nanoparticules de silice amorphe sur la dérégulation des fonctionnalités principales des macrophages. Les principaux tests effectués ont montré un effet important sur les macrophages lorsque les nanoparticules de silice sont à des concentrations subtoxiques, en revanche nous avons seulement observé un léger effet lorsque les macrophages sont exposés à des doses journalières équivalentes aux normes d'exposition imposées. Dans un deuxième projet, nous avons développé une stratégie de cheval de Troie dans laquelle des macrophages différenciés in vitro servent à véhiculer une grande quantité de nanoparticules d'oxyde de fer photoactivables au niveau des sites tumoraux, cela afin d'améliorer les radiothérapies actuelles. Les premiers tests ont démontré que le Ferinject® était peu toxique pour les macrophages même à de fortes concentrations. Ensuite, les expérimentations pré-cliniques effectuées sur la souris ont validé notre concept puisque les macrophages injectés dans la circulation sanguine sont capables de migrer vers la tumeur.

ABSTRACT

Because of their properties, nanoparticles have generated opposed views. They are perceived as promising in many fields of application, particularly in medicine. Nanoparticles are currently used in many therapeutic approaches such as cancer therapy. However, in view of past health crises related to the repeated inhalation of crystalline silica particles and asbestos fibers, nanoparticles are also viewed as a source of potential risks for human health. Alveolar macrophages are now known to play a major role in the evolution of these two diseases. We thus chose to study both the positive and negative aspects of nanoparticles. In order to address a public health issue, our first project focused on the effect of different types of amorphous silica nanoparticles on the disruption of the main functionalities of macrophages. The main tests performed showed a significant effect on macrophages when amorphous silica nanoparticles were tested at subtoxic concentrations. However, we only observed minor effects when macrophages were exposed to a daily dose equivalent to the safety standards. For the second project we developed a Trojan horse strategy using macrophages to bring a significant quantity of photoactivatable nanoparticles to the tumor site so as to improve current radiotherapies. The first assays proved that Ferinject® was not toxic to macrophages even at high concentrations. Then, the pre-clinical experiments performed on mice validated our strategy because macrophages injected into the bloodstream were able to migrate toward the tumor.