



HAL
open science

Interactions entre cellules et facteurs solubles dans les maladies articulaires chroniques : compréhension et ciblage thérapeutique

Samira Filali

► **To cite this version:**

Samira Filali. Interactions entre cellules et facteurs solubles dans les maladies articulaires chroniques : compréhension et ciblage thérapeutique. Pharmacologie. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1294 . tel-03045404

HAL Id: tel-03045404

<https://theses.hal.science/tel-03045404v1>

Submitted on 8 Dec 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.



N° d'ordre NNT : 2018LYSE1294

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

**ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES SANTE
(EDISS)**
N° accréditation ED 205

Spécialité de doctorat : Biologie, médecine et santé
Discipline : Biomolécules, pharmacologie, thérapeutique

Soutenue publiquement le 07/12/2018 par :

Samira FILALI

**Interactions entre cellules et facteurs solubles
dans les maladies articulaires chroniques :
compréhension et ciblage thérapeutique**

Devant le jury composé de :

Sylvie CRAUSTE-MANCIET	Professeure des Universités – Praticien hospitalier	Rapporteure
Hubert MAROTTE	Professeur des Universités – Praticien hospitalier	Rapporteur
Anne TOURNADRE	Professeure des Universités – Praticien hospitalier	Rapporteure
Fabrice PIROT	Professeur des Universités – Praticien hospitalier	Examineur
Christine PIVOT	Praticien hospitalier	Examineur
Pierre MIOSSEC	Professeur des Universités – Praticien hospitalier	Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

RESUME FRANCAIS

Les synoviocytes jouent un rôle crucial dans la pathogénèse des maladies articulaires chroniques, et particulièrement dans la phase de destruction ostéoarticulaire en devenant résistants à l'apoptose. Une première étude a mise en évidence une efficacité antiproliférative du cadmium minéral sur ces synoviocytes. Une preuve de concept d'un nouveau produit thérapeutique intra-articulaire à base de cadmium a été élaborée. Cette préparation pharmaceutique innovante, développée pour éviter la dissémination du cadmium minéral dans l'organisme, contenait des nanoparticules à base de cadmium, administrable sous forme liquide à température ambiante et se gélifiait à la température corporelle, en formant des micelles contenant des nanoparticules, ne traversant ainsi pas la cavité synoviale.

Initialement, la reproductibilité de l'effet antiprolifératif du cadmium entre la forme minérale et les nanoparticules a été vérifiée dans un modèle *in vitro* de synoviocytes humains issus de patients atteint de polyarthrite rhumatoïde. Une captation différente des nanoparticules selon l'environnement inflammatoire ou pathologique des synoviocytes a été ensuite expliquée par la modification accrue de leurs morphologies. Similairement, l'effet de l'inflammation sur les propriétés physiques des vésicules, sécrétées par les synoviocytes, ont consolidé le choix des caractéristiques de la formulation.

Les essais sur des modèles d'arthrite chez le rat ont permis de démontrer l'efficacité de cette nouvelle préparation originale, facilement injectable en intra-articulaire, en réduisant potentiellement les scores cliniques avec une unique injection. Cette thérapie locale peut être une technique rapide et réalisable en ambulatoire.

TITRE ANGLAIS

Interactions between cells and soluble factors in chronic articular diseases: understanding and therapeutic targeting

RESUME ANGLAIS

Synoviocytes play a crucial role in the pathogenesis of chronic joint diseases, particularly in the osteoarticular destruction phase by becoming resistant to apoptosis. A first study has demonstrated an antiproliferative efficacy of cadmium mineral on these synoviocytes. A proof of concept of a new intra-articular cadmium-based therapeutic product has been developed. This innovative pharmaceutical preparation, developed to prevent the spread of mineral cadmium in the body, contained cadmium-based nanoparticles, which can be administered in liquid form at room temperature and gelled at body temperature, forming micelles containing nanoparticles, thus crossing the synovial cavity.

Initially, the reproducibility of the antiproliferative effect of cadmium between the mineral form and the nanoparticles was verified in an *in vitro* model of human synoviocytes with rheumatoid arthritis. A different uptake of nanoparticles according to the inflammatory or pathological environment of synoviocytes was then explained by the massive modification of their morphologies. Similarly, the effect of inflammation on the physical properties of the vesicles, secreted by synoviocytes, consolidated the choice of the characteristics of the formulation.

Tests on arthritis models in rats have demonstrated the effectiveness of this new original preparation, easily injectable intra-articular, reducing clinical scores with a single injection. This local therapy can be a quick technique and achievable in outpatient.

Résumé graphique

Activités

- Sélection du Quantum dot, CdTe-QD (taille, nombre d'atomes de Cd/Te)
- Essais de cytotoxicité *in vitro* du CdTe-QD *versus* nitrate de cadmium sur des cellules de patients
- Essais de visualisation du trafic intracellulaire du CdTe-QD dans les synoviocytes

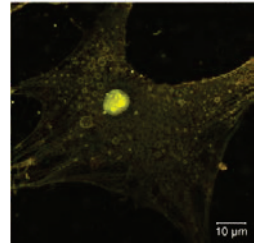


Photo et vidéos 1 et 2 : CdTe-QD dans un synoviocyte

- Essais évaluant l'impact d'un environnement inflammatoire sur l'intégration des QD dans les synoviocytes

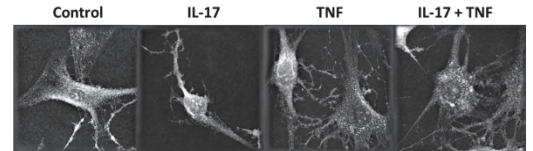
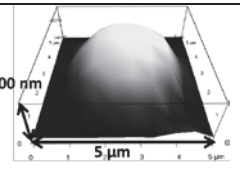
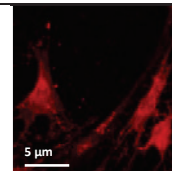


Photo : Synoviocytes en présence de divers cytokines

- Essais évaluant l'impact de l'inflammation chronique sur le liquide synovial
- étude tribologique des vésicules sécrétées par les synoviocytes)



Photos : (i) Synoviocytes sécrétant des microvésicules lipidiques et (ii) une microvésicule lipidique

- Formulation d'un gel intra-articulaire thermosensible
 - confinant dans l'articulation les QD qui vont être administrés
 - le gel à température ambiante est liquide, facilitant l'administration dans un service ambulatoire, puis se gélifie dans l'articulation

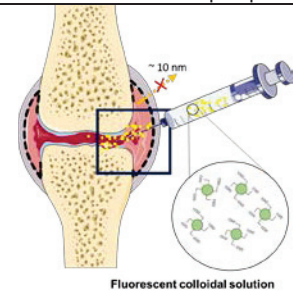


Schéma : Administration du gel thermosensible

- Paramètres de viscosité optimale
 - vis-à-vis de l'articulation
 - vis-à-vis de l'administration

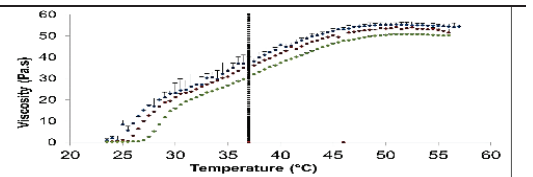


Figure : Viscosité du gel sans et avec QD en fonction de la température

- Production et contrôle pharmaceutique



Photo : Gel intra-articulaire thermosensible

- Essais *in vitro* et *in vivo* sur l'animal (tolérance/efficacité)

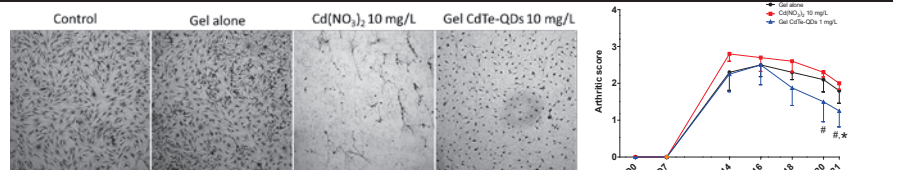


Figure : Effet bénéfique du gel de CdTe-QDs sur des synoviocytes et des rats arthritiques

UNITE D'ACCUEIL DE LA THESE

EA4130 Unité Immunogénomique et Inflammation

Hôpital Edouard Herriot, Pavillon P, 5^e étage,

5 place d'Arsonval, 69003 Lyon

En interaction avec la plateforme FRiPharm UMR CNRS 5305

Hospices Civils de Lyon

Groupement Hospitalier Centre

Hôpital Edouard Herriot

Service Pharmaceutique

Préparation et contrôles des médicaments

Place d'Arsonval

F-69437 Lyon cedex 03

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury,

Professeur Pierre Miossec pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail de thèse et de l'avoir dirigé, pour la confiance et l'autonomie qu'il m'a accordées tout au long de ce travail et pour ces conseils avisés durant toute cette thèse.

Professeur Fabrice Pirot, pour m'avoir tout appris de ce métier et sa motivation au quotidien, sa vision avant-gardiste de notre métier que je partage entièrement, pour ces conseils avisés, pour sa bienveillance en général.

Professeurs Sylvie Crauste-Manciet, Anne Tournadre et Hubert Marotte d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma gratitude.

Docteure Christine Pivot, pour m'accueillir depuis 5 ans dans son service, pour la confiance et le soutien qu'elle me témoigne et qui m'honore.

A toute l'équipe immunogénomique et inflammation:

A Mélissa, qui a su me conseiller et me guider à chaque moment de cette thèse, merci pour ton aide précieuse, ta patience et ta bonne humeur et les bons moments passés en dehors du travail. A Audrey, pour sa bonne humeur partagée et ses petites astuces, on aura finalement été au bout! A Marie-Nathalie, merci de ta gentillesse et de ta bonne humeur ! A Frédéric, à Julie, toujours présent(e) pour donner de bons conseils.

A toute l'équipe de la pharmacie de l'hôpital Edouard Herriot, pour leur gentillesse, leur efficacité, leur collaboration et pour l'environnement de travail détendu et professionnel.

A toute l'équipe du laboratoire de galénique industrielle :

A Damien, pour ces 5 années passées ensemble et ton aide précieuse. A Annick pour les bons moments papotages et les échanges sur nos thèses. A Françoise pour votre gentillesse et vos conseils. A Céline pour ton aide durant cette thèse.

A toute l'équipe du LBTI,

A tous les autres laboratoires qui ont collaboré dans ce projet de thèse :

Au Dr Alain Geloën, faisant parti du laboratoire Carmen pour son aide et ses conseils. A Denis, Amandine et Elisabeth de la plateforme du Ciqle pour leurs aides en microscopie. A Ana-Maria et Nesrine du laboratoire Lamcos pour leurs aides et les bons moments partagés. Au Pr Hubert Marotte et Robin du laboratoire Sainbiose, pour leurs aides, leurs disponibilités et leurs conseils.

A mes amis et tous ceux qui m'entourent au quotidien et que je remercie de leur présence, tout simplement.

Ma famille, mes parents, qui m'ont toujours soutenue au cours de ces longues années d'études et sans qui je ne serai pas là !

LISTE DES ABREVIATIONS

Cd ²⁺	Cadmium minéral
CdTe-QDs	Quantum dots de tellure de cadmium
CFO-QDs	Quantum dots de fluoroxide de carbone
MDC	Monodansylcadavérine
OA	Arthrose
PBMCs	Cellules mononuclées du sang périphérique
PR	Polyarthrite rhumatoïde
QD	Quantum dot
SVNH	Synovite villonodulaire pigmentée

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Modèle proposant l'implication de multiples mécanismes pathogéniques dans la polyarthrite rhumatoïde.

Figure 2 : Mesure des périmètres de chevilles de pattes postérieures de rat en fonction du temps après une injection unique de cadmium minéral (Thèse de doctorat d'université de BONAVENTURA Paola, 2016).

Figure 3 : Mesure de l'indice articulaire et des pertes de mobilité des pattes postérieures de rat en fonction du temps après une injection unique de cadmium minéral (Thèse de doctorat d'université de BONAVENTURA Paola, 2016).

Figure 4 : Images 3D reconstruites après tomographie des os de la cheville de la patte postérieure du rat après une injection unique de cadmium minéral (Thèse de doctorat d'université de BONAVENTURA Paola, 2016).

Figure 5 : Dosage du zinc, du cadmium et des ASAT dans le foie après une injection unique de cadmium minéral (Thèse de doctorat d'université de BONAVENTURA Paola, 2016).

Figure 6 : Design du projet (partie 1).

Figure 7 : Design du projet (partie 2).

Figure 8 : Stabilité d'une suspension colloïdale de quantum dots.

Figure 9 : Principe du marquage à l'annexine V et l'iodure de propidium.

Figure 10 : Caractérisation de la mort cellulaire induite par le cadmium.

Figure 11 : Trafic intracellulaire du cadmium.

Figure 12 : Triplet tribologique de l'articulation synoviale.

Figure 13: Principales composants du liquide synovial et leurs rôles

Figure 14 : Etude tribologique comparant le liquide synovial de patients atteint d'arthrose (OA) et de polyarthrite rhumatoïde (PR) avec l'observation des vésicules lipidiques (Thèse de doctorat d'université de MATEI Constantin Ionut, 2012).

Figure 15 : Schéma des hypothèses explicatives des différences de viscosités obtenues entre la littérature et cette étude.

Figure 16: Représentation schématique du mécanisme d'association de l'eau avec le poloxamère P407.

Figure 17 : Courbe de calibration des dosages du cadmium et du tellure avec le MP-AES.

Figure 18: Chromatographie de la suspension de CdTe-QDs, du gel et du gel avec CdTe-QDs.

Figure 19: Courbe de calibration de la suspension de CdTe-QDs, du gel et du gel avec CdTe-QDs.

Figure 20 : Impact du solvant sur la viscosité de la préparation.

Figure 21 : Quantification de la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 après traitement avec le cadmium minéral et le CdTe-QDs.

Figure 22 : Les différentes cibles potentielles du cadmium minéral affectant les voies de signalisation.

Figure 23 : Planification des études de stabilité.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les différentes maladies articulaires.

Tableau 2 : Caractéristiques physiologiques du liquide synovial.

Tableau 3 : Paramètres chromatographiques pour le dosage du CdTe-QDs.

Tableau 4: Caractéristiques physicochimiques des différentes compositions testées lors du développement galénique.

Tableau 5: Répartition des scores arthritiques selon les formulations.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION GENERALE

1. Physiologie de l'articulation
2. Les maladies articulaires & épidémiologie
3. Pathogénie spécifique de la polyarthrite rhumatoïde
4. Prise en charge de la polyarthrite rhumatoïde (Infiltrations intra-articulaires de corticoïdes, lubrifications par viscosupplémentations, synoviorthèses)
5. Ciblage d'une nouvelle molécule pour la synoviorthèse, le cadmium minéral
6. Objectifs de l'étude

CHAPITRE 1 : REPRODUCTIBILITE ET CARACTERISATION DE LA TOXICITE DU CADMIUM MINERAL AVEC UN NOUVEL OUTIL, QUANTUM DOTS DE TELLURE DE CADMIUM (CdTe-QDs)

1. Quantum dots ou « semi-conducteurs» (principe, structure et cristallisation des quantum dots et synthèse des quantum dots)

REVUE N°1 : SEMICONDUCTOR QUANTUM DOTS IN BIOLOGICAL FIELDS

2. Comparaison et caractérisation de la toxicité du cadmium minéral et des CdTe-QDs

PUBLICATION N° 1: LIVE-STREAM CHARACTERIZATION OF CADMIUM- INDUCED CELL DEATH USING VISIBLE CdTe-QDS

**CHAPITRE 2 : AMELIORATION DE L'ABSORPTION DES CdTe-QDs GRACE
AUX CHANGEMENTS DE LA MORPHOLOGIE CELLULAIRE EN MILIEU
INFLAMMATOIRE**

PUBLICATION N° 2: PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES INDUCE CHANGES IN
CELL MORPHOLOGY IN SYNOVIOCYTES AND CO-CULTURES
(PBMC/SYNOVIOCYTES)

**CHAPITRE 3 : EVALUATION DE L'IMPACT DES MALADIES ARTICULAIRES
CHRONIQUES SUR LES VESICULES SECRETEES PAR LES SYNOVIOCYTES**

1. Définition des études tribologiques du liquide synovial
2. Caractérisation structurale et tribologique du surnageant comparant les patients sains
et les patients souffrant de maladies articulaires chroniques

PUBLICATION N° 3: IMPACT OF CHRONIC INFLAMMATION ON STRUCTURAL,
RHEOLOGICAL AND TRIBOLOGICAL PROPERTIES OF SYNOVIAL FLUID

**CHAPITRE 4 : ELABORATION ET EVALUATION D'UNE PREPARATION
HOSPITALIERE INNOVANTE POUR LE TRAITEMENT DE MALADIES
ARTICULAIRES CHRONIQUES DANS UNE ETUDE PRE-CLINIQUE**

1. Preuve de concept : mise en forme d'une préparation pharmaceutique (développement
galénique)
2. Contrôle qualité de la production (développement analytique)
3. Caractérisation préclinique *in vitro* and *in vivo* dans un modèle d'arthrite chez le rat

PUBLICATION N° 4 : QUANTUM DOTS BASED-THERMOSENSITIVE GEL FOR THE
TREATMENT OF CHRONIC JOINT DISEASES

DISCUSSION GENERALE

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

ANNEXE 1 : DUAL CHLORHEXIDINE DIGLUCONATE - SODIUM EDTA LOADED
THERMOSENSITIVE OCULAR GEL FOR ACANTHAMOEBA KERATITIS
TREATMENT

REFERENCES

INTRODUCTION GENERALE

L'articulation synoviale, ou diarthrose est une entité fonctionnelle qui unit 2 segments de membre par une capsule articulaire qui les entoure permettant leur mobilisation et détermine une cavité articulaire. L'articulation comporte trois composants essentiels : le cartilage, la synoviale et l'os sous-chondral. L'articulation a une double fonction : assurer le maintien de la posture (l'articulation travaille alors en compression) et permettre le mouvement (l'articulation travaille alors en glissement). Le bon fonctionnement articulaire implique que ces trois composants soient normaux.

Le cartilage articulaire est un tissu avasculaire et sans nerf, peu cellulaire, rigide et élastique, constitué de 3 couches (calcifiée, moyenne, superficielle). Les composantes des cartilages sont les chondrocytes (1 à 2%) et la matrice extracellulaire sécrétée par les chondrocytes. La matrice extracellulaire est formée de fibres de collagène (type II collagène) et de substance fondamentale (protéoglycanes libres, glycoprotéines libres, macromolécules géantes, protéines de liaison). Pour éviter l'usure des extrémités osseuses en contact, ces dernières sont recouvertes d'un cartilage hyalin articulaire (vitreux) enchâssées dans un sac ou capsule articulaire dont la face interne, intra-articulaire, est tapissée par la membrane synoviale.

La membrane synoviale est une mince couche formée de tissu conjonctif lâche vasculaire, et présente 1 - 4 couches de cellules synoviales épithéloïdes et des adipocytes. Deux types de cellules sont présentes : les synoviocytes de type A = « macrophages » (origine médullaire), et les synoviocytes de type B = « cellules sécrétoires ». Cette membrane synoviale assure la nutrition du cartilage articulaire et favorise l'évacuation des débris issus

de l'usure du cartilage. La synovie ou liquide synovial, substance claire, visqueuse et lubrifiante, est produite par la membrane synoviale afin de faciliter le mouvement.

A l'extérieur de la capsule, des ligaments assurent le maintien passif et la coaptation de l'articulation. Ils sont eux-mêmes recouverts par les muscles dont les tendons se terminent à proximité de l'articulation et qui assurent le maintien actif de l'articulation, sa protection, sa mobilité et sa stabilité.

L'os sous-chondral est la surface osseuse articulaire située directement sous le cartilage^{1,2}.

PARTIE 2 : LES MALADIES ARTICULAIRES

En pathologie, les nombreuses affections qui touchent une articulation peuvent être classées en 3 groupes et selon le tissu initialement touché (tableau 1) : maladies commençant par le cartilage : principalement l'arthrose, maladies commençant par la membrane synoviale : arthrites (infectieuses, inflammatoires, micro-cristallines) et maladies commençant par l'os sous-chondral : e.g. ostéonécroses épiphysaires, algodystrophie sympathique réflexe, fracture de fatigue sous-chondrale, maladie de Paget. L'atteinte de ces trois structures finira toujours par retentir sur les deux autres, rapidement (arthrite septique, en quelques jours) ou lentement (arthrose, en quelques années), mais inéluctablement

Tableau 1 : Les différentes maladies articulaires^{3,4}.

Membrane synoviale			Os sous-chondral	Cartilage
Rhumatismes inflammatoires chroniques	Maladies infectieuses	Métabolique	Tumeurs	Dégénératives : arthrose
Connectivites polyarthrites rhumatoïdes (F = 0,3%), lupus, sclérodermie, polymyosite, vascularite, syndrome de Gougerot-Sjögren	Bactériennes (endocardites, Lyme, BK)	Microcristallines goutte, hydroxyapatite (dyslipidémies, ochronose...)	Synovite villonodulaire pigmentée	Algodystrophie Coxarthrose gonarthrose
Spondylarthropathies (F = 0,3%) spondylarthropathies ankylosantes, les rhumatismes psoriasique, les arthrites réactionnelles, les entéropathies (Crohn, rectorragie hémorragiques)	Virales (rubéoles, hépatite B, HIV, parvovirus B19)	Hémochromatose		
Maladies « systémiques » Horton, maladie de Still, Behçet, sarcoïdose	Parasitaires (filaires) Levures (candidoses)	Ostéoporose Ostéomalacie Ostéodystrophie rénale		

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie inflammatoire chronique touchant les articulations des membres ⁵. Cette pathologie est fréquente (0,3 à 1 %) et atteint plus particulièrement la femme entre 30 et 50 ans. Les atteintes articulaires sont bilatérales et généralement symétriques avec une prédilection pour les extrémités (mains et pieds). Les genoux, les coudes et les épaules sont également touchés, l'atteinte des hanches (coxite) est moins fréquente. Cette maladie évolue de façon chronique avec des poussées au cours desquelles se constituent des destructions articulaires génératrices de déformations. Dans la polyarthrite rhumatoïde, plusieurs facteurs interviennent dans le déclenchement de la maladie, notamment des facteurs environnementaux, un terrain génétique prédisposé et des facteurs hormonaux. Ces facteurs réunis activent une réponse immunitaire innée et acquise incontrôlée dans la membrane synoviale (figure 1). La synoviale normale, structure paucicellulaire se transforme en une synovite rhumatoïde, infiltrée par de nombreuses cellules comprenant principalement des lymphocytes T CD4+, des lymphocytes B qui peuvent élaborer des auto-

anticorps à l'origine d'immunocomplexes qui majorent les réactions inflammatoires et des macrophages qui s'organisent en agrégats lymphoïdes. Cette synovite rhumatoïde se caractérise également par une prolifération de la couche bordante, composée de synoviocytes et de macrophages, mais aussi par une prolifération importante de néo-vaisseaux (pannus) ⁶.

PARTIE 3 : PATHOGENIE DE LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie inflammatoire et un rhumatisme auto-immun, impliquant à la fois l'immunité innée et adaptative. La réponse de l'immunité innée est activée par des acteurs cellulaires tels que les cellules dendritiques, les monocytes/macrophages, les polynucléaires neutrophiles, les mastocytes attirés dans la membrane synoviale par des chémokines (MCP-1, MIP-1, RANTES, interleukine 8 (IL-8)) en réaction à des facteurs environnementaux (tabac) ou infectieux (bactéries, parasites) ainsi qu'une susceptibilité génétique (HLA-DR1 et DR4) et des modifications épigénétiques. Ces agents activent les récepteurs Toll-like (TLR) qui reconnaissent des molécules exprimées par les micro-organismes (PAMP) et transduisent des signaux d'activation aboutissant à l'expression de molécules de co-stimulation et à la production de cytokines pro-inflammatoires et de chémokines. L'activation des cellules dendritiques induit également leur migration des tissus périphériques où l'antigène a été capté vers la cavité synoviale faisant office d'un organe lymphoïde secondaire. Les facteurs environnementaux et les prédispositions génétiques altèrent la régulation post-transcriptionnelle conduisant à la citrullination des protéines (Sa/vimentine, collagènes, α -énolase, fibrine ou fibrinogène) du tissu synovial inflammatoire, suite à la transformation de leurs résidus arginyl en résidus citrullyl catalysée par des enzymes à activité peptidyl-arginine désiminases (PAD).

La libération en cascade de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, produit par les monocytes, les lymphocytes T activés, les macrophages et les synoviocytes, provoque un déséquilibre entre les cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL1, IL6, IL17, IL15, IL18, IL32...) et les cytokines anti-inflammatoires. L'IL1 β , le TNF α , l'IL6, IL17⁷⁸ sont des cytokines clés de l'inflammation articulaire et contrôlent la production de nombreuses autres cytokines tels que les facteurs de croissance et les chémokines, mais aussi les molécules d'adhésion qui interviennent dans la réaction inflammatoire en favorisant l'angiogénèse et la diapédèse des cellules circulantes à travers la membrane synoviale.

Une dérégulation lymphocytaire intervient également dans la pathogénie de la polyarthrite rhumatoïde. Quatre sous-populations de lymphocytes T sont présentes dans la synovite rhumatoïde : TH1 (produisent de l'IFN γ), TH2 (produisent de l'IL-4), TH17 et T régulateurs⁹. Un déséquilibre vers un phénotype TH1, pro-inflammatoire par la production d'IFN γ en excès par rapport à une production insuffisante d'IL-4 et d'IL-13 par le phénotype TH2 apparaît. Les lymphocytes TH17 produisent de l'IL-17, qui est régulé par les TH2. En effet, l'IL-4 inhibe fortement la différenciation des cellules TH17. A l'inverse, l'IL-23 permet l'expansion et l'activation des lymphocytes TH17 sous l'influence de TGF β , IL-6 et l'IL-21. L'IL-17 produite induit l'expression par les fibroblastes d'IL-1, d'IL-6, de TNF α , de NO synthase inductible, de métalloprotéinases et de chémokines^{10 11}. L'IL-21 et l'IL-22 sont aussi produites par les lymphocytes TH17. L'IL-21 amplifie la lignée TH17 et est pro-inflammatoire agissant sur les lymphocytes T, les cellules NK, NK T et les lymphocytes B. Les lymphocytes T augmentent aussi l'expression de la chémokine RANKL, qui induit la différenciation des monocytes en ostéoclastes. Les lymphocytes T régulateurs sont *a contrario* diminués lors des poussées. L'interaction entre les lymphocytes T et les fibroblastes synoviaux entraîne la production de métalloprotéinases et inhibe la synthèse de protéines matricielles^{12 13 14 15}.

Le « pannus » est produit par la transformation du tissu synovial en un tissu hypertrophique, avec la prolifération des synoviocytes par défaut d'apoptose et le *homing* des fibroblastes issus du sang périphérique. La surexpression de facteurs anti-apoptotiques (mutation de la protéine p53) ¹⁶ et le rôle protecteur de l'activation de l'autophagie sur l'apoptose ^{17 18} contribuent au phénotype de résistance à l'apoptose dans la polyarthrite rhumatoïde. L'augmentation de RANKL sur les préostéoclastes et de RANK sur les fibroblastes entraînent la destruction ostéoarticulaire ^{19 20 21}.

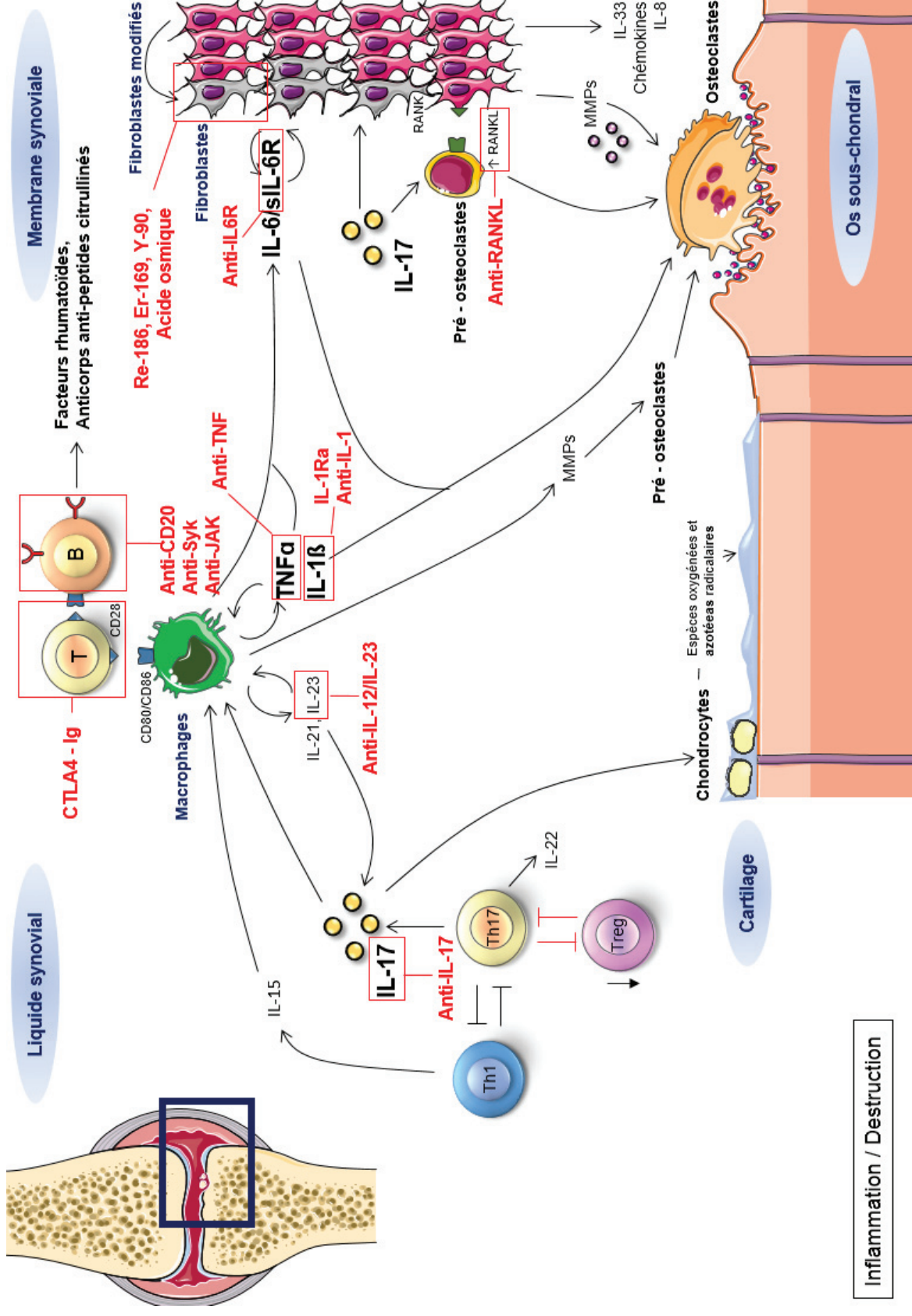


Figure 1: Modèle proposant l'implication de multiples mécanismes pathogéniques dans la polyarthrite rhumatoïde.

Il existe différents traitements de ces pathologies ²² : des traitements médicamenteux de fond, des traitements antalgiques et anti-inflammatoires symptomatiques, des traitements biologiques et locaux (infiltrations et synoviorthèses). Pour la prise en charge thérapeutique de la polyarthrite rhumatoïde, les recommandations EULAR propose de débiter par du méthotrexate en monothérapie ²³; après évaluation de la balance bénéfico-risque, les glucocorticoïdes peuvent être associés sur une période courte. En cas d'échec (absence de réponse à 3 mois ou objectif non atteint à 6 mois), on envisage un autre traitement de fond synthétique (léflunomide, sulfasalazine), une association de traitements de fond ou l'association méthotrexate + biomédicament en fonction des facteurs pronostiques et des caractéristiques du patient. En cas d'échec à un premier biomédicament, la rotation pour un deuxième biomédicament est recommandée. Enfin, en cas de rémission persistante, les traitements de fond pourront être diminués prudemment. Ces recommandations visent à améliorer la prise en charge des patients atteints de PR (18) ; après évaluation de la balance bénéfico-risque, les glucocorticoïdes peuvent être associés sur une période courte. En cas d'échec (absence de réponse à 3 mois ou objectif non atteint à 6 mois), on envisage un autre traitement de fond synthétique (léflunomide, sulfasalazine), une association de traitements de fond ou l'association méthotrexate + biomédicament en fonction des facteurs pronostiques et des caractéristiques du patient. En cas d'échec à un premier biomédicament, la rotation pour un deuxième biomédicament est recommandée. Enfin, en cas de rémission persistante, les traitements de fond pourront être diminués prudemment. En addition, des traitements locaux peuvent être utilisés, tels que les infiltrations intra-articulaires de corticoïdes et de viscosupplémentation. Après échec des traitements généraux et des infiltrations locales de corticoïdes et de viscosupplémentation, la synoviorthèse est envisagée afin de limiter les déformations des articulations, particulièrement invalidantes pour les patients.

1. INFILTRATIONS INTRA-ARTICULAIRES DE CORTICOÏDES

L'infiltration intra-articulaire de corticoïdes d'action longue durée (l'hexacétonide de triamcinolone) permet d'injecter une faible quantité de corticoïdes dans la zone à traiter aussi efficaces que des doses de corticoïdes par voie systémique, permettant ainsi de réduire le risque d'effets indésirables. Ces infiltrations sont indiquées en cas de douleurs articulaires intenses associées à des signes inflammatoires locaux (tels qu'un épanchement intra-articulaires). Dans le traitement local de la polyarthrite rhumatoïde, les infiltrations diminuent le degré de citrullination des protéines (tel que la Sa/vimentine, collagènes, α -énolase, fibrine ou fibrinogène) du tissu synovial inflammatoire, et induisent un effet anti-inflammatoire avec une baisse durable de la CRP et de la vitesse de sédimentation ²⁴.

2. LUBRIFICATION PAR VISCOSUPPLEMENTATION

La viscosupplémentation permet d'augmenter le poids moléculaire et la concentration d'acide hyaluronique dans les articulations ²⁵, principalement chez les patients arthrosiques. Des articles révèlent le rôle important que la lubrification joue dans la polyarthrite rhumatoïde ^{26 27 28 29}. Ces articulations ont en effet une diminution de la viscosité du liquide synovial, et cette injection pourrait ainsi redonner des propriétés plus physiologiques de visco-élasticité au liquide synovial ³⁰. L'acide hyaluronique est un glycosaminoglycane qui est présent dans la matrice extra-cellulaire du liquide synovial ^{31 32 33}. Il est secrété par les synoviocytes de type B et les chondrocytes. Son rôle est de lubrifier l'articulation et d'absorber les chocs, car le cartilage est plus vulnérable aux forces de friction et de compression ³⁴. Les effets bénéfiques de la viscosupplémentation sont l'augmentation de la lubrification des articulations, l'effet

anti-inflammatoire par la réduction de la concentration des médiateurs de l'inflammation et de l'activité des leucocytes, l'activité antalgique directe en agissant comme une barrière entre les médiateurs et les récepteurs et l'effet chondro-protecteur par la stimulation de production d'acide hyaluronique endogène de meilleure qualité dans l'articulation. Trois types d'acide hyaluronique (0,5 – 90 M Da) selon le poids moléculaire sont commercialisés : hyaluronate de sodium = n x (acide glucuronique + glucosamine), hylane = n x hyaluronate (cross linked / réticulisation), NASHA (acide hyaluronique stabilisé non animal) = 1 X longue chaîne AH. Le statut pharmaceutique de ces produits est un dispositif médical sauf Hyalgan (médicament)³⁵. Des articles récents rapportent des associations acides hyaluronique et méthotrexate³⁶ et des nanoparticules d'or complexé avec l'hyaluronate et le tocilizumab²⁷.

3. SYNOVIORTHÈSES

La synoviorthèse consiste en l'injection intra-articulaire d'un produit capable de détruire, décaper, abraser les cellules de la synoviale qui se sont multipliées. Les synoviorthèses sont principalement indiquées dans le cas des mono - ou des oligo - arthrites chroniques et, en particulier, de la polyarthrite rhumatoïde, en dernière intention dans le traitement de l'hémarthrose hémophilique et en cas d'hyarthroses rebelles des genoux d'étiologies diverses (arthrose, spondylarthrite, synovites villonudulaires pigmentés)^{37 38 39 38}⁴⁰. La synoviorthèse peut être chirurgicale (synovectomie) ou chimique. La synovectomie consiste à l'ablation de la prolifération synoviale en excès par résection partielle ou totale de la membrane synoviale de l'articulation. Les synoviorthèses chimiques consistent en des injections intra-articulaires de médicaments. La synoviorthèse chimique peut être associée à la synovectomie comme un traitement adjuvant post-opératoire (4 à 8 semaines post-opératoires) pour les formes diffuses évoluées ou après récurrence. Les médicaments injectés peuvent être de l'acide osmique qui n'a pas le statut de médicaments mais de réactifs ou des médicaments

radiopharmaceutiques émetteurs de rayonnements β^- (métaux radioactifs) et non gamma réservé en diagnostic pour la réalisation de scintigraphie ⁴¹. L'énergie des rayonnements gamma est libérée dans l'articulation et à distance. Néanmoins, le risque d'irradiation extra-articulaire par le système lymphatique d'un radioélément émetteur β^- pur subsiste. Pour limiter ce phénomène, des radionucléides à période physique relativement courte sont utilisés. Les médicaments radiopharmaceutiques prêts à l'emploi les plus couramment utilisés possédant une AMM sont le sulfure de Rhenium-186 colloïdal dans les articulations de volume moyen (coude, épaule, cheville, poignet et hanche), l'Erbium-169 citrate dans les petites articulations des mains, Yttrium-90 citrate et silicate dans le genou ^{42 37} (38). Plus l'articulation à traiter est volumineuse, plus l'énergie du rayonnement β^- doit être élevée. Les médicaments utilisés doivent donc être suffisamment actifs sur la synovite mais dépourvus d'effet secondaire local ou général. Ils ne doivent pas avoir d'action destructrice sur les cartilages, les os et les ligaments. Suite à une synoviorthèse, des améliorations locales durables sont observées au bout de 4 à 8 semaines. Ces isotopes radioactifs sont soumis à un régime d'autorisation (articles L.1333-4, R.1333-24 du code de la Santé publique et doivent être reçus, stockés et utilisés au sein du service de médecine nucléaire par un radiopharmacien habilité à la manipulation des radioactifs, conformément au décret relatif aux pharmacies à usage intérieur (n° 2000-1316) et à l'arrêté du 1^{er} décembre 2003. L'utilisation de ces radioisotopes implique une organisation technique impliquant 3 services (médecine interne, radiologie et rhumatologie) et une formation à la radioprotection des patients pour tous les utilisateurs. Pour éviter que le médicament soluble ne diffuse en extra-articulaire, les radio-éléments sont présentés sur forme colloïdale d'une taille d'environ 10 nm ayant une affinité pour les synoviocytes. À l'opposé, des particules trop grosses peuvent provoquer une irradiation intra-articulaire non homogène. L'injection de tels produits se fait sous contrôle scopique ou échographique pour éviter les complications. Après injection, l'effet cytotoxique est obtenu par la nécrose radique des synoviocytes, la disparition des infiltrats cellulaires et

l'apparition progressive d'une fibrose de la synoviale avec parfois régénérescence d'une synoviale normale après environ trois mois. Le risque de toxicité sur les gonades notamment pour les synoviorthèses des hanches et des genoux impose d'éviter ces produits pour les sujets de moins de 45 ans et les enfants, sauf dans quelques indications exceptionnelles comme l'hémophilie.

PARTIE 5 : CIBLAGE D'UNE NOUVELLE MOLECULE POUR LA SYNOVIORTHESE

La complexité d'utilisation des médicaments radiopharmaceutiques a mené l'unité « *immunogénomique et inflammation* » à cibler des métaux comme nouvel élément toxique sur le pannus synovial. Les résultats présentés dans cette partie V proviennent d'une thèse de doctorat d'université précédente (Bonaventura P., (2012-2016))⁴³.

Le ciblage du métal a été réalisé en testant un mélange de plusieurs métaux sur des synoviocytes : indium, étain, plomb, bismuth, cuivre, cadmium et or. Le cadmium était préférentiellement absorbé par les synoviocytes en comparaison avec le zinc et les autres métaux. Cette absorption a été évaluée en déterminant des mesures cinétiques d'absorption (constante de diffusion K_D) de chaque métal entre les cellules et le milieu par l'utilisation d'un isotope naturel du zinc (^{70}Zn). L'absorption du cadmium a été augmentée en conditions inflammatoires (IL-17, TNF) via les transporteurs spécifiques du zinc (importateur ZIP-8) et a été stockée par les métallothionines.

Le zinc et le cadmium appartiennent au même groupe de métaux divalents (le groupe 12). Ces métaux sont étroitement liés par leurs propriétés chimiques, ainsi que par leurs homéostasies et leurs mécanismes d'induction du stress oxydatif sur les cellules mammifères. Toutefois, même si le zinc est connu pour être nécessaire pour le bon fonctionnement de la réponse immunitaire et de la prolifération cellulaire, le rôle du cadmium n'était pas clair

(induction de la prolifération cellulaire ou de l'apoptose)^{44 45}. Des études ont donc été menées par l'unité pour éclaircir l'effet du cadmium sur les fibroblastes.

Ainsi, il a été démontré qu'à une faible exposition de cadmium, la viabilité des synoviocytes et la production d'IL-6 diminuaient dans les cultures et les biopsies. A noter que la mort cellulaire des synoviocytes a été retardée en conditions non-inflammatoires. Cela est expliqué par l'absorption supérieure du cadmium en conditions inflammatoires. Par ailleurs, des co-cultures de synoviocytes et de cellules mononuclées de sang périphérique ont été utilisées pour reproduire les interactions cellulaires dans l'articulation synoviale. Les résultats ont montré que l'interaction des cellules a fourni, à elle seule, un micro-environnement pro-inflammatoire suffisant pour sensibiliser les synoviocytes à la mort cellulaire induite par le cadmium. L'apoptose des fibroblastes induite par les ions cadmium en conditions inflammatoires (cytokine IL-17, TNF) a été démontré par des essais *in vitro* avec l'annexine V. L'ajout de zinc à une solution contenant du cadmium a permis de démontrer l'effet protecteur et antagoniste du zinc sur les synoviocytes en diminuant la mort cellulaire et en restaurant la production d'IL-6.

Une évaluation *in vivo* a été réalisée par une injection intra-articulaire de cadmium dans une arthrite expérimentale induite par un adjuvant dans un modèle de rat Lewis. Le cadmium dissous dans une solution physiologique de NaCl à 0,9% a été injecté dans les chevilles du rat au stade de l'arthrite actif, au 14^{ème} jour, tandis qu'un groupe témoin a reçu une solution physiologique seule. Son efficacité a été évaluée d'une part par l'amélioration des scores cliniques tels que le périmètre de la cheville (figure 2), l'indice articulaire et l'indice de perte de mobilité (figure 3) et d'autre part par l'amélioration de la perte osseuse causée par l'inflammation visualisée par micro-tomographie à l'autopsie (figure 4). La présence de cadmium a été révélée dans le foie que pour la plus forte concentration (figure 5).

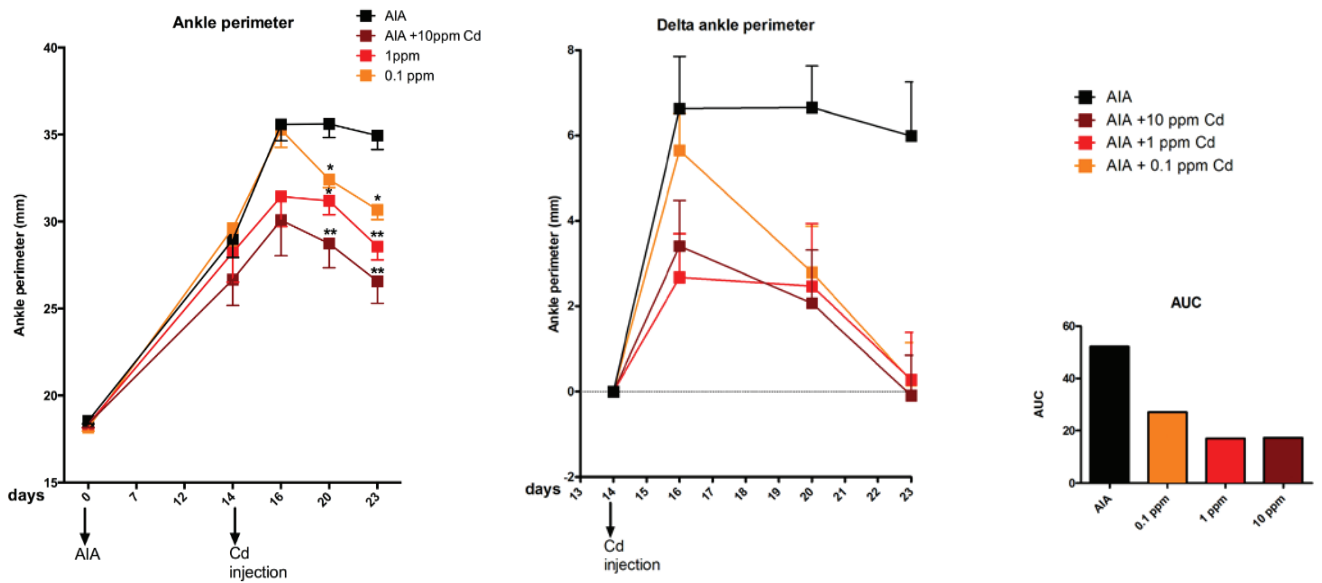


Figure 2 : Mesure des périmètres de chevilles de pattes postérieures de rat en fonction du temps après une injection unique de cadmium minéral⁴³.

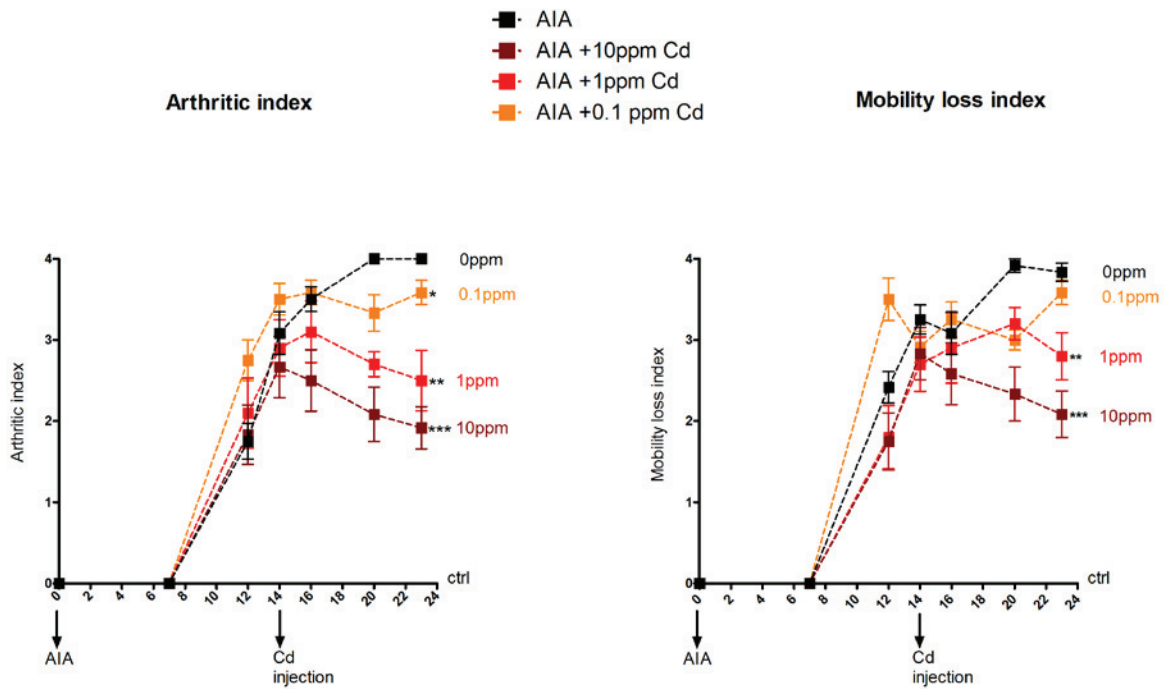


Figure 3 : Mesure de l'indice articulaire et des pertes de mobilité des pattes postérieures de rat en fonction du temps après une injection unique de cadmium minéral⁴³.

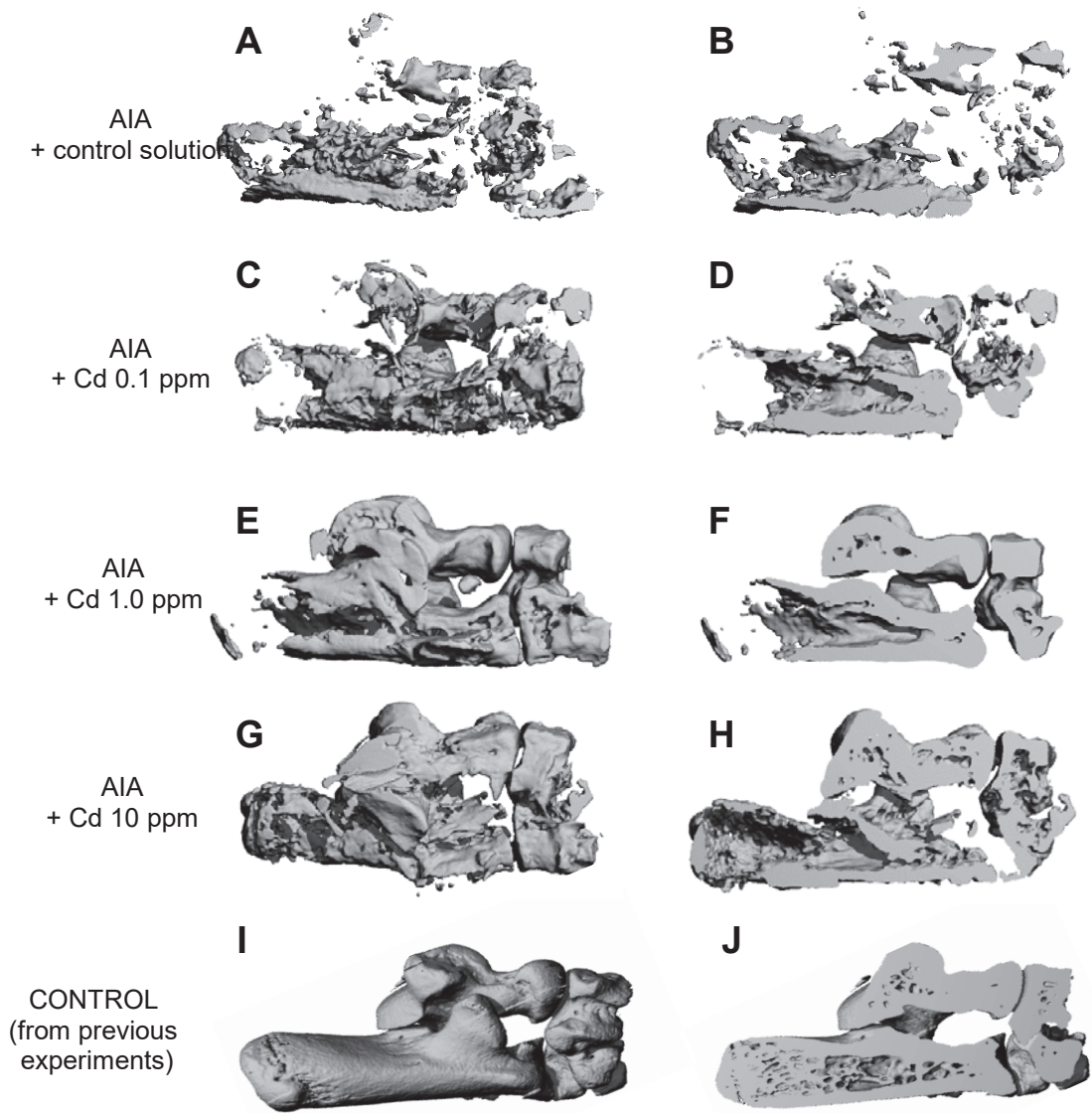


Figure 4 : Images 3D reconstruites après tomographie des os de la cheville de la patte postérieure du rat après une injection unique de cadmium minéral⁴³.

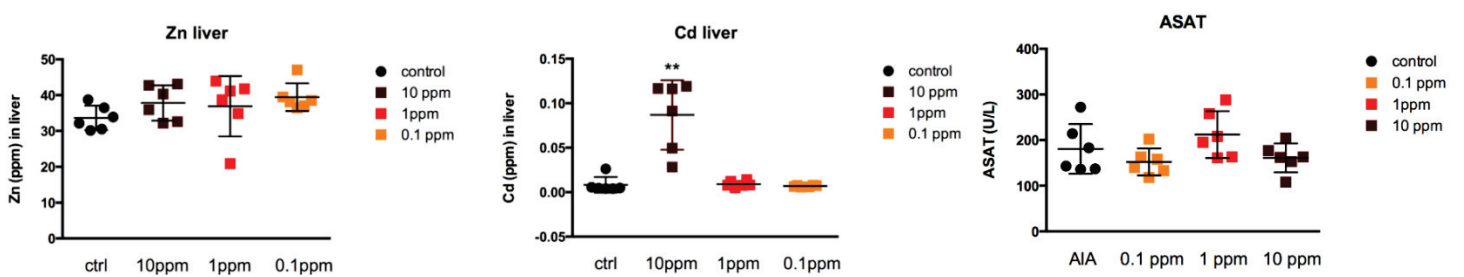


Figure 5 : Dosage du zinc, du cadmium et des ASAT dans le foie après une injection unique de cadmium minéral⁴³.

PARTIE 6 : OBJECTIFS DE L'ETUDE

Les objectifs principaux de ce travail étaient (i) de reproduire la toxicité du cadmium minéral avec une nanoparticule sous forme de cadmium complexé de taille plus importante, (ii) d'élaborer un concept d'un produit thérapeutique intra-articulaire et (iii) d'évaluer ce produit dans une étude pré-clinique.

Parmi les objectifs spécifiques, il y avait entre autres :

- (i) la caractérisation du type de mort cellulaire induit par le cadmium. En effet, la nouvelle thérapeutique ne devait pas induire une mort cellulaire par nécrose provoquant une inflammation, d'autant plus dans un contexte d'inflammation chronique.
- (ii) L'évaluation de l'absorption des nanoparticules dans un environnement inflammatoire et proche des conditions physiologiques en mimant l'environnement par co-culture.
- (iii) L'évaluation de l'impact physique de l'inflammation chronique sur les éléments sécrétés par les synoviocytes provenant de patients sains et de cas pathologiques pour un éventuel ajustement de la formulation.

L'ensemble du projet comme conçu initialement a été résumé dans les 2 organigrammes suivants (figure 6 et figure 7).

Partie 1

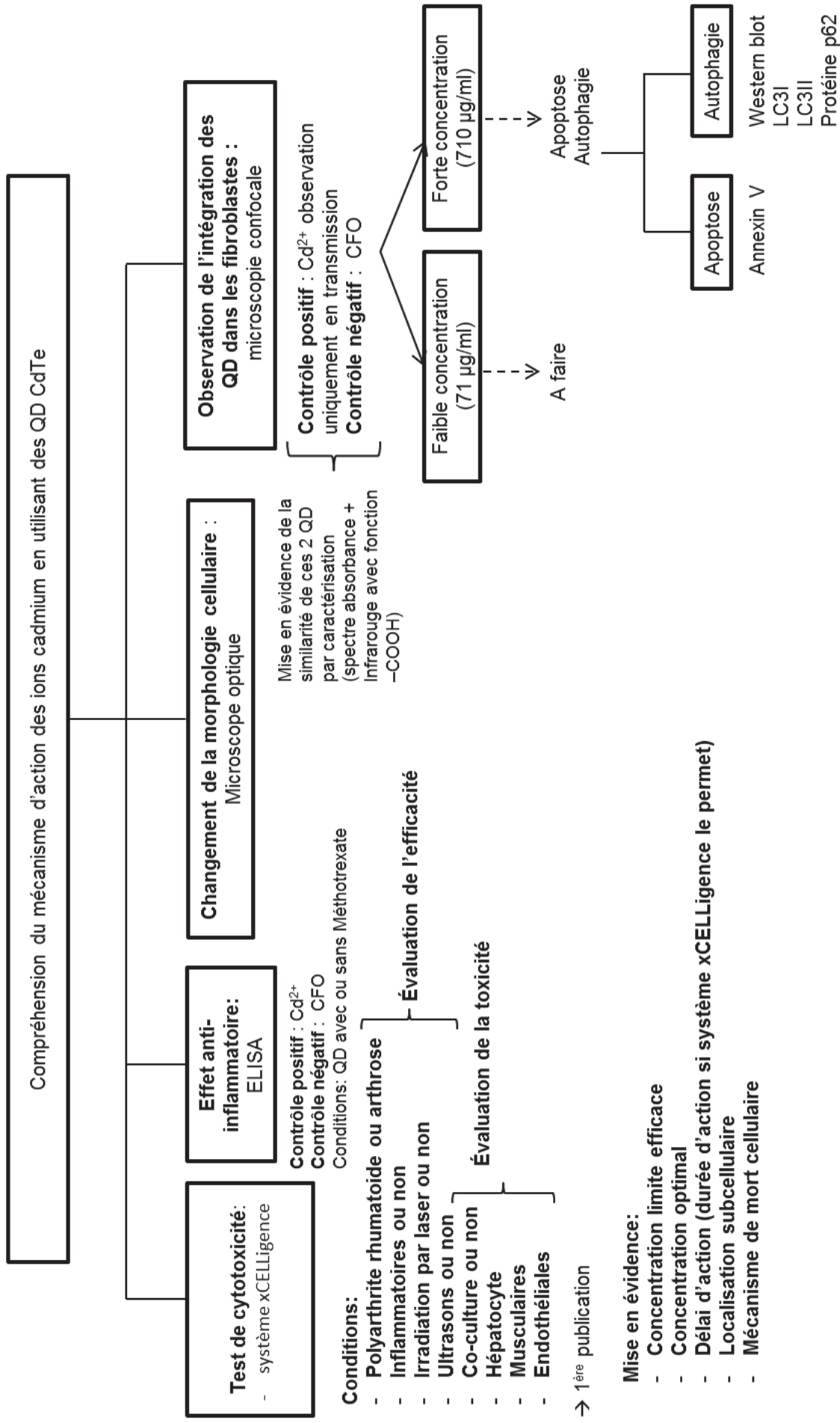


Figure 6 : Design du projet (partie 1)

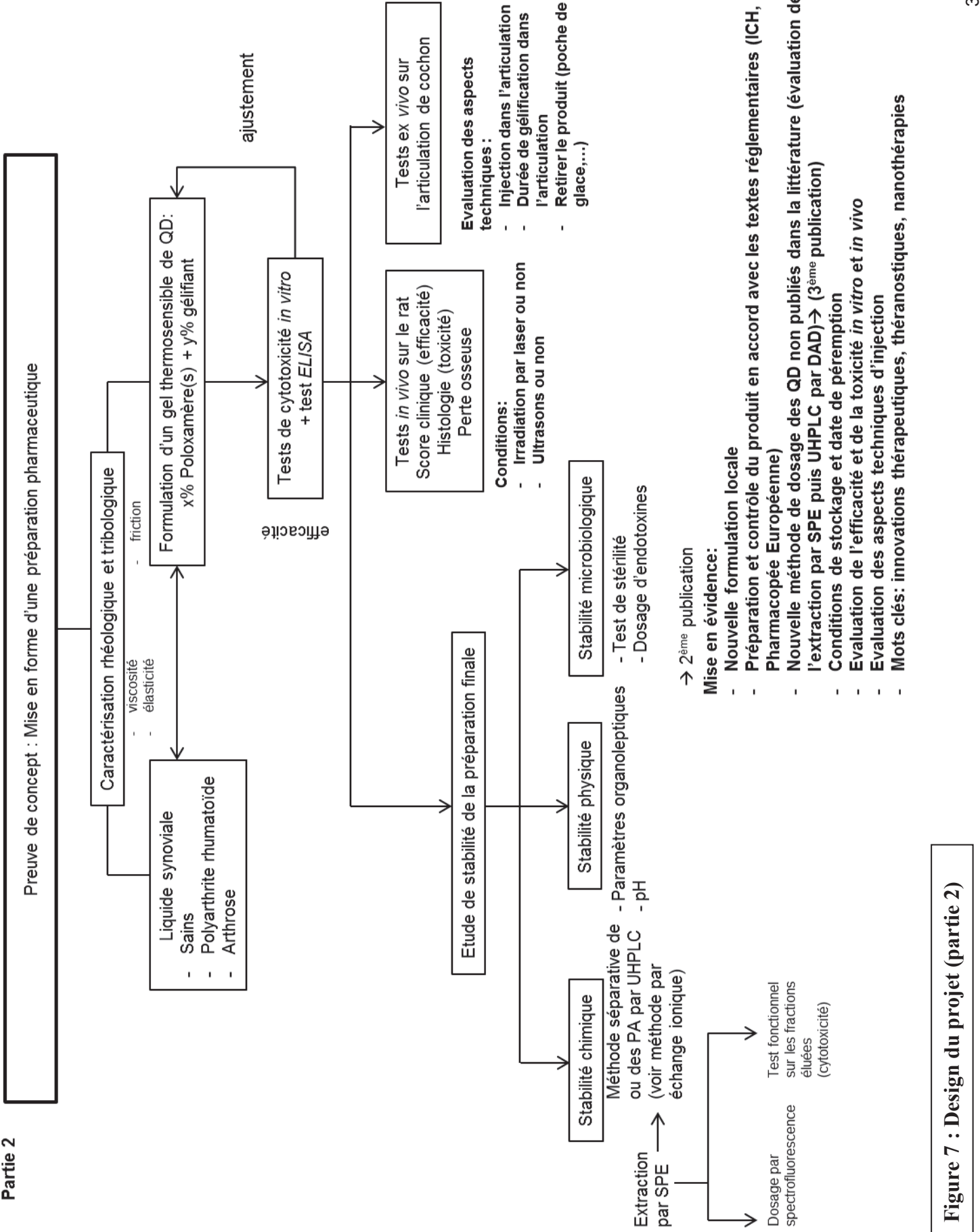


Figure 7 : Design du projet (partie 2)

*CHAPITRE 1 : REPRODUCTIBILITE ET CARACTERISATION DE LA TOXICITE DU
CADMIUM MINERAL AVEC UN NOUVEL OUTIL, QUANTUM DOTS DE TELLURE DE
CADMIUM (CdTe-QDs)*

Le développement de produits biologiques dans la pratique clinique quotidienne a été une étape importante dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (PR). Cependant, cette approche thérapeutique est appliquée à une sous-population de patients atteints de PR active. Pour les patients atteints de PR en phase chronique ou réfractaire, les traitements de fond et les produits biologiques sont souvent inefficaces. Comme expliqué dans la partie 3, les fibroblastes jouent un rôle crucial dans la pathogénèse des patients atteints de PR en phase chronique (principalement dans la phase de destruction ostéo-articulaire) pour lequel l'arsenal thérapeutique fait défaut. A la phase de destruction ostéo-articulaire, les fibroblastes sont modifiés par l'inflammation chronique et se traduit par un défaut d'apoptose. A des fins thérapeutiques, plusieurs métaux ont testé mettant en évidence une meilleure efficacité du cadmium sur l'apoptose de ces fibroblastes modifiés. Pour éviter la diffusion des ions cadmium en dehors de la cavité articulaire, un nouvel outil à base de cadmium et de dimensions plus grandes (2 – 6 nm), des quantum dots de tellure de cadmium, ont été utilisés dans cette partie. Comme indiqué précédemment, la dimension des particules intervient dans la diffusion. Il s'agit donc d'un critère primordial dans le choix de ce nouvel outil. Ces quantum dots de tellure de cadmium ont pour objectif d'améliorer les effets du cadmium. En d'autres termes, ces quantum dots doivent être capables de reproduire la toxicité du cadmium minéral^{46 47 48}. Les quantum dots présentent en plus le potentiel de fluorescence. Cette capacité de fluorescence est très avantageuse pour différents points (faciliter le suivi de la diffusion du produit dans l'articulation lors de la synoviorthèse chimique, intérêt pour une application théranostique). Ce potentiel de fluorescence était notamment utilisé pour comprendre le mécanisme d'intégration et d'action du cadmium minéral dans les synoviocytes.

1. PRINCIPE

Un quantum dot ou point quantique (QD) est un nanocristal en matériaux semi-conducteurs qui est suffisamment petit (tailles nanométriques) pour présenter des propriétés mécaniques quantiques. Les quantum dots ont une dimension zéro et correspondent à un point fixe. La dimension se réfère au nombre de degrés de liberté dans le mouvement des électrons. Dans un point quantique, l'électron est confiné dans les trois directions, réduisant ainsi les degrés de liberté à zéro^{49 50}. Le comportement des semi-conducteurs est décrit par la théorie de la bande. Ce modèle stipule qu'un électron dans un solide peut prendre des valeurs d'énergie que dans certains intervalles appelés «bandes», plus précisément, des "bandes permises" qui sont séparés par des "bandes interdites". Deux bandes d'énergie permises jouent un rôle particulier: la "bande de valence» et la "bande de conduction". La bande de valence est complètement remplie par des électrons. La bande de conduction, quant à elle, est soit vide (pour des températures proches du zéro absolu dans un semi-conducteur) ou semi-remplie avec des électrons (comme dans le cas des métaux). Dans les conducteurs (métaux), la bande de conduction et la bande de valence se chevauchent. Ainsi, les électrons peuvent passer de la bande valence à la bande de conduction et circulent dans tout le solide. Dans un semi-conducteur et un isolant, ces deux bandes sont séparées par un intervalle. La seule différence entre un semi-conducteur et un isolant est la largeur de la bande interdite. Cette largeur attribue à chacun leurs propriétés respectives. La paire d'électrons-trous créé est appelée un exciton et se caractérise par le rayon de Bohr (R_b) de l'exciton, correspondant à la distance entre les deux porteurs de charge de la quasi-particule^{50 51}. Les deux porteurs de charge peuvent se déplacer indépendamment les uns des autres, en raison de l'interaction de

Coulomb, et sont toujours associés à un exciton. Les matériaux massifs ont toujours un diamètre plus grand que le rayon de Bohr. En revanche, dans le cas plus spécifique de quantum dots, le diamètre des particules est inférieur au rayon de Bohr. Le mouvement des porteurs de charge est alors limité et une position dite de confinement quantique est observée⁵². Dans un isolant, cette valeur est si élevée que les électrons ne peuvent pas passer de la bande de valence à la bande de conduction: les électrons ne traversent pas le solide. Dans les semi-conducteurs, cette valeur est plus faible. Si cette énergie est apportée aux électrons, par exemple en chauffant le matériau, ou en appliquant un champ électromagnétique, ou dans certains cas par l'éclairage, les électrons sont alors en mesure de se déplacer à partir de la bande de valence à la bande de conduction, et de circuler à travers le matériel⁵³. Une autre caractéristique des QDs est que la bande interdite d'énergie augmente avec la diminution de la taille des QDs. Les spectres d'émission et d'absorption du QD correspondent à cette bande d'énergie⁵⁴. La résolution des pics dépend essentiellement de la dispersion en taille des nanocristaux. De ce fait, les QDs possèdent des propriétés de fluorescence particulièrement intéressantes⁵⁵. En effet, la longueur d'onde de fluorescence dépend fortement de la taille de la particule et du matériau. Ces quantum dots peuvent être excités dans une large gamme de longueurs d'onde en dessous de la longueur d'onde de fluorescence, et fluorescent sans photoblanchiment par rapport aux fluorophores organiques usuels. Leur rendement quantique peut atteindre 80-90%. Il est donc possible d'observer plusieurs QDs émettant à des couleurs différentes en excitant à la même longueur d'onde. La couleur d'une dispersion colloïdale de nanocristaux observée en lumière visible est déterminée par le spectre d'absorption. Le spectre de fluorescence présente, lui, une raie fine et symétrique⁵⁵.

2. STRUCTURE ET CRISTALLISATION DES QUANTUM DOTS

Les QDs sont synthétisés par voie chimique et sont obtenus sous forme colloïdale. Ceux-ci sont composés d'un grand nombre d'atomes de l'ordre de plusieurs dizaines de milliers, dont une fraction importante est en surface d'autant plus que le nanocrystal est petit. Le quantum est un ensemble de nanocristaux semi-conducteurs et de ligands organiques qui passivent partiellement la surface pour conserver les propriétés optiques (ce qui évite le photoblanchiment), assure sa stabilisation et empêche son agrégation. Les quantum dots les plus couramment utilisés, notamment pour les applications biologiques, proviennent du groupe II-VI des éléments du tableau périodique (CdS, CdSe, CdTe, ZnO, ZnS, ZnSe) et du groupe III-V (InP, InAs, GaN, GaP, GaAs), ainsi que les groupes IV-VI (PbS, PbSe, PbTe), I-VII (CuCl), V-VI (Bi_2Te_3) et II-V (Cd_3As_2 , Zn_3P_2 , Zn_3As_2)⁵⁴. Un cristal est un matériau qui a un arrangement ordonné et périodique des atomes dans un espace tridimensionnel. Une structure cristalline est composée d'un motif, un ensemble d'atomes disposés d'une manière spécifique, et d'un réseau. Le réseau cristallin est constitué par la répétition périodique dans les 3 dimensions de l'espace d'un motif atomique ou moléculaire. Les longueurs axiales (longueurs des arêtes de la maille le long de ses axes principaux) sont généralement désignées par a, b et c et les angles inter-axiaux sont généralement désignés par alpha (α), bêta (β) et gamma (γ). les longueurs des arêtes le long de tous les axes peuvent être tous égales ($a = b = c$), de sorte qu'une seule constante de réseau est utilisée pour sa description dimensionnelle (a) comme dans la structure zinc blende « cubique » ou certaines leurs longueurs peuvent différer comme pour la structure wurtzite « hexagonale » où $a = b \neq c$ ^{54 56}. L'empilement de ces deux structures varie : la structure zinc blende est de type ABCABC, alors que la structure wurtzite est de type ABABAB. La différence d'énergie entre les deux structures est très faible. La structure zinc blende est stable à basse température alors que la structure wurtzite est plus stable à température élevée^{56 57}. Dans les matériaux II-VI, les liaisons atomiques ne

sont pas simplement covalentes comme dans le silicium. Elles reposent sur le transfert d'électrons des atomes du groupe VI sur ceux du groupe II. Dans le cas du tellure de cadmium, le tellure possède six électrons périphériques et le cadmium deux. Dans le cristal, chaque atome de tellure est entouré de quatre atomes de cadmium, et chaque atome de cadmium est entouré de deux atomes de tellure. Il se produit alors un échange d'électrons, et le cristal se construit avec les ions Cd^{2+} et Te^{2-} , qui ont tous quatre électrons périphériques. Cette répartition est à l'origine du caractère partiellement ionique et partiellement covalent des liaisons (semi-conducteurs polaires), qui sont orientées dans l'espace suivant les axes de symétrie d'un tétraèdre régulier. A noter que les changements dans les paramètres de maille modifient les distances inter-atomiques intrinsèques, et les niveaux d'énergie de liaison des électrons. Dans un semi-conducteur cristallin, ces déformations changent de manière significative les propriétés électroniques et optiques telles que l'absorption et d'émission.

La stabilité colloïdale des QDs est déterminée par l'interaction entre les particules et les conditions internes du système (telles que la méthode de préparation, la présence d'additifs ou de polymères, la concentration de composé) ainsi que par la structure du composé constituant le quantum dots (figure 8). Les principaux mécanismes de stabilisation sont la stabilisation électrostatique, la stabilisation stérique et la stabilité par la molécule elle-même décrit dans le paragraphe précédent ⁵⁸. La stabilité électrostatique est expliquée par le résultat de la somme des interactions du type van der Waals et les forces de répulsion électrostatiques qui doivent être dominantes. Cette stabilité est évaluée par le potentiel zêta qui est la valeur de la charge de surface (potentiel électrique au niveau de la surface du plan de cisaillement) s'appelle le potentiel zêta. Les particules qui possèdent un potentiel zêta compris entre 30 et 50 mV (en valeur absolue) sont considérées comme des particules stables. L'ajout de macromolécules organiques (comme les polymères, les copolymères ...) favorisent la répulsion entre les

PARTIE 2 : Comparaison et caractérisation de la toxicité du cadmium minéral et des CdTe-QDs

Afin d'observer et de comprendre le mécanisme d'action du cadmium minéral dans les synoviocytes, un suivi du cadmium et de la morphologie du synoviocytes ont été réalisés en utilisant les capacités fluorescentes des QDs de tellure de cadmium (CdTe-QDs). L'emploi de plusieurs techniques d'imagerie a apporté une complémentarité dans les résultats (microscopie confocale, microscopie électronique à transmission, microscopie digitale holographique et microscopie holographique et tomographique). Ces CdTe-QDs hydrophiles (fonction -COOH à leur surface) a permis de tracer l'intégration du cadmium dans la cellule et de déterminer le type de mort cellulaire complexe induit en présence de cadmium (*i.e.*, la combinaison de l'apoptose et de l'autophagie). L'utilisation d'un quantum dot contrôlé (fluorure de carbone CFO-QDs) non cytotoxique a permis de confirmer la provenance de l'effet cytotoxique du cadmium et non un effet « cargo » provenant de la nanoparticule. L'emploi de ces CdTe-QDs en vue de ces objectifs a mis en évidence une nouvelle application des QDs dans la caractérisation de la mort cellulaire qui a fait l'objet d'un article qui a été accepté dans le journal Scientific Reports.

Résumé :

Introduction :

La caractérisation de la mort cellulaire nécessite actuellement l'utilisation de marqueurs indirects, ce qui a largement limité la capacité de surveiller les processus de mort cellulaire à l'intérieur de la cellule. Ces méthodes conventionnelles ne permettent pas une identification concomitante des molécules cytotoxiques et la caractérisation de plusieurs types de processus de mort cellulaire. Plusieurs types de mort cellulaire ont été décrits, qui diffèrent par leurs morphologies. Ainsi, trois processus morphologiquement distincts ont été décrits. L'apoptose se produit dans des conditions physiologiques normales par des signaux de suicides spécifiques. Morphologiquement, on observe principalement un arrondissement de la cellule, une condensation de la chromatine, une modification mineure des organites cytoplasmiques et l'observation de bulles caractéristiques. La nécrose est une mort cellulaire pathologique qui provoque une réaction inflammatoire. Morphologiquement, on observe principalement un gonflement cytoplasmique, une rupture de la membrane plasmique et un gonflement des organites cytoplasmiques. La mort cellulaire autophagique implique une augmentation de vacuoles autophagiques qui contribue à la mort cellulaire.

Méthodes :

Dans cet article, nous nous basons uniquement sur une étude descriptive de la structure cellulaire. Historiquement, la découverte de l'apoptose par Kerr *et al.* en 1972¹⁵¹ a été faite en observant des modifications structurelles en microscope électronique. Le mécanisme apoptotique a été décrit en se basant sur ces observations rapportées comme une preuve à part entière et un paradigme explicatif. En outre, une étude a montré l'importance des critères morphologiques pour éviter la classification erronée du type de mort cellulaire. Ainsi, il a été constaté que le phénotype annexine V+ / PI- n'était pas spécifique des cellules apoptotiques

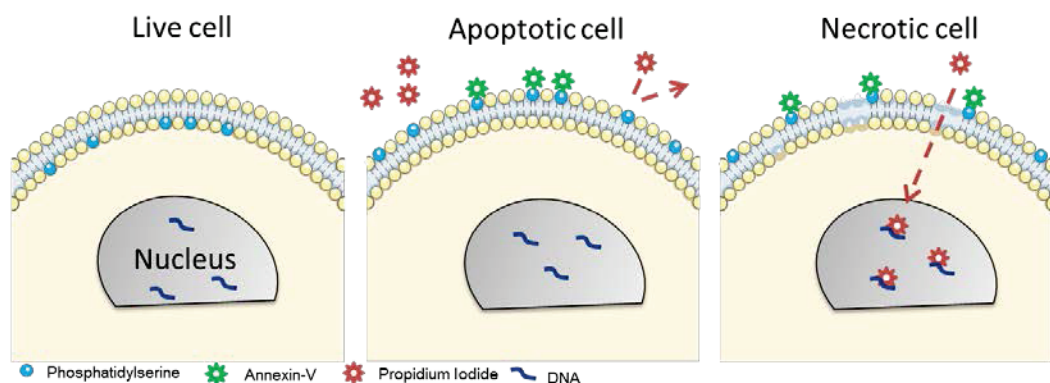
précoces (figure 9) et que la différenciation de l'apoptose et de l'oncose était vérifiée par des critères morphologiques (microscopie holographique) couplés à une détection de fluorescence (annexine V / iodure de propidium)¹⁵².

Les observations obtenues avec l'imagerie QDs ont été confirmés en concomitance par les techniques morphologiques habituellement utilisées. L'apoptose a été confirmée par microscope holographique digital, par un marquage à l'annexine V (figure 9) et par microscopie électronique. La mort cellulaire autophagique a été caractérisée par la coloration à la monodansylcadavérine et la microscopie électronique. La nécrose a été caractérisée par la coloration à l'iodure de propidium (figure 9) et la microscopie électronique.

MATERIALS & METHODS

Annexin V-fluorescein isothiocyanate conjugated with propidium iodide staining.

Principle:



Operating mode:

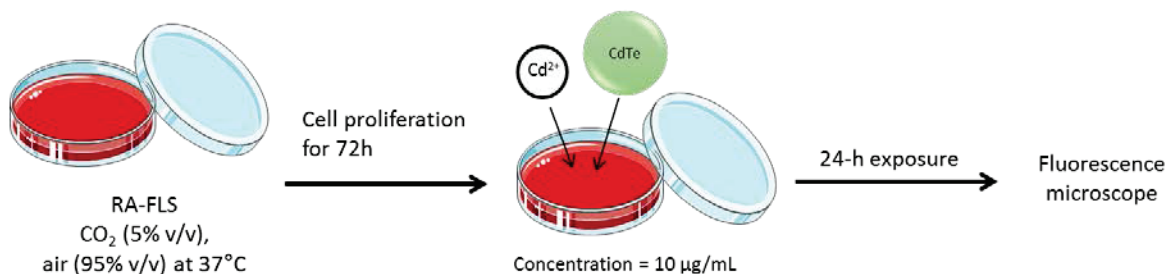


Figure 9 : Principe du marquage à l'annexine V et l'iodure de propidium : Les phospholipides de la membrane cellulaire sont répartis asymétriquement entre la partie interne et des feuillettes externes de la membrane. La phosphatidylcholine et la sphingomyéline sont

exposées sur la feuille externe de la bicouche lipidique, tandis que la phosphatidylsérine est située sur la surface interne. Pendant l'apoptose, cette asymétrie est perturbée et la phosphatidylsérine est exposée à la surface extérieure de la membrane plasmique. L'annexine V de la protéine anticoagulante se lie avec une forte affinité à la phosphatidylsérine. A la phase tardive de l'apoptose, les cellules commencent à perdre l'intégrité de leur membrane et permettent à l'iodure de propidium (qui est un colorant imperméable aux cellules) de passer et de colorer les ADN.

Principe du marquage au monodansylcadavérine (MDC) :

De nombreuses études ont utilisé la monodansylcadavérine, un composé lysosomotrope, pour évaluer l'induction de l'autophagie en observant l'accumulation de vacuoles autophagiques, sans refléter la maturation autophagosomale. Le marquage des vacuoles autophagiques par MDC a été étudié et démontré. Ainsi, le MDC ne s'accumule que dans des vacuoles autophagiques déjà fusionnées avec des lysosomes, un compartiment acide par piégeage d'ions (Bampton et al., 2005)¹⁵³. Le MDC n'est pas présent dans les endosomes précoces et tardifs (Biederbick, A., et al. ., 1995)¹⁵⁴. Cependant, il a été démontré que le MDC peut agir dans des conditions non acides en s'intercalant dans la membrane lipidique de la vacuole autophagique selon le type de cellule (Niemann, A., et al., 2000; Vazquez, CL et al., 2009)^{155,156}.

Résultats :

Dans cette étude, nous avons principalement adopté une approche sémiotique (observation des changements visuels entre les cellules témoins et traitées), ce qui a permis de définir temporellement la trajectoire de Cd²⁺ dans la cellule grâce au continuum de la visualisation. Plus précisément, la commutation entre les différents domaines visuels obtenus par ces

différentes techniques microscopiques a révélé la conséquence de cet élément dans la cellule, en particulier dans le le noyau. Cette conceptualisation a également permis de mettre en évidence l'incapacité de la cellule à se protéger d'éléments tels que le Cd²⁺ ou les particules à base de Cd²⁺, activant de manière néfaste la voie endocytosique et conduisant à un échec de la protection cellulaire. Enfin, l'utilisation de CdTe-QDs en tant qu'outil de visualisation de Cd²⁺ en temps réel a démontré l'induction d'un processus complexe de mort cellulaire combinant à la fois l'apoptose et l'autophagie, qui s'est produit dans un ordre bien défini (figures 10 et 11). Initialement, un effet anti-prolifératif similaire a été observé avec entre 10 µg/ml de Cd²⁺ et de CdTe-QDs à 24 h (le ratio indice cellulaire / densité cellulaire a diminué de 0,6 à -16,6 , p < 0,05). L'apoptose a été confirmée par la quantification des paramètres morphologiques (surface réduite, augmentation de l'épaisseur des cellules) et le marquage positif à l'annexine V. Cela a été confirmé en comparant les images prises par un agent cytotoxique connu pour induire l'apoptose (bortézomib)¹⁵⁷ et les images prises par CdTe-QDs. Ces images réalisées montrent clairement une apoptose similaire à celle observée lors d'une exposition par CdTe-QDs. Deuxièmement, nous avons également observé les signes d'apoptose avec un autre agent connu pour induire l'apoptose sur un autre type de cellules (cellules pancréatiques)¹⁵⁸. Nous avons retrouvé les mêmes signes apoptotiques entre le CdTe-QDs et la ciclosporine. L'autophagie a été confirmée par coloration à la monodansylcadavérine, identifiant des vacuoles autophagiques similaires avec Cd²⁺ et CdTe-QDs. L'aspect morphologique des vacuoles autophagiques a été confirmé avec un agent inducteur de l'autophagie connu, de manière dépendante de l'AMPK (la metformine) en retrouvant les mêmes signes d'autophagie après 1 heure d'exposition aux CdTe-QDs. De plus, l'imagerie par QDs a permis de visualiser les éléments de cadmium dans les structures cellulaires et leurs modifications cinétiques conduisant à la mort cellulaire. Les caractéristiques de mort cellulaire étaient similaires dans les environnements inflammatoires et non inflammatoires, mais ont été induites précocement jusqu'à 4 h plus tôt.

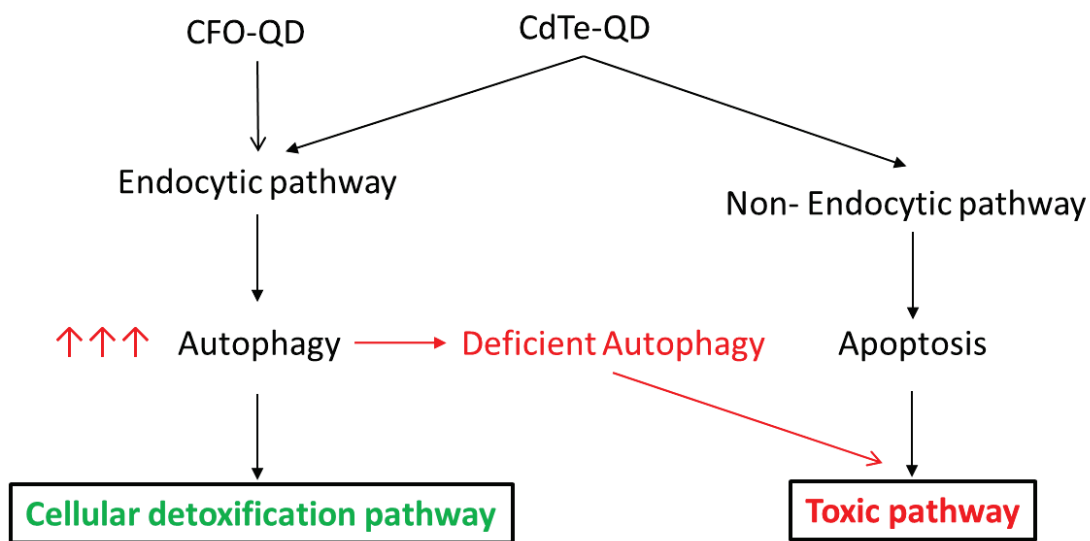


Figure 10 : Caractérisation de la mort cellulaire induite par le cadmium.

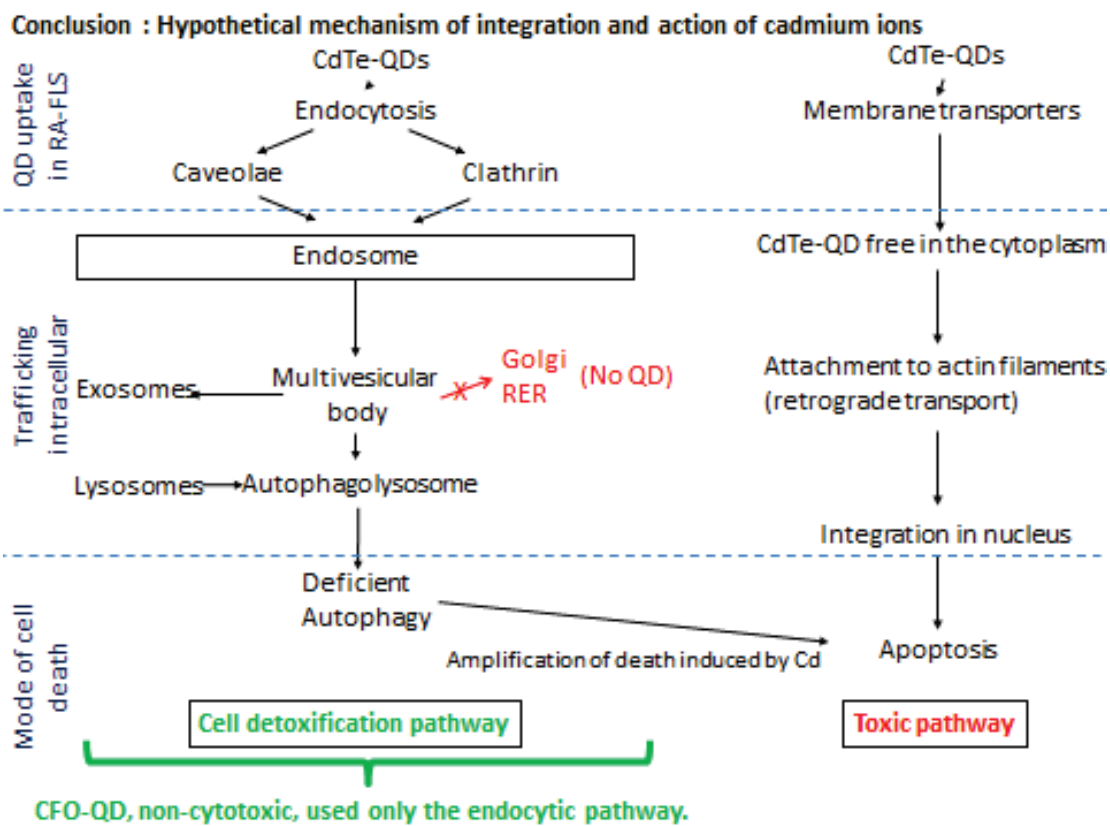


Figure 11 : Traffic intracellulaire du cadmium.

Conclusion

En conclusion, par rapport aux méthodes conventionnelles, l'utilisation de CdTe-QDs a permis la visualisation directe et simultanée de différents types de mort cellulaire. La caractérisation en direct de la mort cellulaire a montré que l'absorption de CdTe-QDs par les voies endocytosiques et non endocytosiques conduisait simultanément à l'apoptose (avec condensation de la chromatine et corps apoptotiques détectables) et à l'autophagie (basée sur l'observation de vacuoles autophagiques contenant des CdTe-QDs). Par conséquent, l'imagerie en direct d'un agent cytotoxique visible a des applications utiles qui ne sont actuellement pas possible avec les méthodes indirectes, notamment la surveillance chronologique de la mort cellulaire. Cette méthode a des applications potentiellement utiles, notamment la surveillance des modifications cinétiques associées aux processus de mort cellulaire sur d'autres types de cellules, par l'étude du déséquilibre homéostatique des métaux essentiels par d'autres métaux ou par une combinaison de différents métaux sur différents types de cellules. À l'avenir, dans le cas spécifique de Cd²⁺, les CdTe-QDs peuvent être utilisés dans des modèles animaux pour étudier la propagation de Cd²⁺ et définir les effets cytotoxiques des QDs basés sur Cd²⁺ dans différents types de cellules en vue d'une application clinique.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Live-stream characterization of cadmium-induced cell death using visible CdTe-QDs

Samira Filali^{1,2}, Alain Geloën³, Vladimir Lysenko⁴, Fabrice Pirot² & Pierre Miossec¹

Characterization of cell death currently requires the use of indirect markers, which has largely limited the ability to monitor cell death processes inside the cell. Here, we introduce a new method for the characterization of cell death mechanisms using cadmium telluride quantum dots (CdTe-QDs). Using visible CdTe-QDs with mesenchymal cells (e.g. synoviocytes), live-stream imaging allowed for visualization of cadmium-induced cell death, combining characteristics of apoptosis and autophagy. Initially, similar anti-proliferative effect was observed between 10 µg/ml Cd²⁺ and CdTe-QDs at 24 h (cell index/cell density ratio decreased from 0.6 to -16.6, $p < 0.05$) using techniques that do not require the capacity of CdTe-QDs. Apoptosis was confirmed by the quantification of morphological parameters (reduced surface area, increased cell thickness) and positive labeling with annexin V. Autophagy was confirmed by monodansylcadaverine staining, identifying similar autophagic vacuoles with both Cd²⁺ and CdTe-QD. However, QD imaging allowed for visualization of cadmium elements inside cell structures and their kinetic changes leading to cell death. Cell death characteristics were similar in inflammatory and non-inflammatory environment but were induced up to 4 h earlier in the former. Therefore, live-stream imaging of a visible cytotoxic agent has useful applications not currently possible with indirect methods, including chronological monitoring of cell death.

Characterization of various types of cell death (e.g., apoptosis, necrosis, autophagy) currently requires the use of indirect markers^{1,2} and a combination of different assays (e.g., morphological, immunohistochemical, biochemical, and molecular methods); however, it is not possible to directly investigate the intracellular events leading to cell death. Moreover, these methods are often tedious, time-consuming, and expensive, and do not allow for concomitant identification of the cytotoxic molecules and the process of cell death. The development of each new cytotoxic molecule necessarily requires characterization of cell death. In response to different stimuli induced by these cytotoxic molecules, several types of cell death can be considered: (1) apoptosis, which is characterized by a controlled process of cellular dismantling under non-inflammatory conditions; (2) necrosis, which can be described as an “accidental” process that causes an inflammatory reaction; and (3) autophagic cell death, which involves an increase in autophagy that contributes to cell death under intense metabolic stress¹. In the present study, we aimed to use a visible compound for simultaneously inducing and characterizing cell death in real-time.

Mesenchymal cells such as macrophages, endothelial cells, and fibroblasts play crucial roles in chronic inflammatory disease by interacting synergistically with activated immune cells recruited to the injury site, leading to their inappropriate survival and accumulation. In the present study, we focused on mesenchymal cells from an inflamed joint (synoviocytes) as a cellular model, which are known to exhibit defects in apoptosis³. Homeostasis of metal ions is required in several biological processes, including cell viability. Thus, to overcome this apoptosis resistance, homeostasis of essential metals (e.g., calcium, iron, and zinc) can be disturbed by non-biological elements such cadmium. Indeed, the intra-articular administration of low-dose mineral cadmium (Cd²⁺) was previously shown to induce massive cell death in synoviocytes and protect against joint destruction in an animal model^{4,5}. Moreover, Cd²⁺-based quantum dots (QDs) induce cellular cytotoxicity *in vitro*^{6–11}. QDs are

¹Immunogenomics and Inflammation Research Unit EA 4130, Department of Immunology and Rheumatology, Edouard Herriot Hospital, Hospices Civils de Lyon, University of Lyon, Lyon, France. ²Laboratory of Research and Development of Industrial Galenic Pharmacy and Laboratory of Tissue Biology and Therapeutic Engineering UMR-CNRS 5305, Pharmacy Department, FRIPHARM Platform, Edouard Herriot Hospital, Hospices Civils de Lyon, University of Lyon, Lyon, France. ³CarMeN laboratory, INRA UMR1397, INSERM U1060, INSA Lyon, University of Lyon, Lyon, France. ⁴Nanotechnology Institute of Lyon, UMR-CNRS 5270, INSA Lyon, University of Lyon, Lyon, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to P.M. (email: pierre.miossec@univ-lyon1.fr)

1–10-nm-diameter⁷ nanocrystals¹² that emit intense fluorescence without photobleaching^{13,14}. The remarkable properties of QD make them particularly advantageous for monitoring in photonic and electronic imaging, notably owing to their ability of fluorescence emission in the visible wavelength range and their relatively high density, which strongly depends on the size and materials of the particles. In the present study, cadmium telluride quantum dots (CdTe-QDs) were used to directly visualize the events leading to the cell death of synoviocytes in real-time.

Results

Satisfactory reproducibility of cell death between Cd²⁺ and CdTe-QDs. The proliferation of synoviocytes treated with QDs was evaluated qualitatively by imaging and quantitatively by cell impedance-based kinetics, enabling a real-time detection of cell death. For both Cd²⁺ and CdTe-QDs, a dose-response assay by imaging determined that a 10 µg/mL concentration induced a complete inhibition of synoviocyte proliferation at 24 hours and a lethal effect at 72 hours (Supplementary Figs 1 and 2). The cellular morphology and proliferation of synoviocytes treated with the negative control non-cytotoxic carbon fluoroxide quantum dots (CFO-QDs) were unchanged. Those indicated that an anti-proliferative effect was similar between Cd²⁺ and CdTe-QDs.

Imaging of CdTe-QDs-induced apoptosis. We characterized apoptosis with different methods (digital holographic microscopy, Annexin V staining, electron microscopy), and the results were compared to those obtained through QD imaging. Digital holographic microscopy showed significant changes in cell morphology at 24 h, including a significant decrease in surface area (mean ± standard error of the mean (SEM): 425 ± 35 µm² vs. 1008 ± 80 µm², $p < 0.05$) and a significant increase in cell thickness (mean ± SEM: 3.90 ± 0.26 µm vs. 1.56 ± 0.10 µm, $p < 0.05$), indicative of apoptosis (Supplementary Video 1, Fig. 1a). Classical Annexin V staining of fixed cells confirmed the induction of apoptosis by revealing phosphatidylserine labeling with both Cd²⁺ and CdTe-QDs (Fig. 1b). Moreover, Hoechst blue staining was used to confirm chromatin condensation (data not shown).

Qualitative and quantitative analysis of apoptosis by QD imaging was characterized by fluorescence and confocal microscopy. Wide-field merged images obtained by fluorescence microscopy after 24 h clearly demonstrated the rounding and shrinking of cells in the presence of CdTe-QDs, which were not detected with the negative control non-cytotoxic CFO-QDs, and significantly greater fluorescent signals inside synoviocytes were displayed in both groups treated with QDs compared to untreated cells (mean ± SEM: CdTe-QDs: 57.4 ± 3.2 A.U., CFO-QDs: 20.1 ± 1.4 A.U., untreated: 2.2 ± 3.3 A.U., $p < 0.01$, Fig. 2a,b). Powerful magnification images obtained by confocal microscopy demonstrated distinct labeling between CdTe-QDs and CFO-QDs. For CdTe-QDs, filamentous labeling was visible in the cytoplasm for up to 6 h. Surprisingly, naked CdTe-QDs with -COOH functional groups showed the cytoskeletal organization of the cell (Fig. 3a). Beyond 24 h, CdTe-QDs labeling showed condensed chromatin (Fig. 3a). The QD volume per nucleus, measured by tomographic holographic microscopy, was significantly greater compared to that of untreated cells (mean ± SEM; CdTe-QDs: 155 ± 49 µm³, CFO-QD: 180 ± 20 µm³, untreated: 23 ± 9 µm³, $p < 0.05$, Fig. 2c,d). A clear morphological change (Figs 2a and 3a–d, Supplementary Video 2) was observed, with the disappearance of intra-nuclear components in approximately half of the cells and the presence of apoptotic bodies was evident. For CFO-QDs, no characteristic labeling of apoptosis was displayed.

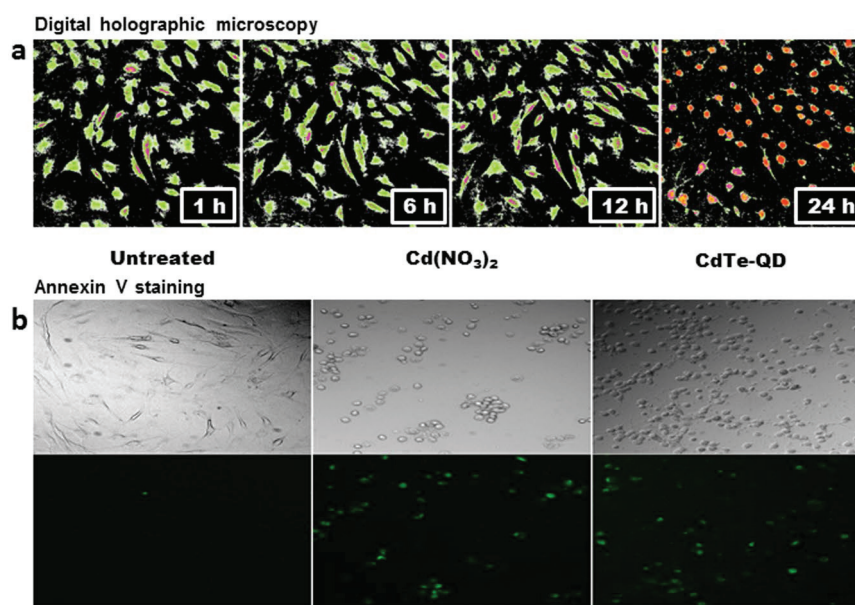
To analyze the mechanism of cell death induced by CdTe-QDs, cytoplasmic CdTe-QDs uptake by direct transfer was observed by electron microscopy. Most of the CdTe-QDs preferentially bound to actin filaments, but not to the microtubules or intermediate filaments. At 24 h, heterochromatin was not clearly distinguishable from the nuclear membrane of untreated cells, while massive condensation of heterochromatin encrusted with CdTe-QDs was observed (Supplementary Fig. 3). These findings demonstrated that the discrimination, development, and monitoring of apoptosis characteristics are feasible using QD imaging.

Imaging of CdTe-QDs-induced autophagy. The possible contribution of autophagy was concomitantly detected and investigated. Autophagic cell death was characterized with different methods (monodansylcadaverine [MDC] staining, electron microscopy) and compared with the findings obtained through QD imaging. MDC staining showed autophagic flux, with an increase of autophagic vacuoles in the presence of Cd²⁺ and CdTe-QDs (Fig. 1c). Confocal microscopy showed labeling of the cytoplasmic vesicles with CdTe-QDs from the first hour and until 72 h in addition to the filamentous labeling described above. Conversely, CFO-QDs could only label the vesicular regions. The vesicles were heavily loaded with CFO-QDs, and were specifically located in the perinuclear region from the first hour and until 72 h. After 24 h, intense vacuolization of a larger diameter was detected near the nucleus in the presence of CdTe-QDs.

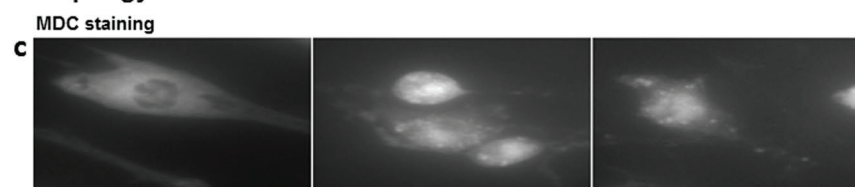
The mechanism of autophagic cell death induced by CdTe-QDs was examined using electron microscopy. CdTe-QDs entered either via clathrin-coated vesicles that were morphologically recognizable by their protein coats, or by caveolin vesicles formed from lipid rafts. After 6 h of exposure, many multi-vesicular bodies containing CdTe-QDs were observed, which were either expelled by exosomes or up taken by auto-phago-lysosomes for their degradation. An increase in autophagic vacuoles containing QDs was also observed (Supplementary Fig. 3). Therefore, monitoring the progress of endocytic vesicle formation was feasible using QD imaging.

Imaging of lack of evidence of necrosis. Although no signs of necrosis were identified in the previous tests, it was also evaluated using different methods (propidium iodide staining, electron microscopy, and QD imaging). Propidium iodide did not reveal cell death by necrosis (Fig. 1d). Electron microscopy did not reveal cellular or mitochondrial swelling, broken lysosomes, or damage to the cell membrane. These results provide strong arguments for confirming the absence of necrosis.

Apoptosis



Autophagy



Necrosis

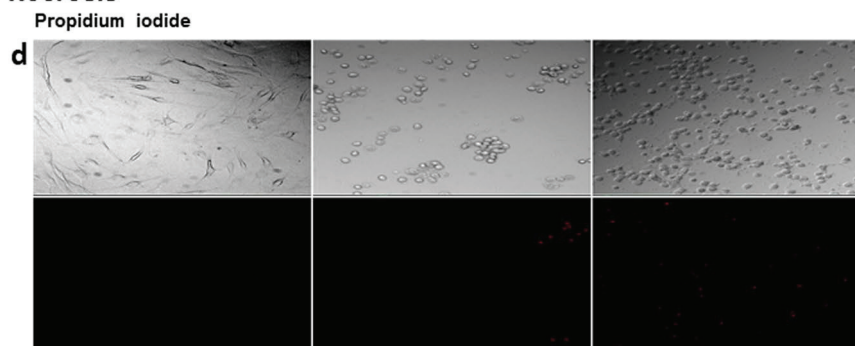


Figure 1. Cell death imaging using conventional methods. **(a)** Digital holograms of synoviocytes treated with CdTe-QDs (λ_{ex} : 510 nm) for 1, 6, 12, and 24 hours. Fluorescence micrographs of cells left untreated or treated with Cd(NO₃)₂ or CdTe-QDs (10 μ g/mL) for 24 hours stained by **(b)** annexin V, **(c)** MDC, and **(d)** propidium iodide.

Imaging of CdTe-QDs-induced apoptosis and autophagy in an inflammatory environment.

Finally, we evaluated the method in an inflammatory environment, using combinations of the cytokines tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin (IL-17) to mimic the pathological conditions of chronic joint diseases¹⁵. The characterization of cell death was the same as in non-inflammatory conditions, and only the timeline of development changed, with cell death induced up to 4 hours earlier under inflammatory conditions, especially in the presence of both cytokines (Fig. 4a,b). A similar timeline for cell death was observed with Cd²⁺ (mean \pm SEM: Cd²⁺: 17.28 \pm 0.08 A.U., Cd²⁺ + IL-17: 10.62 \pm 0.07 A.U., Cd²⁺ + TNF- α : 10.49 \pm 0.07 A.U., Cd²⁺ + IL-17/TNF- α : 10.01 \pm 0.06 A.U., $p < 0.01$), and was therefore not due to the use of CdTe-QDs (Fig. 4b,c). The inflammatory environment does not affect the detection of type of cell death but induces the phenomenon early.

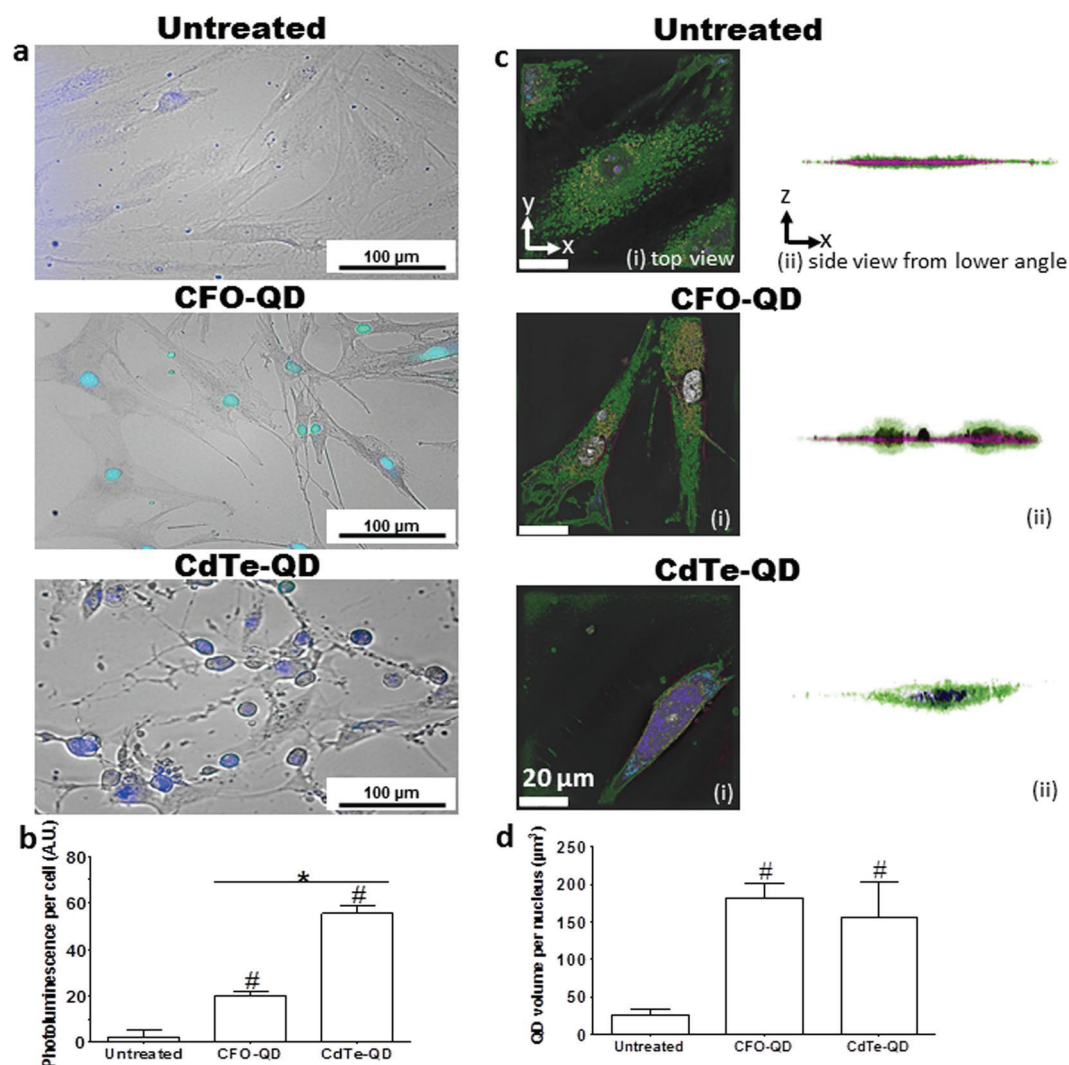


Figure 2. Quantification of cell death by QD imaging. (a) Fluorescence micrographs of synoviocytes treated with CFO-QDs and CdTe-QDs compared to untreated cells. (b) The photoluminescence of cells ($n = 35$) is represented by the mean \pm SEM. $\#p < 0.01$ vs. untreated cells. $*p < 0.01$ vs. CFO-QDs. (c) Three-dimensional holographic and tomographic microscopy images of synoviocytes left untreated or treated with CFO-QDs or CdTe-QDs. (d) The QD volume per nucleus is represented by the mean \pm SEM. $\#p < 0.01$ vs. untreated cells.

Discussion

Current indirect techniques used to define lethal cell processes do not meet the needs to characterize several types of cell death processes associated with the position of the cytotoxic agent inside the cell over time. Based on a previous study reporting the anti-proliferative and anti-inflammatory effect of Cd^{2+} on synoviocytes^{4,5}, we designed a visible Cd^{2+} -based new tool, CdTe-QDs, for cell death characterization to define and decompose the different entities involved in the uptake, trafficking, and phenomenon of cell death caused by Cd^{2+} from a structural point of view. In this study, we mainly adopted a semiotic approach (i.e., observation of visual changes between the control and treated cells), which allowed for temporally defining the trajectory of Cd^{2+} in the cell owing to the continuity of the visualization. More specifically, the switch between the different visual realms obtained by these various microscopic techniques revealed the consequence of this element in the cell, especially in the fateful site, the nucleus. This conceptualization also served to highlight the inability of the cell to protect itself from elements such as Cd^{2+} or the Cd^{2+} -based particles, harmfully activating the endocytic pathway and leading to cell protection failure. Finally, the use of CdTe-QDs as a Cd^{2+} visualization tool demonstrated the induction of a complex cell death process combining both apoptosis and autophagy, which occurred in a well-defined order.

The effect of Cd^{2+} itself on synoviocytes was demonstrated by first comparing Cd^{2+} and CdTe-QDs, which considers the intrinsic Cd^{2+} ion concentration constituting CdTe-QDs, and then by comparing two QDs consisting of different materials: one composed of Cd^{2+} and the other of carbon. The dose-response curve showed an anti-proliferative effect for the same intrinsic theoretical concentration of Cd^{2+} ions, arguing in favor of a Cd^{2+} effect. The absence of an anti-proliferative effect for the QDs composed of carbon suggested that cell death was induced by Cd^{2+} and not by a so-called “cargo effect” of QDs, indicating the critical need of a control QD. In other

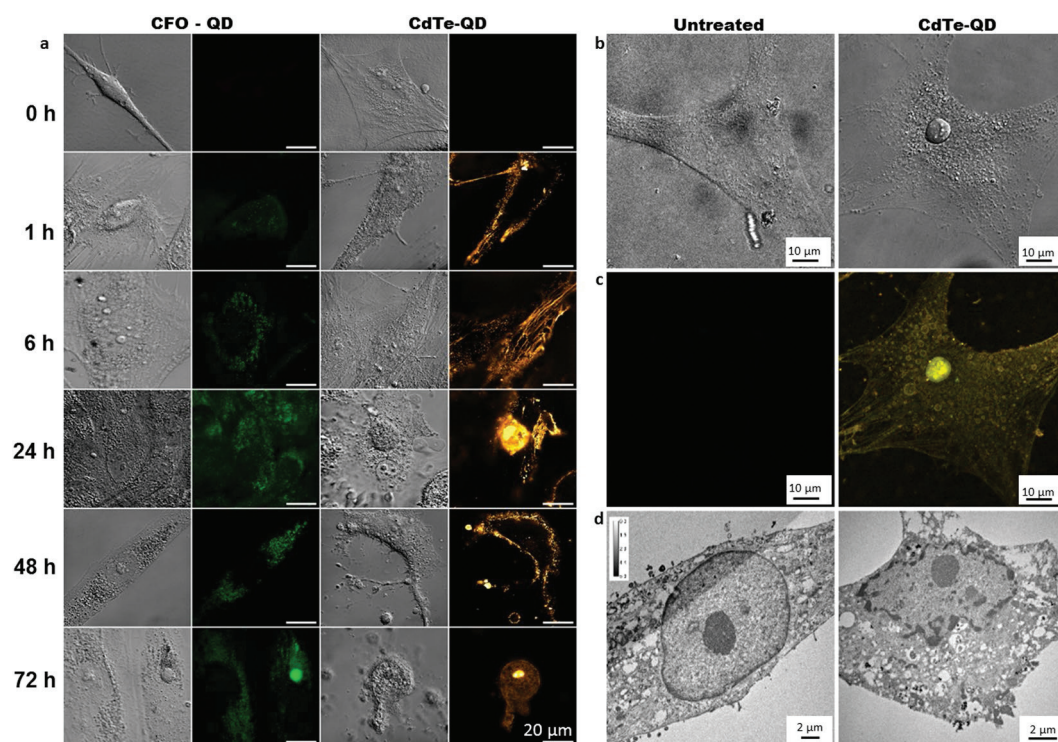


Figure 3. Cell death characterization by QD imaging. (a) Confocal micrograph of whole synoviocyte untreated and treated with CFO-QDs and CdTe-QDs (λ_{ex} : 670 nm). (b,c) Confocal micrograph (λ_{ex} : 580 nm) and (d) transmission electron micrograph of a whole synoviocyte clearly showing evidence of apoptosis and autophagy after treatment with CdTe-QDs.

words, CdTe-QDs monitoring would be representative of the trajectory and effect of Cd^{2+} . Furthermore, the impedance system helped to define the timing of cell death and to deduce the rate of the process. Therefore, the anti-proliferative effect was reproducible between Cd^{2+} and CdTe-QDs, but the effect was postponed according to the size of the nanoparticles. This shift is probably related to the time it took for the compound to enter the cells. Once inside, Cd^{2+} caused faster cell death than the CdTe-QDs, which required more time to reach the nucleus. The amount of intrinsic Cd^{2+} ions required per cell to achieve a similar cell death rate compared to CdTe-QDs was estimated at 100 pg/cell using the same impedance system. Thus, the monitoring by QD revealed two types of stimuli in these resistant synoviocytes: apoptosis and autophagy.

By comparing our new QD imaging method to conventional methods for the ability to characterize apoptosis, we demonstrated multiple improvements regarding the experimental duration, possibility of using live cells, availability of equipment, lower costs, and the exceptional image clarity (Supplementary Table 2). Although digital holographic microscopy was performed on living cells without requiring additional reagents and ensuring the quantification of morphological parameters, this method is accompanied by an important limitation in that it is not possible to test several conditions simultaneously. Annexin V staining, which is performed on fixed cells, is seen as the reference technique for apoptosis detection. However, since Annexin V denatures the cells after staining, this method precludes the examination of kinetics in the same cells. Therefore, QD imaging is convenient to implement and is reproducible for conducting both the qualitative and quantitative analysis of apoptosis. After 24 h of exposure, the presence of the toxic element inside the cells was confirmed owing to wide-field merged images obtained by fluorescence microscopy. Different spatiotemporal localizations were observed for CdTe-QDs compared to those of CFO-QDs. These localizations chronologically determined the onset of different signals leading to cell death. Surprisingly, after direct integration during the first hour, CdTe-QDs with their -COOH terminal function were first trapped by the actin microfilaments, which could be attracted by the positive ends in the periphery and were distributed throughout the cytoplasm after 6 h of exposure. To our knowledge, this is the first demonstration of the successful labeling of actin microfilaments by naked QDs to date. Interestingly, the CFO-QDs, which have the same -COOH terminal function, did not enter the cell via a non-endocytic route, and therefore had no such affinity for actin microfilaments. These results suggest that it is its metallic nature contributing to the affinity of QD for actin microfilaments, which in turn favors a complexation reaction or precipitation. Cd^{2+} was transported to the nucleus with preferential attraction for heterochromatin, which triggered the process of cell death by apoptosis. The initiation of cell death appeared once the CdTe-QDs reached the nucleus as observed after 24 h. This is correlated with the results obtained with the cell impedance system where normalized cell index changes were observed from the 15th and 25th hour. Apart from this study, the morphological appearance of apoptosis was confirmed with a known cytotoxic agent inducing apoptosis (i.e., bortezomib) in synoviocytes¹⁶, inducing the same apoptotic changes. The changes induced by apoptosis were investigated on another cell type (panc cell line) and another agent known to induce apoptosis (i.e., cyclosporin)¹⁷ compared to

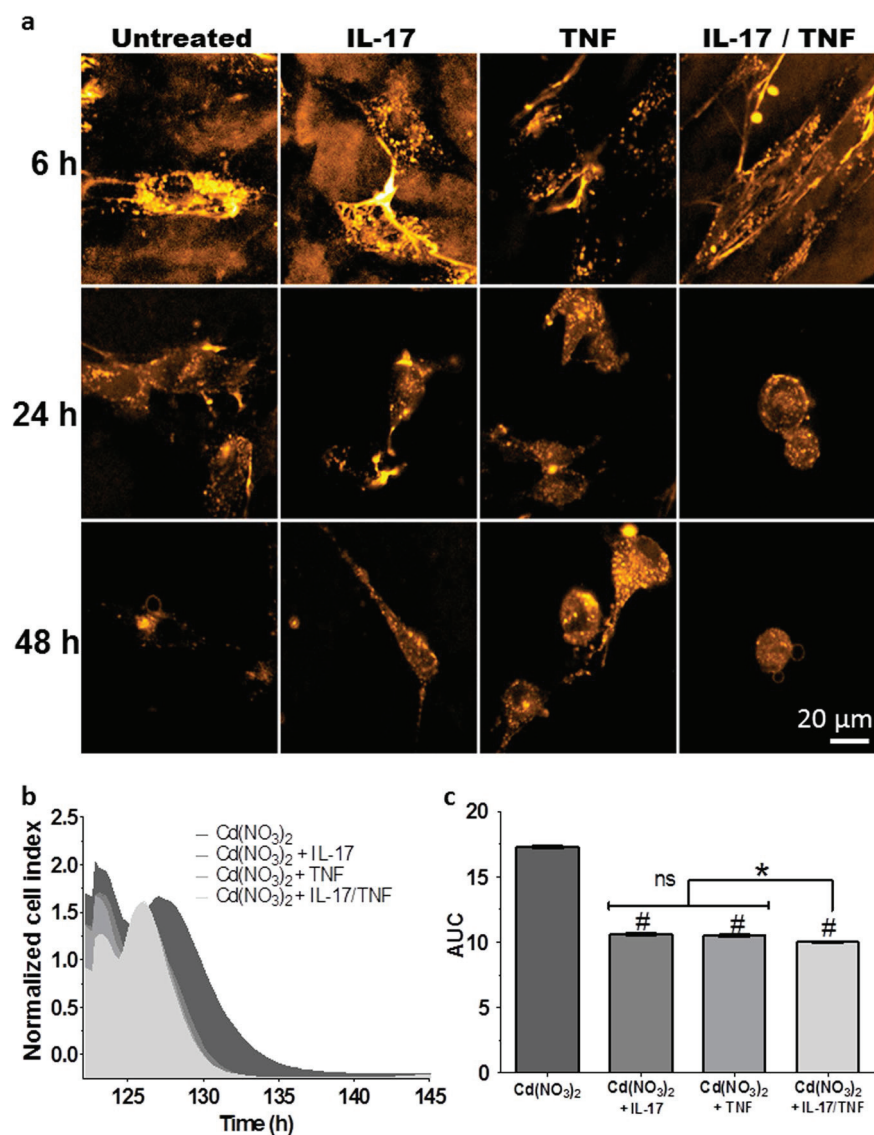


Figure 4. Sensitivity of the new method. (a) Confocal micrographs of synoviocytes acquired after 6, 24, and 48 hours exposure to CdTe-QDs (λ_{ex} : 580 nm, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the presence or absence of inflammatory conditions (IL-17: 50 ng/mL, TNF- α : 1 ng/mL). (b) Real-time growth curves of synoviocytes in the presence of Cd(NO₃)₂ (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and inflammatory conditions (IL-17: 50 ng/mL, TNF- α : 1 ng/mL), represented by the normalized cell index (mean values \pm SEM, $n = 8$), as a function of time. (c) AUCs with different inflammatory conditions are represented by the mean \pm SEM. * $p < 0.01$ vs. untreated cells.

CdTe-QDs, showing the same apoptotic changes between CdTe-QDs and ciclosporin (Supplementary Fig. 4). The non-endocytic pathway was predominant and governed the apoptosis induced by Cd²⁺. Besides allowing for clear characterization of apoptosis, QD imaging further provided information to explain the interaction of Cd²⁺ with the elements inside the cell and to understand the pathway leading to apoptosis.

As for the detection of apoptosis, this new QD imaging method demonstrated various improvements for autophagy characterization compared to conventional methods. The visualization of autophagic vacuoles was more clearly displayed with QD imaging than by the conventional method of MDC staining. This was used to evaluate the induction of autophagy through the accumulation of autophagic vacuoles without reflecting autophagosomal maturation and endocytic pathway^{18–21}. Furthermore, the non-destructive nature of QD imaging allowed for visualization of vesicle enlargement over the course of the experiment, which was impossible with MDC. The endocytic pathway by caveolin and clathrin ensured detoxification of the cell by expelling Cd²⁺ via the exosomes or its removal through lysosomal degradation, which oriented the pathway toward autophagy. Once this autophagy became ineffective, these events contributed to cell death. This latter phenomenon was highlighted by the significant presence of large autophagic vacuoles containing CdTe-QDs as early as 24 h with an increase of their sizes up to 48 h. From this time up to 72 h, the apoptotic changes (the net rounding of cells and the formation of apoptotic bodies) were concomitantly highlighted. For summary, the kinetics of apoptosis and autophagy signs were as follows: 1 h: uptake by the non-endocytic and endocytic pathway; 6 h: distribution throughout the cytoplasm via

actin microfilaments and multivesicular body formation; 24 h: condensation of chromatin and presence of autophagic vacuoles; 48 h–72 h: rounding of cells, increase in size of autophagic vacuoles and formation of apoptotic bodies. The morphological appearance of autophagic vacuoles was confirmed with a known autophagy inducing agent (i.e. metformin)²², showing the same autophagic signs after 1 hour of CdTe-QDs exposure without induction of apoptosis (Supplementary Fig. 4). At the molecular level (which was not the focus of our study), three previous studies showed a strong caspase involvement in the apoptotic process of CdTe-QDs in HUVEC and CdSe/ZnS-QD cells with terminal function -COOH in mesenchymal cells by using a caspase inhibitor zVAD.fmk. One of them also suggests the involvement of autophagy in cell death. In mesenchymal cells, inhibition of apoptosis with zVAD.fmk has been shown neither to affect the level of autophagy nor to prevent cell death^{23–25}. Thus, QD imaging not only permitted clear characterization of autophagy, but further allowed for tracing of the evolution of the phenomenon of autophagy ranging from cellular protection to ultimate cell death.

The phenomenon of necrotic cell death is mainly characterized by an increase in cell volume, swelling of the organelles, and an increase in the permeability of the plasma membrane of cells. These events contribute to disruption of the plasma membrane, resulting in the release of the cellular contents into the surrounding medium, which triggers a strong inflammatory reaction. Here, the imbalance of homeostasis of the essential metals did not trigger the events that are characteristic of necrosis. The lack of necrosis induction is important and crucial information that highlights the potential for the development of new Cd-based cytotoxic therapies in the context of chronic inflammatory diseases.

Toward this end, we further evaluated the sensitivity of the method under inflammatory conditions. Apoptosis and autophagy were induced by CdTe-QDs to the same extent as observed in the non-inflammatory condition, although they were triggered earlier. This relatively early induction of cell death in an inflammatory environment could be explained by the changes in cell morphology induced by cytokines (increased numbers of pseudopodia), which would allow for increased Cd²⁺ and CdTe-QDs uptake. In fact, the numerous pseudopodia on the cell surface increase the collecting surface of elements. Indeed, a previous study demonstrated that cytokines induced morphological changes in microglial cells and astrocytes, including time-dependent cytoskeletal changes, and increased the number of filopodia in microglial cells²⁶. However, few studies have examined the improved uptake of compounds under inflammatory conditions; thus, this issue needs further clarification in more detailed studies. The QD imaging method clearly highlighted that the difference observed between the inflammatory and non-inflammatory conditions had an impact on the initiation of the anti-proliferative effects without affecting any of the processes occurring inside the cell. Indeed, the clear increase of fluorescence and the morphological changes characteristic of cell death perceived early in the inflammatory condition indicated that the phenomenon had indeed occurred. These kinetic observations on cell death were also found with Cd²⁺ in the inflammatory condition using the same impedance system.

Conclusion

In conclusion, as compared to conventional methods, the use of CdTe-QDs enabled the direct and simultaneous visualization of different modes of Cd-induced cell death. Live-stream characterization of cell death showed that CdTe-QDs uptake by both the endocytic and non-endocytic pathways simultaneously led to apoptosis (with chromatin condensation and apoptotic bodies detectable) and autophagy (based on observation of autophagic vacuoles containing CdTe-QDs). This newly developed live-stream QD imaging method is a promising tool for the characterization and monitoring of the type of cell death but not to quantify the general toxicity of CdTe-QDs. This method has potentially useful applications, including monitoring of kinetic changes associated with cell death processes on other types of cells, through investigation of the homeostasis imbalance of the essential metals by other metals or with a combination of different metals on various type of cells. In the future, for the specific case of Cd²⁺, CdTe-QDs may be used in animal models to investigate the spread of Cd²⁺ and to define the cytotoxic effects of Cd²⁺-based QDs in different cell types toward clinical application.

Methods

Materials. Cadmium nitrate solutions were obtained from the geology laboratory of the University of Lyon (UMR 5276). Carbon fluoroxide nanoparticles were synthesized and characterized as described by Lysenko *et al.* at the Institute of Nanotechnology of Lyon^{27,28}. Three sizes (1.53 nm, 3.24 nm, 3.99 nm) of hydrophilic CdTe-QDs (coated with -COOH groups) in powder form emitting at three different wavelengths (green, λ_{ex} : 510 nm; orange, λ_{ex} : 580 nm; red, λ_{ex} : 670 nm) were purchased from PlasmaChem GmbH (Berlin, Germany; Supplementary Table 1). CdTe-QDs were reconstituted with pyrogen-free water-for-injection (Lavoisier[®], Paris, France) and then filtered through a 0.20 μm polytetrafluoroethylene filter (MILLEX[®], Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Non-cytotoxic carbon fluoroxide QDs (CFO-QDs), which have similar structure to CdTe-QDs in terms of form, hydrophilicity, core size, visible emission and equal photoluminescence, were used as negative control (Supplementary Table 1). Water was prepared using a Millipore Direct-Q 8 purification system for all other purposes.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Trypsin – Versene (EDTA; Eurobio, Les Ulis, France) was supplemented with 10% (w/v) fetal bovine serum (FBS; Gibco, Grand Island, NY, USA), 2% (w/v) penicillin/streptomycin (Eurobio), 1% (w/v) L-glutamine (Eurobio), amphotericin B (Eurobio), plasmocyn prophylactic (InvivoGen, Toulouse, France) and then filtered through a 0.20 μm polytetrafluoroethylene filter (Millex, Merck Millipore). IL-17A was provided by Dendritics (Lyon, France) and TNF by R&D systems (Lille, France). The Annexin-fluos kit was purchased from Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany).

Cell culture. Rheumatoid arthritis - fibroblast-like synoviocytes were grown from synovial tissue of three patients undergoing joint surgery, who fulfilled the American College of Rheumatology criteria for rheumatoid arthritis. Each individual signed an informed consent form and the protocol was approved by the Lyon teaching

Hospitals review board (number AC-2016-27-29) according to French Public Health laws (art R1243-57, art L1121-1-1, art L 1121-1-2). All methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations. Synovial tissue was minced into small pieces which were allowed to adhere to 6-well plates in supplemented DMEM, as described above. RA-FLS grew out of the tissue and colonized the plastic dishes until reaching confluence. Synoviocytes were then trypsinized and grown in 75 cm² cell culture flasks in a humidified atmosphere (5% v/v CO₂) at 37 °C. Growth medium was replaced twice a week, and when the cells were confluent they were trypsinized and transferred in two 75 cm² cell culture flasks for continued growth. The cells used in this study were recovered from between the 4th and 9th cell passage.

Dose-response assay. Change of cellular morphology was observed using an inverted optical microscope (Zeiss Axiovert 200 M fluorescent microscope, Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany) with a magnification of x40. Synoviocytes were incubated in the presence of increasing concentrations of CFO-QDs (negative control; 0.25, 2.5, 25, 250 µg/mL), of Cd(NO₃)₂ (positive control; 0.01, 0.1, 1, 10 µg/mL) and three sizes of CdTe-QDs (0.01, 0.1, 1, 10 µg/mL). The desirable characteristics were rounding, cell detachment, loss of adhesion, and cytoplasmic retraction.

Cytotoxicity with real-time and label-free monitoring. The effects of QDs on cell viability were examined using the xCELLigence real-time cell analysis system (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The change over time in cellular proliferation was determined by impedance of RA-FLS cells grown in under inflammatory conditions (IL-17 or TNF alone or in combination) or not, and at different seeding densities (7,500, 15,000, 22,500, and 30,000 cells/cm²) in E-plates 96 (Roche Diagnostics GmbH). Three parameters are taken into account by the RTCA software to determine normalized cell index (NCI): cell number, cell area, and cell adhesion strength. CI is a dimensionless parameter and is derived, according to the following equation:

$$CI = \max_{1=1, \dots, N} \left(\frac{R_{cell}(f_i)}{R_b(f_i)} - 1 \right)$$

where $R_b(f)$ is the frequency-dependent electrode resistance (a component of impedance) without cells and $R_{cell}(f)$ with cells, and N is the number of the frequency points at which the impedance is measured. Cell proliferation leads to a higher CI value because of larger $R_{cell}(f)$, while cytotoxicity induces rounding-up and detachment of cells leading to a decreased CI value. The NCI was measured every five minutes for the first 4 hours and then every 15 minutes from 5 to 87 hours. After 72 hours of proliferation in DMEM, the following conditions were tested: DMEM alone, and with either Cd(NO₃)₂, CFO-QDs, or CdTe-QDs ($\lambda_{exc} = 510$, $\lambda_{exc} = 580$, or $\lambda_{exc} = 670$). The NCI was also used to calculate the area under curve (AUC) at each timepoint.

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). IL-6 production was measured using commercially available ELISA kit, according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Lille, France).

Fluorescence microscopy. The quantification of fluorescence of the untreated and labeled cells was determined using a fluorescence microscope (Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader, Biotek Instruments Inc, Winooski, VT, USA) with an excitation of 490 nm and an emission 525 nm.

Confocal scanning microscopy. High resolution imaging was performed using a confocal laser scanning Zeiss LSM 78-NLO microscope (Carl Zeiss Microscopy) equipped with 100x objective (with an oil-immersion objective (alpha "Plan-Apochromat" 100X/1.46 Oil DIC) with laser diode 405 nm 30 mW, 561 nm 20 mW) and a photomultiplier tube (PMT) detector (360 to 800 nm), and a 34-channel spectral detector (470 to 670 nm). Cells were seeded into the wells of two-compartment Nunc culture chambers (LabTek[®] II non-separable, Dutscher scientific, Brumath, France) at a density of 50 000 cells/cm². The excitation wavelength was 405 nm and the laser power was 5%. Imaging was carried out using QD 670 at 10 µg/mL, and detection in spectral mode. The master gain remained the same for all sessions. The cells were incubated for 1, 6, 24, 48, and 72 hours, and then washed twice with PBS to remove any non-specifically adsorbed QD. The PMT gain was adjusted at each acquisition to obtain the best image quality with good contrast. Stacks of optical sections were collected by optical z sectioning (z step = 0.4 µm). Auto fluorescence of FLS (ranging from 400 to 600 nm) was deconvoluted using spectral unmixing algorithms (ZEN 2012, Carl Zeiss Microscopy). Images were analyzed using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Fluorescence calculations were performed using ZEN 2012 software (Carl Zeiss Microscopy). Three-dimensional images of synoviocytes were rendered using ICY software (<http://icy.bioimageanalysis.org>) and the 3D Rotation plugin.

Electron microscopy. After fixing cells as previously described²⁰, images were acquired using a JEM Jeol 1400 transmission electron microscope (Jeol Ltd., Tokyo, Japan) operated at 80 kV coupled to a digital camera (Orius 600, Gatan Inc., Pleasanton, CA, USA) and processed using Digital Micrograph[®] software (Gatan Inc.).

Digital holographic microscopy. The quantitative morphological parameters (cell area, volume, and thickness) were defined by analysis of cellular kinetics over 25 hours by HoloMonitor[®] M4 (Phase Holographic Imaging AB, Lund, Sweden) with and without smallest CdTe-QDs. The digital holographs were recorded every five minutes.

Living cell tomography. The visualization of the 3D morphologies of synoviocytes and localization of the QDs were performed by interferometric detection using tomographic holographic 3D microscopy Nanolive[®] (3D Cell Explorer, Lausanne, Switzerland), and processed using STEVE[®] software (3D Cell Explorer). Each color in

the figures represents a different refractive index range. In addition, this technique allowed to quantify the volume of QDs in synoviocytes after 24 hours of exposure.

Annexin V-fluorescein isothiocyanate conjugated with propidium iodide staining. After exposure to Cd²⁺ or CdTe-QDs, synoviocytes apoptosis was quantified by Annexin-V-FLUOS Staining kit according to the manufacturer's instructions (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany), using Zeiss Axiovert 200 M fluorescent microscope (Carl Zeiss Microscopy; magnification x40).

Monodansylcadaverine (MDC) staining. After exposure to Cd²⁺ or CdTe-QDs, autophagic vacuoles in synoviocytes were labeled with 0.05 mmol/L MDC in PBS at 37 °C for 10 min. The cells were then washed three times with PBS and then observed under a Zeiss Axiovert 200 M fluorescent microscope (Carl Zeiss Microscopy; magnification x40).

Statistical analysis. All experiments were repeated three times. Results are presented as mean ± standard error of the mean (SEM). All statistical tests were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett HSD post hoc using Graphpad version 5.0 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, California, USA). P values < 0.05 were considered as significant.

References

1. Kepp, O., Galluzzi, L., Lipinski, M., Yuan, J. & Kroemer, G. Cell death assays for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 221–237 (2011).
2. Amaravadi, R. K. *et al.* Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clin. Cancer Res.* **17**, 654–666 (2011).
3. Baier, A., Meineckel, I., Gay, S. & Pap, T. Apoptosis in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **15**, 274–279 (2003).
4. Bonaventura, P. *et al.* Protective effect of low dose intra-articular cadmium on inflammation and joint destruction in arthritis. *Sci. Rep.* **7**, 2415 (2017).
5. Ansari, M. M., Neha & Khan, H. A. Effect of cadmium chloride exposure during the induction of collagen induced arthritis. *Chem. Biol. Interact.* **238**, 55–65 (2015).
6. Zhang, T., Wang, Y., Kong, L., Xue, Y. & Tang, M. Threshold Dose of Three Types of Quantum Dots (QDs) Induces Oxidative Stress Triggers DNA Damage and Apoptosis in Mouse Fibroblast L929 Cells. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **12**, 13435–13454 (2015).
7. Chen, N. *et al.* The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots. *Biomaterials.* **33**, 1238–1244 (2012).
8. Wang, M. *et al.* Time-dependent toxicity of cadmium telluride quantum dots on liver and kidneys in mice: histopathological changes with elevated free cadmium ions and hydroxyl radicals. *Int. J. Nanomedicine.* **11**, 2319–2328 (2016).
9. Yan, M. *et al.* Cytotoxicity of CdTe quantum dots in human umbilical vein endothelial cells: the involvement of cellular uptake and induction of pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress. *Int. J. Nanomedicine.* **11**, 529–542 (2016).
10. Lai, L. *et al.* Necrotic cell death induced by the protein-mediated intercellular uptake of CdTe quantum dots. *Chemosphere.* **135**, 240–249 (2015).
11. Liu, J. *et al.* Cytotoxicity assessment of functionalized CdSe, CdTe and InP quantum dots in two human cancer cell models. *Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **57**, 222–231 (2015).
12. Wei, S. H. & Zhang, S. B. Structure stability and carrier localization in CdX (X = S, Se, Te) semiconductors. *Phys. Rev. B.* **62**, 6944–6947 (2000).
13. Kamila, S. *et al.* Diagnostic and Therapeutic Applications of Quantum Dots in Nanomedicine. *Top. Curr. Chem.* **370**, 203–224 (2016).
14. Wang, J., Liu, R. & Liu, B. Cadmium-containing Quantum Dots: Current Perspectives on Their Application as Nanomedicine and Toxicity Concerns. *Mini Rev. Med. Chem.* **16**, 905–916 (2016).
15. Miossec, P. & Kolls, J. K. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 763–776 (2012).
16. Yannaki, E. *et al.* The proteasome inhibitor bortezomib drastically affects inflammation and bone disease in adjuvant-induced arthritis in rats. *Arthritis & Rheumatology.* **62**, 3277–3288 (2010).
17. Drachenberg, C. B. *et al.* Islet cell damage associated with tacrolimus and cyclosporine: morphological features in pancreas allograft biopsies and clinical correlation. *Transplantation* **68**, 396–402 (1999).
18. Biederick, A., Kern, H. F. & Elsässer, H. P. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific *in vivo* marker for autophagic vacuoles. *European journal of cell biology* **66**, 3–14 (1995).
19. Vazquez, C. L. & Colombo, M. I. Assays to Assess Autophagy Induction and Fusion of Autophagic Vacuoles with a Degradative Compartment, Using Monodansylcadaverine (MDC) and DQ-BSA. *Methods in enzymology* **452**, 85–95 (2009).
20. Niemann, A., Takatsuki, A. & Elsässer, H. P. The lysosomotropic agent monodansylcadaverine also acts as a solvent polarity probe. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **48**, 251–258 (2000).
21. Bampton, E. T., Goemans, C. G., Niranjana, D., Mizushima, N. & Tolkovsky, A. M. The dynamics of autophagy visualised in live cells: from autophagosome formation to fusion with endo/lysosomes. *Autophagy* **1**, 23–36 (2005).
22. Byun, S., Lee, E. & Lee, K. W. Therapeutic Implications of Autophagy Inducers in Immunological Disorders, Infection, and Cancer. *International journal of molecular sciences* **18**, 1959 (2017).
23. Yan, M. *et al.* An *in vitro* study of vascular endothelial toxicity of CdTe quantum dots. *Toxicology* **282**, 94–103 (2011).
24. Yan, M. *et al.* Cytotoxicity of CdTe quantum dots in human umbilical vein endothelial cells: the involvement of cellular uptake and induction of pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress. *International journal of nanomedicine* **11**, 529 (2016).
25. Manshian, B. B., Munck, S., Agostinis, P., Himmelreich, U. & Soenen, S. J. High content analysis at single cell level identifies different cellular responses dependent on nanomaterial concentrations. *Scientific reports* **5**, 13890 (2015).
26. Sheng, W. *et al.* Pro-inflammatory cytokines and lipopolysaccharide induce changes in cell morphology, and upregulation of ERK1/2, iNOS and sPLA 2-IIA expression in astrocytes and microglia. *Journal of neuroinflammation.* **8**, 121 (2011).
27. Serdiuk, T., Lysenko, V., Mognetti, B., Skryshevsky, V. & Gélouën, A. Impact of cell division on intracellular uptake and nuclear targeting with fluorescent SiC-based nanoparticles. *J. Biophotonics.* **6**, 291–297 (2013).
28. Kharin, A. *et al.* Carbon fluoroxide nanoparticles as fluorescent labels and sonosensitizers for theranostic applications. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **16**, 044601 (2015).

Acknowledgements

This work has been supported by the OPeRa IHU program, and the Institut Universitaire de France. PM is a senior member of the Institut Universitaire de France.

Author Contributions

S.F.: experiments and writing; V.L.: reagent; A.G.: experiments and correction of text; F.P.: concept and correction of text, and P.M. concept and writing.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31077-2>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

1 Live-stream characterization of cadmium-induced cell death using visible CdTe-QDs

2

3 Samira Filali^{1,2*}, Alain Geloën³, Vladimir Lysenko⁴, Fabrice Pirot², Pierre Miossec¹

4 ¹ Immunogenomics and Inflammation Research Unit EA 4130, Department of Immunology and
5 Rheumatology, University of Lyon, Lyon, France

6 ² Laboratory of Research and Development of Industrial Galenic Pharmacy and laboratory of tissue
7 biology and therapeutic engineering UMR-CNRS 5305, Plateform FRIPHARM, University of Lyon,
8 Lyon, France

9 ³ CarMeN laboratory, INRA UMR1397, INSERM U1060, INSA Lyon, University of Lyon, Lyon, France

10 ⁴ Nanotechnology Institute of Lyon, UMR-CNRS 5270, INSA Lyon, University of Lyon, Lyon, France

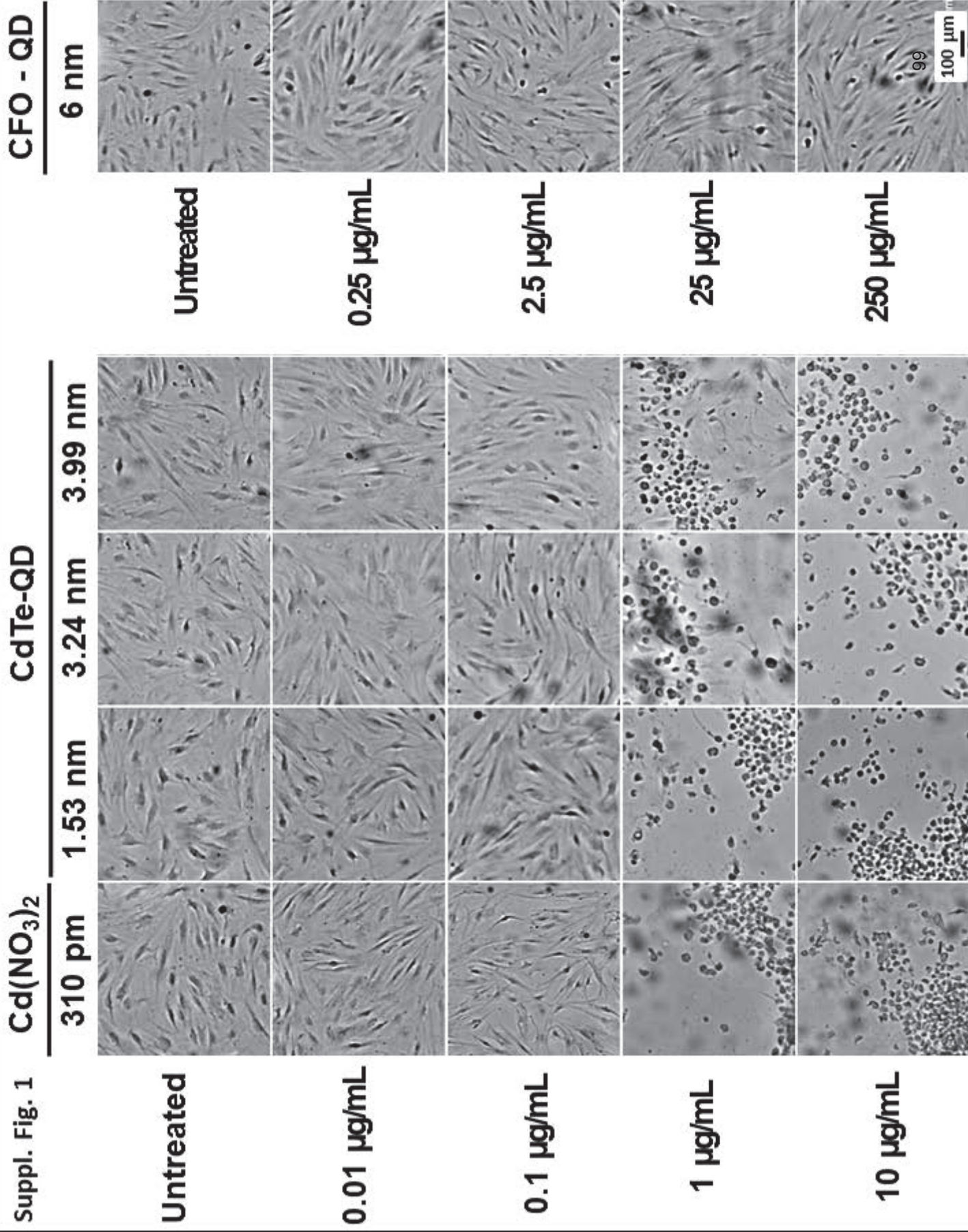
11 Supplementary Figure 1: Dose-response assay of the anti-proliferative effects of Cd(NO₃)₂, CdTe-
12 QDs, and CFO-QDs

13 Changes in synoviocytes morphology were observed after 72 hours exposure to CFO-QDs (0.25, 2.5,
14 25, or 250 µg/mL), Cd(NO₃)₂, and CdTe-QDs (Cd: 0.01, 0.1, 1, or 10 µg/mL).

15

16

Suppl. Fig. 1

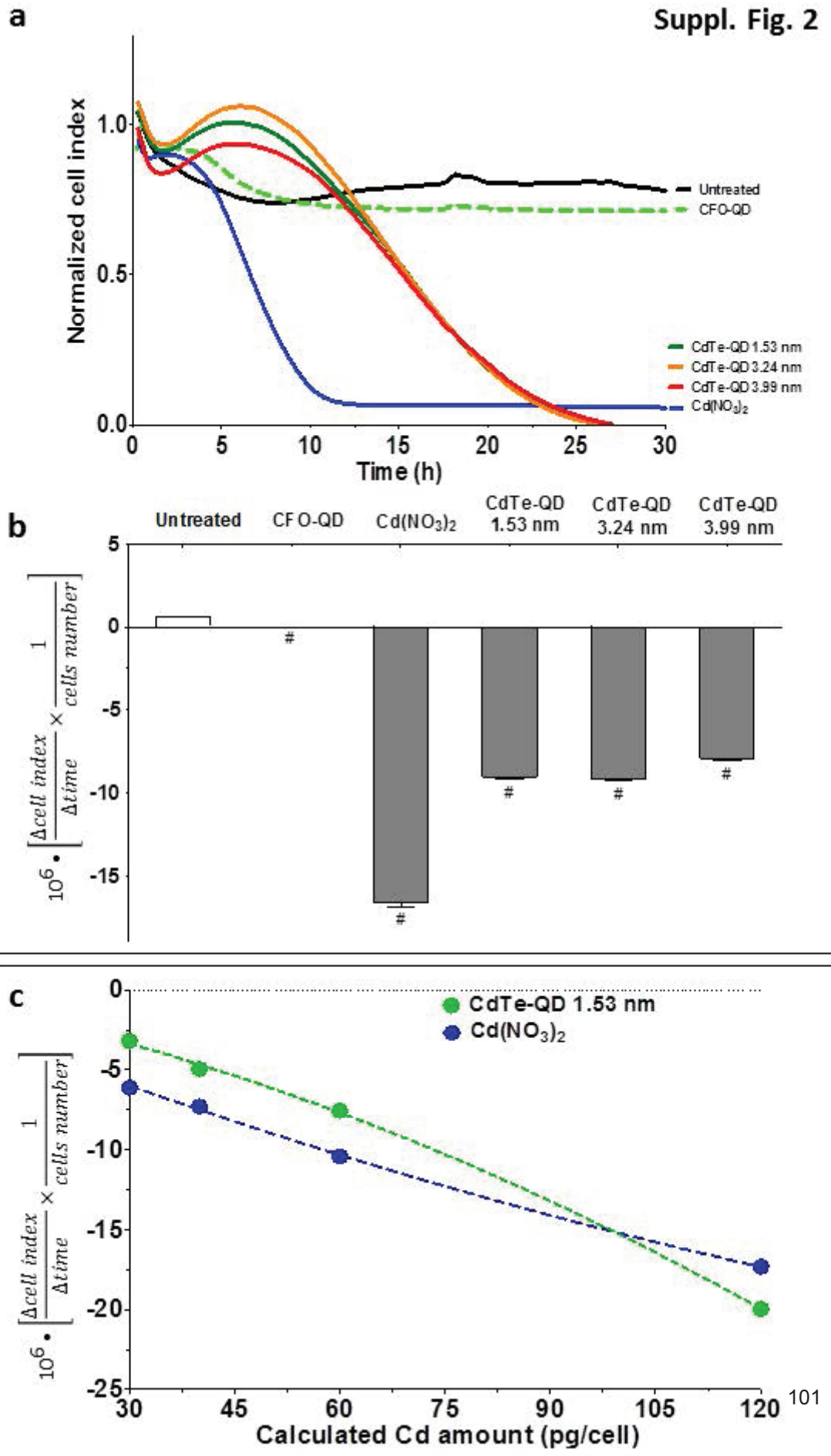


18 Supplementary Figure 2: Quantification of the anti-proliferative effects induced by Cd²⁺ and CdTe-QDs
19 on synoviocyte (a) Real-time growth curves of synoviocytes with different treatments (CFO-QD,
20 Cd(NO₃)₂, CdTe-QD), represented by the normalized cell index (mean values ± SEM, n = 8), as a
21 function of time. (b) The positive and negative slopes of cell index correspond to the cell proliferation
22 and cell death kinetics, respectively. #, p < 0.01 vs. untreated cells. (c) Cell death kinetics in the
23 presence of Cd(NO₃)₂ and CdTe-QD were identical at 100 pg Cd per cell. Data were fitted to a
24 polynomial model (R = 0.999).

25

26

Suppl. Fig. 2



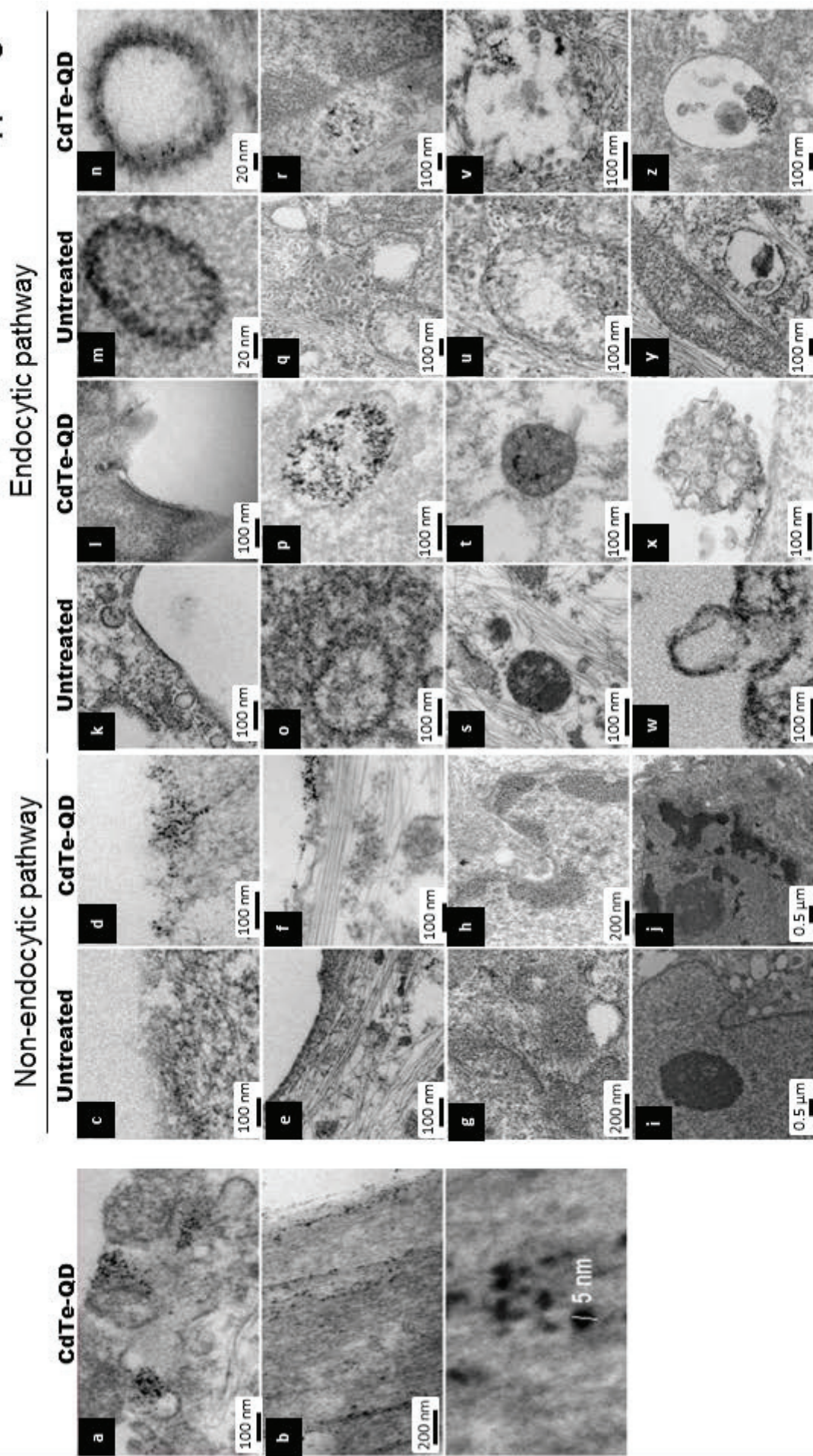
27 Supplementary Figure 3: Cd²⁺ uptake in synoviocytes through the endocytic and non-endocytic
28 pathways

29 Transmission electron micrographs of synoviocytes exhibiting (a) CdTe-QD uptake by direct transfer
30 through the membrane and by vesicle transport; (b) CdTe-QDs linked to actin microfilaments, and the
31 size of the CdTe-QDs. Non-endocytic pathways: (c, d) membrane; (e, f) actin filaments, microtubules,
32 and intermediate filaments; (g, h) euchromatin and heterochromatin; (i, j) the nucleus. Endocytic
33 pathways: (k, l) caveolin vesicles; (m, n) clathrin-coated vesicles; (o, p) endosomes; (q, r) multi-
34 vesicular bodies; (s, t) lysosomes; (u, v) auto-phagolysosomes; (w, x) exosomes; (y, z) autophagic
35 vacuoles.

36

37

Suppl. Fig. 3



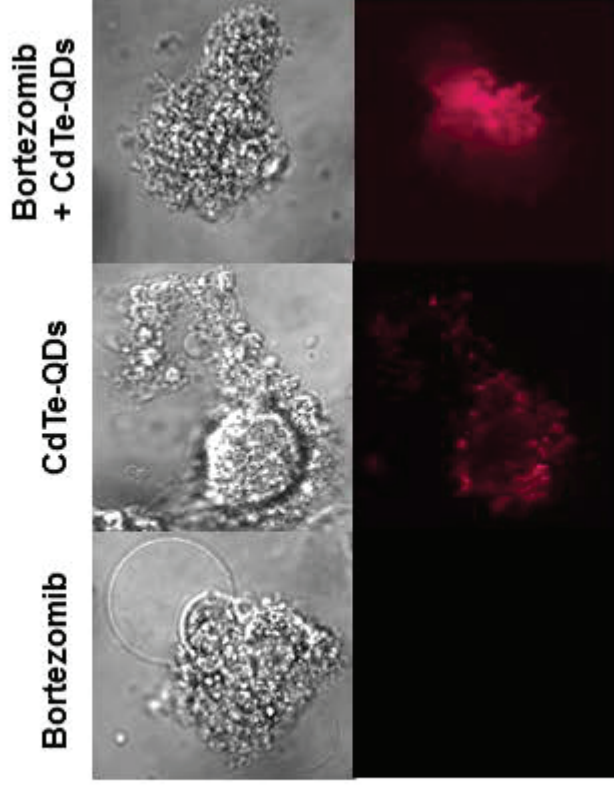
36 Supplementary Figure 4: Confirmation of apoptotic and autophagic labeling and apoptotic-induced
37 morphological change using apoptotic and autophagic inducers

38 (a) Confocal micrographs of synoviocytes acquired after 24 hours exposure to an apoptosis inducer
39 (bortezomib, 10 nM) or CdTe-QDs (10 µg/ml) or bortezomib (10 nM) then 1 hour exposure with CdTe-
40 QDs (10 µg/ml). (b) Confocal micrographs of synoviocytes acquired after 24 hours exposure to an
41 autophagy inducer (metformin, 10 mM) or metformin (10 mM) then 1 hour exposure with CdTe-QDs
42 (10 µg/ml). (c) Holographic and tomographic microscopy images of panc cells line treated with an
43 apoptosis inducer (cyclosporin, 27 mM) or CdTe-QDs (10 µg/ml).

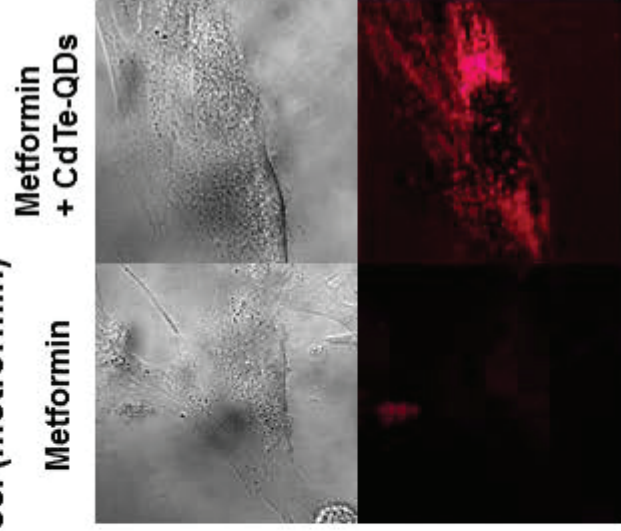
44

45

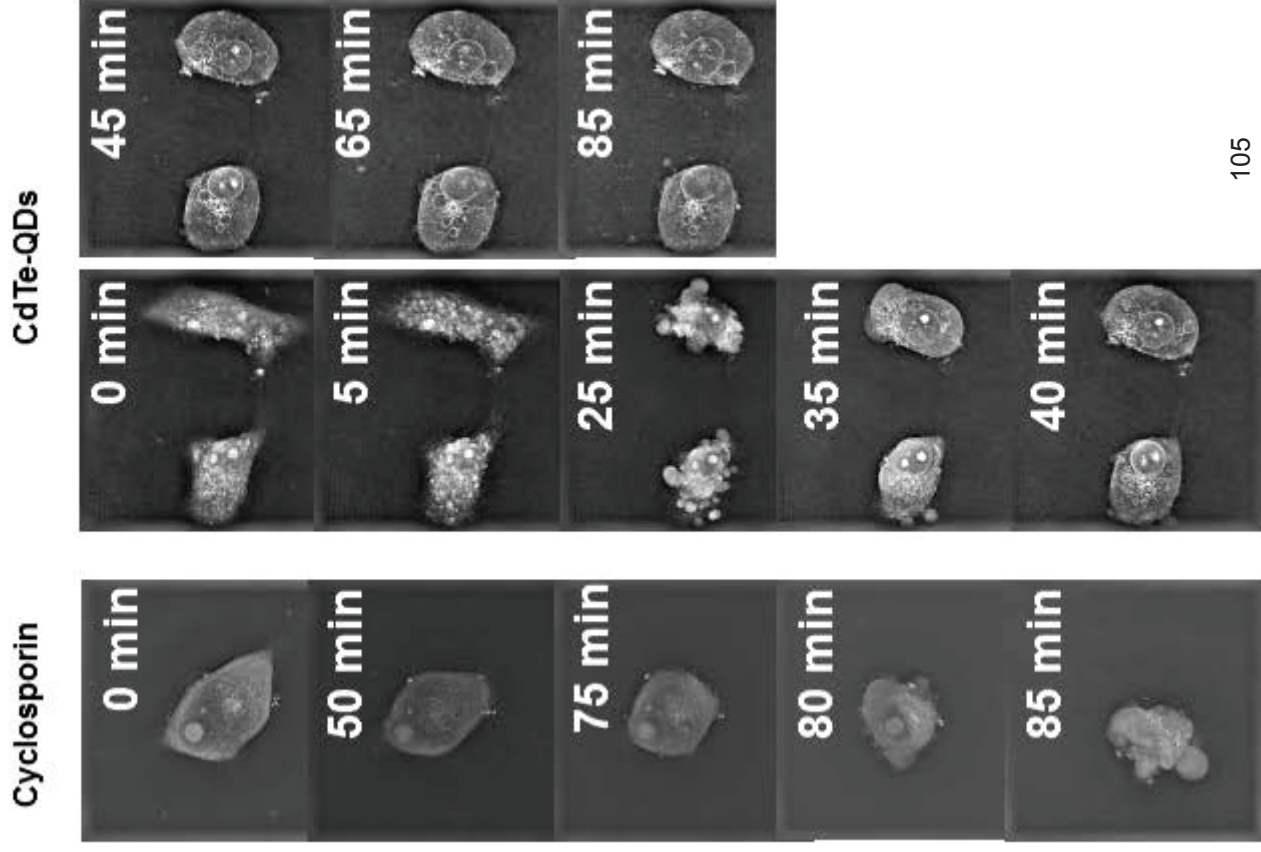
a Apoptosis inducer (bortezomib)



b Autophagy inducer (metformin)



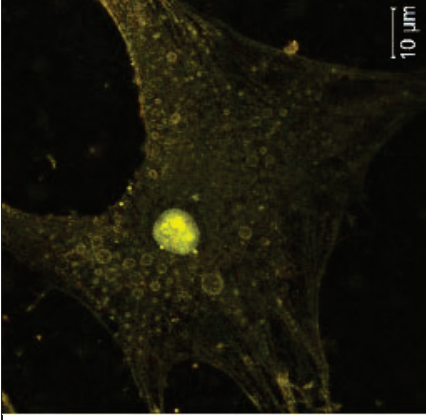
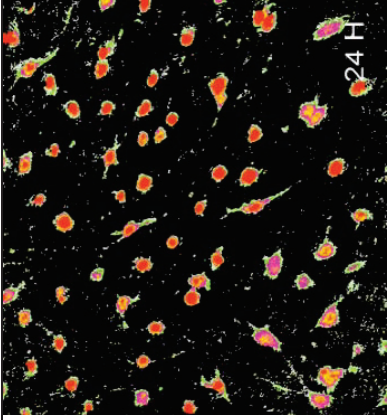
c Panc cells

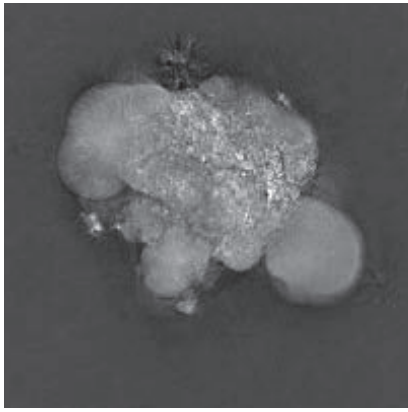
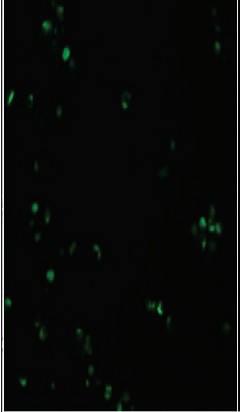
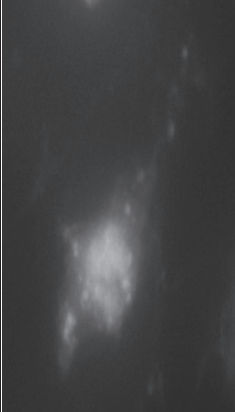


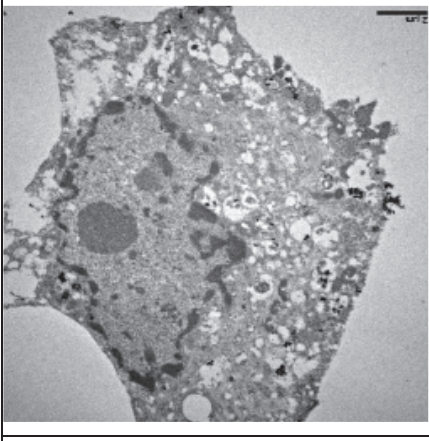
Supplementary table 1 : Physicochemical characterization of CFO-QD and CdTe-QD.

Physicochemical characteristic	Carbon fluoroxide (CFO-QD)	Cadmium telluride (CdTe-QD)
Analog		
Shape	Spherical	Spherical
Size (nm)	6	1.53 3.24 3.99
Surface chemical	- COOH	- COOH
Average molecular weight (g/mol)	2500	3200 67 000 124 000
Emission wavelength (nm)	Visible domain	Visible domain (510 - 580 – 670 nm)
Opposite		
Composition	Carbon fluoroxide	Atomic ratio Cd : Te [Cd : Te] [3 : 1] [5 : 1] [6 : 1]
Cell effect	Non-cytotoxic	Cytotoxic

Supplementary table 2 : Technical and economic comparison of the different methods for characterizing apoptosis and autophagy.

	Experimental duration	Possibility of using live cells,	Number of samples	Availability of equipment,	Costs	Image quality	Characterization
QD imaging (confocal or fluorescence microscopy)	kinetics	Living cells	several conditions (unrestricted)	available	330 tests (87 euros)		<ul style="list-style-type: none"> - Uptake - Trafficking - Apoptosis - Autophagy
Digital holographic microscopy (Holomonitor M4) low resolution	kinetics	Living cells	1 condition per test	instrument unusual	Price of equipment (20,000 euros)		<ul style="list-style-type: none"> - Apoptosis - Necrosis

Holographic and tomographic microscopy (Nanolive) high resolution	kinetics	Living cells	1 condition per test	instrument unusual	Price of equipment (20,000 to 40,000 euros)		<ul style="list-style-type: none"> - Apoptosis - Necrosis
Annexin-V (confocal or fluorescence microscopy)	at a given time	fixed cells	several conditions	available	50 tests (247 euros)		<ul style="list-style-type: none"> - Apoptosis
MDC (confocal or fluorescence microscopy)	at a given time	fixed cells / nonfixed cells	several conditions	available	20 tests (68 euros)		<ul style="list-style-type: none"> - Autophagy

<p>Electron microscopy</p>	<p>at a given time</p>	<p>fixed cells</p>	<p>limited number of conditions because cumbersome technique requiring trained and experienced team</p>	<p>instrument unusual</p>	<p>250 euros per conditions</p>		<ul style="list-style-type: none"> - Apoptosis - Autophagy
--------------------------------	----------------------------	--------------------	---	-------------------------------	---	---	--

46 Supplementary Video

47 Supplementary Video 1: Digital holograms of RA-FLS treated with CdTe-QDs 510 nm at 1 µg/mL
48 during 27 hours.

49 Supplementary Video 2: Three-dimensional video of RA-FLS taken after 24-hours exposure with
50 CdTe-QDs 10 µg/mL by confocal microscopy in fluorescence mode.

51 Supplementary Video 3: Time-lapse video of ten synoviocytes in the presence of CdTe-QDs, taken in
52 images every 30 min during 48 hours.

53

*CHAPITRE 2 : AMELIORATION DE L'ABSORPTION DES CdTe-QDs GRACE AUX
CHANGEMENTS DE LA MORPHOLOGIE CELLULAIRE EN MILIEU INFLAMMATOIRE*

Dans le chapitre précédent, il a été vu que, dans les conditions inflammatoires, les effets du cadmium minéral et sous forme de nanoparticules étaient plus précoces que ceux observés en conditions non inflammatoires. L'analyse bibliographique rapporte peu d'informations et d'études sur les modifications d'absorption de molécules par les cellules en conditions inflammatoires. En réalisant les essais cinétiques de la cytotoxicité des CdTe-QDs par mesure d'impédance des cellules, il a été constaté que les effets cytotoxiques étaient plus précoces mais que les vitesses de mort cellulaire étaient équivalentes entre les conditions inflammatoires et non-inflammatoires, suggérant une modification au niveau de l'absorption du cadmium mais pas d'accélération d'effets intracellulaires. En outre, il avait aussi été constaté une morphologie cellulaire différente selon les conditions inflammatoires, avec un particularisme pour les conditions inflammatoires (nettement observé avec la combinaison IL-17 / TNF) qui correspondait à la présence de nombreuses petites pseudopodes avec un aspect chevelu en microscopie optique. Il avait donc été émis l'hypothèse selon laquelle la présence de ces nombreux pseudopodes augmentait la surface de contact disponible pour l'absorption. Une fois à l'intérieur, la concentration seuil était précocement atteinte, rendant ainsi inefficace le système de détoxification de la cellule. Le déclenchement de la mort cellulaire était par la suite identique et à même vitesse. Ces informations concernant les délais d'action des molécules dans un contexte inflammatoire sont importantes où il pourrait être déduit des variables pharmacocinétiques notamment en terme de doses selon le degré de l'inflammation.

Article: “ Pro-inflammatory cytokines induce changes in cell morphology in synoviocytes and co-cultures (PBMC/synoviocytes) ”

Les cytokines pro-inflammatoires induisent des modifications de la morphologie cellulaire dans les synoviocytes et les co-cultures (PBMC / synoviocytes)

Résumé :

Introduction :

Le synovium normal est constitué de deux couches cellulaires d'épaisseur, principalement des monocytes / macrophages et des cellules mésenchymateuses, les synoviocytes de type fibroblastique. La synovite rhumatoïde est infiltrée par de nombreuses cellules immunitaires comprenant principalement des lymphocytes T CD4+, des lymphocytes B et des macrophages qui s'organisent en agrégats lymphoïdes. Ces cellules immunitaires interagissent avec les synoviocytes et les macrophages induisant leur prolifération anormale et contribuent à la production massive de cytokines pro-inflammatoires. Le facteur de nécrose tumorale α (TNF) et l'interleukine 7 (IL-17) sont des cytokines essentielles dans l'inflammation des articulations et contribuent à la production de cytokines pro-inflammatoires IL 6. Dans nos précédentes études, des modifications de la morphologie des cellules induites dans un environnement inflammatoire (augmentation du nombre de pseudopodes) étaient possiblement à l'origine de l'augmentation de l'absorption de cadmium minéral et de quantum dots. L'objectif de l'étude était d'approfondir plus amplement ces observations.

Méthodes :

Premièrement, les synoviocytes issus de donneurs variables (sains, arthrose (OA) ou polyarthrite rhumatoïde (PR)) exposés à différentes conditions inflammatoires (IL-17 seul,

TNF seul et une combinaison d'IL-17/TNF) ont été observés avec différents microscopes ((i) optique, (ii) digital holographique et (iii) holographique et tomographique) et comparés au témoin. Une quantification des paramètres morphologiques a été possible, incluant la confluence, l'élongation cellulaire, la vitesse de la motilité, l'aire, le périmètre, la circularité, la densité intracellulaire et le pourcentage de cellules selon le nombre de pseudopodes). Secondairement, des co-cultures entre des cellules mononuclées de sang périphérique (PBMCs) issus de donneurs sains et des synoviocytes issus de donneurs variables (sains ou polyarthrite rhumatoïde) en présence ou non de phytohémagglutinine (PHA) ou de cytokines (IL-17 / TNF) ont été utilisées pour mimer la situation *in vivo*. Ces co-cultures ont été observées uniquement en microscopie optique, les autres outils ne permettant pas de faire de mises au point convenable. Les paramètres morphologiques (l'aire, le périmètre et la circularité) ont pu être quantifiés.

Résultats :

Les cytokines inflammatoires ont induit nettement une modification de la morphologie cellulaire des synoviocytes, transformant ainsi une cellule étalée et étirée en une cellule rétractée comprenant à leur surface un nombre de pseudopodes plus élevé. Quantitativement, ces changements morphologiques ont été significativement différents pour les mesures de la confluence cellulaire avec une réduction de $31,7 \pm 2,5\%$ pour le témoin à $19,8 \pm 1,6\%$ pour IL-17 / TNF- α), de l'aire des synoviocytes avec une réduction globale dans le cas sain (témoin: $5425 \pm 532 \mu\text{m}^2$, IL-17 / TNF- α : $2959 \pm 243 \mu\text{m}^2$) et pathologiques OA (témoin: $6080 \pm 1321 \mu\text{m}^2$, IL-17 / TNF- α : $3978 \pm 376 \mu\text{m}^2$) et PR (témoin: $4523 \pm 384 \mu\text{m}^2$, IL-17 / TNF- α : $2869 \pm 94 \mu\text{m}^2$), de l'élongation cellulaire vers la hausse dans les conditions inflammatoires (témoin: $55,0 \pm 1,5 \mu\text{m}$, IL-17 / TNF- α : $67,8 \pm 0,8 \mu\text{m}$) et de la vitesse de la motilité des cellules (témoin: $446,4 \pm 7,1 \mu\text{m/h}$, IL-17 / TNF- α : $1591,1 \pm 1,3 \mu\text{m/h}$). Ce même impact important sur la morphologie cellulaire a été observé en co-culture des synoviocytes et des PBMCs, touchant les deux types cellulaires. Les synoviocytes par leur rétraction et

inversement pour les PBMCs dont leurs aires croient en co-culture et d'autant plus en conditions inflammatoires et avec la PHA. Ceci suggère que l'activation des cellules induit un changement morphologique des cellules. Fait intéressant, dans les cas de synoviocytes issus de patients atteints de polyarthrites rhumatoïdes, la co-culture n'était pas suffisante pour activer à la fois les PBMCs et les synoviocytes elles-mêmes. L'effet morphologique provenait uniquement de l'environnement inflammatoire et non de l'interaction cellulaire comme si elle n'existait pas et n'avaient pas eu lieu. L'effet morphologique restait donc partiel et n'était pas aussi fort qu'avec le cumul de l'interaction cellulaire et l'environnement inflammatoire. Au niveau intracellulaire, les éléments intracellulaires étaient plus denses dans les conditions IL-17/TNF. La membrane cellulaire exhibait un nombre de pseudopodes bien plus important dans les conditions inflammatoires (témoins : 18 % des cellules présentaient plus de 4 pseudopodes vs. IL-17 / TNF : 82 %). Par ailleurs, deux types de pseudopodes ont été observés : un plus globulaire et un autre plus d'aspect chevelu suggérant des origines de formations différentes (possiblement protéiques et lipidiques respectivement). Ces observations nécessitent plus d'investigations.

Conclusion

Les changements morphologiques de base des cellules sont induits par une modification de l'osmolarité extracellulaire. Ici, nous montrons que l'environnement inflammatoire probablement en intervenant dans l'homéostasie de la cellule induit des changements morphologiques massifs. Il reste à vérifier s'il existe une corrélation entre les cellules non activées et leurs fonctionnalités.

*CHAPITRE 3 : EVALUATION DE L'IMPACT DES MALADIES ARTICULAIRES
CHRONIQUES SUR LES VESICULES SECRETEES PAR LES SYNOVIOCYTES*

PARTIE 1 : DEFINITION DES ETUDES TRIBOLOGIQUES

NOTION DE RHEOLOGIE ET DE TRIBOLOGIE

La rhéologie est l'étude de la déformation et de l'écoulement de la matière et plus généralement de la viscosité et l'élasticité des matériaux sous l'effet d'une contrainte appliquée. Le comportement rhéologique des solutions et suspensions dépend largement de leur concentration et de la nature de la matière qui les constitue. Il peut varier d'un comportement Newtonien à un comportement plus complexe.

La tribologie englobe les concepts de contacts de surface, de frottement, d'usure et de lubrification. Plus précisément, la tribologie est l'étude des interactions entre surfaces solides en mouvement relatif.

APPLICATION SUR LE LIQUIDE SYNOVIAL

L'articulation synoviale, supportant les charges et conférant une friction et une usure minimales, est considérée comme un système tribologique parfait. L'ensemble du triplet tribologique de l'articulation synoviale est constitué : (i) du mécanisme représenté par le système musculo-ligamentaire, qui impose les sollicitations globales et qui se traduit au niveau local par une pression du contact et une vitesse relative des corps en contact ; (ii) des 1^{ers} corps constitués par les cartilages articulaires qui forment les surfaces en contact, (iii) du 3^{ème} corps, le liquide synovial, qui sépare les 1^{ers} corps et assure la lubrification (figure 12).

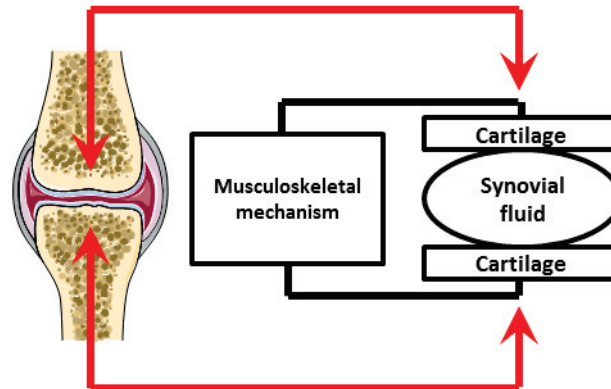


Figure 12 : Triplet tribologique de l'articulation synoviale.

Le triplet possède deux fonctions essentielles quant à la réalisation de tout mouvement. D'une part, il assure une fonction dynamique en diminuant au maximum les forces de friction présentes lors de déplacement des segments osseux. D'autre part, il assure une fonction statique lui permettant d'assurer la transmission, la répartition et l'amortissement des contraintes subies par l'articulation. Des composants biologiques du liquide synovial et leur concentration jouent un rôle crucial dans le mécanisme de lubrification des articulations^{159 160 161 162 163} (figure 13, tableau 2). En terme rhéologique, le liquide synovial est un liquide non newtonien et rhéofluidifiant. Le fluide rhéofluidifiant est caractérisé par une diminution de la viscosité lorsque le gradient de vitesse augmente. L'accélération de l'écoulement force les constituants à s'orienter de façon parallèle entre eux. L'ensemble oppose ainsi une résistance moindre à l'écoulement d'où une viscosité moins importante³⁴¹⁶⁴
^{165 166 167 168} .

Main components of the synovial fluid and their roles

Hyaluronic acid : Lubrication and shock absorption with its viscoelastic properties (*i.e.* deformable gel which becomes elastic if applied shear forces are higher).

Albumin:

- Transports nutrients and balances extracellular and intracellular osmotic pressures
- role in bio-lubrication by increasing the viscosity by forming crosslinks between the molecular chains of hyaluronic acid.

Globulins: precipitates lipids and protects against wear.

Phospholipids and cholesterol:

- Thermal insulation and mechanical protection
- Structural and lubrication role by forming lipid bilayers on the articular surface or the lipid vesicles

Lubricin: a major joint protector, prevents cartilage wear, proliferation and adhesion of synoviocytes

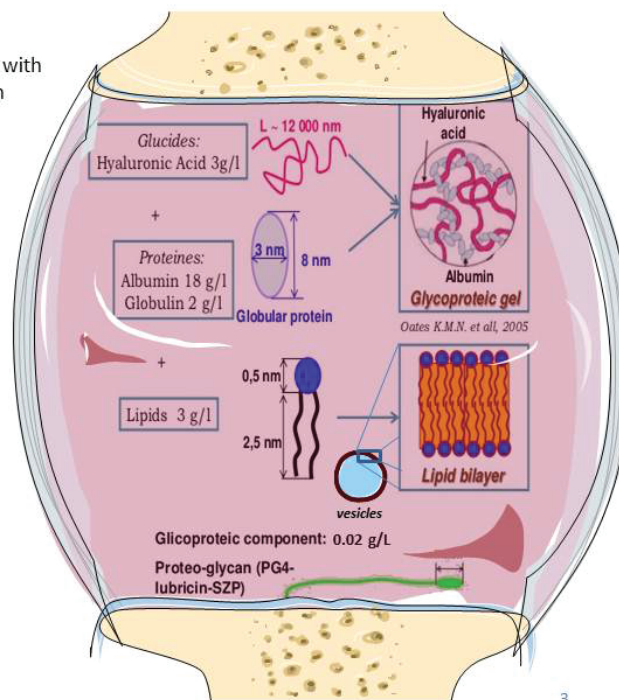


Figure 13: Principales composants du liquide synovial et leurs rôles

Tableau 2 : Caractéristiques physiologiques du liquide synovial ¹⁶⁹.

	Sain	Arthrose
Concentration des protéines totales	18-20 mg/mL	30.6 – 31.8 mg/mL
Albumine	11.65 – 12.92 mg/mL	17.75 – 18.45 mg/mL
Globuline	6.84 – 7.58 mg/mL	12.85 – 13.36 mg/mL
Lubricine	0.05 - 0.35 mg/mL	0.05 - 0.35 mg/mL
Acide hyaluronique	1 - 4 mg/mL	1.5 mg/mL
pH	7.3 – 7.43	7.4 – 8.1
Coefficient de friction	élevé	élevé
vitesse angulaire	faible	élevé
Viscosité	élevé (45 Pa.s à 2,5 Hz)	faible (8 Pa.s à 2,5 Hz)
Elasticité	élevé (100 à 2,5 Hz)	faible (8 à 2,5 Hz)
Taux de cisaillement	élevé	faible

PARTIE 2 : CARACTERISATION STRUCTURALE, RHEOLOGIQUE ET TRIBOLOGIQUE DE SURNAGEANTS DE CULTURES CELLULAIRES PROVENANT DE PATIENTS SAINS ET ATTEINTS DE MALADIES ARTICULAIRES

La rareté d'obtention du liquide synovial en particulier de sujets sains qui a valu le plus souvent l'utilisation de liquide synovial d'animaux et en faible volume nous a amené à utiliser un modèle de liquide synovial, en l'occurrence ici le surnageant de cultures de synoviocytes. La transition entre le liquide synovial et le surnageant a été permise en raison que les synoviocytes sécrètent l'ensemble des biomolécules qui confèrent les propriétés rhéologiques et tribologiques du liquide synovial.

Des études préliminaires au laboratoire LamCos en collaboration avec l'unité immunogénomique et inflammation ont d'ores et déjà été réalisées (thèse de doctorat d'université MATEI Constantin Ionut) en 2012¹⁷⁰. Ces résultats avaient déjà permis de mettre en évidence les paramètres de viscosité, de frottements et d'élasticité des surnageants de synoviocytes provenant de patients atteints d'arthrose et de polyarthrite rhumatoïde, mais pas de patients humains sains. Des vésicules lipidiques de l'ordre de 200 nm avaient aussi été mises en évidence, de la même façon que ce qui avaient été détectées chez le rat. Le fait marquant de cette thèse est que pour les échantillons dans les conditions non inflammatoires, de grandes vésicules lipidiques multilamellaires de l'ordre de 200 nm avaient été observées alors que pour les conditions inflammatoires, les vésicules étaient unilamellaires de l'ordre de 10 à 100 nm (figure 14). De plus, les proportions d'acides gras oméga 3 et oméga 6 de ces vésicules différaient entre les conditions inflammatoires et non inflammatoires ; notamment la balance oméga 3 (anti-inflammatoire) et oméga 6 (pro-inflammatoire) était plus en faveur des oméga 6 pour les échantillons de polyarthrite rhumatoïde. Depuis, les méthodes de

caractérisation des vésicules ont été améliorées. Il a été donc envisagé de reprendre dans la totalité une partie de cet étude avec un grand nombre d'échantillons et des conditions supplémentaires en variant les ajouts de cytokines impliquées dans la polyarthrite rhumatoïde (telles que l'IL-17, TNF, IL-17 – TNF) ; à savoir l'étude de rhéologie (viscosité et élasticité), l'étude de tribologie (compression en microscopie de force atomique), l'étude morphologique des vésicules présentes dans le liquide synovial (taille/nombre, détermination du module de courbure, et extraction des membranes lipidiques).

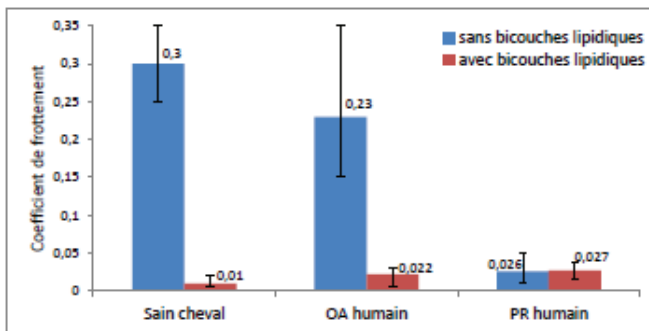


Figure 72. Variation du coefficient de frottement pour le contact modèle articulaire fonction de la présence ou non de bicouches lipidiques sur les surfaces frottantes, dans le cas sain (cheval) et le cas pathologique OA/PR (humain). Histogramme des valeurs médianes affectées de l'écart entre les valeurs expérimentales minimale et maximale obtenues sur 2 échantillons LS sain, 6 échantillons LS OA et 4 échantillons LS PR.

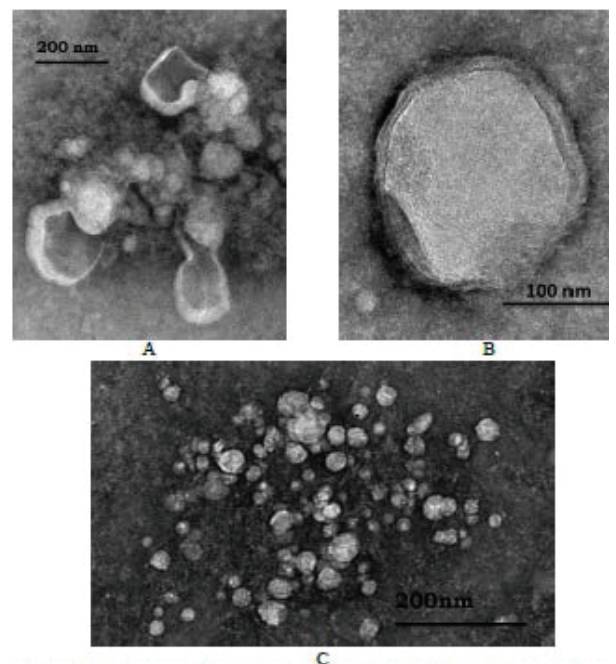


Figure 36. Vésicules dans des échantillons de liquide synovial pathologique humain A, et B - non inflammatoire (OA) ; C - inflammatoire (PR) observés (après dilution à 1% en MET avec coloration négative à l'APT 2%)

Figure 14 : Etude tribologique comparant le liquide synovial de patients atteint d'arthrose (OA) et de polyarthrite rhumatoïde (PR) avec l'observation des vésicules lipidiques (Thèse de doctorat d'université de MATEI Constantin Ionut, 2012¹⁷⁰)

*CHAPITRE 4 : ELABORATION ET EVALUATION D'UNE PREPARATION HOSPITALIERE
INNOVANTE POUR LE TRAITEMENT DE MALADIES ARTICULAIRES CHRONIQUES
DANS UNE ETUDE PRE-CLINIQUE*

Cette partie correspond à l'étape de preuve du concept à propos de la mise en forme d'une nouvelle préparation pharmaceutique à visée locale. Cette preuve de concept permettra le développement d'un nouveau traitement pour des patients en impasse de thérapie. Ainsi, la formulation d'un gel thermosensible de CdTe-QDs sera développée pour éviter la dissémination du cadmium dans l'organisme, puis testée sur des cellules issues de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et sur un modèle animal représentatif de la pathologie. Plus précisément, une formulation sous l'état liquide à température ambiante qui se gélifie à la température corporelle sera développée. Un tel gel thermosensible avait déjà été développé avec succès par nos soins pour un traitement oculaire indiqué dans la kératite amibienne (cf article en cours de révision annexe 1). Cette formulation doit être proche des caractéristiques physiologiques du liquide synoviale. La caractérisation de la formulation se fera par mesure de la viscosité et de la taille des micelles de la suspension colloïdale. L'efficacité et la toxicité seront évaluées par des tests *in vitro*, et *in vivo* lors de l'étude pré-clinique.

PARTIE 1 : PREUVE DE CONCEPT : MISE EN FORME D'UNE PREPARATION PHARMACEUTIQUE

La formulation d'un gel thermosensible de QDs joue un double rôle : faciliter l'injection et empêcher la dissémination du cadmium dans tout l'organisme. Le développement de cette formulation a été fait sur la base des caractéristiques physiologiques du liquide synovial en termes de rhéologie (viscosité) en utilisant des poloxamères et de l'alginate. La normalisation de la viscosité doit améliorer les fonctions mécaniques et métaboliques de l'articulation. La caractérisation rhéologique du gel a été faite avec un rhéomètre. Plusieurs tests ont été réalisés jusqu'à l'obtention de la meilleure composition et proportion en viscosifiant et/ou en gélifiant. La préparation pharmaceutique de QDs dans le

gel thermosensible doit être stable en solution et doit présenter une viscosité satisfaisante à la température du corps soit 37°C. La réalisation des tests *in vitro* a permis aussi d'ajuster et de sélectionner la composition de la formulation la plus efficace. Cette formulation devait présenter une efficacité semblable au cadmium minéral dans la cavité synoviale et une toxicité faible ou quasi nulle sur les autres cellules présentes dans la cavité synoviale telle que les chondrocytes.

Poloxamères

Les poloxamères sont des copolymères de polyoxypropylène correspondant à des polymères amphiphiles thermosensibles (figure 16). Les deux premiers chiffres x 100 donnent la masse molaire approximative du bloc central, et le dernier chiffre x 10 donne le taux massique de motifs oxyde d'éthylène dans la molécule. Par exemple, le poloxamère 407 a une masse molaire du bloc central de 4 000 g•mol⁻¹ et un taux de motifs oxyde d'éthylène de 70 %. L'état fluide à température ambiante facilite l'administration et l'état de gel est obtenu au-dessus de la température de transition solution-gel à la température corporelle. Cet état de gel permet aussi la libération prolongée du principe actif. L'évaluation pharmaceutique consiste à déterminer le comportement rhéologique (courbe d'écoulement ou des études oscillatoires), température de transition solution-gel, la libération du médicament *in vitro* en utilisant une membrane synthétique ou physiologique à l'aide d'une cellule de Franz et les caractéristiques d'adhérence. Les formulations avec le poloxamère 407 conduisent à une meilleure solubilisation des médicaments solubles dans l'eau et à un profil de libération prolongée pour de nombreuses applications galéniques (par exemple, par voie orale, rectale, topique, ophtalmique, nasale et les préparations injectables). L'utilisation concomitante de P407 et P188 permet d'ajuster les températures de transition de solution-gel ou d'augmenter les propriétés bioadhésives. De plus, le poloxamère 407 exerce une modulation significative de la

fonction immunitaire avec une amélioration significative de l'immunité à médiation cellulaire et de la réponse immunitaire humorale et favorise l'action de divers agents. En effet, des études préliminaires sur des animaux ont montré que l'activité cytotoxique des agents antinéoplasiques est augmentée de deux à trois fois. Les nanoparticules enrobées dans le gel offrent une alternative intéressante pour réduire significativement l'absorption hépatique. Effectivement, les nanoparticules se camouflent grâce aux copolymères évitant ainsi d'être reconnu par les macrophages. Sur la base de tous les éléments qui viennent d'être évoqué, les poloxamères paraissent comme des excipients idéaux pour la formulation que nous souhaitons développer (62). Par ailleurs, les poloxamères disposent d'une monographie à la Pharmacopée Européenne.

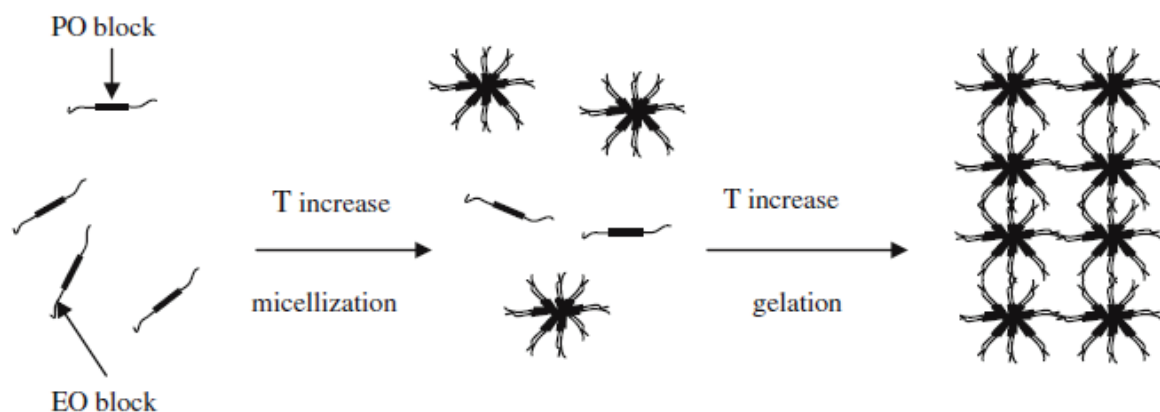


Figure 16: Représentation schématique du mécanisme d'association de l'eau avec le poloxamère P407.

Alginate

L'alginate est un polysaccharide formé de deux monomères: l'acide mannuronique et l'acide guluronique. L'ajout de ce composant permettrait la modification des propriétés d'élasticité du gel ou d'encapsulé les QDs pour obtenir une taille supérieure de 10 nm. En effet, le module d'élasticité du gel peut être augmenté de façon significative, tandis

que la viscosité de la solution augmente peu, en utilisant une combinaison de polymères de haut et bas poids moléculaires d'alginate^{175 176 177}.

METHODES

La formulation d'un gel homogène s'effectue par le bon choix des matières premières (la base et l'agent gélifiant) et de la méthodologie de fabrication¹⁷⁸. Premièrement, un mélange de poudre a été constitué à partir de poloxamère P407, poloxamère P188 avec et sans alginate. Cette poudre a ensuite dispersée dans de l'eau ppi stérile sous agitation magnétique à froid (placé dans un réfrigérateur) qui a été poursuivi toute une nuit afin d'obtenir une meilleure homogénéisation. L'ajout des QDs n'a été fait que le lendemain sous agitation magnétique. La préparation a été conditionnée dans des flacons de 10 mL avec col serti puis stérilisée à l'autoclave.

PARTIE 2 : CONTROLE QUALITE DE LA PRODUCTION

Le contrôle qualité des suspensions de CdTe-QDs et du gel thermosensible du CdTe-QDs ont suivi les bulletins d'analyse suivant :

DISCUSSION GENERALE

L'objectif principal de ce travail était de produire une préparation pharmaceutique intra-articulaire originale pour traiter les maladies articulaires chroniques avec la mise en place d'un contrôle pharmaceutique et d'évaluer l'efficacité de cette préparation dans le cadre d'une étude préclinique. Pour cela, une phase de recherche fondamentale a été initiée pour évaluer et caractériser l'effet cytotoxique du principe actif *in vitro* sur des synoviocytes humaines atteints de maladies articulaires chroniques en l'absence et en présence d'un contexte inflammatoire chronique. Durant cette phase, nous avons ensuite investigué l'amélioration d'absorption du principe actif dans un contexte inflammatoire pour en déduire des variables pharmacocinétiques. De la même façon, nous avons voulu comprendre l'impact de l'inflammation chronique sur le liquide synovial. Ces données ensuite ont été prises en compte pour concevoir le nouveau produit pharmaceutique présentant une fonctionnalité nanomécanique similaire au liquide synovial. La phase de recherche fondamentale a été suivie par la phase de développement galénique durant laquelle de nombreuses compositions ont été étudiées jusqu'à l'obtention de la formulation avec les paramètres optimaux à notre projet. Une phase de développement analytique en vue du contrôle qualité du produit pharmaceutique a permis ensuite de caractériser la formulation sélectionnée. Une caractérisation préclinique *in vitro* et *in vivo* a validé l'efficacité de cette option pharmaceutique. Toutes ces étapes correspondent à la biopharmacie clinique.

Dans un premier temps, nous avons démontré que la reproductibilité de l'effet du cadmium minéral était satisfaisante entre le nitrate de cadmium et les CdTe-QDs. Dans la poursuite du projet, il était primordial de définir le type de mort cellulaire. Pour un agent cytotoxique, une mort physiologique par apoptose et/ou autophagie était obligatoire d'autant plus dans ce contexte de maladies inflammatoires où la nécrose est génératrice d'inflammations. Nous avons développé une nouvelle méthode pour caractériser la mort

cellulaire, tout en suivant l'agent cytotoxique, en utilisant les capacités fluorescentes des CdTe-QDs. Cette méthode comportait de nombreux avantages et a fourni de nombreuses informations, contrairement aux méthodes conventionnelles, à savoir la caractérisation de deux types de morts cellulaires, la cinétique et le déroulé des processus de morts cellulaires, la possibilité de quantifier et des images d'une clarté excellente et de bonnes résolutions. Après confirmation d'une mort cellulaire par apoptose et autophagie et non par nécrose, qui a été conforté par un dosage de la production d'IL-6 après ajout d'IL-17 et de TNF (figure 21, résultats non parus dans l'article) en présence des CdTe-QDs.

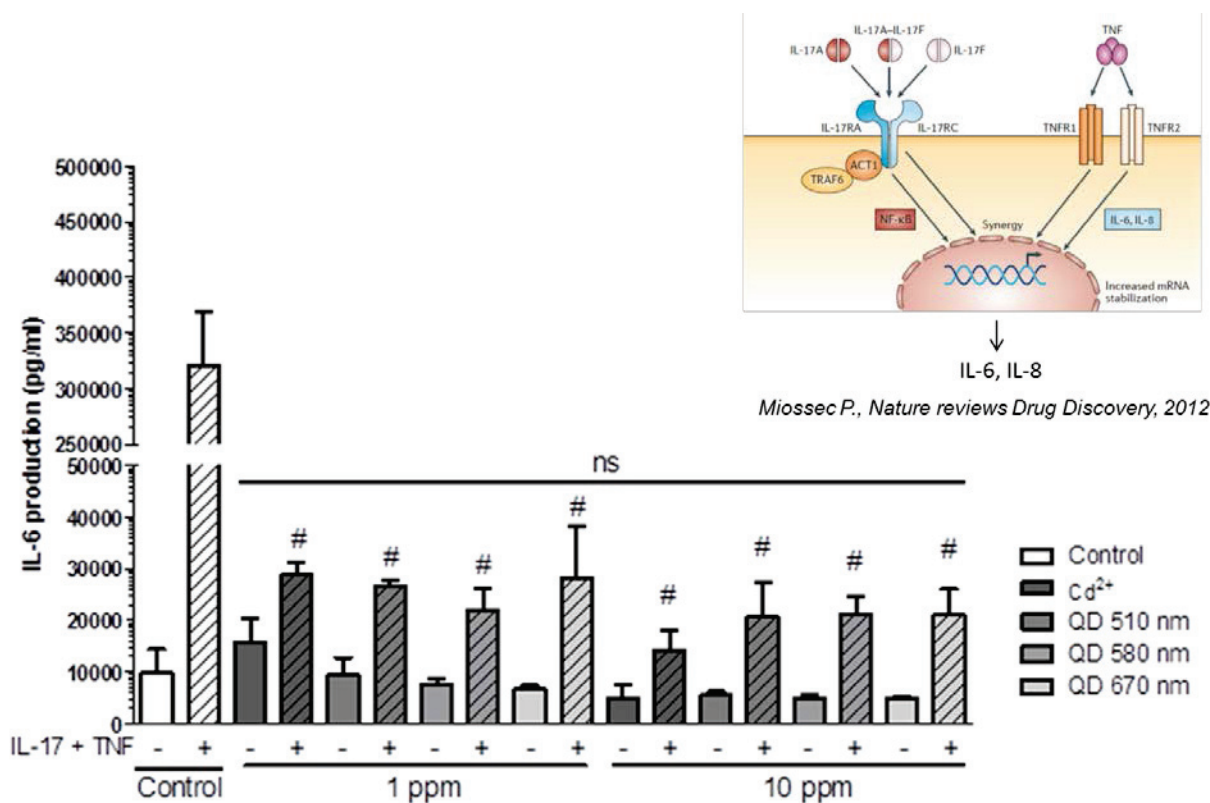


Figure 21 : Quantification de la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 après traitement avec le cadmium minéral et le CdTe-QDs.

Par ailleurs, en se basant sur toutes les observations réalisées en microscopies, plusieurs pistes mécanistiques d'un point de vue moléculaire récapitulés dans la figure 22 ont été entrevues, mais n'ont pas pu être explorées par manque de temps.

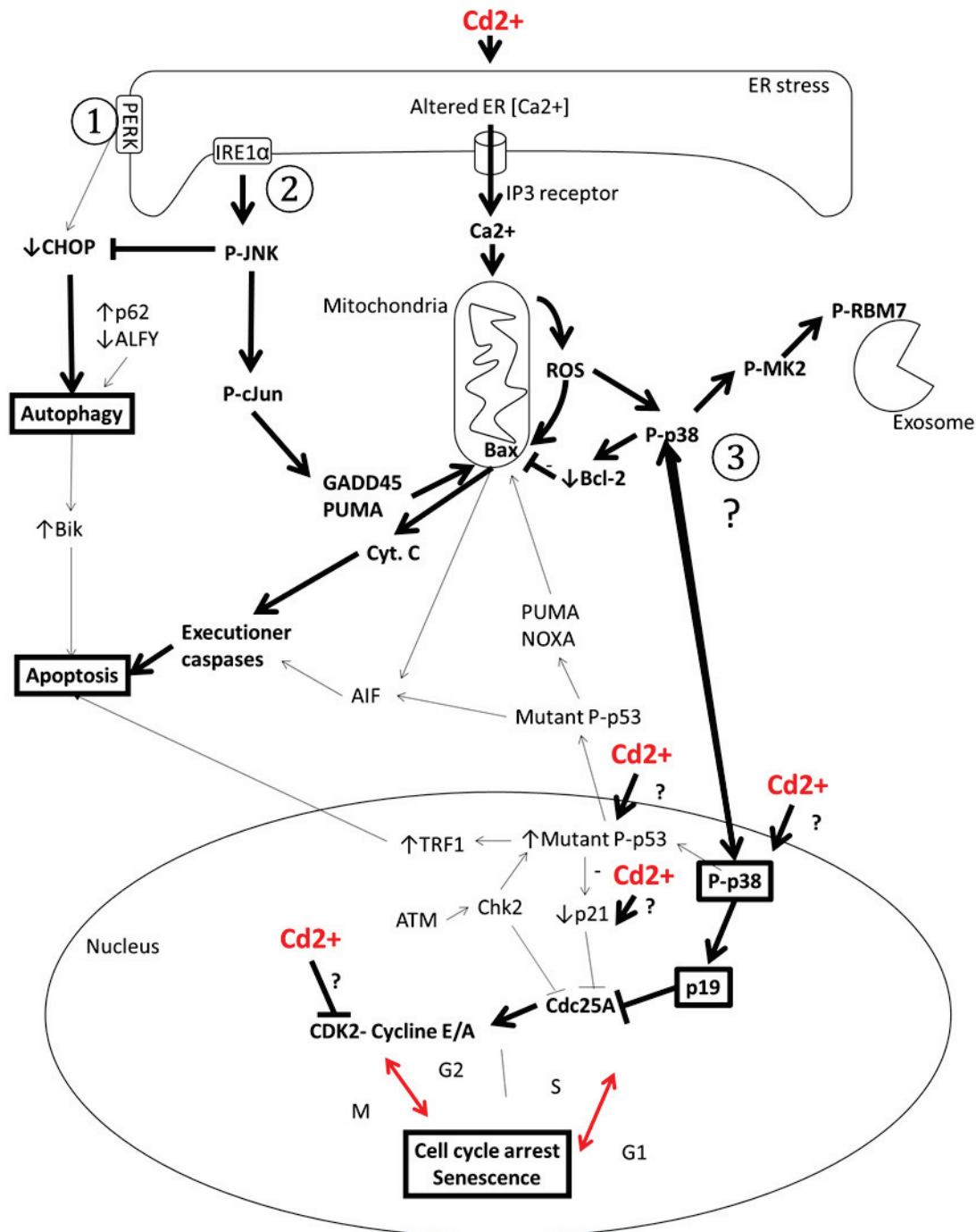


Figure 22 : Les différentes cibles potentielles du cadmium minéral affectant les voies de signalisation.

Lors des ajouts de cytokines afin de mimer un contexte inflammatoire chronique, il a été constaté une apparition des effets cytotoxiques du cadmium plus précoces. Toutefois, aucun changement de la vitesse de mort cellulaire déterminé grâce au système d'impédance des cellules n'a été trouvé. Durant ces expérimentations, il avait été remarqué des changements morphologiques nets des synoviocytes (rétraction cellulaire) avec une augmentation du nombre de pseudopodes. Il avait été émis l'hypothèse que l'augmentation du nombre de pseudopodes devait augmenter la surface de contact avec les éléments extérieurs engendrant ainsi une captation plus importante. Nous avons donc investigué plus amplement ces données en employant divers techniques microscopiques et en quantifiant ces changements morphologiques. Les observations faites initialement se sont avérées vraies et ont aussi été observées pour les synoviocytes en co-culture avec les cellules mononuclées du sang (PBMCs). Ces dernières cellules ont aussi subi un changement morphologique en devenant plus volumineuses ce qui a permis de mettre en évidence que le changement morphologique était associé à l'activation cellulaire. Il a aussi été remarqué que contrairement à ce qui est annoncé dans la littérature, l'interaction entre ces deux types cellulaires n'apparaissait pas comme un simple contact, mais comme une fusion cellulaire avec une forte déformation des PBMCs. De plus larges investigations sont nécessaires pour clarifier ce point. De plus, en testant différents types cellulaires provenant de patients sains ou atteint d'arthrose ou de polyarthrite rhumatoïde, il a été observé que pour le cas de la polyarthrite rhumatoïde, l'interaction cellulaire n'était pas suffisante pour déclencher une activation cellulaire et nécessitait pour cela la présence d'un environnement inflammatoire. Ces premières données peuvent être utilisées à visée diagnostic pour détecter les cellules pathologiques lorsque la clinique et les résultats biologiques ne permettent pas d'établir un diagnostic sûr (par exemple dans le cas de PR séronégative). Cette piste de diagnostic est donc à exploiter.

L'intérêt de notre étude s'est ensuite porté sur l'impact de l'inflammation chronique sur le liquide synovial. Le manque de données dans la littérature dans ce cas précis de l'inflammation chronique et le manque d'échantillons de liquides synoviales en raison de leurs raretés nous a amené à faire une caractérisation structurale, rhéologique et tribologique sur des surnageants de synoviocytes sains ou atteints d'arthrose ou de polyarthrite rhumatoïde. Cette étude a nécessité une longue mise au point par la sélection du point le plus propice pour avoir une quantité suffisante de matières (vésicules, lipides) pour les étudier, par la sélection du passage permettant une reproductibilité des données et la vérification de la reproductibilité inter-patient avant d'entamer une étude plus complète. Suite à cela, il avait été observé premièrement des différences de structures, de tailles et de rigidités des microvésicules lipidiques sécrétées par les synoviocytes entre les cas sains, arthrosiques et arthritiques. Avec pour le cas arthrite, un statut d'emblée « get-out » (masse gélatineuse en dehors des vésicules) qui avait induit une viscosité plus importante. Secondairement, l'ajout de cytokines inflammatoire avait induit quelque soit l'origine des synoviocytes un statut « gel-out » et une agrégation des microvésicules. Pour rappel, ces microvésicules jouent un rôle prépondérant dans le système de lubrification des articulations par effet de roulement. Ceci avait donc pour conséquence de détériorer la qualité du liquide synovial. Par ailleurs, les résultats obtenus pour les viscosités avaient un profil différent de ceux observés traditionnellement en littérature. Dans le chapitre 3, des hypothèses explicatives avaient été émises quant à la manière de réaliser les expérimentations en dénaturant le liquide synovial. Ces résultats expliquent aussi que la théorie d'apporter de l'acide hyaluronique avec une viscosité similaire au liquide synovial n'est pas suffisante pour obtenir une lubrification optimale et obtenir des résultats satisfaisants en clinique. Dans la même optique que précédemment, ces résultats peuvent intervenir à visée diagnostic, mais contribue aussi au développement de nouvelles

thérapeutiques ou substituts au liquide synovial où la présence des microvésicules doit être prise en compte.

A propos de la mise en forme d'une nouvelle préparation pharmaceutique à visée locale, plusieurs pistes de développement avaient été suggérées. Une préparation d'un gel oculaire thermosensible pour le traitement de la kératite amibienne (annexe 1) avait déjà été réalisée ce qui avait permis de suggérer l'idée d'ajouter du cadmium minéral tel quel dans un gel thermosensible. Le cadmium minéral dans un milieu alcalin avait alors été testé dans une solution aqueuse en milieu alcalin et dans un gel sur des synoviocytes et n'avaient pas induit de cytotoxicité. En effet un changement conformationnel du cadmium communément appelé la spéciation chimique du cadmium minéral (connu pour les métaux) survient en milieu alcalin en jouant sur le potentiel rédox et diminuent la toxicité de l'élément. L'ajout d'acide hyaluronique avait aussi été discuté, mais pour diverses raisons cet ajout a été écarté, à savoir pour des aspects économiques, des difficultés d'obtention de l'acide hyaluronique réticulée à haut poids moléculaire en quantité suffisante et pour un apport bénéfique modéré. Les essais avec les formulations comprenant l'alginate ont montré rapidement leurs limites, notamment en terme d'instabilité de la solution quelquesoit le solvant mais immédiatement perçue avec le NaCl 0.9 % et ses résidus laissés dans le surnageant lors des essais *in vitro* démontrant l'instabilité de l'alginate avec les éléments qui constituent le milieu de culture cellulaire et donc probablement avec les éléments dans l'organisme en particulier la cavité synoviale. Après sélection d'une formulation avec un gel constitué uniquement de poloxamères, la caractérisation rhéologique a été tout de même comparée avec la viscosité de liquide synoviale provenant de patient sain fournie par la littérature et comparé à la taille des microvésicules sécrétées par les synoviocytes. Ainsi en réalisant la granulométrie, il a été vu que pour la gamme de concentration de 15 à 30 % de poloxamères des micelles chargées en CdTe-QDs avaient des tailles de l'ordre de 100 à 200 nm, soit du même ordre que les

microvésicules lipidiques. Nous avons aussi montré que contrairement à la suspension colloïdale de CdTe-QDs, les micelles de CdTe-QDs étaient lipophiles et passaient donc plus facilement la membrane cellulaire. Ceci a aussi été constaté lors des essais *in vitro* en observant une meilleure efficacité du gel de CdTe-QDs versus la suspension de CdTe-QDs à des concentrations très faibles. Dans les essais *in vivo*, la forte induction d'arthrite n'a pas permis de juger convenablement de l'effet du gel thermosensible avec le CdTe-QDs sur l'arthrite. Se pose la question si pour une telle induction le temps nécessaire d'exposition d'une semaine était adapté et si le sacrifice n'aurait pas été initié trop tôt puisqu'il a été observé pour de fortes arthrites une réduction du score arthritique au bout de 20 – 21 jours. Toutefois, en excluant les scores arthritiques (3,5 et 4), avec un n = 5 rats, des résultats équivalents avec le nitrate de cadmium à l'étude précédente ont été obtenus. Et le gel thermosensible avec le CdTe-QDs présente une meilleure efficacité que le cadmium nitrate avec une concentration 10 fois moindre. Par ailleurs, les dosages des transaminases étaient diminués dans les conditions de gel thermosensibles avec CdTe-QDs aux 3 concentrations. Les résultats d'histologie permettront aussi de fournir davantage de renseignements sur l'efficacité du produit notamment en termes d'amélioration de la perte osseuse. Ces essais sont encourageants mais nécessite une confirmation par une deuxième étude. Des essais de libération des CdTe-QDs devront aussi être réalisés pour évaluer la diffusion du CdTe-QDs en dehors du gel. Un premier essai de libération des CdTe-QDs avait déjà été réalisé mais celui-ci n'avait pas fonctionné en raison d'une interaction du CdTe-QDs avec le matériau qui compose le filtre.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce projet de recherche innovant est un véritable challenge médical d'autant plus à l'heure actuelle où la viscosupplémentation par injection intra-articulaire d'acide hyaluronique a été déremboursée depuis le 1^{er} juin 2017, en raison de son efficacité modérée, sans aucune alternative de traitement pour les patients. Ces résultats ont contribué à des avancées scientifiques, en mettant au point des nouvelles méthodes, en apportant des données non rapportées à ce jour dans la littérature et en développant une nouvelle option thérapeutique. Lors d'impasse thérapeutique, la formulation d'une nouvelle thérapie locale peut être une alternative et éviter ou retarder une intervention chirurgicale. Cette thérapie locale peut être une technique rapide, non invasive et réalisable en ambulatoire. Les quantum dots étant fluorescents, un suivi par imagerie peut aussi être envisagé.

Ces résultats encourageants ont été le fruit de plusieurs collaborations réussies entre divers laboratoires de recherches académiques et complémentaires par leurs spécialisations dans différents domaines (immunologique, pharmaceutique, imagerie cellulaire, tribologique, expérimentation animale).

Ce projet se poursuivra après la thèse. Si les résultats se confirment avec la deuxième étude chez le rat, une étude de stabilité et une certification des CdTe-QDs en grade pharmaceutique devront être réalisés. Le cas échéant, un ajustement de la formulation devra être entrepris.

L'étude de stabilité permettra de fixer les conditions de stockage de cette nouvelle formulation et la date de péremption. Cette étude de stabilité comprendra la stabilité chimique (dosage du ou des principe(s) actif(s)), la stabilité physique (apparence organoleptique, pH, osmolalité), la stabilité microbiologique (test de stérilité et dosage d'endotoxines) ¹⁸². Cette

étude de stabilité initialement prévue n'a pas pu être réalisée dans les temps impartis de la thèse. La méthode de dosage séparative développée pour la suspension colloïdale de CdTe-QDs devra être validée selon les recommandations des *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)* ¹⁸³ (figure 23). Pour le gel thermosensible de CdTe-QDs, nous avons tenté d'analyser à la fois le poloxamère et le CdTe-QDs, mais en raison du quenching généré par le poloxamère, un prétraitement analytique de l'échantillon pour faire précipiter le poloxamère sera nécessaire pour doser uniquement la quantité de CdTe-QDs. Pour le test de stérilité, en raison d'un possible effet bactérien des quantum dots, un essai de fertilité selon la Pharmacopée Européenne devra être réalisé afin de valider l'essai de stérilité bien que celle-ci a été réalisée avec un kit antibiotique ¹⁸⁴.

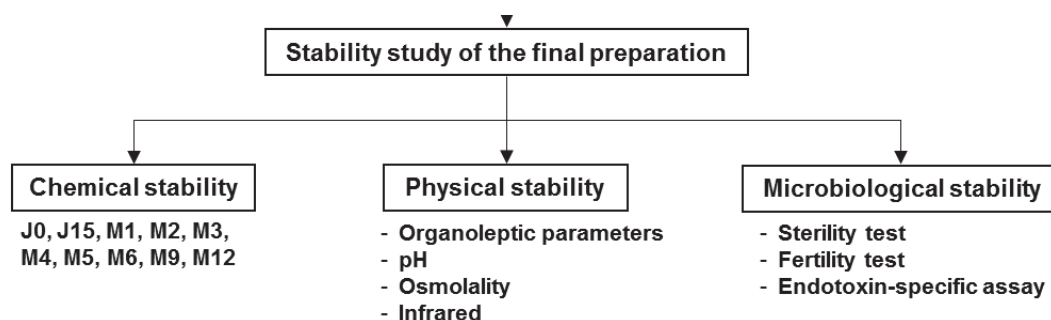


Figure 23 : Planification des études de stabilité

Une certification des CdTe-QDs en grade pharmaceutique devra ensuite être réalisée. Cette certification, réalisée selon la Pharmacopée Européenne, inclut l'analyse des solvants résiduels, des métaux lourds et des impuretés élémentaires (également selon les recommandations ICH Q3D) et des essais de la toxicité anormale chez la souris. A noter que pour ces essais de la toxicité anormale chez la souris, la Pharmacopée Européenne indique que pour toute autre voie hors orale ou intraveineux (en l'occurrence ici en intra-articulaire),

l'injection doit être réalisée par intraveineux ou en intra-péritonéale. Malgré que l'administration ne se fasse pas en condition de pratique réelle, il reste important d'évaluer la voie intraveineuse, car un des risques de la voie intra-articulaire est d'injecter en dehors de la cavité intra-articulaire.

ANNEXE 1

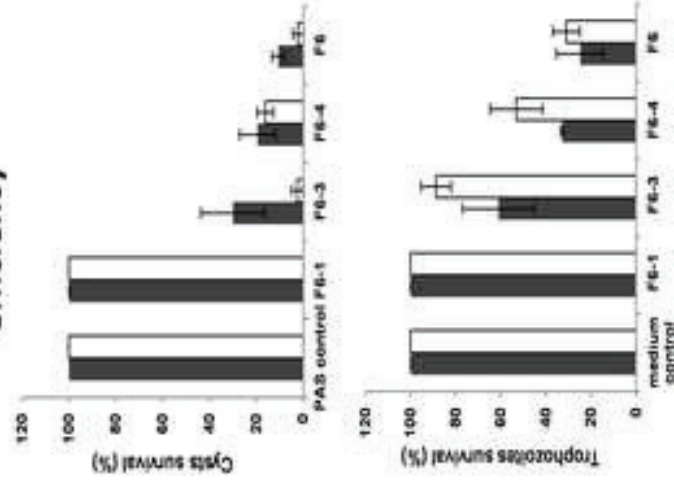
Eye drop formulations



Permeation and penetration through bovine cornea



In vitro anti-amoebic efficiency



Dual chlorhexidine digluconate – disodium EDTA loaded thermosensitive ocular gel for *Acanthamoeba* keratitis treatment

Annamaria Cucina^{a,b}, Arnaud Risler^{c,‡}, Samira Filali^{a,b,‡}, Camille Febvay^d, Damien Salmon^{a,b},

5 Christine Pivot^a, Michel Pelandakis^e and Fabrice Pirot^{a,b,*}

^a *Service Pharmaceutique, Plateforme Fripharm, Groupe Hospitalier Centre Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, 5, Place d'Arsonval, F-69437 Lyon cedex 03, France*

^b *Université de Lyon, Laboratoire de Pharmacie Galénique Industrielle, UMR-CNRS 5305, Plateforme
10 Fripharm, ISPB-Faculté de Pharmacie, Université Claude Bernard Lyon 1, 8, avenue Rockefeller, F-69373 Lyon Cedex 08, France*

^c *Laboratoire Lorrain de Chimie Moléculaire, Faculté des Sciences et Techniques, Université de Lorraine, Boulevard des Aiguillettes, F-54506 Vandoeuvre les Nancy, France.*

^d *Service d'Ophtalmologie, Groupement Hospitalier Edouard Herriot, 5, Place d'Arsonval, F-69437
15 Lyon cedex 03, France.*

^e *Université de Lyon, Laboratoire de Microbiologie, Adaptation et Pathogénie, UMR 5240, ISPB-Faculté de Pharmacie Laboratoire L3, 8, avenue Rockefeller - 69373 Lyon Cedex 08, France.*

* : Corresponding author

20 Prof. Fabrice Pirot
Laboratoire de Pharmacie Galénique Industrielle, UMR-CNRS 5305, Plateforme Fripharm, Faculté de Pharmacie, Université Claude Bernard
Tel : 33 [0] 4 78 78 56 86
Tel : 33 [0] 6 15 25 14 27
25 Fax: 33 [0] 4 78 77 72 47
Email: fabrice.pirot@univ-lyon1.fr
<http://fripharm.com>

30 [‡] These authors have equally contributed to the present manuscript.

Abstract

Poor bioavailability and low residence time limit the efficiency of conventional biguanide-based eye drops against *Acanthamoeba* keratitis. The aim of this work was to formulate an original anti-amoebic thermoreversible ocular gel combining biguanide and metalloproteases inhibitor - chelating agent. Chlorhexidine digluconate (CHX)-ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (Na₂EDTA) were compounded in poloxamer 407 saline solution. CHX-Na₂EDTA loaded thermosensitive ocular gel exhibited appropriate pH (5.73 ± 0.06), iso-osmolality (314 ± 5 mOsm/kg), thermal gelation, and viscosity (12.0 ± 3.0 mPa and 20.0 ± 3.6 mPa at 20°C and 33°C, respectively) properties. Corneal bioadhesion of ocular gel was successfully tested onto isolated bovine eyes as well as the assessment of CHX penetration into the cornea. Intracorneal CHX concentration was found greater than trophozoite minimum amoebicidal concentration and minimal cysticidal concentration after 15-min and 2-h ocular exposure, respectively, while any CHX permeation through the cornea was detected (< 51 ng/cm²/h). Improvement of CHX ocular bioavailability was attributed to probable solubilization of tear film lipid layer by poloxamer. *In vitro* efficiency of CHX-Na₂EDTA ocular gel was confirmed from the drastic reduction of trophozoite and cyst survival (to 25% and 2%, respectively), confirming the potential of the multicomponent pharmaceutical material strategy for the treatment of *Acanthamoeba* keratitis.

50

Keywords

Acanthamoeba

Keratitis

Eye drops

55 Chlorhexidine

EDTA disodium salt

Poloxamer

1. Introduction

60 The free-living amoeba *Acanthamoeba* is one of the most prevalent protozoa isolated in natural environment and anthropized sites with a worldwide distribution (Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Visvesvara and Schuster, 2008). Its lifecycle includes (i) a trophozoite feeding on organic molecules and other microorganisms and dividing by mitosis; and (ii) a double-walled cyst (Lloyd, 2014). *Acanthamoeba* is an opportunistic pathogen involved in keratitis (i.e., a painful, severe sight-
65 threatening infection of the cornea in healthy patients) (Chin et al., 2015), in granulomatous amebic encephalitis and cutaneous amebiasis in immuno-compromised patients (Marciano-Cabral and Cabral, 2003). The prevalence of *Acanthamoeba* keratitis (AK) is estimated to 1.2 per million adults per year and up to 2 per 10'000 contact lens wearers per year (Page and Mathers, 2013). Advanced cases of AK may lead to surgical enucleation (Kuennen et al., 2010).

70 The main antimicrobial agents currently used in eye drops for treating *Acanthamoeba* ocular infections include biguanides e.g., chlorhexidine digluconate (CHX, 0.02 %) or polyhexamethyle biguanide (0.02%). In this field, clinical trials showed that chlorhexidine digluconate (CHX) and polyhexamethylene biguanide based eye drops had comparable efficiency in monotherapy (Lim et al., 2008) and a synergistic effect *in vitro* (Mafra et al., 2013), but that CHX exhibited a lower cytotoxicity
75 (Lim et al., 2008). Hourly (day and night during the first days) eye drop administration (Lorenzo-Morales et al., 2015) and poor antimicrobial ocular bioavailability require a chronic treatment (from 3-4 weeks, up to 6-12 months (Khan, 2006; Lorenzo-Morales et al., 2015) disordering patient compliance (Lim et al., 2008; Lorenzo-Morales et al., 2015). Recently, a combination of ciprofloxacin-voriconazole-chlorhexidine showed a relevant amoebicidal activity characterized by severe damage of the cellular
80 membrane and a dramatic decrease in cell concentration (Ortillés et al., 2017). Furthermore, the presence of viable cysts within the cornea, confirmed by *in vivo* confocal microscopic examination, jeopardizes the efficiency of conventional eye drops (Figure 1). Therefore, new therapeutic strategies, based on gel forming system combining thermal gelation and corneal mucoadhesive properties, may sustain drug's corneal residence time and improve corneal absorption, recover patient compliance and
85 increase clinical benefits (Ludwig, 2005). In earlier studies, poloxamers, as non-ionic copolymers with thermoreversible gelation and surface active properties, were successfully used to formulate *in situ* gel for ocular delivery (Dumortier et al., 2006; Qi et al., 2006). Recently, antiglaucoma and antibacterial eye drops with different ratio of poloxamers, or with poloxamer derivatives were developed (Ammar et al., 2010; Dumortier et al., 2006; Mansour et al., 2008). Complementary, ethylenediaminetetraacetic

90 acid disodium salt (Na_2EDTA , metalloproteases inhibitor, chelating agent) was shown to inhibit (3.7 – 7.4%) the invasion and disruption of corneal tissue performed by the penetration of the amoebae through cell junctions (Omaña-Molina et al., 2013), and be effective (0.1%) against *Acanthamoeba* cysts within 24 hours (Thomas et al., 2010).

The aim of this work was to formulate a dual CHX- Na_2EDTA loaded ocular gel (i) combining 95 thermal gelation and corneal mucoadhesion mechanisms and (ii) exhibiting a significant anti-amoebic activity against trophozoites and cysts. Additionally, CHX penetration into and through the cornea treated by CHX loaded thermosensitive eye drops was investigated *in vitro* to compare intracorneal and efficient anti-amoebic/cystic CHX concentration.

100 2. Materials and methods

2.1. Preparation and selection of CHX- Na_2EDTA loaded thermosensitive ocular gel.

Seven formulations were prepared by spiking 20% CHX aqueous solution (Cooper, Melun, France), either in sodium chloride solutions (0.9% or 0.45%) or in water for injection. Therefore, 105 pharmaceutical poloxamer 407 (Lutrol[®] F127, BASF, Lyon, France) was dispersed in previous saline solutions or water maintained at 4°C for 20 min to improve complete dissolution. Composition of seven formulations is referred in Table 1. Formulations F₅, F₆ and F₇ were supplemented by Na_2EDTA (Caesar & Loretz GmbH Company, Hilden, Germany) to appreciate the potential effect of metalloproteases inhibitor - chelating agent against *Acanthamoeba*. Finally, formulations were 110 sterilised through 0.22- μm filter (Millex[®]-OR, Millipore, Illkirch, France) and conditioned in multidose closing tip (Novelia[®], Namera, La Verpillière, France) avoiding the need to add preservatives (Hasegawa et al., 2015).

Osmolality of eye drops formulations was determined by measurement of freezing point depression (Fiske[®] Mark 3 Osmometer, Lyon, France). pH of formulations was determined by using 115 pH-meter (HQD, Hach-Lange, Lognes, France). The volumetric mass density (ρ) of formulations was determined by weighing 1 ml of eye drops at 4°C. All measurements were repeated three times.

A qualitative analysis of *in vitro* thermal gelation was straightforwardly carried out by dropping off a blue methylene coloured formulations (i) into water maintained at 33°C, (ii) onto glass plate maintained at room temperature then heated at 33°C.

120 Preformulation of CHX- Na_2EDTA gels for treatment of AK was based on ocular physiology and
pharmaceutical compounding. Thus, the tear film presenting an osmolality nearly 300 mOsm/kg (Stahl
et al., 2012), and the ocular tolerance to topical formulations being ranged between
240-400 mOsm/kg, hypo- and hyperosmotic formulations (F_1 , F_2 and F_5) were not selected for further
assays (Table 2). Furthermore, Na_2EDTA free formulations (F_3 and F_4) presented instability and turned
125 milky. Formulation F_7 was not easily filterable through 0.22- μm filter limiting the feasibility of sterilizing
filtration. Physico-chemical properties (osmolality, pH and ρ) of formulation F_6 was considered as
suitable for topical ocular delivery. Sol-gel point temperature and gel strength of poloxamer 407 based
formulations were clearly influenced by the ionic strength of additives (sodium chloride and Na_2EDTA)
in liquids, as earlier reported (Dumortier et al., 2006) and revealed by the “easy to carry out” procedure
130 of thermal gelation (Table 2). Again, as compared to other formulations, formulation 6 exhibited better
gelling-forming system (liquid at room temperature and gelified at 33°C) and enhanced gel strength.
Formulation F_6 was chosen for further investigations because of its iso-osmolality, its better stability
and its superior thermal gelation as compared to other formulations.

135 2.2. Characterization of CHX- Na_2EDTA loaded thermosensitive ocular gel.

2.2.1. Rheological behaviour

The influence of temperature upon ρ and viscosity of formulation F_6 was determined at 4°C, 20°C
and 33°C by weighing 1 ml of the formulation and by using a RM200 rheometer (Lamy rheology,
140 Champagne-au-Mont-d'Or, France) with a constant shear stress of 10 s^{-1} coupled with cryostat and
thermostat, respectively. All measurements were repeated three times.

2.2.2. Eye drop volume from multi-dose container test

The repeatability and reproducibility of eye drops volume dispensed from multi-dose containers
145 (Novelia[®], Namera, La Verpillière, France) were checked by weighing successively about 300 drops
delivered through the preservative-free eyedropper. The weight was converted into volume by
considering the mean of ρ at 20°C determined previously. All measurements were repeated three
times.

150

2.2.3. *Solubilization of tear film lipid layer*

To appreciate the potential of formulation F6 to solubilize tear film lipid layer, 25 mg of lipids composed of saturated mono-, di- and triglycerides (i.e., esters of C10-C18 fatty acids, the triester fraction being predominant, Suppocire[®] A, Gattefosse, Lyon, France) were melted and dropped off at the surface of either (i) pure water, (ii) blue methylene colored formulation F6, or (iii) blue methylene colored poloxamer-free formulation F6 filled in glass beakers maintained at room temperature (20°C) then slowly heated until 33°C. The disruption of film lipid layer was visually evaluated during the heating phase.

160

2.2.4. *In vitro microdialysis study*

CHX controlled release from formulation F₆ was studied by dialysing CHX through 300 kDa molecular cut-off membrane maintained between the well and the collar of microdialyzers (QuixSep[®], Membrane Filtration Products, Inc., Seguin, TX). Microdialysers were filled by 500 µl of formulation F6 varying poloxamer 407 content (0 to 12%) then placed into a stirred beaker containing 50 ml of purified water heated at 37°C for two hours. An aliquot of dialysate was withdrawn and replaced by fresh purified water at regular intervals of time before CHX assay by HPLC (see section 2.3.).

170 2.2.5. *Thermal gelation, penetration and permeation ex vivo study*

Isolated bovine eyes were provided by local slaughterhouse. Thermal gelation and bioadhesion of blue methylene colored formulation F6 onto corneal surface were observed by using isolated bovine eyes immersed in purified water heated at 33°C for two hours.

Isolated bovine eyes were carefully excised and corneas were mounted onto vertical static diffusion cells (surface area: 0.78 cm²) containing about 8 ml purified water in receptor compartment maintained at 37°C. Then, 500 µl of formulation F₆ were applied onto the delimited area of the cornea and the top of the compartment was closed with a cap. After 15, 30, 60 and 120 minutes, the excess of the formulation was removed and cornea specimens (n = 3 for each time exposure) were weighed. The receptor was totally withdrawn and the fluid was kept for further analysis. Therefore, cornea specimens were cut into small pieces and immersed into 800 µl of acetonitrile and 20 mM sodium acetate / acetic acid buffer solution (pH 3.3) mixture (1:1, v/v) contained into Eppendorf[®] tube for 15 minutes, followed by ultrasonic homogenization (35 kHz) for 15 minutes. Finally, suspensions

180

were centrifuged at about 17'000 g for 20 minutes. The supernatants were withdrawn and filtered through a 0.45 µm pore size filter (RC, Dominique Dutscher SAS, Brumath, France).

185

2.3. Quantitative analysis of CHX

CHX assay in dialysate, supernatant and receptor solutions were carried out by high performance liquid chromatography (HPLC) using a column Eclipse XDB-C18, 4.6 x 12.5 mm (Agilent®, Les Ulis, France). The mobile phase was composed of acetonitrile and 20 mM sodium acetate / acetic acid buffer solution (pH 3.3) mixture (1:1, v/v). A flow rate of 1.5 ml/min and an injection volume of 40 µl were used for the entire run. CHX was detected at 254 nm and the retention time was 1.89 min. For concentrations between 0 and 5 µg/ml, chromatograms were linear with a factor correlation of 0.9999. The limits of detection and quantification of CHX was about 10 ng/ml and 30 ng/ml, respectively.

195 2.4. In vitro anti-amoebic efficiency

Acanthamoeba castellanii (T4 genotype) were grown in our laboratory axenically on culture medium (casein enzymatic digest: 10 g/L, Na₂HPO₄: 1.3 g/L, KH₂PO₄: 0.8 g/L, glucose: 5 g/L, yeast extract: 5 g/L, MEM amino acids 100× 1%, MEM vitamins 50× 2%, penicillin-streptomycin 100× 1%, and foetal calf serum 10 %, pH 7) at 30°C (Risler et al., 2013). Cysts were obtained by inoculating trophozoites on non-nutrient agar plate seeded with a lane of *Escherichia coli* (Visvesvara and Schuster, 2008). After 10 days at 30°C, cysts were harvested in sterile Page's Amoeba Saline (PAS, ATCC 1323).

Acanthamoeba castellanii trophozoites were inoculated in 1.5 mL microtubes (10⁴ cells per tube) filled with culture medium then incubated overnight at 33°C. Culture medium was discarded, and cells were washed with 1 mL PAS at 33°C for 5 minutes. After centrifugation (1000 g, 1 min) and removal of supernatant, 180 µL of formulation (F₆, F₆₋₁, F₆₋₂, F₆₋₃ or F₆₋₄, Table 3) were added and then cells were immediately centrifuged at 1000 g for 30 sec. Finally, discarded, then cells were rinsed with PAS (200 µL) and centrifuged for 1 min and the supernatants were removed. This step was repeated twice, and then the cells were incubated in culture medium at 205 33°C for 1 hour. The procedure was repeated six times, in two triplicates. Viability was monitored in triplicate immediately after incubation, then after one day, by trypan blue exclusion assay (Lee et al., 2013; Mafra et al., 2013). Efficiency test on cysts are performed by inoculating 3.10⁴ cysts per 1.5 mL microtubes filled with PAS instead of culture medium to avoid dedifferentiation in trophozoites, then the cysts were treated by formulations as described previously, and finally cyst survival was quantified

210

215 using a haemocytometer, by trypan blue exclusion assay, immediately after incubation, then after two or four days. The procedure was repeated six or three times, in two triplicates.

2.5. Statistical analysis

220 Statistical analysis of the corneal CHX concentration, trophozoite and cyst survival was performed by using one-way analysis of variance (ANOVA) by using GraphPad® Prism (GraphPad® Software Inc., San Diego, CA). All possible pairwise comparisons between groups were made by using *Tukey's* post hoc method. Differences between groups were considered statistically significant with $p < 0.05$.

225 3. Results and discussion

3.1. Characterization of CHX- Na_2EDTA loaded thermosensitive ocular gel

230 Density and viscosity of formulation F6, measured at different temperatures, exhibited, as expected, highest values at 33°C (4°C: 1.10 ± 0.01 g/ml and 13.7 ± 3.7 mPa•s, 20°C: 1.26 ± 0.03 g/ml and 12.0 ± 3.0 mPa•s, 33°C: 1.33 ± 0.01 g/ml and 20.0 ± 3.6 mPa•s, respectively) suitable for ocular delivery (optimal viscosity range: 15–25 mPa•s, Chowhan et al., 2012). Furthermore, the viscosity of the gel did not affect the repeatability and reproducibility of drop volume (19 ± 3 μl) dispensed by the eyedropper maintained at room temperature (20°C) as shown in Fig. 2a.

235 Interestingly, a disruption of lipid film onto the surface of formulation F6 heated at 33°C was evidenced likely by insertion of hydrophobic polyoxypropylene nucleus, confirming the potential of poloxamer 407 to promote the penetration of hydrophilic compound into the cornea after breaking the tear film lipid layer (Fig. 2b). Similarly, the interaction between poloxamer and lipids was confirmed by the ability of poloxamer 188 to insert into lipid monolayers of cell membranes and to modify the phase behaviour and morphology of monolayers (Maskarinec et al., 2002).

240 Although the breaking of the tear film lipid layer may cause a dramatic evaporation of aqueous fraction of the tear film leading to dry eye manifestations, tear film displays a rapid restoration time of 2–3 min, and conventional topical ophthalmic are washed away within 15 – 30 s after instillation and less than 5% of the applied dose reach the intraocular tissues (Chowhan et al., 2012). Therefore, bioadhesive ocular formulation with promoting properties for hydrophilic drug transport through tear film lipid layer is highly required. *In-situ* gelation and bioadhesion of formulation F6, applied to bovine cornea, were maintained for (at least) 2 hours without ocular gel detachment or disruption in heated

water as shown in Fig. 2c. Corneal desorption of bioadhesive formulation F6 by cold water rinsing confirmed the thermosensitive properties of ocular gel (data not shown). Furthermore, the poloxamer content in formulation F6 influenced also the extent and the kinetic profile of CHX release from ocular gel as reported in Fig. 2d. Free CHX dialysis from 0-12% poloxamer loaded formulation F6 through 300 kDa molecular cut-off membrane followed zero-order kinetic after ~0.5-h lag-time. Clearly, the kinetic of dialysis was inversely proportional to poloxamer 407 concentrations confirming that (i) the extent of CHX release might be modulate and adapted to different clinical scenario and posology (e.g., slow release during the night), (ii) any erosion or shrinking of CHX ocular gel might be deduced from kinetic profiles, (iii) the supplementation of poloxamer in ocular CHX formulation allowed to reduce dramatically (up to 5 times) the free fraction of CHX, potentially eliminated by lachrymal fluid, (iv) poloxamer 407 formed gel reservoir with bioadhesive and thermoreversible properties improving potentially the intra-ocular CHX delivery.

CHX, amphiphilic and cationic molecule, has a positively charged hydrophilic and lipophilic groups ($K_{\text{octanol-water}}$: 0.037, Lboutounne et al., 2002) that interacts with phospholipids and lipopolysaccharides on the cell membrane by either (i) active or passive transport mechanism or (ii) an electrostatic interaction between the positively charged cationic biguanide and the negatively charged corneal proteoglycans limiting the penetration through the corneal stroma (Vontobel et al., 2015). In the present study, the assessment of intra-ocular CHX delivery was conducted *ex vivo* through bovine cornea treated by formulation F6. After 15 min, 30 min and 60 min of corneal treatment, a significant CHX concentration was found into the corneal specimens (Fig. 2e). In earlier study, trophozoite minimum amoebicidal concentration (TMAC) and minimal cysticidal concentration (MCC) were 0.71 µg/ml and 2.77 µg/ml respectively (Elder et al., 1994). Remarkably, corneal CHX concentrations were about 1.7 times higher than TMAC. Furthermore, after 2-h ocular exposure, corneal CHX concentration was about 1.2 times higher than MCC, while no CHX was recovered into the receptor fluid of vertical diffusion cell confirming a significant penetration and a minimal permeation (i.e., permeation rate lower than 51 ng/cm²/h) of CHX into and through the cornea. Earlier study showed that 0.02% CHX eyedrop treatment increased the corneal CHX concentration after about 15 minutes and a concomitant CHX permeation through the cornea into the aqueous humour (Xuguang et al., 2006). Therefore, formulation F6 restricted ocular CHX bioavailability to corneal compartment with minimal transcorneal drug delivery avoiding potential harmful adverse effects. Complementary *in vitro* experiments were conducted, with axenic lab culture (i.e., presenting potentially lower resistance than

fresh environmental isolate cysts, Coulon et al., 2012), to complete bioavailability data by the determination of anti-amoebic efficiency.

280

3.2. *In vitro* anti-amoebic efficiency

After repeated exposure (6 x 30 sec), formulation F6 reduced trophozoite survival to 25% (day-0) with no significant regrowth at day-1 (Fig. 3a), while CHX-free formulation (F6-1) failed to reduce trophozoite survival. Formulation F6 reduced cyst survival from 10.6% (\pm 2.7%) to 2.3% (\pm 2.2%), at 285 day-0 and day-2, respectively (Fig. 3b). No cyst survival was shown in CHX-free formulation (F6-1) treated group. Poloxamer/Na₂EDTA-free formulation (F6-2), showing notable precipitation, induced a detachment of the cells, then cellular aggregation which produced the loss of most of the cells and cancelled trypan blue cell count. Poloxamer-free formulation (F6-3) reduced temporarily trophozoite survival (day-0: 61% \pm 16%; day-1: 88.7% \pm 6.6%) followed by rapid cellular re-growth, but was found 290 effective against cysts by reducing cell survival to 30.1% \pm 13.5% (day-0) then to 2.6% \pm 2.3% (day 2). The importance of poloxamer role in dual CHX-Na₂EDTA formulation F6 was emphasized in determining a significant reduction of cyst survival, after 3 contacts (30 sec), immediately after incubation (29.3% \pm 3.7%), then after four days (21.7% \pm 3.2%) as compared to poloxamer-free formulation F6-3 (Fig. 3c).

295 Na₂EDTA-free formulation (F6-4), showing aggregates in suspension, reduced initial trophozoite survival (similarly to formulation F6), followed by significant regrowth after one day (53.1% \pm 11.6%), while cyst survival was notably reduced to 19.5% \pm 7.6% (day-0) then to 16.2% \pm 3.5% (day-2). Instability of Na₂EDTA-free formulations (F6-2 and F6-4) was possibly due to chemical interaction with saline solution components forming insoluble CHX salt. In the same field, the precipitation of CHX salt and EDTA as acid form was the result of insoluble salt formation (Rasimick et al., 2008; Rossi-Fedele 300 et al., 2012).

4. Conclusion

In the present study, the rationalization of eye drops formulation was conducted to achieve 305 efficient, well-tolerated, minimally invasive ocular drug delivery for the treatment of AK. At the outset, we showed that the constitution of CHX, Na₂EDTA and poloxamer triad had a greater anti-amoebic activity than individual drug application. The use of thermosensitive ocular gel designed for easy aseptic conditioning increases the ophthalmic remanence time, potentially protects endothelial cells from dehydration usually observed in AK and would improve patient compliance in chronic treatment.

5. References

- 315 Ammar, H.O., Salama, H.A., Ghorab, M., Mahmoud, A.A., 2010. Development of dorzolamide hydrochloride in situ gel nanoemulsion for ocular delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 36, 1330–1339. <https://doi.org/10.3109/03639041003801885>
- Chin, J., Young, A.L., Hui, M., Jhanji, V., 2015. Acanthamoeba keratitis: 10-year study at a tertiary eye care center in Hong Kong. *Contact Lens Anterior Eye J. Br. Contact Lens Assoc.* 38, 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.clae.2014.11.146>
- 320 Chowhan, M., Lang, J.C., Missel, P., 2012. Ophthalmic preparation, in: *Essentials of Pharmaceutics*. Pharmaceutical Press, London, England, pp. 541–563.
- Coulon, C., Dechamps, N., Meylheuc, T., Collignon, A., McDonnell, G., Thomas, V., 2012. The effect of in vitro growth conditions on the resistance of Acanthamoeba cysts. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59, 198–205. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2012.00612.x>
- 325 Dumortier, G., Grossiord, J.L., Agnely, F., Chaumeil, J.C., 2006. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm. Res.* 23, 2709–2728. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9104-4>
- Elder, M.J., Kilvington, S., Dart, J.K., 1994. A clinicopathologic study of in vitro sensitivity testing and Acanthamoeba keratitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35, 1059–1064.
- 330 Hasegawa, A., Shankar, S., Jariwala, K., Gulmezian, M., Srikumar, R., 2015. Container Closure System with Integral Antimicrobial Additives. US2015209177 (A1).
- Khan, N.A., 2006. Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 564–595. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00023.x>
- 335 Kuennen, R.A., Smith, R.H., Mauger, T.F., Craig, E., 2010. Enucleation following treatment with intravenous pentamidine for Acanthamoeba sclerokeratitis. *Clin. Ophthalmol. Auckl. NZ* 4, 1145–1149. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S13831>
- Lboutounne, H., Chaulet, J.-F., Ploton, C., Falson, F., Pirot, F., 2002. Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly(epsilon-caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 82, 319–334.
- 340 Lee, J.-Y., Song, S.-M., Moon, E.-K., Lee, Y.-R., Jha, B.K., Danne, D.-B.S., Cha, H.-J., Yu, H.S., Kong, H.-H., Chung, D.-I., Hong, Y., 2013. Cysteine protease inhibitor (AcStefin) is required for complete cyst formation of Acanthamoeba. *Eukaryot. Cell* 12, 567–574. <https://doi.org/10.1128/EC.00308-12>
- 345 Lim, N., Goh, D., Bunce, C., Xing, W., Fraenkel, G., Poole, T.R.G., Ficker, L., 2008. Comparison of polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine as monotherapy agents in the treatment of Acanthamoeba keratitis. *Am. J. Ophthalmol.* 145, 130–135. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2007.08.040>
- Lloyd, D., 2014. Encystment in Acanthamoeba castellanii: a review. *Exp. Parasitol.* 145 Suppl, S20–27. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.03.026>

- 350 Lorenzo-Morales, J., Khan, N.A., Walochnik, J., 2015. An update on *Acanthamoeba keratitis*: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite Paris Fr.* 22, 10. <https://doi.org/10.1051/parasite/2015010>
- Ludwig, A., 2005. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 1595–1639. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.07.005>
- 355 Mafra, C.S.P., Carrijo-Carvalho, L.C., Chudzinski-Tavassi, A.M., Taguchi, F.M. de C., Foronda, A.S., Carvalho, F.R. de S., de Freitas, D., 2013. Antimicrobial action of biguanides on the viability of *Acanthamoeba* cysts and assessment of cell toxicity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 6363–6372. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-11990>
- Mansour, M., Mansour, S., Mortada, N.D., Abd Elhady, S.S., 2008. Ocular poloxamer-based ciprofloxacin hydrochloride in situ forming gels. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 34, 744–752. <https://doi.org/10.1080/03639040801926030>
- Marciano-Cabral, F., Cabral, G., 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 273–307.
- Maskarinec, S.A., Hannig, J., Lee, R.C., Lee, K.Y.C., 2002. Direct observation of poloxamer 188 insertion into lipid monolayers. *Biophys. J.* 82, 1453–1459. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75499-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75499-4)
- Omaña-Molina, M., González-Robles, A., Iliana Salazar-Villatoro, L., Lorenzo-Morales, J., Cristóbal-Ramos, A.R., Hernández-Ramírez, V.I., Talamás-Rohana, P., Cruz, M., René, A., Martínez-Palomo, A., 2013. Reevaluating the Role of *Acanthamoeba* Proteases in Tissue Invasion: Observation of Cytopathogenic Mechanisms on MDCK Cell Monolayers and Hamster Corneal Cells [WWW Document]. *BioMed Res. Int.* <https://doi.org/10.1155/2013/461329>
- 370 Ortilles, Á., Belloc, J., Rubio, E., Fernández, M.T., Benito, M., Cristóbal, J.Á., Calvo, B., Goñi, P., 2017. In-vitro development of an effective treatment for *Acanthamoeba keratitis*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 50, 325–333. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.03.033>
- 375 Page, M.A., Mathers, W.D., 2013. *Acanthamoeba keratitis*: a 12-year experience covering a wide spectrum of presentations, diagnoses, and outcomes. *J. Ophthalmol.* 2013, 670242. <https://doi.org/10.1155/2013/670242>
- Qi, H., Li, L., Huang, C., Li, W., Wu, C., 2006. Optimization and physicochemical characterization of thermosensitive poloxamer gel containing puerarin for ophthalmic use. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 54, 1500–1507.
- 380 Rasimick, B.J., Nekich, M., Hladek, M.M., Musikant, B.L., Deutsch, A.S., 2008. Interaction between chlorhexidine digluconate and EDTA. *J. Endod.* 34, 1521–1523. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.08.039>
- Risler, A., Coupat-Goutaland, B., Pélandakis, M., 2013. Genotyping and phylogenetic analysis of *Acanthamoeba* isolates associated with keratitis. *Parasitol. Res.* 112, 3807–3816. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3572-3>
- 385 Rossi-Fedele, G., Dođramaci, E.J., Guastalli, A.R., Steier, L., de Figueiredo, J.A.P., 2012. Antagonistic interactions between sodium hypochlorite, chlorhexidine, EDTA, and citric acid. *J. Endod.* 38, 426–431. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.01.006>
- 390 Stahl, U., Willcox, M., Stapleton, F., 2012. Osmolality and tear film dynamics. *Clin. Exp. Optom.* 95, 3–11. <https://doi.org/10.1111/j.1444-0938.2011.00634.x>

- Thomas, V., McDonnell, G., Denyer, S.P., Maillard, J.-Y., 2010. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 231–259. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00190.x>
- 395 Visvesvara, G.S., Schuster, F.L., 2008. Opportunistic Free-Living Amebae, Part II. *Clin. Microbiol. Newsl.* 30, 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2008.10.001>
- Vontobel, S.F., Abad-Villar, E.M., Kaufmann, C., Zinkernagel, A.S., Hauser, P.C., Thiel, M.A., 2015. Corneal Penetration of Polyhexamethylene Biguanide and Chlorhexidine Digluconate. *J. Clin. Exp. Ophthalmol.* 6, 1–5. <https://doi.org/10.4172/2155-9570.1000430>
- 400 Xuguang, S., Yanchuang, L., Feng, Z., Shiyun, L., Xiaotang, Y., 2006. Pharmacokinetics of chlorhexidine gluconate 0.02% in the rabbit cornea. *J. Ocul. Pharmacol. Ther. Off. J. Assoc. Ocul. Pharmacol. Ther.* 22, 227–230. <https://doi.org/10.1089/jop.2006.22.227>

Table 1Composition of CHX and CHX-Na₂EDTA loaded thermosensitive ocular gel formulations.

Components	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇
20% CHX solution	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Poloxamer 407	12 g	12 g	12 g	8 g	12 g	12 g	8 g
Na ₂ EDTA	-	-	-	-	0.1 g	0.1 g	0.1 g
0.9 % sodium chloride solution	-	qs 100 mL	-	qs 100 mL	qs 100 mL	-	qs 100 mL
0.45 % sodium chloride solution	-	-	qs 100 mL	-	-	qs 100 mL	-
Water for injection	qs 100 mL	-	-	-	-	-	-

Table 2

Selection of CHX and CHX-Na₂EDTA loaded thermosensitive ocular gel formulations. Gelation of formulations was visually appreciated in water and to glass plate surface maintained at room temperature then heated at 33°C.

(-): absence of gelation to (+/+/+): very good gelation. The values are expressed as the mean \pm standard deviation of at least 3 experimental determinations.

Formulation	Osmolality (mOsm/kg)	pH	ρ (g/ml) (4°C)	Gelation (33°C)
F ₁	128 \pm 9	6.89 \pm 0.02	1.09 \pm 0.02	-
F ₂	462 \pm 6	6.24 \pm 0.14	1.15 \pm 0.14	+/+
F ₃	328 \pm 1	6.50 \pm 0.01	1.08 \pm 0.02	+/+
F ₄	398 \pm 1	6.34 \pm 0.01	1.07 \pm 0.03	+
F ₅	454 \pm 14	5.48 \pm 0.02	1.14 \pm 0.02	+/+
F₆	314 \pm 5	5.73 \pm 0.06	1.10 \pm 0.01	+/+/+
F ₇	395 \pm 4	5.32 \pm 0.14	1.14 \pm 0.02	+/+

Table 3

Composition of formulations tested on anti-amoebic efficiency tests.

Components	F ₆	F ₆₋₁	F ₆₋₂	F ₆₋₃	F ₆₋₄
20% CHX solution	100 µL	-	100 µL	100 µL	100 µL
Poloxamer 407	12 g	12 g	-	-	12 g
Disodium EDTA	0.1 g	0.1 g	-	0.1 g	-
0.45 % sodium chloride solution	qs 100 mL	qs 100 mL	qs 100 mL	qs 100 mL	qs 100 mL

Legend of figures

Fig. 1. A 50-year-old contact lens wearer patient with *Acanthamoeba* keratitis associated to (a) corneal pseudodendrite, and (b) corneal neovascularization. II. *In vivo* confocal microscopy (Heidelberg HRT3) examination showing (c) *Acanthamoeba* cyst and (d) radial keratoneuritis.

Fig. 2. (a) Drop volume distribution of CHX- Na_2EDTA loaded thermosensitive ocular gel dispensed from multidose eyedropper. Each data point is the mean of 3 experimental determinations (b) Examination of triglyceride film onto the surface of (i) water (black dashed line), (ii) formulation F6 (white dashed line), and (iii) poloxamer-free formulation F6 (white dashed line). (c) Bioadhesive *in-situ* gelling CHX- Na_2EDTA formulation F6 (stained with methylene blue, 100 μl , white dashed line) applied onto bovine cornea immersed in heated pure water (33 $^\circ\text{C}$) for 2 hours. (d) Profiles of cumulative CHX dialysate amount from formulation F6 varying poloxamer 407 content (\bullet : none; \blacksquare : 4%; \blacktriangle : 8%; \blacklozenge : 12%) as function of time. (e) Intracorneal CHX concentration after treatment by formulation F6 (0.02% CHX) for 15, 30, 60 and 120 minutes. Each bar is the mean \pm standard deviation of three experimental determinations. Trophozoite minimum amoebicidal concentration (TMAC) and minimal cysticidal concentration (MCC) have been included. * $p < 0.05$.

Fig. 3. *In vitro* anti-amoebic efficiency of formulations F6 (a) against trophozoites immediately after treatment (day-0) and after one day (day-1) of incubation, (b) against cysts immediately after treatment (day-0) and after two days (day-2) of incubation, (c) cysts survival (%) immediately after treatment (day-0) and after 4 days (day-4) of incubation. Each bar is the mean \pm standard deviation of six experimental determinations. Trophozoite and cyst survival (%) was expressed as the ratio of unstained cells to the sum of stained and unstained cells. Results from formulation F6-2 were neither reported nor presented due to formulation instability. # $p < 0.001$ vs. control group, $^\text{\$}$ $p < 0.05$ vs. control group, *** $p < 0.001$.

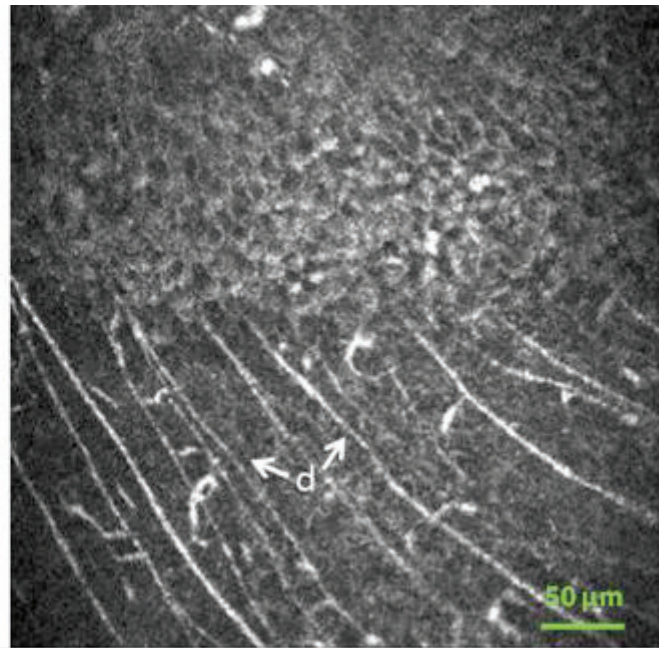
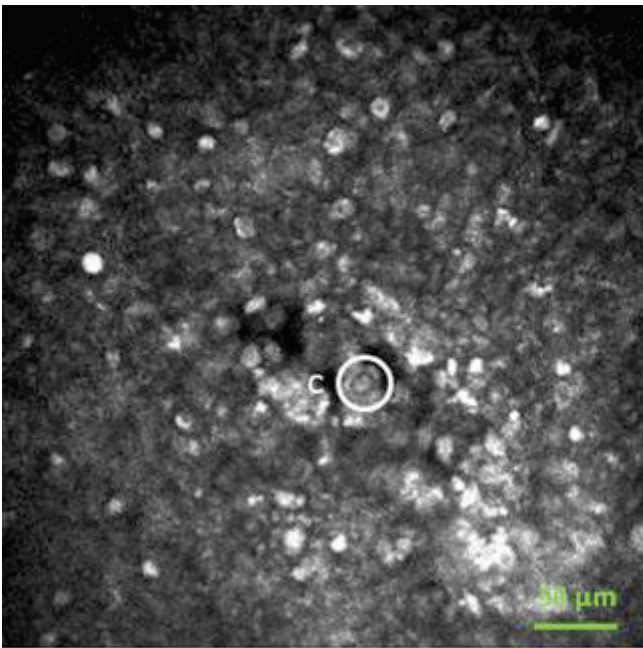
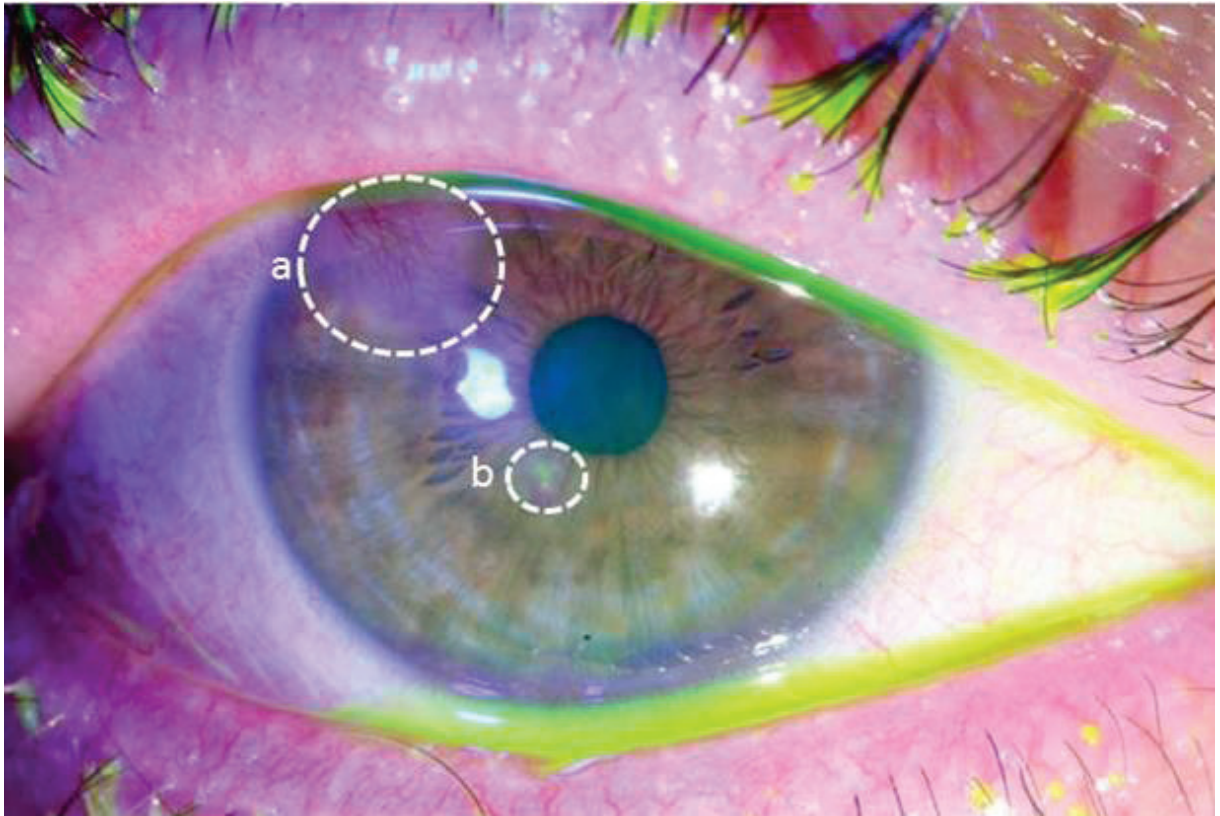


Fig. 1

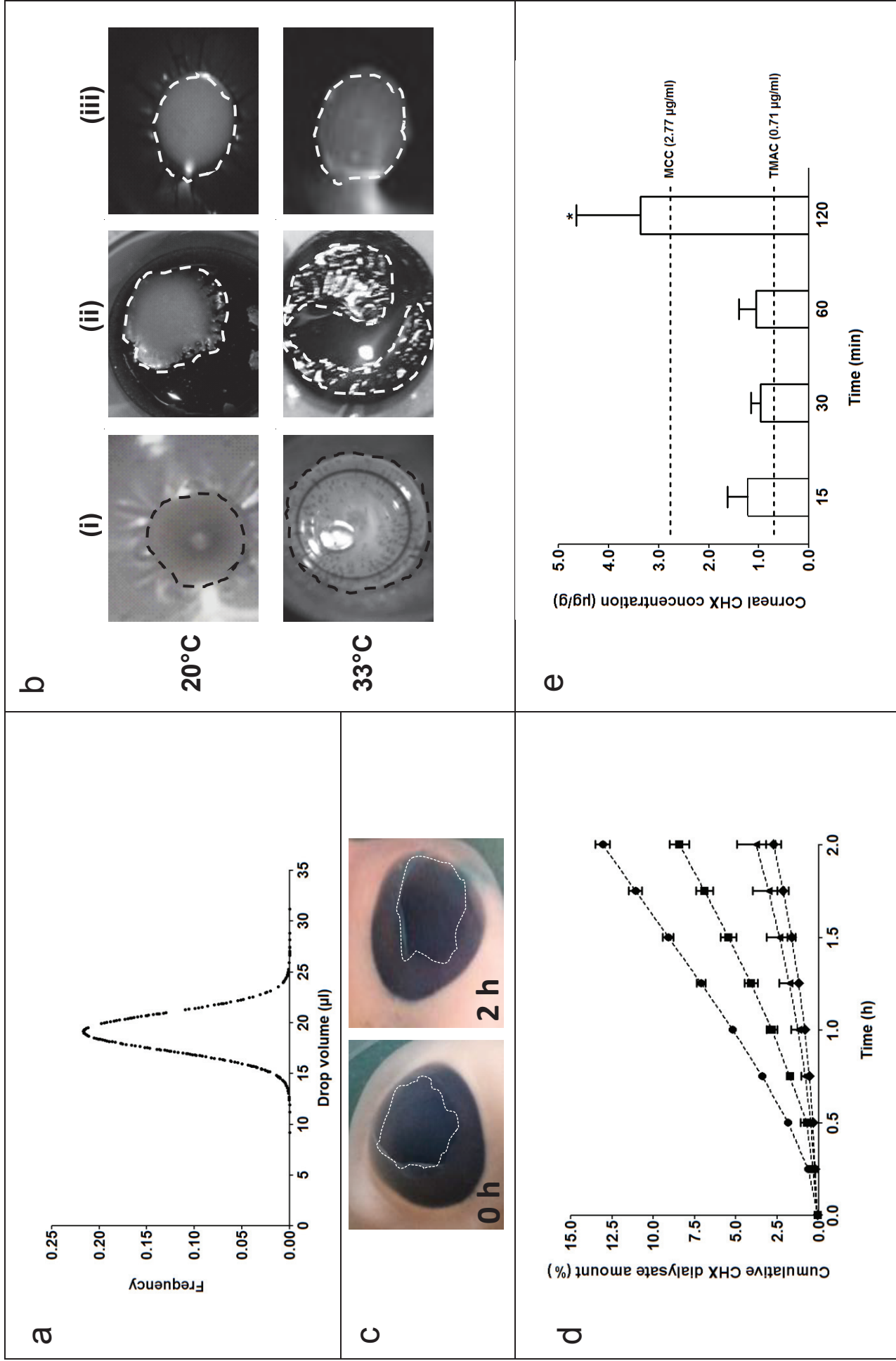


Fig. 2

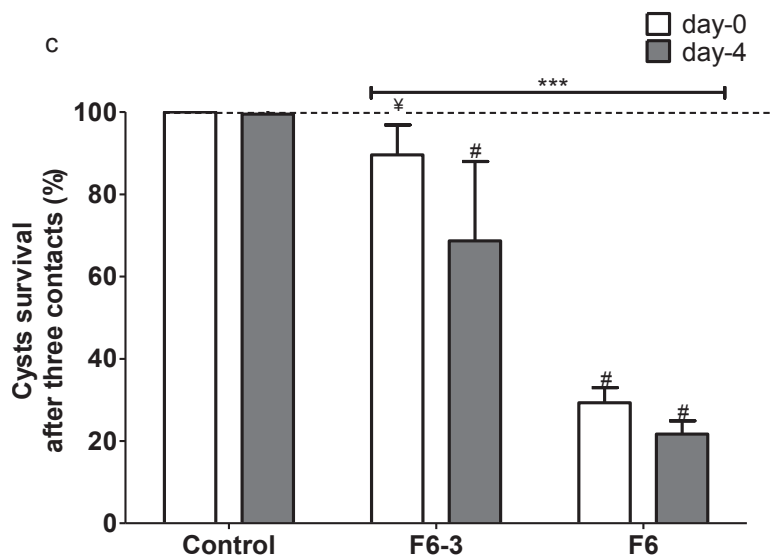
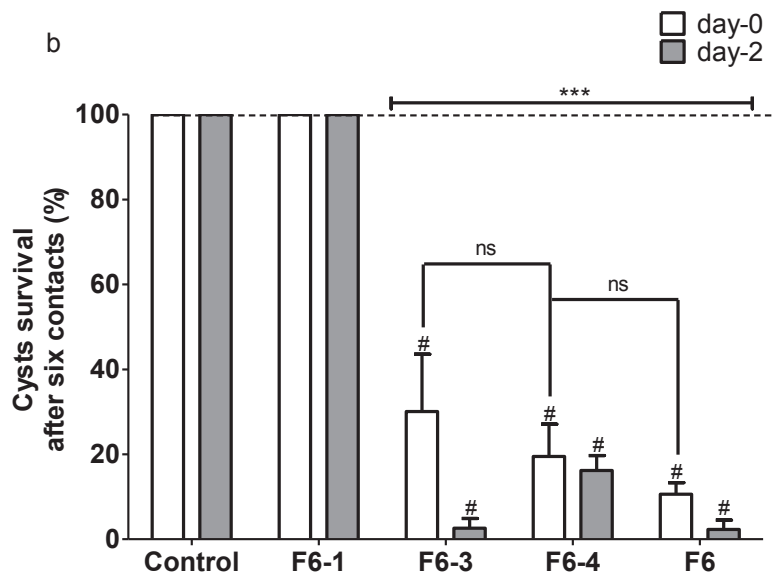
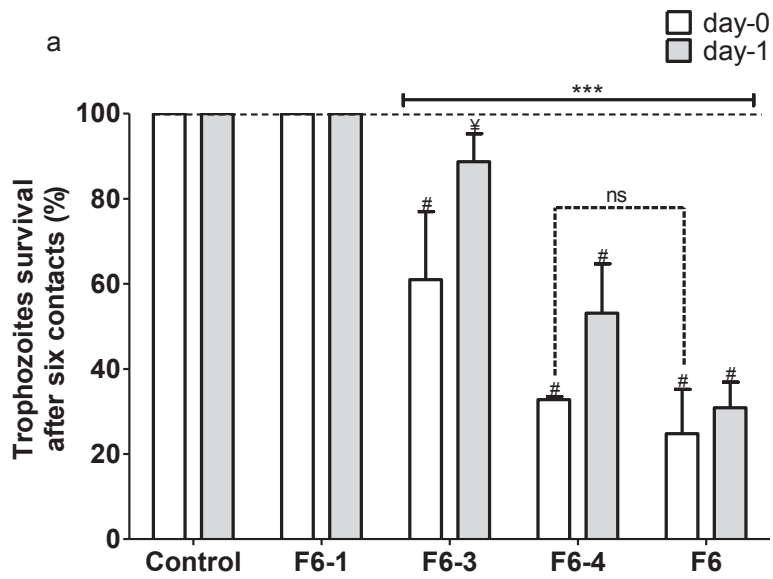


Fig. 3

REFERENCES

1. Jr, M. M. C. The new bone biology: Pathologic, molecular, and clinical correlates. *American Journal of Medical Genetics Part A* **140A**, 2646–2706 (2006).
2. Cartilage in Bone Biology and Pathophysiology. *APLAR Journal of Rheumatology* **9**, A33–A39 (2006).
3. Lipowitz, A. J. & Newton, C. D. Degenerative joint disease and traumatic arthritis. *Textbook of small animal orthopaedics, International Veterinary Information Service, Ithaca* (1985).
4. Sibilia, J. Comment définir et classer les maladies inflammatoires? *Revue du rhumatisme* **74**, 714–725 (2007).
5. Miossec, P. Rheumatoid arthritis: still a chronic disease. *The Lancet* **381**, 884–886
6. Autoimmune priming, tissue attack and chronic inflammation — The three stages of rheumatoid arthritis - Holmdahl - 2014 - European Journal of Immunology - Wiley Online Library. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.201444486/full>. (Accessed: 10th February 2016)
7. Miossec, P. & Kolls, J. K. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov* **11**, 763–776 (2012).
8. Miossec, P., Korn, T. & Kuchroo, V. K. Interleukin-17 and Type 17 Helper T Cells. *New England Journal of Medicine* **361**, 888–898 (2009).
9. Miossec, P. Are T cells in rheumatoid synovium aggressors or bystanders? [Miscellaneous Article]. *Current Opinion in Rheumatology* **12**, 181–185 (2000).
10. Hot, A. & Miossec, P. Effects of interleukin (IL)-17A and IL-17F in human rheumatoid arthritis synoviocytes. *Ann Rheum Dis* **70**, 727–732 (2011).
11. Benedetti, G. & Miossec, P. Interleukin 17 contributes to the chronicity of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* **44**, 339–347 (2014).
12. Bartok, B. & Firestein, G. S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunological Reviews* **233**, 233–255 (2010).
13. Filer, A. The fibroblast as a therapeutic target in rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Pharmacology* **13**, 413–419 (2013).
14. Juarez, M., Filer, A. & Buckley, C. D. Fibroblasts as therapeutic targets in rheumatoid arthritis and cancer. *Swiss Med Wkly* **142**, w13529 (2012).
15. Mor, A., Abramson, S. B. & Pillinger, M. H. The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. *Clinical Immunology* **115**, 118–128 (2005).
16. Kullmann, F. *et al.* Analysis of the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis & Rheumatism* **42**, 1594–1600 (1999).
17. Kato, M., Ospelt, C., Gay, R. E., Gay, S. & Klein, K. Dual Role of Autophagy in Stress-Induced Cell Death in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. *Arthritis & Rheumatology* **66**, 40–48 (2014).

18. Shin, Y.-J. *et al.* Autophagy induction and CHOP under-expression promotes survival of fibroblasts from rheumatoid arthritis patients under endoplasmic reticulum stress. *Arthritis Res. Ther.* **12**, R19 (2010).
19. Shin, Y.-J. *et al.* Autophagy induction and CHOP under-expression promotes survival of fibroblasts from rheumatoid arthritis patients under endoplasmic reticulum stress. *Arthritis Res. Ther.* **12**, R19 (2010).
20. Bottini, N. & Firestein, G. S. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol* **9**, 24–33 (2013).
21. Huber, L. C. *et al.* Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **45**, 669–675 (2006).
22. Miossec, P. Drug treatments for rheumatoid arthritis: looking backwards to move forwards. *BMJ* **350**, h1192 (2015).
23. Gaujoux-Viala, C. *et al.* Recommandations de la Société française de rhumatologie pour la prise en charge de la polyarthrite rhumatoïde. *Revue du Rhumatisme* **81**, 303–312 (2014).
24. Berthelot, J.-M., Le Goff, B. & Maugars, Y. Nouveautés concernant les effets secondaires des injections locales de corticoïdes. *Revue du Rhumatisme* **80**, 345–349 (2013).
25. Borzacchiello, A., Mayol, L., Schiavinato, A. & Ambrosio, L. Effect of hyaluronic acid amide derivative on equine synovial fluid viscoelasticity. *J. Biomed. Mater. Res.* **92A**, 1162–1170 (2010).
26. Chou, C. & Su, Y. Intra-articular Injection for the Management of Rheumatoid Arthritis Patients with Knee Osteoarthritis-Current Evident and Future Prospects. *J Arthritis* **4**, (2015).
27. Lee, H. *et al.* Hyaluronate–Gold Nanoparticle/Tocilizumab Complex for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *ACS Nano* **8**, 4790–4798 (2014).
28. Axe, J. M., Snyder-Mackler, L. & Axe, M. J. The Role of Viscosupplementation: *Sports Medicine and Arthroscopy Review* **21**, 18–22 (2013).
29. Cianflocco, A. J. Viscosupplementation in Patients with Osteoarthritis of the Knee. *Postgraduate Medicine* **125**, 97–105 (2013).
30. Clegg, T. E., Caborn, D. & Mauffrey, C. Viscosupplementation with hyaluronic acid in the treatment for cartilage lesions: a review of current evidence and future directions. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology* **23**, 119–124 (2012).
31. Hunter, D. J. Viscosupplementation for Osteoarthritis of the Knee. *New England Journal of Medicine* **372**, 1040–1047 (2015).
32. Jevsevar, D., Donnelly, P., Brown, G. A. & Cummins, D. S. Viscosupplementation for Osteoarthritis of the Knee. *J Bone Joint Surg Am* **97**, 2047–2060 (2015).
33. Rutjes, A. W. S. *et al.* Viscosupplementation for Osteoarthritis of the Knee A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Intern Med* **157**, 180–191 (2012).
34. Bhuanantanondh, P., Grecov, D., Kwok, E. & Guy, P. Rheology of osteoarthritic synovial fluid mixed with viscosupplements: A pilot study. *Biomed. Eng. Lett.* **1**, 213–219 (2011).

35. Conrozier, T. Comment optimiser l'efficacité de la viscosupplémentation en dehors du genou. *Revue du Rhumatisme* **83**, 4–6 (2016).
36. Shin, J. M. *et al.* A hyaluronic acid–methotrexate conjugate for targeted therapy of rheumatoid arthritis. *Chem. Commun.* **50**, 7632–7635 (2014).
37. Eraghi, A. S., Kaseb, M. H., Espandar, R. & Mardookhpour, S. The long-term effects of radioactive phosphorous synoviorthesis on hemophilic arthropathy. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **55**, 68–70 (2015).
38. Rau, H., Franke, C., Goretzki, G. & Spitz, J. Radiosynoviorthesis in Osteoarthritis and Other Disorders with Concomitant Synovitis in Comparison to Rheumatoid Arthritis. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* **20**, 349–355 (2005).
39. Martínez-Esteve, A. *et al.* Radioisotope synoviorthesis in pediatric and adolescent patients with hemophilia. *Revista Española de Medicina Nuclear e Imagen Molecular (English Edition)* **35**, 12–16 (2016).
40. Infante-Rivard, C. *et al.* A retrospective cohort study of cancer incidence among patients treated with radiosynoviorthesis. *Haemophilia* **18**, 805–809 (2012).
41. Brillouet, S., Arrault, X., Guludec, D. L., Meyer, O. & Farinotti, R. Les synoviorthèses radioisotopiques : une alternative à l'acide osmique. *Journal de Pharmacie Clinique* **24**, 83–89 (2005).
42. Riera, E. *et al.* ⁹⁰Yttrium PET-CT images assessing radioisotopic knee synoviorthesis. *Revista Española de Medicina Nuclear e Imagen Molecular (English Edition)* **32**, 134–135 (2013).
43. Bonaventura, P. Changement de l'homéostasie du Zinc et du Cadmium par l'inflammation chronique et nouvelles options thérapeutiques pour le traitement de l'arthrite. (Lyon, 2016).
44. Ansari, M. M., Neha & Khan, H. A. Effect of cadmium chloride exposure during the induction of collagen induced arthritis. *Chemico-Biological Interactions* **238**, 55–65 (2015).
45. Prins, J. M., Fu, L., Guo, L. & Wang, Y. Cd²⁺-Induced Alteration of the Global Proteome of Human Skin Fibroblast Cells. *J. Proteome Res.* **13**, 1677–1687 (2014).
46. Zhang, T., Wang, Y., Kong, L., Xue, Y. & Tang, M. Threshold Dose of Three Types of Quantum Dots (QDs) Induces Oxidative Stress Triggers DNA Damage and Apoptosis in Mouse Fibroblast L929 Cells. *Int J Environ Res Public Health* **12**, 13435–13454 (2015).
47. Yan, M. *et al.* Cytotoxicity of CdTe quantum dots in human umbilical vein endothelial cells: the involvement of cellular uptake and induction of pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress. *International Journal of Nanomedicine* 529 (2016). doi:10.2147/IJN.S93591
48. Chen, N. *et al.* The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots. *Biomaterials* **33**, 1238–1244 (2012).
49. Jacak, L., Hawrylak, P. & Wojs, A. *Quantum Dots*. (Springer Science & Business Media, 2013).
50. Chukwuocha, E. O., Onyeaju, M. C. & Harry, T. S. T. Theoretical Studies on the Effect of Confinement on Quantum Dots Using the Brus Equation. *World Journal of Condensed Matter Physics* **02**, 96–100 (2012).

51. Takagahara, T. & Takeda, K. Theory of the quantum confinement effect on excitons in quantum dots of indirect-gap materials. *Phys. Rev. B* **46**, 15578–15581 (1992).
52. Haug, H. & Koch, S. W. *Quantum theory of the optical and electronic properties of semiconductors*. **5**, (World Scientific, 1990).
53. Soltani, N., Gharibshahi, E. & Saion, E. Band gap of cubic and hexagonal cds quantum dots- experimental and theoretical studies. *Chalcogenide Lett* **9**, 321–328 (2012).
54. *Quantum Dots: Applications in Biology*. **1199**, (Springer New York, 2014).
55. Alivisatos, A. P., Gu, W. & Larabell, C. Quantum Dots as Cellular Probes. *Annual Review of Biomedical Engineering* **7**, 55–76 (2005).
56. Rogach, A. L. *et al.* Synthesis and characterization of thiol-stabilized CdTe nanocrystals. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* **100**, 1772–1778 (1996).
57. Kan, S., Mokari, T., Rothenberg, E. & Banin, U. Synthesis and size-dependent properties of zinc-blende semiconductor quantum rods. *Nat Mater* **2**, 155–158 (2003).
58. Jaffar, S. *et al.* Layer-by-Layer Surface Modification and Patterned Electrostatic Deposition of Quantum Dots. *Nano Lett.* **4**, 1421–1425 (2004).
59. Wuister, S. F., Swart, I., van Driel, F., Hickey, S. G. & de Mello Donegá, C. Highly Luminescent Water-Soluble CdTe Quantum Dots. *Nano Lett.* **3**, 503–507 (2003).
60. Zhou, D. *et al.* Simple Synthesis of Highly Luminescent Water-Soluble CdTe Quantum Dots with Controllable Surface Functionality. *Chem. Mater.* **23**, 4857–4862 (2011).
61. Lei, Y. *et al.* Labeling of hematopoietic stem cells by Tat peptide conjugated quantum dots for cell tracking in mouse body. *J Nanosci Nanotechnol* **12**, 6880–6886 (2012).
62. Pleskova, S. N., Mikheeva, E. R. & Gornostaeva, E. E. The interaction between human blood neutrophil granulocytes and quantum dots. *Micron* **105**, 82–92 (2018).
63. Samuel, S. P. *et al.* CdTe quantum dots induce activation of human platelets: implications for nanoparticle hemocompatibility. *Int J Nanomedicine* **10**, 2723–2734 (2015).
64. Zhao, X. *et al.* Effect of nonendocytic uptake of nanoparticles on human bronchial epithelial cells. *Anal. Chem.* **87**, 3208–3215 (2015).
65. Yin, H. *et al.* Quantum dots modulate intracellular Ca²⁺ level in lung epithelial cells. *Int J Nanomedicine* **12**, 2781–2792 (2017).
66. Turdalieva, A. *et al.* Bioelectric and Morphological Response of Liquid-Covered Human Airway Epithelial Calu-3 Cell Monolayer to Periodic Deposition of Colloidal 3-Mercaptopropionic-Acid Coated CdSe-CdS/ZnS Core-Multishell Quantum Dots. *PLoS ONE* **11**, e0149915 (2016).
67. Ando, M. *et al.* Cytotoxicity of CdSe-based quantum dots incorporated in glass nanoparticles evaluated using human keratinocyte HaCaT cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80**, 210–213 (2016).

68. Shang, W. *et al.* The uptake mechanism and biocompatibility of graphene quantum dots with human neural stem cells. *Nanoscale* **6**, 5799–5806 (2014).
69. Zhang, J. *et al.* Labeling primary nerve stem cells with quantum dots. *J Nanosci Nanotechnol* **11**, 9536–9542 (2011).
70. Corazzari, I., Gilardino, A., Dalmazzo, S., Fubini, B. & Lovisolo, D. Localization of CdSe/ZnS quantum dots in the lysosomal acidic compartment of cultured neurons and its impact on viability: potential role of ion release. *Toxicol In Vitro* **27**, 752–759 (2013).
71. Fujita, H. *et al.* Identification of Three Distinct Functional Sites of Insulin-mediated GLUT4 Trafficking in Adipocytes Using Quantitative Single Molecule Imaging. *Mol Biol Cell* **21**, 2721–2731 (2010).
72. Yoshioka, T. *et al.* Fate of bone marrow mesenchymal stem cells following the allogeneic transplantation of cartilaginous aggregates into osteochondral defects of rabbits. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **5**, 437–443
73. Wu, Y. *et al.* Functional quantum dot-siRNA nanoplexes to regulate chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Acta Biomater* **46**, 165–176 (2016).
74. Filali, S., Geloën, A., Lysenko, V., Pirot, F. & Miossec, P. Live-stream characterization of cadmium-induced cell death using visible CdTe-QDs. *Scientific Reports* **8**, 12614 (2018).
75. Hsieh, M.-S., Shiao, N.-H. & Chan, W.-H. Cytotoxic Effects of CdSe Quantum Dots on Maturation of Mouse Oocytes, Fertilization, and Fetal Development. *Int J Mol Sci* **10**, 2122–2135 (2009).
76. Peng, L., He, M., Chen, B., Qiao, Y. & Hu, B. Metallomics Study of CdSe/ZnS Quantum Dots in HepG2 Cells. *ACS Nano* **9**, 10324–10334 (2015).
77. Song, S. H. *et al.* Primary hepatocyte imaging by multiphoton luminescent graphene quantum dots. *Chemical Communications* **51**, 8041–8043 (2015).
78. Yan, M. *et al.* Cytotoxicity of CdTe quantum dots in human umbilical vein endothelial cells: the involvement of cellular uptake and induction of pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress. *Int J Nanomedicine* **11**, 529–542 (2016).
79. Jiang, X., Li, B. Q., Qu, X., Yang, H. & Liu, H. Thermal sensing with CdTe/CdS/ZnS quantum dots in human umbilical vein endothelial cells. *JOURNAL OF MATERIALS CHEMISTRY B* **5**, 8983–8990 (2017).
80. Paris-Robidas, S., Brouard, D., Emond, V., Parent, M. & Calon, F. Internalization of targeted quantum dots by brain capillary endothelial cells in vivo. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **36**, 731–742 (2016).
81. Trabelsi, H., Azzouz, I., Sakly, M. & Abdelmelek, H. Subacute toxicity of cadmium on hepatocytes and nephrocytes in the rat could be considered as a green biosynthesis of nanoparticles. *Int J Nanomedicine* **8**, 1121–1128 (2013).
82. Pujalte, I. *et al.* Cytotoxic effects and cellular oxidative mechanisms of metallic nanoparticles on renal tubular cells: impact of particle solubility. *TOXICOLOGY RESEARCH* **4**, 409–422 (2015).

83. Li, Y. *et al.* Detection of Echinococcus granulosus antigen by a quantum dot/porous silicon optical biosensor. *Biomed Opt Express* **8**, 3458–3469 (2017).
84. Courtney, C. M. *et al.* Photoexcited quantum dots for killing multidrug-resistant bacteria. *Nature Materials* **15**, 529–534 (2016).
85. Kulvietis, V., Zurauskas, E. & Rotomskis, R. Distribution of polyethylene glycol coated quantum dots in mice skin. *Experimental Dermatology* **22**, 157–159
86. Prow, T. W. *et al.* Quantum dot penetration into viable human skin. *Nanotoxicology* **6**, 173–185 (2012).
87. Gratieri, T. *et al.* Penetration of quantum dot particles through human skin. *J Biomed Nanotechnol* **6**, 586–595 (2010).
88. Minami, S. S. *et al.* Selective targeting of microglia by quantum dots. *J Neuroinflammation* **9**, 22 (2012).
89. Liu, Y. *et al.* Graphene quantum dots for the inhibition of β amyloid aggregation. *Nanoscale* **7**, 19060–19065 (2015).
90. Kim, D. *et al.* Graphene quantum dots prevent α -synucleinopathy in Parkinson's disease. *Nature Nanotechnology* **1** (2018). doi:10.1038/s41565-018-0179-y
91. Wu, Q., Zhi, L., Qu, Y. & Wang, D. Quantum dots increased fat storage in intestine of *Caenorhabditis elegans* by influencing molecular basis for fatty acid metabolism. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **12**, 1175–1184 (2016).
92. Haque, M. M. *et al.* Effects of folic acid and polyethylene glycol coated quantum dots on toxicity and tissue uptake to precision-cut spleen slices of rats. *Journal of Pharmaceutical Investigation* **43**, 375–383 (2013).
93. Blum, J. L. *et al.* Short-term inhalation of cadmium oxide nanoparticles alters pulmonary dynamics associated with lung injury, inflammation, and repair in a mouse model. *Inhal Toxicol* **26**, 48–58 (2014).
94. Wu, T. & Tang, M. Toxicity of quantum dots on respiratory system. *Inhal Toxicol* **26**, 128–139 (2014).
95. Carbary-Ganz, J. L., Welge, W. A., Barton, J. K. & Utzinger, U. In vivo molecular imaging of colorectal cancer using quantum dots targeted to vascular endothelial growth factor receptor 2 and optical coherence tomography/laser-induced fluorescence dual-modality imaging. *J Biomed Opt* **20**, 096015 (2015).
96. Carbary-Ganz, J. L., Barton, J. K. & Utzinger, U. Quantum dots targeted to vascular endothelial growth factor receptor 2 as a contrast agent for the detection of colorectal cancer. *J Biomed Opt* **19**, 086003 (2014).
97. Wang, J. *et al.* Dose and time effect of CdTe quantum dots on antioxidant capacities of the liver and kidneys in mice. *Int J Nanomedicine* **12**, 6425–6435 (2017).
98. Pan, Y. *et al.* In vivo biodistribution and toxicity of intravesical administration of quantum dots for optical molecular imaging of bladder cancer. *Sci Rep* **7**, (2017).

99. Kobirumaki-Shimozawa, F. *et al.* Sarcomere Imaging by Quantum Dots for the Study of Cardiac Muscle Physiology. *J Biomed Biotechnol* **2012**, (2012).
100. Terada, N., Saitoh, Y., Ohno, N. & Ohno, S. Application of “In Vivo Cryotechnique” to Visualization of Microvascular Blood Flow in Mouse Kidney by Quantum Dot Injection. in *In Vivo Cryotechnique in Biomedical Research and Application for Bioimaging of Living Animal Organs* 219–221 (Springer, Tokyo, 2016). doi:10.1007/978-4-431-55723-4_42
101. Wang, Y., Ajtai, K. & Burghardt, T. P. The Qdot-labeled actin super-resolution motility assay measures low-duty cycle muscle myosin step size. *Biochemistry* **52**, 1611–1621 (2013).
102. Ambrosone, A. *et al.* Dissecting common and divergent molecular pathways elicited by CdSe/ZnS quantum dots in freshwater and marine sentinel invertebrates. *Nanotoxicology* **11**, 289–303 (2017).
103. Liu, T. *et al.* Hematopoiesis toxicity induced by CdTe quantum dots determined in an invertebrate model organism. *Biomaterials* **35**, 2942–2951 (2014).
104. Yan, S.-Q. *et al.* Reproductive toxicity and gender differences induced by cadmium telluride quantum dots in an invertebrate model organism. *Sci Rep* **6**, 34182 (2016).
105. Xing, R. *et al.* Targeting and retention enhancement of quantum dots decorated with amino acids in an invertebrate model organism. *Sci Rep* **6**, 19802 (2016).
106. Brandt, Y. I., Mitchell, T., Smolyakov, G. A., Osiński, M. & Hartley, R. S. Quantum dot assisted tracking of the intracellular protein Cyclin E in *Xenopus laevis* embryos. *J Nanobiotechnol* **13**, 31 (2015).
107. Alaraby, M., Demir, E., Hernández, A. & Marcos, R. Assessing potential harmful effects of CdSe quantum dots by using *Drosophila melanogaster* as in vivo model. *Sci. Total Environ.* **530–531**, 66–75 (2015).
108. Bozrova, S. V., Baryshnikova, M. A., Nabiev, I. & Sukhanova, A. Semiconductor quantum dot toxicity in a mouse in vivo model. *J. Phys.: Conf. Ser.* **784**, 012013 (2017).
109. Benayas, A. *et al.* PbS/CdS/ZnS Quantum Dots: A Multifunctional Platform for In Vivo Near-Infrared Low-Dose Fluorescence Imaging. *ADVANCED FUNCTIONAL MATERIALS* **25**, 6650–6659 (2015).
110. Yaghini, E., Turner, H., Pilling, A., Naasani, I. & MacRobert, A. In vivo biodistribution and toxicology studies of cadmium-free indium-based quantum dot nanoparticles in a rat model. *Nanomedicine* (2018). doi:10.1016/j.nano.2018.07.009
111. Liu, N. *et al.* Degradation of aqueous synthesized CdTe/ZnS quantum dots in mice: differential blood kinetics and biodistribution of cadmium and tellurium. *Part Fibre Toxicol* **10**, 37 (2013).
112. Haque, M. M. *et al.* Acute toxicity and tissue distribution of CdSe/CdS-MPA quantum dots after repeated intraperitoneal injection to mice. *J Appl Toxicol* **33**, 940–950 (2013).
113. Roberts, J. R. *et al.* Lung toxicity and biodistribution of Cd/Se-ZnS quantum dots with different surface functional groups after pulmonary exposure in rats. *Part Fibre Toxicol* **10**, 5 (2013).

114. Liu, J. *et al.* Toxicity assessment of phospholipid micelle-encapsulated cadmium-based quantum dots using Kunming mice. *RSC ADVANCES* **3**, 1768–1773 (2013).
115. Jeyadevi, R. *et al.* Enhancement of anti arthritic effect of quercetin using thioglycolic acid-capped cadmium telluride quantum dots as nanocarrier in adjuvant induced arthritic Wistar rats. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **112**, 255–263 (2013).
116. Amiri, G. *et al.* Comparison of Toxicity of CdSe: ZnS Quantum Dots on Male Reproductive System in Different Stages of Development in Mice. *Int J Fertil Steril* **9**, 512–520 (2016).
117. Xu, G. *et al.* The Reproductive Toxicity of CdSe/ZnS Quantum Dots on the in vivo Ovarian Function and in vitro Fertilization. *Sci Rep* **6**, 37677 (2016).
118. Valipoor, A. *et al.* A comparative study about toxicity of CdSe quantum dots on reproductive system development of mice and controlling this toxicity by ZnS coverage. *Nanomedicine Journal* **2**, 261–268 (2015).
119. Zalgeviciene, V. *et al.* Quantum dots mediated embryotoxicity via placental damage. *Reproductive Toxicology* **73**, 222–231 (2017).
120. Costa, C. R. M. *et al.* Labeling of adipose-derived stem cells with quantum dots provides stable and long-term fluorescent signal for ex vivo cell tracking. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal* **53**, 363–370 (2017).
121. Ye, L. *et al.* A pilot study in non-human primates shows no adverse response to intravenous injection of quantum dots. *Nature Nanotechnology* **7**, 453–458 (2012).
122. Liu, J. *et al.* Assessing clinical prospects of silicon quantum dots: studies in mice and monkeys. *ACS Nano* **7**, 7303–7310 (2013).
123. Sain, S., Kar, A., Patra, A. & Pradhan, S. K. Microstructure and photoluminescence properties of ternary Cd_{0.2}Zn_{0.8}S quantum dots synthesized by mechanical alloying. *J Nanopart Res* **16**, 2673 (2014).
124. Azpiroz, J. M., Ugalde, J. M. & Infante, I. Benchmark Assessment of Density Functional Methods on Group II-VI MX (M = Zn, Cd; X = S, Se, Te) Quantum Dots. *J Chem Theory Comput* **10**, 76–89 (2014).
125. Daly, A. B. *et al.* Optical and structural properties in type-II InAlAs/AlGaAs quantum dots observed by photoluminescence, X-ray diffraction and transmission electron microscopy. *Superlattices and Microstructures* **110**, 1–9 (2017).
126. Abbasi, S., Molaei, M. & Karimipour, M. CdSe and CdSe/CdS core-shell QDs: New approach for synthesis, investigating optical properties and application in pollutant degradation. *Luminescence* **32**, 1137–1144 (2017).
127. Spirin, M. G., Brichkin, S. B. & Razumov, V. F. Hydrophilization of CdSe quantum dots with surfactants. *Colloid J* **75**, 427–432 (2013).
128. Bobrovsky, A. *et al.* Quantum dot–polymer composites based on nanoporous polypropylene films with different draw ratios. *European Polymer Journal* **82**, 93–101 (2016).

129. Thovhogi, N., Sibuyi, N. R. S., Onani, M. O., Meyer, M. & Madiehe, A. M. Peptide-functionalized quantum dots for potential applications in the imaging and treatment of obesity. *International Journal of Nanomedicine* (2018). doi:10.2147/IJN.S158687
130. Brazhnik, K., Nabiev, I. & Sukhanova, A. Advanced Procedure for Oriented Conjugation of Full-Size Antibodies with Quantum Dots. in *Quantum Dots: Applications in Biology* 55–66 (Humana Press, New York, NY, 2014). doi:10.1007/978-1-4939-1280-3_4
131. Mansur, H. S. & Mansur, A. A. P. CdSe quantum dots stabilized by carboxylic-functionalized PVA: Synthesis and UV–vis spectroscopy characterization. *Materials Chemistry and Physics* **125**, 709–717 (2011).
132. Alemu, Y. A., Albuquerque, G. H. & Herman, G. S. Enhanced photoluminescence from CuInS₂/ZnS quantum dots: Organic superacid passivation. *Materials Letters* **219**, 178–181 (2018).
133. Ahia, C. C., Tile, N., Botha, J. R. & Olivier, E. J. Photoluminescence and structural properties of unintentional single and double InGaSb/GaSb quantum wells grown by MOVPE. *Physica B: Condensed Matter* **535**, 13–19 (2018).
134. Grabolle, M. *et al.* Determination of the Fluorescence Quantum Yield of Quantum Dots: Suitable Procedures and Achievable Uncertainties. *Anal. Chem.* **81**, 6285–6294 (2009).
135. Borah, P., Siboh, D., Kalita, P. K., Sarma, J. K. & Nath, N. M. Quantum confinement induced shift in energy band edges and band gap of a spherical quantum dot. *Physica B: Condensed Matter* **530**, 208–214 (2018).
136. Marotti, R. E., Giorgi, P., Machado, G. & Dalchiele, E. A. Crystallite size dependence of band gap energy for electrodeposited ZnO grown at different temperatures. *Solar Energy Materials and Solar Cells* **90**, 2356–2361 (2006).
137. Sinclair, R., Kempen, P. J., Chin, R. & Koh, A. L. The Stanford Nanocharacterization Laboratory (SNL) and Recent Applications of an Aberration-Corrected Environmental Transmission Electron Microscope. *Adv Eng Mater* **16**, 476–481 (2014).
138. Ramírez-García, G. *et al.* Functionalization and characterization of persistent luminescence nanoparticles by dynamic light scattering, laser Doppler and capillary electrophoresis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **136**, 272–281 (2015).
139. Ramírez-García, G. *et al.* Characterization of phthalocyanine functionalized quantum dots by dynamic light scattering, laser Doppler, and capillary electrophoresis. *Anal Bioanal Chem* **409**, 1707–1715 (2017).
140. Henglein, A. Small-particle research: physicochemical properties of extremely small colloidal metal and semiconductor particles. *Chem. Rev.* **89**, 1861–1873 (1989).
141. Shim, M., Shilov, S. V., Braiman, M. S. & Guyot-Sionnest, P. Long-Lived Delocalized Electron States in Quantum Dots: A Step-Scan Fourier Transform Infrared Study. *J. Phys. Chem. B* **104**, 1494–1496 (2000).
142. Bonu, V. & Das, A. Size Distribution of SnO₂ Quantum Dots Studied by UV–Visible, Transmission Electron Microscopy and X-Ray Diffraction. *MAPAN* **28**, 259–262 (2013).

143. Choi, Y. J. *et al.* Cyto-/genotoxic effect of CdSe/ZnS quantum dots in human lung adenocarcinoma cells for potential photodynamic UV therapy applications. *J Nanosci Nanotechnol* **12**, 2160–2168 (2012).
144. Takahashi, C., Ueno, K., Aoyama, J., Adachi, M. & Yamamoto, H. Imaging of intracellular behavior of polymeric nanoparticles in *Staphylococcus epidermidis* biofilms by slit-scanning confocal Raman microscopy and scanning electron microscopy with energy-dispersive X-ray spectroscopy. *Materials Science and Engineering: C* **76**, 1066–1074 (2017).
145. Cepeda-Pérez, E. *et al.* Interaction of TGA@CdTe Quantum Dots with an Extracellular Matrix of *Haematococcus pluvialis* Microalgae Detected Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS). *Appl Spectrosc* **70**, 1561–1572 (2016).
146. Kostić, R., Stojanović, D., Trajić, J. & Balaž, P. Off-Resonant Raman Spectroscopy of ZnS Quantum Dots. in *Proceedings of the IV Advanced Ceramics and Applications Conference* 203–215 (Atlantis Press, Paris, 2017). doi:10.2991/978-94-6239-213-7_16
147. Biermann, A. *et al.* Interface formation during silica encapsulation of colloidal CdSe/CdS quantum dots observed by in situ Raman spectroscopy. *J Chem Phys* **146**, 134708 (2017).
148. Pitkänen, L. & Striegel, A. M. Size-exclusion chromatography of metal nanoparticles and quantum dots. *Trends Analyt Chem* **80**, 311–320 (2016).
149. Hao, C. L. In Vivo Stability and Biodistribution of Quantum Dots by Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry. in *Advanced Materials Research* **412**, 449–452 (Trans Tech Publ, 2012).
150. Gondim, C. S., Durán, G. M., Contento, A. M. & Ríos, Á. Development and Validation of an Electrochemical Screening Methodology for Sulfonamide Residue Control in Milk Samples Using a Graphene Quantum Dots@Nafion Modified Glassy Carbon Electrode. *Food Anal. Methods* **11**, 1711–1721 (2018).
151. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239–257 (1972).
152. Balvan, J. *et al.* Multimodal Holographic Microscopy: Distinction between Apoptosis and Oncosis. *PLOS ONE* **10**, e0121674 (2015).
153. Bampton, E. T. W., Goemans, C. G., Niranjana, D., Mizushima, N. & Tolkovsky, A. M. The dynamics of autophagy visualized in live cells: from autophagosome formation to fusion with endo/lysosomes. *Autophagy* **1**, 23–36 (2005).
154. Biederbick, A., Kern, H. F. & Elsässer, H. P. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *Eur. J. Cell Biol.* **66**, 3–14 (1995).
155. Niemann, A., Takatsuki, A. & Elsässer, H. P. The lysosomotropic agent monodansylcadaverine also acts as a solvent polarity probe. *J. Histochem. Cytochem.* **48**, 251–258 (2000).
156. Vázquez, C. L. & Colombo, M. I. Assays to assess autophagy induction and fusion of autophagic vacuoles with a degradative compartment, using monodansylcadaverine (MDC) and DQ-BSA. *Meth. Enzymol.* **452**, 85–95 (2009).

157. Yannaki, E. *et al.* The proteasome inhibitor bortezomib drastically affects inflammation and bone disease in adjuvant-induced arthritis in rats. *Arthritis Rheum.* **62**, 3277–3288 (2010).
158. Drachenberg, C. B. *et al.* Islet cell damage associated with tacrolimus and cyclosporine: morphological features in pancreas allograft biopsies and clinical correlation. *Transplantation* **68**, 396–402 (1999).
159. Chan, S. M. T., Neu, C. P., DuRaine, G., Komvopoulos, K. & Reddi, A. H. Tribological altruism: A sacrificial layer mechanism of synovial joint lubrication in articular cartilage. *Journal of Biomechanics* **45**, 2426–2431 (2012).
160. Fisher, J. & Dowson, D. Tribology of Total Artificial Joints. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine* **205**, 73–79 (1991).
161. Ghosh, S. *et al.* Tribological performance of the biological components of synovial fluid in artificial joint implants. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **16**, 045002 (2015).
162. Role of Synovial Fluid Constituents on Tribological Behavior of Synovial Joints - Application for Developing Novel Therapeutic Substitutes. Available at: <http://www.scientific.net/AMM.658.477>. (Accessed: 15th January 2016)
163. Corroboration of in vivo cartilage pressures with implications for synovial joint tribology and osteoarthritis causation. Available at: <http://www.pnas.org/content/102/41/14819.short>. (Accessed: 15th January 2016)
164. Bloch, B. & Dintenfuss, L. Rheological Study of Human Synovial Fluid. *Australian and New Zealand Journal of Surgery* **33**, 108–113 (1963).
165. Bali, R. & Shukla, A. K. Rheological effects of synovial fluid on nutritional transport. *Tribology Letters* **9**, 233–239 (2001).
166. Caygill, J. C. & West, G. H. The rheological behaviour of synovial fluid and its possible relation to joint lubrication. *Med. & biol. Engng.* **7**, 507–516 (1969).
167. Roselli, R. J. & Diller, K. R. Rheology of Biological Fluids. in *Biotransport: Principles and Applications* 107–168 (Springer New York, 2011). doi:10.1007/978-1-4419-8119-6_4
168. Zhang, Z., Barman, S. & Christopher, G. F. The role of protein content on the steady and oscillatory shear rheology of model synovial fluids. *Soft Matter* **10**, 5965–5973 (2014).
169. Ghosh, S., Choudhury, D., Das, N. S. & Pinguan-Murphy, B. Tribological role of synovial fluid compositions on artificial joints — a systematic review of the last 10 years. *Lubr. Sci.* **26**, 387–410 (2014).
170. Matej, C. I. Recherche des assemblages moléculaires actifs en biolubrification en vue du diagnostic et de la thérapeutique précoce de pathologies articulaires. (Université Claude Bernard - Lyon I, 2012).
171. Mazzucco, D., Scott, R. & Spector, M. Composition of joint fluid in patients undergoing total knee replacement and revision arthroplasty: correlation with flow properties. *Biomaterials* **25**, 4433–4445 (2004).

172. Balazs, E. A. The physical properties of synovial fluid and the special role of hyaluronic acid. *Disorders of the Knee* **2**, 61–74 (1982).
173. Mirea, D. A. *et al.* Role of the biomolecular interactions in the structure and tribological properties of synovial fluid. *Tribology International* **59**, 302–311 (2013).
174. SAVA, M.-M., Suflet, D. M., Berthier, Y. & TRUNFIO-SFARGHIU, A.-M. Role of Synovial Fluid Constituents on Tribological Behavior of Synovial Joints. Application for Developing Novel Therapeutic Substitutes. *Applied Mechanics & Materials* (2014).
175. Lee, K. Y. & Mooney, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science* **37**, 106–126 (2012).
176. Pelletier, S. *et al.* Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate for cartilage repair: Rheological properties. *J. Biomed. Mater. Res.* **54**, 102–108 (2001).
177. Steelandt, J. *et al.* Antimicrobial nanocapsules: from new solvent-free process to in vitro efficiency. *Int J Nanomedicine* **9**, 4467–4474 (2014).
178. Kirilov, P. *et al.* Aqueous dispersions of organogel nanoparticles – potential systems for cosmetic and dermo-cosmetic applications. *Int J Cosmet Sci* **36**, 336–346 (2014).
179. Bonaventura, P. *et al.* Protective effect of low dose intra-articular cadmium on inflammation and joint destruction in arthritis. *Scientific Reports* **7**, 2415 (2017).
180. Courbon, G., Cleret, D., Linossier, M.-T., Vico, L. & Marotte, H. Early Subchondral Bone Loss at Arthritis Onset Predicted Late Arthritis Severity in a Rat Arthritis Model. *J. Cell. Physiol.* **232**, 1318–1325 (2017).
181. Hong, S.-S. *et al.* PUMA gene delivery to synoviocytes reduces inflammation and degeneration of arthritic joints. *Nat Commun* **8**, 146 (2017).
182. Stability Testing of New Drug Substances and Products : ICH Q1A (R2). (2003). Available at: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/stability-testing-of-new-drug-substances-and-products.html>. (Accessed: 3rd December 2015)
183. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology : ICH Q2B. (1999). Available at: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html>. (Accessed: 3rd December 2015)
184. Schneider, R. *et al.* The exposure of bacteria to CdTe-core quantum dots: the importance of surface chemistry on cytotoxicity. *Nanotechnology* **20**, 225101 (2009).