



**HAL**  
open science

# Nanoparticules et santé: de grandes promesses thérapeutiques, mais pour quel risque?

Raphaël Cornu

► **To cite this version:**

Raphaël Cornu. Nanoparticules et santé: de grandes promesses thérapeutiques, mais pour quel risque?. Médecine humaine et pathologie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2019. Français. NNT: 2019UBFCE018 . tel-03169400

**HAL Id: tel-03169400**

**<https://theses.hal.science/tel-03169400v1>**

Submitted on 15 Mar 2021

**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.



**THESE DE DOCTORAT  
DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE**

**PREPAREE A L'UFR SCIENCES DE LA SANTE**

Ecole doctorale n°554

Environnements-Santé

Doctorat de spécialité Biochimie et Biologie Moléculaire

Par

Raphaël CORNU

**NANOPARTICULES ET SANTE :  
DE GRANDES PROMESSES THERAPEUTIQUES MAIS POUR QUEL RISQUE ?**

Thèse présentée et soutenue à Besançon, le 16 décembre 2019

Composition du Jury :

Pr. Chambin Odile	Professeur des Universités, Université de Bourgogne	Président
Dr. Boland Sonja	Ingénieur de Recherche, Université Paris Diderot	Rapporteur
Pr. Fattal Elias	Professeur des Universités, Université Paris Sud	Rapporteur
Dr. Langoüet-Prigent Sophie	Directrice de Recherche, Université Rennes 1	Examinatrice
Dr. Martin Hélène	Maître de conférences, Université de Franche-Comté	Directrice de thèse
Dr Béduneau Arnaud	Maître de conférences, Université de Franche-Comté	Codirecteur de thèse



## Remerciements

*Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement le Dr. Hélène Martin, ma directrice de thèse qui m'a fait confiance et m'a guidé tout au long de mes trois années de thèse. Merci pour tous vos conseils, votre gentillesse et pour tout ce que vous m'avez transmis. Merci d'avoir toujours laissé votre porte ouverte malgré mes trop nombreuses sollicitations.*

*Je souhaite aussi remercier très sincèrement le Dr. Arnaud Béduneau, mon codirecteur de thèse. Merci pour votre encadrement, votre disponibilité, votre dynamisme et pour tout ce que vous m'avez appris. Vous avez toujours répondu présent pour m'aider à prendre les bonnes décisions à la paillasse, je vous en suis très reconnaissant.*

*Je tiens à remercier le Dr. Sonja Boland, le Pr. Elias Fattal, le Pr. Odile Chambin et le Dr. Sophie Langoüet pour avoir consacré du temps à la lecture de mon manuscrit de thèse et de me faire l'honneur de participer à mon jury de thèse.*

*Je voudrais également remercier le Pr. Chantal Pichon et à nouveau le Dr. Sophie Langoüet pour leur participation à mes comités de suivi de thèse. Merci pour tous vos conseils avisés.*

*Merci au Pr. Céline Demougeot, directrice de l'EA 4267, de m'avoir accueilli au sein de l'équipe durant ma thèse.*

*J'aimerais aussi remercier tout particulièrement les membres de l'équipe PEPITE. Yann, merci pour tes nombreux conseils à la fois sur mon travail de thèse mais aussi sur mes projets post-thèse. Un grand merci Claire pour ta contribution à mes travaux, notamment pour ton aide précieuse en culture cellulaire et à l'animalerie. Merci aussi pour tous ces délicieux gâteaux que tu as pris le temps de nous préparer et qui nous ont toujours régalés. Alexandre, merci pour tes conseils à la paillasse et ton expertise sur les hépatocytes. Que le temps est vite passé depuis notre réunion sur les « SH » avec Barbara, Laurence, et Hélène. Depuis mon Master, on est devenu des voisins de bureau, merci de m'avoir supporté. Les petites pauses « fruits » en ces fins d'après-midi vont me manquer.*

*Un très grand merci à tous les doctorants, Ryma, Jason et Romain avec qui j'ai partagé de très bons moments au labo et en dehors. Un clin d'œil tout particulier à toi Romain présent depuis le tout début de cette aventure.*



*Merci également à tous les membres des laboratoires de pharmacognosie, de physiologie et de chimie. Merci notamment à Lydie, Barbara, Andy et Vincent pour toutes les conversations animées et plus ou moins sérieuses que nous avons eues pendant les pauses déjeuner.*

*Je remercie tous les stagiaires avec qui j'ai pu travailler et passer de très bons moments : Thomas S., Elisa, Stecy, Valentin et Thomas A. Je vous souhaite plein de réussite et de bonheur tant dans votre vie professionnelle que personnelle.*

*Je souhaiterais aussi très sincèrement remercier Anne-Marie pour sa bienveillance et sa disponibilité.*

*J'ai une pensée toute particulière pour Jean Radom qui m'a fait découvrir et m'a transmis sa passion de la recherche il y a quelques années.*

*A toutes les personnes que j'ai côtoyées, qui ont contribué de près ou de loin à cette thèse, qu'elles trouvent en ces mots l'expression de ma profonde reconnaissance.*

*Enfin, je tiens à remercier mes parents, ma sœur Gaëlle et ma grand-mère Maïé. Gaëlle, que de chemin parcouru depuis un certain exposé sur les Romains... Ces quelques mots sont l'occasion pour moi de vous remercier du fond du cœur pour votre soutien et vous prouver toute mon affection.*

*Pour tous ces bons moments partagés, pour vos encouragements, vos conseils et bien plus encore, à tous, je vous dis de nouveau un très grand merci.*

*Je remercie également la Communauté d'Agglomération du Grand Besançon qui a accepté de financer ce projet de thèse.*





# **SOMMAIRE**

---



<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>1</b>
<b>ABBREVIATIONS ET ACRONYMES.....</b>	<b>7</b>
<b>FIGURES.....</b>	<b>11</b>
<b>TABLEAUX.....</b>	<b>17</b>
<b>CADRE ET BUT DU TRAVAIL .....</b>	<b>21</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>27</b>
<b>I. LES NANOPARTICULES.....</b>	<b>29</b>
1. Définition .....	29
2. Historique .....	30
3. Contexte économique et cadre juridique.....	32
3.1 Marché économique .....	32
3.2 Réglementation.....	34
4. Les différents types de nanoparticules .....	34
4.1 Les nanoparticules organiques .....	35
4.1.1 Les liposomes.....	35
4.1.2 Les micelles polymériques.....	36
4.1.3 Les dendrimères .....	37
4.1.4 Les nanoparticules polymériques.....	38
4.2 Les nanoparticules inorganiques .....	42
4.2.1 Les nanoparticules à base de carbone .....	42
4.2.2 Les quantum dots .....	43
4.2.3 Les nanoparticules métalliques et d'oxydes métalliques .....	43
4.2.4 Les nanoparticules de silice .....	45
<b>II. VOIES D'EXPOSITION.....</b>	<b>47</b>
1. Voie pulmonaire.....	47
2. Voie cutanée.....	48
3. Voie gastro-intestinale.....	50
4. Voie parentérale .....	52
5. Voie oculaire .....	54
6. Mécanismes d'entrée dans la cellule.....	54
7. Elimination.....	56

III. LE FOIE, UN ORGANE CIBLE .....	59
1. Anatomie et structure .....	59
2. Les différents types cellulaires hépatiques et leurs fonctions .....	60
2.1 Cellules endothéliales.....	61
2.2 Cellules de Kupffer .....	61
2.3 Cellules étoilées.....	62
2.4 Hépatocytes .....	62
2.4.1 Métabolisme des glucides .....	62
2.4.2 Métabolisme des lipides.....	63
2.4.3 Synthèse des protéines plasmatiques et fonctions immunitaires .....	63
2.4.4 Sécrétion de bile.....	64
2.4.5 Métabolisme des xénobiotiques .....	64
3. Le métabolisme des xénobiotiques .....	64
3.1 Métabolisme de phase I et cytochromes P450 .....	65
3.1.1 Historique.....	65
3.1.2 Structure .....	66
3.1.3 Nomenclature et classification .....	67
3.1.4 Cycle catalytique des cytochromes P450.....	68
3.1.5 Induction des cytochromes P450 .....	69
3.1.6 Inhibition des cytochromes P450.....	70
3.1.7 Polymorphisme des cytochromes P450 .....	72
3.1.8 CYP1 .....	73
3.1.9 CYP2.....	73
3.1.10 CYP3 .....	73
3.2 Métabolisme de phase II .....	76
3.3 Phase 0 et phase III.....	77
IV. L'INTESTIN, UN ORGANE CIBLE.....	79
1. Anatomie et structure .....	79
2. Le microbiote .....	79
3. Le mucus .....	81
4. L'épithélium intestinal .....	83
4.1 Les différents types cellulaires et leurs fonctions .....	83
4.2 Perméabilité et transport.....	86
4.2.1 Les transporteurs .....	86

4.2.2	Jonctions cellulaires .....	86
4.2.3	Régulation des jonctions serrées .....	88
4.2.4	Rupture des jonctions serrées.....	89
4.2.5	Autres types de jonctions cellulaires.....	90
5.	Tissus lymphoïdes associés à l'intestin et plaques de Peyer .....	92
<b>TOXICITÉ DES NANOPARTICULES : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>		<b>93</b>
I.	LA NANOTOXICOLOGIE.....	95
II.	FACTEURS DE TOXICITE DES NANOPARTICULES.....	96
1.	La taille.....	96
2.	La composition chimique .....	97
3.	La charge de surface.....	98
4.	Le degré d'agrégation/d'agglomération .....	98
5.	La forme .....	99
6.	Caractérisation.....	99
III.	OUTILS ET TESTS POUR L'EVALUATION TOXICOLOGIQUE.....	102
1.	Modèles hépatiques .....	102
1.1	Lignées cellulaires.....	102
1.2	Cultures primaires .....	102
1.3	Les modèles 3D.....	103
1.4	Les coupes de foie .....	104
2.	Modèles intestinaux.....	105
2.1	Lignées cellulaires.....	105
2.2	Cellules primaires.....	106
2.3	Organoïdes .....	107
2.4	Modèle ex-vivo .....	107
3.	Tests de toxicité.....	107
3.1	<i>In vitro</i> .....	107
3.2	<i>In vivo</i> .....	108
IV.	ORGANOTOXICITE DES NANOPARTICULES .....	110
1.	Au niveau hépatique.....	110
PUBLICATION : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....		111
2.	Au niveau intestinal.....	154
2.1	Exposition par voie orale aux nanoparticules .....	154



2.2	Impact des fluides biologiques et du bol alimentaire sur les nanoparticules .....	155
2.3	Passage des nanoparticules à travers la barrière intestinale .....	157
2.4	Effets des nanoparticules sur la barrière intestinale .....	158
2.4.1	Nanoparticules d'argent .....	158
2.4.2	Nanoparticules de dioxyde de titane .....	160
2.4.3	Nanoparticules de dioxyde de silice.....	162
2.4.4	Nanoparticules polymériques et métalliques .....	163
<b>TOXICITÉ DES NANOPARTICULES : PARTIE EXPÉRIMENTALE .....</b>		<b>165</b>
	PUBLICATION 1 .....	167
I.	CONTEXTE ET OBJECTIFS .....	169
II.	METHODOLOGIE.....	169
III.	PRINCIPAUX RESULTATS / CONCLUSIONS .....	170
IV.	PUBLICATION I .....	170
	PUBLICATION 2.....	183
I.	CONTEXTE ET OBJECTIFS .....	185
II.	METHODOLOGIE.....	185
III.	PRINCIPAUX RESULTATS / CONCLUSIONS .....	186
IV.	PUBLICATION II.....	187
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....</b>		<b>219</b>
I.	TOXICITE HEPATIQUE .....	221
1.	Méthodologie .....	221
2.	Résultats .....	222
3.	Perspectives.....	223
II.	TOXICITE INTESTINALE.....	226
1.	Méthodologie .....	226
2.	Résultats .....	227
3.	Perspectives.....	229
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>		<b>231</b>
<b>ANNEXES .....</b>		<b>263</b>

# **ABBREVIATIONS ET ACRONYMES**

---



## ABBREVIATIONS ET ACRONYMES

<b>ABC</b> : ATP-binding cassette	<b>Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b> : oxyde de fer
<b>ADME</b> : absorption, distribution, métabolisme, élimination	<b>FGF</b> : fibroblast growth factor
<b>ADN</b> : acide désoxyribonucléique	<b>G1P</b> : glucose-1-phosphate
<b>AFM</b> : microscopie à force atomique	<b>G6P</b> : glucose-6-phosphate
<b>AhR</b> : aryl hydrocarbon receptor	<b>GALT</b> : gut associated lymphoid tissue
<b>Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b> : oxyde d'aluminium	<b>GLUT</b> : glucose transporter
<b>AMPc</b> : adénosine monophosphate cyclique	<b>GR</b> : glucocorticoïd receptor
<b>ANSES</b> : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail	<b>GST</b> : glutathion-S-transférase
<b>ARNm</b> : acide ribonucléique messenger	<b>HDL</b> : high density lipoprotein
<b>ATP</b> : adénosine triphosphate	<b>HGF</b> : hepatocyte growth factor
<b>BCRP</b> : breast cancer resistance protein	<b>IFN</b> : interféron
<b>BSA</b> : bovine serum albumine	<b>IL</b> : interleukine
<b>BSEP</b> : bile salt export pump	<b>IPSCs</b> : cellules souches pluripotentes induites
<b>CAR</b> : constitutive androstane receptor	<b>JAM</b> : junctional adhesion molecule
<b>CdS</b> : sulfure de cadmium	<b>kDa</b> : kilodalton
<b>CdSe</b> : séléniure de cadmium	<b>Km</b> : constante de Michaelis-Menten
<b>CdTe</b> : tellurure de cadmium	<b>LPS</b> : lipopolysaccharides
<b>CeO<sub>2</sub></b> : dioxyde de cérium	<b>LSECs</b> : liver sinusoidal endothelial cells
<b>CLP</b> : classification, labelling, packaging	<b>LXR</b> : liver X receptor
<b>CO</b> : monoxyde de carbone	<b>MCP</b> : monocyte chemoattractant protein
<b>CXCL</b> : chemokine (C-X-C motif) ligand	<b>MLC</b> : myosin light-chain
<b>CYP</b> : cytochrome P450	<b>MLCK</b> : myosin light-chain kinase
<b>DCFDA</b> : 2',7'-dichlorofluoréscine diacétate	<b>MLP</b> : myosin phosphatase
<b>DLS</b> : dynamic light scattering	<b>MRP</b> : multidrug resistance-associated protein
<b>EFSA</b> : Autorité européenne de sécurité des aliments	<b>MTT</b> : 3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
<b>EGF</b> : epidermal growth factor	<b>MTX</b> : méthotrexate
<b>EPR</b> : enhanced permeability and retention	<b>MUC</b> : mucine
<b>ERK</b> : extracellular signal-regulated kinase	<b>MWCNT</b> : multi-walled carbon nanotubes
<b>ES</b> : complexe enzyme-substrat	<b>NADPH</b> : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b>FAD</b> : flavine adénine dinucléotide	<b>NASH</b> : non alcoholic steato hepatitis
<b>FDA</b> : Food and Drug Administration	<b>NAT</b> : N-acétyltransférase
	<b>NF-κB</b> : nuclear factor kappa B

## ABBREVIATIONS ET ACRONYMES

**NO** : monoxyde d'azote

**NPs** : nanoparticules

**NTCP** : Na<sup>+</sup> taurocholate co-transporting polypeptide

**OATP** : organic anion transporter

**PAMAM** : poly(amidoamine)

**P-gp** : glycoprotéine P

**pH** : potentiel hydrogène

**PKA** : protéine kinase A

**PKC** : protéine kinase C

**PPAR** : peroxisome proliferator-activated receptor

**PXR** : pregnane X receptor

**PLA** : acide poly-lactique

**PLGA** : acide poly-lactique-co-glycolique

**PEG** : polyéthylène glycol

**QDs** : quantum dots

**REACH** : registration, evaluation, authorization and restriction of chemicals

**RESS** : rapid expansion of supercritical solution

**ROCK** : Rho-associated protein kinase

**ROS** : reactive oxygen species

**RT-PCR** : reverse transcription polymerase chain reaction

**RXR** : retinoïd X receptor

**SAA** : serum amyloïd A

**SiO<sub>2</sub>** : dioxyde de silice

**SLC** : solute carrier

**SPION** : superparamagnetic iron oxide nanoparticles

**ST** : sulfotransférase

**SWCNT** : single-walled carbon nanotubes

**TBS** : tris buffered saline

**TEER** : résistance électrique transépithéliale

**TEOS** : tetraethylorthosilicate

**TFF** : trefoil factor

**TGF** : transforming growth factor

**TLR** : toll-like receptor

**TiO<sub>2</sub>** : dioxyde de titane

**TNF** : tumor necrosis factor

**TPMT** : méthyltransferase

**UGT** : UDP-glucuronosyltransférase

**VLDL** : very low density lipoprotein

**Vmax** : vitesse maximale

**WST** : water-soluble tetrazolium salts

**ZnO** : oxyde de zinc

**ZnS** : sulfure de zinc

**ZnSe** : séléniure de zinc

**ZnTe** : tellurure de zinc

**ZO** : zonula occludens

# FIGURES

---



## FIGURES

Figure 1 : Gamme de taille des NPs comparée à celles des principales structures chimiques et biologiques.....	30
Figure 2 : Coupe de Lycurgue datant du IV <sup>ème</sup> siècle après J.-C. appartenant aux collections du British Museum.....	31
Figure 3 : Domaines d'applications des NPs. ....	32
Figure 4 : Evolution du nombre de produits répertoriés dans le <i>Nanotechnology Consumer Products Inventory</i> entre 2005 et 2014.....	33
Figure 5 : Nombre de produits présents dans le <i>Nanotechnology Consumer Products</i> regroupés en cinq catégories selon leur composition : non indiquée, nanomatériaux métalliques (métaux et oxides métalliques), nanomatériaux à base de carbone (nanotubes de carbone, fullerènes, graphènes). ....	33
Figure 6 : Classification des NPs organiques et inorganiques. ....	35
Figure 7 : Représentation schématique de la structure d'un liposome. ....	36
Figure 8 : Représentation schématique de la structure d'une micelle polymérique. ....	37
Figure 9 : Représentation schématique de la structure des dendrimères.....	38
Figure 10 : Polymères utilisés pour la synthèse de NPs.....	38
Figure 11 : Représentation schématique de la structure d'une nanocapsule et d'une nanosphère. ....	39
Figure 12 : Représentation schématique des structures des nanomatériaux à base de carbone. ....	42
Figure 13 : Principales voies d'exposition de l'organisme aux NPs. ....	47
Figure 14 : Dépôt des NPs dans les voies respiratoires en fonction de leur taille. ....	48
Figure 15 : Voies de passage des NPs à travers la peau.....	50
Figure 16 : Voies d'absorption des NPs à travers la barrière intestinale.....	52
Figure 17 : Ciblage passif avec des NPs PEGylées et non PEGylées.....	53
Figure 18 : Voies d'exposition de l'œil aux nanosystèmes.....	54
Figure 19 : Voies d'endocytose des NPs. ....	55
Figure 20 : Voies de clairance des NPs. ....	57
Figure 21 : Elimination des NPs au niveau hépatique. ....	57
Figure 22 : Organisation générale et histologique du lobule hépatique. ....	60
Figure 23 : Localisation des hépatocytes, cellules sinusoidales, cellules de Kupffer et cellules étoilées au sein du parenchyme hépatique. ....	60



## FIGURES

Figure 24 : Représentation schématique des 4 phases du métabolisme d'un xénobiotique dans un hépatocyte. ....	65
Figure 25 : Schéma de la structure d'un CYP.....	66
Figure 26 : Exemple de nomenclature du CYP2D6.....	67
Figure 27 : Mécanisme moléculaire du cycle catalytique des CYP.....	69
Figure 28 : Représentation schématique de l'induction du CYP3A4 par un xénobiotique et activation de PXR. ....	70
Figure 29 : Structures des principaux inhibiteurs réversibles des CYP. ....	71
Figure 30 : Abondance des CYP hépatiques chez l'Homme et proportion de médicaments métabolisés par ces mêmes CYP. ....	74
Figure 31 : Proportion de chaque enzyme de phase II chez l'Homme au niveau hépatique. ..	77
Figure 32 : Schéma représentatif des phases de transport (0 et 3) du métabolisme des xénobiotiques. ....	78
Figure 33 : Structure de la barrière intestinale. ....	79
Figure 34 : Composition bactérienne du microbiote intestinal. ....	81
Figure 35 : Structure de MUC2 sécrétée et de MUC1 transmembranaire. Processus de maturation et de transport des MUC. ....	82
Figure 36 : Structure de l'épithélium intestinal et localisation de chaque type cellulaire. ....	84
Figure 37 : Différenciation des cellules souches en différentes cellules intestinales. ....	85
Figure 38 : Schéma représentatif des transporteurs ABC et SLC. ....	86
Figure 39 : Structure d'une jonction serrée. ....	87
Figure 40 : Régulation des jonctions serrées par les phosphatases et kinases. ....	89
Figure 41 : Les différentes jonctions cellulaires de l'épithélium intestinal. ....	91
Figure 42 : Organisation des tissus lymphoïdes associés à l'intestin et interactions entre les cellules des sites inducteur et effecteur.....	92
Figure 43 : Evolution du nombre de publications en nanotoxicologie et nanotechnologie de 1980 à 2010. ....	95
Figure 44 : Caractéristiques physico-chimiques des NPs impliquées dans leur activité biologique. ....	96
Figure 45 : Représentation schématique d'un Transwell®.....	106

## FIGURES

Figure 46 : Représentation schématique de la procédure de digestion <i>in vitro</i> . .....	156
Figure 47 : Les petites NPs d'argent peuvent moduler la perméabilité intestinale en l'absence de tout effet cytotoxique sur les cellules. ....	159
Figure 48 : Observation en microscopie électronique des villosités après traitement avec les NPs de TiO <sub>2</sub> . ....	161



# TABLEAUX

---



## TABLEAUX

Tableau 1 : Méthodes de préparation des NPs en fonction du polymère.....	40
Tableau 2 : Utilisation des principales NPs inorganiques.....	45
Tableau 3 : Nanomatériaux présents dans des produits de consommation pouvant conduire à une exposition cutanée.....	49
Tableau 4 : Classification des CYP identifiés chez l'Homme. ....	68
Tableau 5 : Substrats, inhibiteurs et inducteurs des CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 et 3A4. ....	75
Tableau 6 : Liste des réactions de phase II, les enzymes impliquées et leurs substrats.....	76



# **CADRE ET BUT DU TRAVAIL**

---





Les nanoparticules (NPs) ont connu un essor très important dans de très nombreux domaines depuis une vingtaine d'années. Elles ont permis de lever certains verrous technologiques et aujourd'hui encore elles constituent une approche très prometteuse pour des applications biotechnologiques, électroniques ou agroalimentaires. Cependant, leur très rapide développement a conduit à une exposition de plus en plus fréquente et à des doses de plus en plus importantes pour l'Homme. En parallèle, la mise au point d'outils permettant de les caractériser a permis de mieux détecter leur présence dans notre environnement. En raison de leur échelle nanométrique, les NPs possèdent des propriétés physico-chimiques uniques. En raison de ces caractéristiques, les NPs peuvent interagir avec les systèmes biologiques et ce de façon totalement différente comparativement aux matériaux « conventionnels ». Apparaissent alors de nombreuses interrogations d'ordre scientifique et sanitaire et notamment au sujet de leur toxicité potentielle qui est pour l'heure encore mal connue. Cette thèse, débutée en Octobre 2016, avait pour objectif de répondre en partie à ces nouvelles interrogations.

Dans le domaine de la santé, les nanomédicaments constituent une approche innovante et prometteuse comme outils de diagnostic et systèmes de transport et d'administration de molécules pharmaceutiques. Comme l'Abraxane™ ou le Feridex®, un certain nombre de médicaments sous forme nanoparticulaire sont actuellement commercialisés ou en phase d'essais cliniques. L'acide poly-lactique-co-glycolique (PLGA) dont l'utilisation est approuvée par la *Food and Drug Administration* (FDA), est un polymère biocompatible et biodégradable largement utilisé pour la formulation de médicaments sous forme de microparticules. De nombreuses études ont montré qu'entre 30 et 99% de ces NPs injectées par voie intraveineuse et dont la taille est supérieure à 6 nm sont localisées au niveau du tissu hépatique et ceci seulement 5 minutes après l'injection. En raison du rôle prépondérant du foie dans les processus de détoxification et au vu de ces différentes études, les potentielles interactions entre NPs et tissu hépatique doivent être élucidées. Ma première année de thèse a par conséquent été consacrée à l'étude des effets des NPs de PLGA sur la fonction hépatique et notamment leur impact sur l'activité des cytochromes P450 (CYP) dans des modèles *in vitro* et *in vivo* murins et humains. Ces enzymes de phase I du métabolisme sont responsables de la biotransformation des xénobiotiques *via* des réactions de mono-oxydation ou de réduction permettant l'élimination après conjugaison ou non par les enzymes de phase II, des composés exogènes.

Les NPs évaluées dans ce projet de thèse ne concernent pas uniquement celles sous forme de nanomédicaments. L'étude a été en effet élargie aux nano-objets présents dans certains produits du quotidien à savoir les NPs de dioxyde de silice (SiO<sub>2</sub>). Celles-ci sont utilisées comme régulateur d'écoulement dans l'élaboration des comprimés mais aussi comme agent anti-agglomérant ou anti-mottant dans des denrées en poudre et répertoriées sous le nom d'additif E551. La présence de ces additifs dans les produits agroalimentaires constitue l'une des sources principales d'exposition aux NPs manufacturées par la voie digestive, l'autre provenance étant un relargage à partir des emballages alimentaires. Formé d'une couche de mucus acellulaire et d'un épithélium, la muqueuse intestinale constitue un site d'absorption majeur pour les éléments nutritifs mais forme également une barrière physiologique contre les xénobiotiques et les bactéries. Des études ont montré qu'un certain nombre de maladies telles que les ulcères gastriques, les maladies inflammatoires de l'intestin ou encore des pathologies liées à l'obésité pourraient être associées à des altérations de la barrière intestinale et une augmentation de sa perméabilité. Au vu de ces données, nous avons décidé de consacrer les travaux de ma seconde année de thèse à l'étude des effets des NPs de silice sur la barrière intestinale et notamment leur impact sur la perméabilité intestinale dans deux modèles *in vitro* de barrière. Actuellement, le modèle de monocouche de cellules Caco-2 (adénocarcinome colorectal humain) représente le gold standard pour mimer la barrière intestinale bien qu'il présente de nombreuses limites, à savoir l'absence de mucus qui recouvre l'épithélium intestinal et une trop forte densité de jonctions serrées et de glycoprotéines P (P-gp), ce qui aboutit à sous-estimer la perméabilité para-cellulaire et trans-cellulaire. Une coculture de cellules Caco-2 et HT29-MTX a été développée et brevetée par notre équipe (F. Demarne *et al.*, 2012). Les cellules HT29-MTX sont une sous-population de la lignée d'adénocarcinome colorectal humain HT29, sélectionnée à l'aide de méthotrexate (MTX) et ont la particularité de sécréter du mucus, d'exprimer faiblement les jonctions serrées et enfin, d'être dépourvues de P-gp. Ce modèle de coculture Caco-2/HT29-MTX présente ainsi des caractéristiques fonctionnelles beaucoup plus proches de celles de la barrière intestinale humaine.

L'ensemble de mes travaux a fait l'objet de 3 articles scientifiques dont une revue traitant des effets des NPs sur le tissu et les fonctions hépatiques :

- R Cornu, N Rougier, Y Pellequer, A Lamprecht, P Hamon, R Li, A Beduneau and H Martin. *Interspecies differences in the cytochrome P450 activity of hepatocytes exposed to PLGA and silica nanoparticles: an in vitro and in vivo investigation*. *Nanoscale*, 2018, 10, 5171 – 5181 DOI : 10.1039/C8NR00226F
- R Cornu, C Chrétien, Y Pellequer, H Martin and A Beduneau. *Small Silica Nanoparticles Transiently Modulate the Intestinal Permeability by Actin Cytoskeleton Disruption*.  
Article soumis au journal *Nanotoxicology*
- R Cornu, A Beduneau and H Martin. *Influence of nanoparticles on liver tissue and hepatic functions: a review*.  
Revue soumise au journal *Toxicology*



# **INTRODUCTION**

---



## I. LES NANOPARTICULES

### 1. Définition

Le terme « nanoparticule » provient de l'association de « nanos » qui signifie « nain » en grec et de « particula » en latin qui correspond à une « petite partie ». Dans le système international des unités, un nanomètre représente  $10^{-9}$  mètre. Apparu dans les années 1970-1980, ce mot ne possède aujourd'hui encore aucune définition acceptée à l'échelle internationale. Cependant, depuis 2011, la Commission Européenne a défini les nanomatériaux comme des matériaux répondant à deux paramètres physiques, la taille et la surface spécifique. En effet, un nanomatériau est considéré comme tel si les particules qui le composent présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm ou si leur surface spécifique est en volume supérieure à  $60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$  ("Recommandation de la Commission du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux," 2011). La Commission prévoyait une révision en décembre 2014, mais cette nouvelle définition n'est toujours pas publiée.

Les nano-objets sont des structures de taille et de forme variées pouvant être d'origine naturelle ou être produites par les activités industrielles humaines de façon intentionnelle ou non. Ils peuvent être divisés en trois catégories en fonction du nombre de dimensions externes à l'échelle nanométrique. Les NPs présentent trois dimensions inférieures à 100 nm et les longueurs du plus grand et du plus petit axe ne diffèrent pas de façon significative. Ces dimensions, comparées à d'autres structures organiques naturelles, placent les NPs dans une gamme de taille correspondant à celle des protéines (**Figure 1**). Quant aux nanotubes ou nanofilaments, ils ne présentent que deux dimensions à l'échelle nanométrique, la troisième étant largement supérieure. Enfin, les nano-feuillets n'en présentent qu'une seule (ISO/TC 229, Nanotechnologies, 2017)



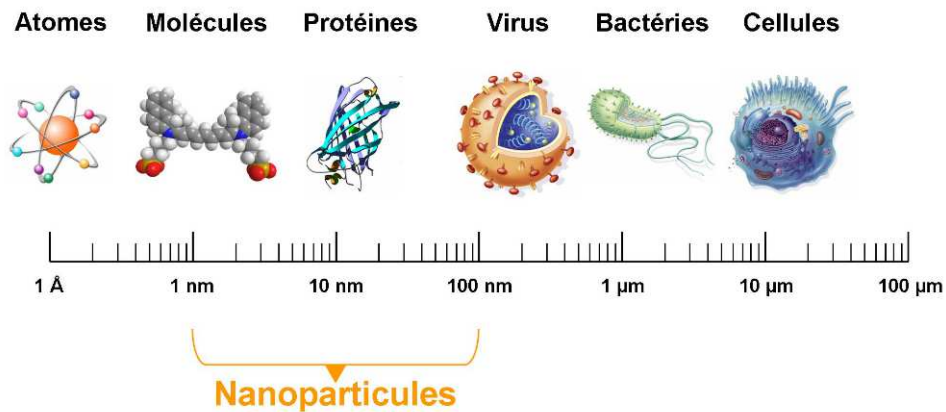


Figure 1 : Gamme de taille des NPs comparée à celles des principales structures chimiques et biologiques.

## 2. Historique

De façon surprenante, les NPs ont une très longue histoire. En effet, le renforcement de matrice en céramique avec des nanofibres d'amiante était déjà utilisé il y a plus de 4 000 ans (Heiligtag and Niederberger, 2013). Des preuves ont également été rapportées sur la présence de NPs de plomb d'un diamètre d'environ 5 nm dans des colorations pour cheveux utilisées pendant la période gréco-romaine (Walter *et al.*, 2006). D'autres traces de nanocristaux ont été décrites dans certains pigments comme le bleu d'Égypte préparé à partir de cuprorivaïte ( $\text{CaCuSi}_4\text{O}_{10}$ ) et dont l'utilisation était très répandue dans toutes les régions de l'Égypte, de la Mésopotamie, de la Grèce et l'Empire romain (Johnson-McDaniel *et al.*, 2013). Pendant plusieurs siècles, les NPs d'or ont été utilisées par les Romains dans la coloration rouge du verre (**Figure 2**) (Heiligtag and Niederberger, 2013).



*Figure 2 : Coupe de Lycurgue datant du IV<sup>ème</sup> siècle après J.-C. appartenant aux collections du British Museum. Lorsqu'elle est éclairée de face, la coupe parait verte et opaque et illuminée de l'intérieur, celle-ci apparait rouge. D'après "The Lycurgus Cup".*

Il faudra ensuite attendre, Michael Faraday et ses travaux sur l'interaction de la lumière avec les NPs métalliques au milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle pour voir émerger réellement les nanosciences (Edwards and Thomas, 2007). Aujourd'hui, l'électronique, l'écologie, la médecine et la pharmacie mais aussi l'agroalimentaire, ont profité du développement exponentiel qu'ont connu les nanotechnologies et en particulier des nanomatériaux à partir de la fin du XX<sup>ème</sup> siècle. En effet, en raison de leur échelle nanométrique, les nanomatériaux présentent des propriétés physico-chimiques très particulières que n'offrent pas les matériaux à des échelles supérieures. Ils ont permis de lever certains verrous technologiques en permettant par exemple la miniaturisation des systèmes électroniques ou la production de matériaux très résistants et légers à destination des secteurs automobile et aérospatial. Ainsi ils occupent aujourd'hui de très nombreux secteurs d'activité (**Figure 3**).

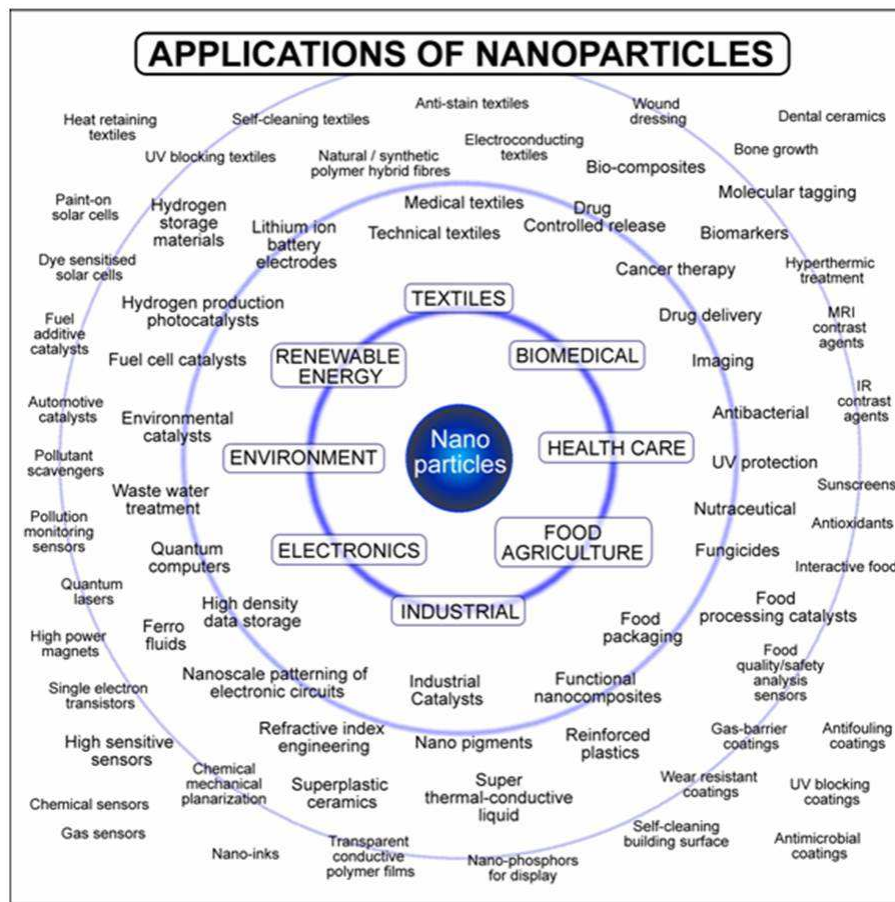


Figure 3 : Domaines d'applications des NPs. D'après Tsuzuki, 2009.

### 3. Contexte économique et cadre juridique

#### 3.1 Marché économique

Les données économiques reflètent parfaitement la place importante qu'occupent aujourd'hui les nanotechnologies dans les activités industrielles et de recherche. Les quantités totales de nanomatériaux produites et importées en France ne cessent d'augmenter et sont évaluées à 475 000 tonnes en 2016 (Ministère de l'Environnement, de l'Energie et de la Mer, 2016). Le marché européen des nanomatériaux représentait environ 2,2 milliards d'euros en 2015 et devrait atteindre plus de 8 milliards d'euros en 2022 (Inshakova and Inshakov, 2017).

En 2005, selon les données du *Project on Emerging Nanotechnologies*, 54 produits étaient recensés dans l'inventaire des produits nanotechnologiques de consommation. Dix ans plus tard, ce sont plus de 1800 produits provenant de 600 sociétés localisées dans 32 pays du monde qui sont, au total, répertoriés (**Figure 4**). Le dioxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ), de silice et l'oxyde de zinc ( $\text{ZnO}$ ) constituent les trois nanomatériaux les plus produits annuellement à l'échelle

mondiale. Bien qu'elles ne représentent que 2% de la production annuelle de  $\text{TiO}_2$ , ce sont les NPs d'argent qui entrent dans la composition de près d'un quart (438) des produits recensés (Figure 5).

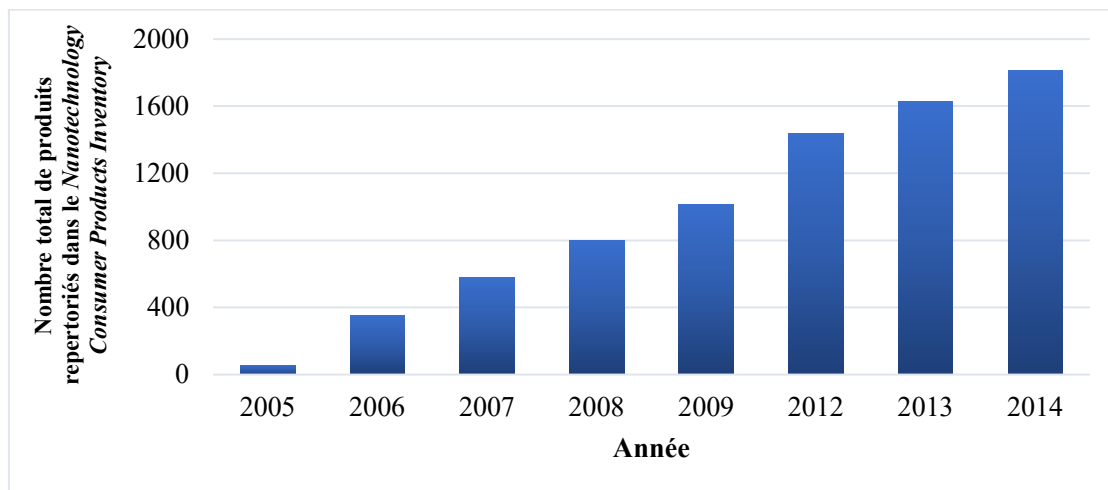


Figure 4 : Evolution du nombre de produits répertoriés dans le Nanotechnology Consumer Products Inventory entre 2005 et 2014. D'après Vance et al., 2015.

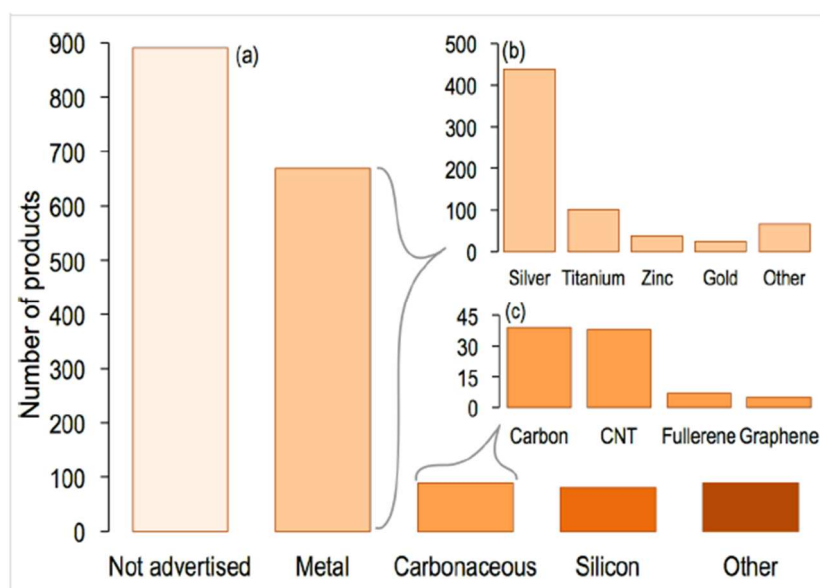


Figure 5 : Nombre de produits présents dans le Nanotechnology Consumer Products regroupés en cinq catégories selon leur composition : non indiquée, nanomatériaux métalliques (métaux et oxydes métalliques), nanomatériaux à base de carbone (nanotubes de carbone, fullerènes, graphènes).

D'après Vance et al., 2015.

### 3.2 Réglementation

Au niveau national, la réglementation impose depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2013 une déclaration annuelle de toute substance sous forme nanoparticulaire qu'elle soit fabriquée, importée ou mise sur le marché dès lors que les quantités sont supérieures à 100g par an. Le système R-Nano sous l'égide du Ministère de la Transition Ecologique et Solidaire et de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) permet notamment de mieux cerner les usages des nanomatériaux et les volumes utilisés. En effet, les déclarants du système R-Nano ont l'obligation d'identifier le nanomatériau par des données physico-chimiques et si possible des données relatives à leur toxicité et écotoxicité, ses différents usages, son tonnage annuel. Les clients professionnels doivent également être informés de la présence de NPs dans les produits fournis.

A l'échelle européenne, ce sont les règlements REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*) et CLP (*Classification, Labelling, Packaging*) qui s'appliquent. Toutefois, ces directives ne sont pas spécifiquement destinées aux nanomatériaux. Ils imposent la déclaration de toute substance chimique (y compris sous forme nanoparticulaire) dont les quantités produites sont supérieures à une tonne. Afin de renforcer la gestion des risques liés aux nanomatériaux, des exigences plus spécifiques relatives à ces substances devaient être introduites dans la réglementation. Ainsi à partir du 1<sup>er</sup> janvier 2020, la Commission oblige les industriels à identifier la taille, la forme, la structure de surface ainsi que des paramètres de dissolution et de stabilité des nanomatériaux. Elle demande aussi des informations relatives à l'évaluation de la sécurité chimique et à la préparation adéquate des échantillons ("RÈGLEMENT (UE) 2018/ 1881 DE LA COMMISSION - du 3 décembre 2018 - modifiant les annexes I, III, VI, VII, VIII, IX, X, XI, et XII du règlement (CE) no 1907/ 2006 du Parlement européen et du Conseil concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), aux fins de couvrir les nanoformes des substances," 2018).

## 4. Les différents types de nanoparticules

Les NPs se divisent en deux grandes familles avec d'un côté les nanosphères et nanocapsules polymériques, les micelles polymériques, les liposomes et les dendrimères qui forment la classe des NPs organiques par opposition aux NPs inorganiques dont la classe

comporte les NPs de silice, les nanotubes de carbone, les NPs d'oxydes métalliques, les NPs d'or et les quantum dots (QDs) (**Figure 6**).

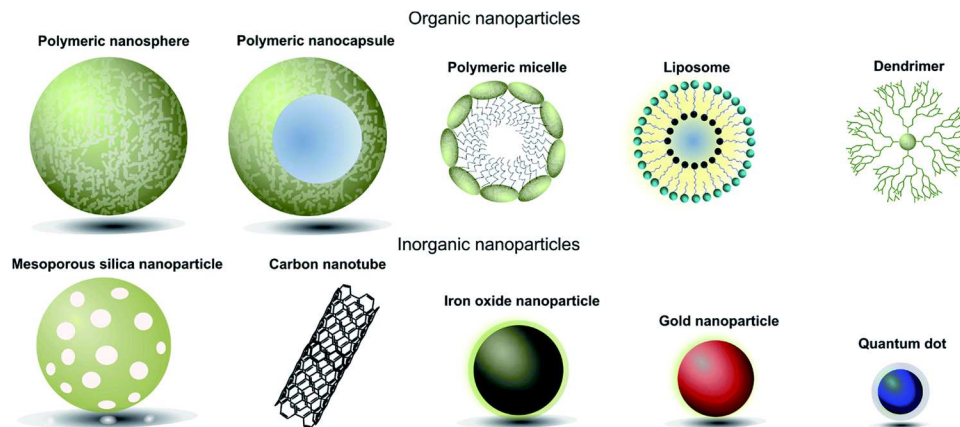


Figure 6 : Classification des NPs organiques et inorganiques. D'après Richards *et al.*, 2017.

## 4.1 Les nanoparticules organiques

### 4.1.1 Les liposomes

Les liposomes ont été décrits pour la première fois en 1965 par Alec Bangham (Bangham and Horne, 1964). Les liposomes sont constitués de phospholipides le plus souvent d'origine naturelle et de lipides comme le cholestérol. Les extrémités hydrophile et hydrophobe des lipides qui les composent leur permettent de s'organiser sous une forme vésiculaire (**Figure 7**). A l'image des membranes cellulaires, les liposomes sont ainsi composés d'une bicouche lipidique. Le choix des phospholipides, qui sont généralement des molécules de phosphatidylcholine, phosphatylsérine ou phosphatyléthanolamine, détermine les propriétés de surface des liposomes et la perméabilité de la bicouche (Jesorka and Orwar, 2008). L'utilisation des liposomes se concentre sur des applications biomédicales. Ils ont en effet constitué l'une des premières formes de NPs utilisée comme vecteurs pharmaceutiques et un certain nombre de formulations sont aujourd'hui approuvées par la FDA (Allen and Cullis, 2013). Leur structure peut contenir des molécules lipophiles, amphiphiles et hydrophiles. Ils présentent de très nombreux avantages parmi lesquels leur facilité de synthèse, leur totale biocompatibilité et biodégradabilité (Richards *et al.*, 2017). Enfin, ils peuvent être facilement fonctionnalisés pour permettre par exemple un ciblage actif précis. Cependant, ils ont démontré une forte sensibilité aux changements structuraux liés à des problèmes de stabilité chimique (oxydation des phospholipides) et physique (agrégation) et une capacité d'encapsulation très variable selon les molécules chimiques. La bicouche lipidique peut être stabilisée et rigidifiée par l'ajout de

molécules de cholestérol (Immordino *et al.*, 2006). L'utilisation des liposomes ne se limite pas à l'encapsulation de molécules à visée thérapeutique. Ils sont également employés dans l'industrie agroalimentaire (Walde and Ichikawa, 2001).

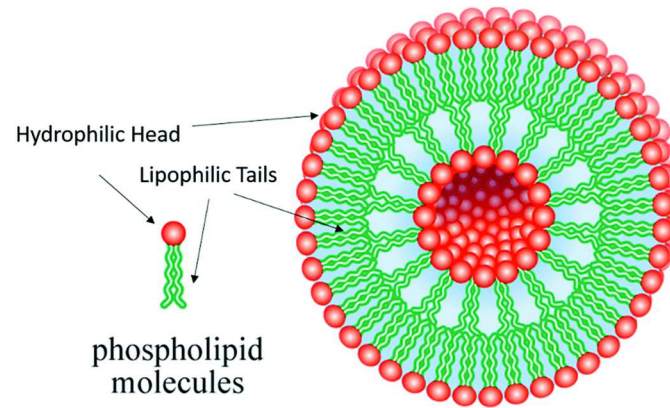


Figure 7 : Représentation schématique de la structure d'un liposome. D'après Hwang *et al.*, 2016.

#### 4.1.2 Les micelles polymériques

Les micelles polymériques sont des structures nanoparticulaires à base de copolymères. En milieu aqueux, la partie hydrophobe du copolymère forme un cœur jouant le rôle d'un réservoir à substance active, tandis que les chaînes hydrophiles du copolymère forment une couronne protectrice à l'extérieur (Richards *et al.*, 2017) (**Figure 8**). Les micelles constituent ainsi un excellent outil pour la solubilisation et le transport de molécules actives. Elles sont par exemple utilisées comme vecteurs de composés anticancéreux tels que le méthotrexate hydrophobe (Wei *et al.*, 2007). Ces molécules peuvent être chargées dans les micelles par liaison covalente au polymère ou par piégeage physique (Mukherjee *et al.*, 2016). De plus, la petite taille des micelles, entre 10 et 100 nm, et leurs propriétés de surface hydrophiles limitent leur reconnaissance par le système réticulo-endothélial, ce qui leur confèrent une longue demi-vie plasmatique. Tout comme les liposomes, les micelles polymériques sont parfaitement biocompatibles et permettent une protection efficace de la substance active des dégradations enzymatiques (Jones and Leroux, 1999 ; Shatrohan Lal, 2014).



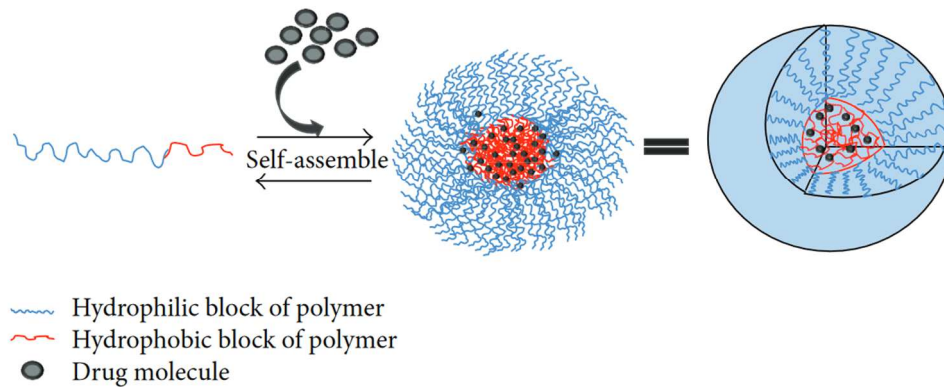


Figure 8 : Représentation schématique de la structure d'une micelle polymérique. D'après Xu *et al.*, 2013.

#### 4.1.3 Les dendrimères

Le développement des dendrimères a débuté dans les années 1970. Les dendrimères sont des structures de petite taille (10 nm en moyenne) (Verma *et al.*, 2017). Ils possèdent une structure ramifiée à symétrie radiale (**Figure 9**). A partir d'un corps central formé par un ou plusieurs atomes se répètent des unités qui forment les branches du dendrimère, elles-mêmes terminées par des groupements de surface (Aulenta *et al.*, 2003). Le processus de synthèse permet de contrôler le nombre de branches ajoutées à chaque génération et donc la forme et la taille finale (Richards *et al.*, 2017). Les acides aminés ou les sucres peuvent être utilisés pour la fabrication des dendrimères. Les PAMAM (PolyAMidoAMine) synthétisés à partir de polyamidoamine constituent l'une des familles les plus connues de dendrimères (Medina and El-Sayed, 2009). En plus de leur biocompatibilité, les dendrimères ont une excellente uniformité structurale et une composition chimique variable. Le grand nombre de groupes fonctionnels à la périphérie des dendrimères leur confère un large éventail d'applications potentielles et notamment biomédicales. Les dendrimères sont en effet utilisés comme agents de contraste mais également comme vecteurs pharmaceutiques (Kojima *et al.*, 2011 ; Pandita *et al.*, 2014). La molécule active peut être liée de manière covalente aux extrémités des branches du dendrimère ou piégée plus au cœur du dendrimère dans les cavités hydrophobes (Shatrohan Lal, 2014).



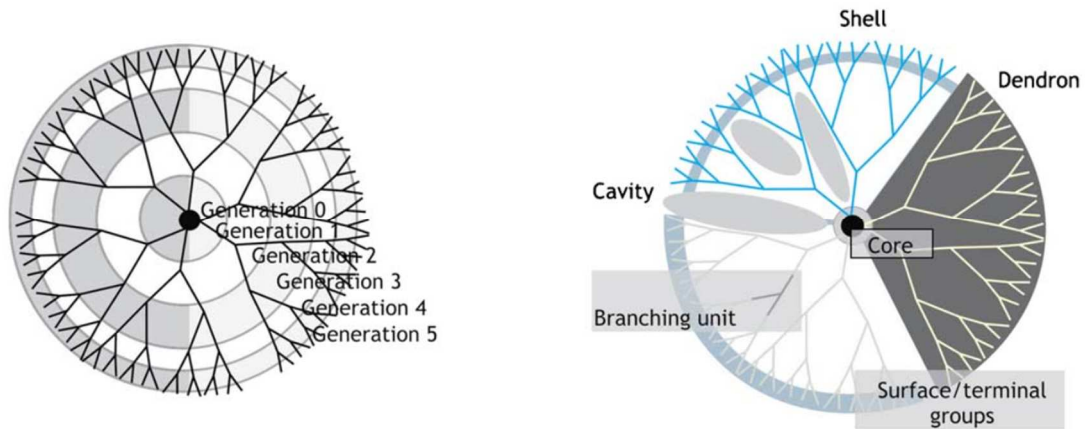


Figure 9 : Représentation schématique de la structure des dendrimères. D'après Dufes et al., 2005.

#### 4.1.4 Les nanoparticules polymériques

Les NPs polymériques sont formulées à partir de polymères biodégradables ou non biodégradables selon la voie d'administration qui sont d'origine naturelle ou synthétique. Ils sont détaillés dans la **Figure 10**.

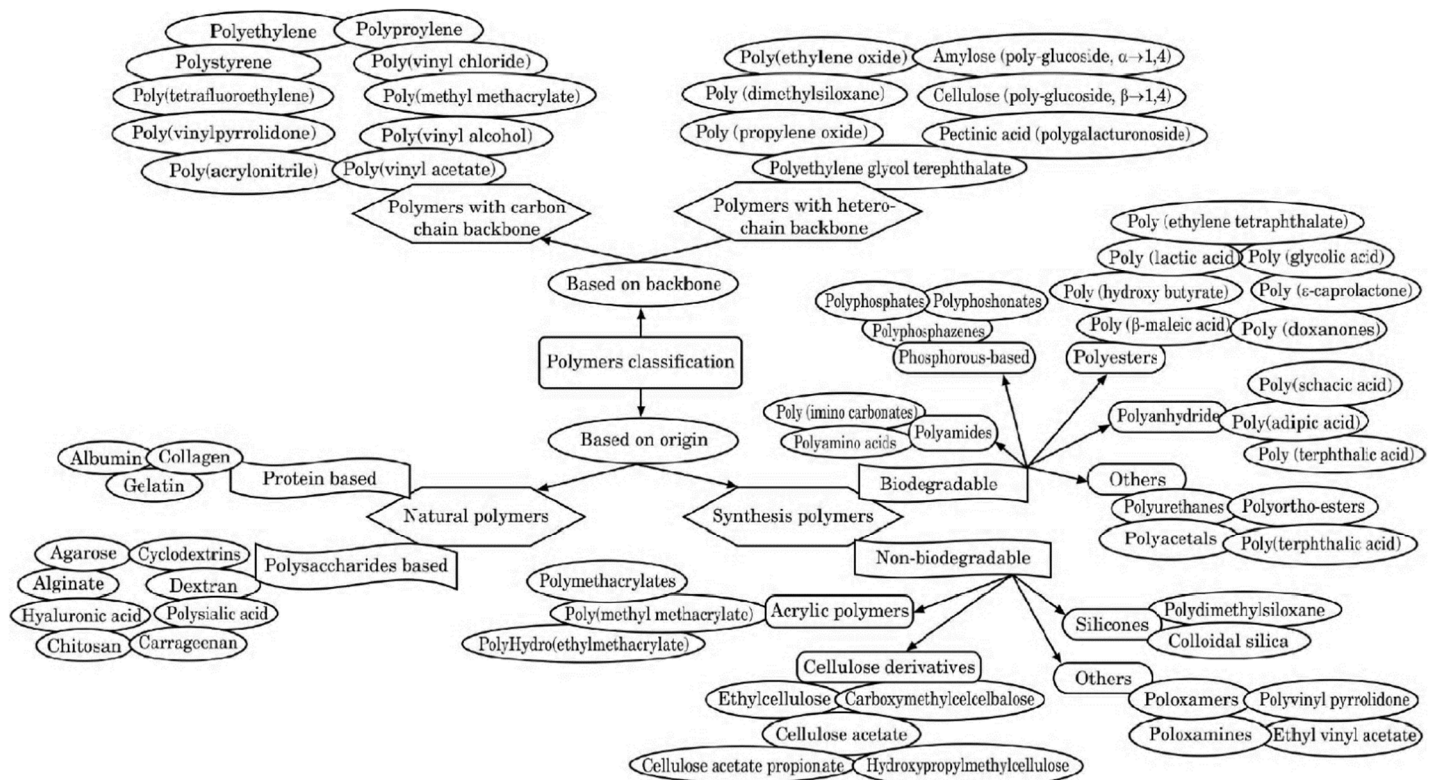


Figure 10 : Polymères utilisés pour la synthèse de NPs. D'après Mishra et al., 2014.

Selon la méthode employée, les NPs pourront présenter deux structures différentes et être considérées comme des nanocapsules ou des nanosphères (**Figure 11**). Les nanocapsules comportent une coque en polymère et un réservoir contenant le composé actif alors que les nanosphères sont formées par une matrice de polymère dans laquelle est dispersée la molécule active (Guterres *et al.*, 2007).

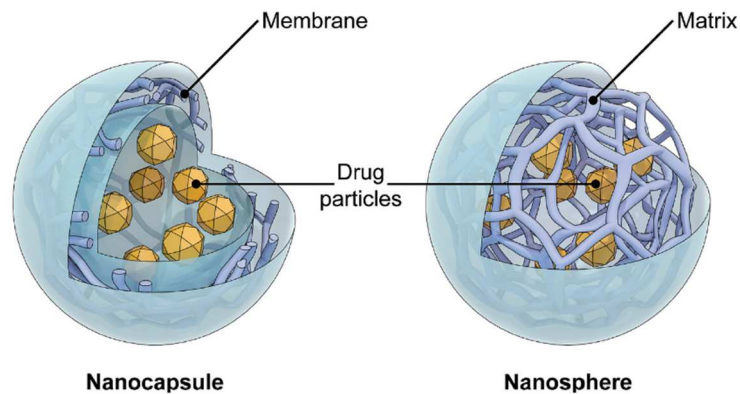


Figure 11 : Représentation schématique de la structure d'une nanocapsule et d'une nanosphère.

D'après Suffredini *et al.*, 2014.

Les méthodes de préparation diffèrent du polymère utilisé (**Tableau 1**) (Kumar *et al.*, 2012 ; Vauthier, 2016 ; Wang *et al.*, 2016). Parmi ces méthodes, on distingue :

- Emulsification/évaporation de solvant : Cette méthode est une méthode de synthèse de NPs permettant principalement l'encapsulation de molécules hydrophobes. Le polymère et la molécule active sont dissous dans un solvant organique volatil non miscible ou faiblement miscible à l'eau. La nanoémulsion est ensuite préparée par dispersion sous haute énergie de cette phase organique dans une solution aqueuse contenant un surfactant tel que le polysorbate 80 ou l'alcool polyvinylique. Après évaporation du solvant organique, les NPs sont récupérées par centrifugation. Les molécules hydrophiles quant à elles peuvent être encapsulées selon une méthode de double émulsion qui est cependant très complexe à réaliser à l'échelle nanométrique.
- Nanoprécipitation : Dans ce cas, la précipitation du polymère sous forme nanoparticulaire est réalisée par l'ajout très rapide d'un non solvant du polymère comme l'eau dans une solution organique contenant le polymère. Les NPs sont alors lavées pour éliminer le solvant puis collectées par centrifugation et lyophilisées.

- Polymérisation en miniémulsion : la phase organique contenant le monomère est ajoutée sous agitation à la phase aqueuse contenant le stabilisant. L'émulsion grossière est ensuite soniquée afin d'obtenir une miniémulsion. La polymérisation est alors initiée au contact d'un amorceur. Une molécule thérapeutique peut éventuellement être ajoutée dans la phase organique. Les NPs de poly (alkyl cyanoacrylate) peuvent être synthétisées par cette technique.
- Salting out ou relargage : Le polymère est dissous dans une solution organique miscible à l'eau. La phase aqueuse contient un surfactif et une solution saturée d'électrolytes comme du chlorure de magnésium ou de l'acétate de magnésium, réduisant considérablement sa miscibilité avec la phase organique. La phase huileuse est alors émulsifiée dans la phase aqueuse. Une grande quantité d'eau est ensuite ajoutée afin de diminuer la concentration en électrolytes et ainsi extraire le solvant organique dans la phase aqueuse, ce qui aboutit à la précipitation du polymère et la formation des NP. Enfin, les électrolytes et tensioactifs sont éliminés par centrifugation ou dialyse.
- Technologie des fluides supercritiques (procédé RESS (*Rapid Expansion of Supercritical Solution*)) : la substance active et le polymère d'intérêt sont solubilisés dans un fluide à l'état supercritique comme le CO<sub>2</sub> qui est ensuite pulvérisé dans une chambre d'expansion. Ainsi, le CO<sub>2</sub> n'étant plus à l'état supercritique mais sous forme gazeuse, son pouvoir solvant est diminué considérablement, conduisant à la précipitation du polymère et de la substance active.

<b><i>Method of preparation</i></b>	<b><i>Polymers</i></b>
Solvent evaporation	Poly (methacrylate), Poly (ε-caprolactone), Polylactic acid, Poly (lactic-co-glycolic acid), Poly (β hydroxy butyrate), Ethyl cellulose
Nanoprecipitation	Polystyrene, Poly (vinyl pyridine), Poly (ε-caprolactone), PLA, PLGA, Poly (methacrylate)
Salting out	Ethyl cellulose, Poly (alkyl methacrylate)
Supercritical fluids technology	PLA, PLGA, Natural polymers, Albumins
Polymerization	Synthetic polymers, Poly (alkyl cyanoacrylate), Poly (alkyl methacrylate)

Tableau 1 : Méthodes de préparation des NPs en fonction du polymère. D'après Mishra et al., 2014.

Le PLGA est un polyester linéaire constitué de monomères d'acide lactique et d'acide glycolique. C'est l'un des copolymères les plus utilisés car il présente de multiples avantages, le premier étant sa biocompatibilité. En effet, les produits de son hydrolyse, l'acide lactique et l'acide glycolique, sont des molécules endogènes parfaitement métabolisables par le cycle de Krebs. Son second intérêt est son caractère biodégradable. Outre le milieu dans lequel il se trouve, sa cinétique de dégradation dépend de sa masse moléculaire et du ratio acide lactique/acide glycolique qui conditionne son taux de cristallinité. Son temps de dégradation en milieu physiologique est compris entre quelques semaines et quelques mois mais il peut être beaucoup plus rapide après internalisation cellulaire du fait de la présence de nombreuses enzymes. Un troisième avantage est la possibilité de le fonctionnaliser afin de faciliter le ciblage et les interactions avec l'environnement biologique. Le PLGA est approuvé par la FDA pour des applications cliniques chez l'Homme. A l'heure actuelle, seules quelques références de médicaments sous forme de microparticules de PLGA sont autorisées par la FDA comme le Lupron Depot<sup>®</sup> ou le Trelstar<sup>®</sup> (Rezvantalab *et al.*, 2018). Plusieurs techniques permettent de produire du PLGA parmi lesquelles il est possible de citer la polycondensation de l'acide lactique et de l'acide glycolique qui est réalisée dans diverses conditions expérimentales mais aussi un procédé plus lent de polymérisation enzymatique nécessitant l'emploi de lipase (Danhier *et al.*, 2012 ; Gentile *et al.*, 2014).

Les NPs de PLGA comme la plupart des autres NPs polymériques en cours de développement sont généralement destinées à des applications biomédicales. Elles sont utilisées comme vecteurs de médicaments, de gènes, d'antigènes (vaccins) mais aussi de molécules permettant l'imagerie et le diagnostic (Banik *et al.*, 2016 ; Da Silva *et al.*, 2019 ; Vasir and Labhasetwar, 2006). Les NPs polymériques ont été extensivement utilisées en chimiothérapie en permettant de mieux cibler les tumeurs solides tout en réduisant les effets secondaires des anticancéreux (toxicité systémique, neurotoxicité et immunodépression). Les NPs peuvent cibler très efficacement de façon passive et/ou active les cellules tumorales grâce à l'effet EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) et/ou l'ajout de ligands spécifiques (Golombek *et al.*, 2018). L'effet EPR est un phénomène passif qui se produit en raison de l'hypervascularisation et le manque de drainage lymphatique au sein des tumeurs et qui conduit à l'accumulation des NPs dans les cellules tumorales plutôt que dans les cellules saines (Greish, 2010).

## 4.2 Les nanoparticules inorganiques

### 4.2.1 Les nanoparticules à base de carbone

Ce type de NPs uniquement formées d'atomes de carbone regroupe les fullerènes, les graphènes et les nanotubes de carbone notamment (**Figure 12**). Les graphènes sont des assemblages d'un nombre indéterminé d'atomes de carbone sur un même plan. Les atomes forment sur ce plan d'un nanomètre d'épaisseur, un réseau hexagonal (Anu Mary Ealia and Saravanakumar, 2017). Les fullerènes quant à eux possèdent un nombre précis d'atomes de carbone. Dans le cas du C<sub>60</sub>, premier fullerène découvert en 1985, 60 atomes de carbone forment une structure sphérique à 32 facettes (Encyclopædia Universalis FULLERENES). Des structures de plus de 1000 atomes de carbone sont désormais réalisables (Dunlap and Zope, 2006). La possibilité de modifier la surface des fullerènes en ouvrant une liaison carbone-carbone afin de permettre la greffe d'un ou plusieurs atomes ou molécules a ouvert la voie à des applications dans le domaine médical (Bosi *et al.*, 2003). Schinazi *et al.* ont montré que des dérivés de fullerènes C<sub>60</sub> possèdent une activité anti-VIH car ils sont capables de se fixer sur le site actif de la protéase du virus (Schinazi *et al.*, 1993).

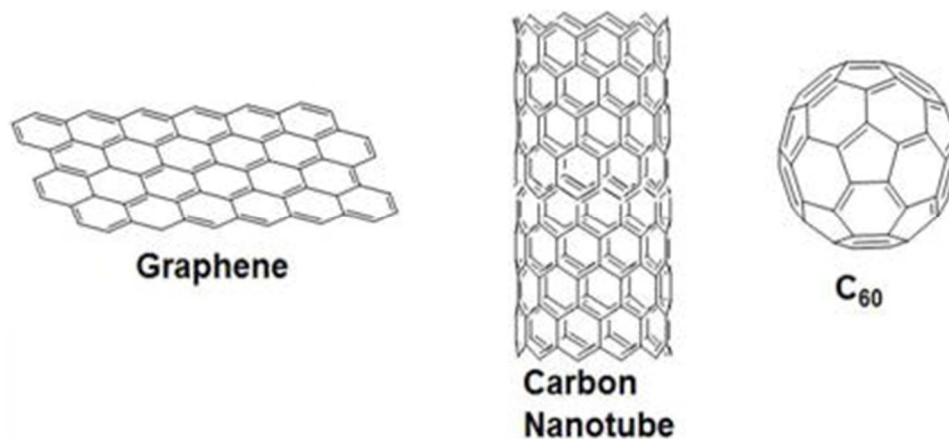


Figure 12 : Représentation schématique des structures des nanomatériaux à base de carbone. D'après Cha *et al.*, 2013.

Les nanotubes de carbone sont des structures cylindriques de 1 à plusieurs dizaines de nanomètres de diamètre et dont la longueur peut varier de quelques dizaines de nanomètres à plusieurs millimètres (Aqel *et al.*, 2012). Les nanotubes de carbone sont classés en nanotubes à paroi unique (SWCNT pour *Single-Walled Carbon Nanotubes*) et en nanotubes à parois multiples (MWCNT pour *Multi-Walled Carbon Nanotubes*). Les nanotubes de carbone

présentent deux inconvénients de taille pour des applications biologiques : une très faible solubilité et une cytotoxicité élevée (Geckeler and Premkumar, 2011 ; Mohanta *et al.*, 2019). De plus, ils ont une très faible biodégradabilité et s'accumulent dans les organes limitant ainsi leur utilisation pour des applications *in vivo*. Ces aspects négatifs peuvent en partie être améliorés en modifiant la chimie de surface des nanotubes. La fixation d'albumine de sérum bovin (BSA) à leur surface augmente leur solubilité et la cytotoxicité est d'autant plus réduite que les nanotubes sont modifiés (Huang *et al.*, 2002). Les nanotubes de carbone comme les fullerènes ont été utilisés avec succès dans les thérapies anticancéreuses (Prylutska *et al.*, 2011 ; Son *et al.*, 2016). Les agents chimiothérapeutiques peuvent être fixés à la surface des structures carbonées ou séquestrés à l'intérieur (Madani *et al.*, 2011). Les cellules cancéreuses peuvent ensuite être ciblées de façon passive (effet EPR) ou par ciblage actif en fixant des ligands ou anticorps spécifiques (Shatrohan Lal, 2014). L'utilisation des nanomatériaux à base de carbone ne se limite pas à des applications biomédicales. Ils sont également intégrés dans certains matériaux composites et batteries (Beigmoradi *et al.*, 2018 ; Fang *et al.*, 2017).

#### 4.2.2 Les quantum dots

Les types QDs sont classés en fonction des éléments à partir desquels ils sont fabriqués. Il existe les semiconducteurs III-V fabriqués à partir des éléments du groupes III et du groupe V de la classification périodique des éléments tels que le gallium, l'indium, le phosphore ou l'arsenic (Micić and Nozik, 2002) ; les semiconducteurs II-VI fabriqués à partir des éléments du groupes II et du groupe VI de la classification périodique comme le sélénure de cadmium (CdSe), le sulfure de cadmium (CdS), le tellure de cadmium (CdTe), le sélénure de zinc (ZnSe), le sulfure de zinc (ZnS) et le tellure de zinc (ZnTe) (Andrews *et al.*, 2011) ; et les QDs de silice (Ma *et al.*, 2014). Les plus fréquents QDs sont formés par un cœur de cadmium sélénure ou cadmium tellure recouvert de sélénure de zinc. Ils sont principalement utilisés en électronique en entrant dans la fabrication de certains écrans d'affichage par exemple mais aussi pour des applications biomédicales (Piccinno *et al.*, 2012). Les QDs possèdent des propriétés optiques particulières et émettent des couleurs vives. Utilisés comme sondes fluorescentes, ils sont de très bons outils d'imagerie pour le diagnostic cancéreux et le marquage cellulaire par exemple (Park *et al.*, 2017 ; Zhao and Zeng, 2015). Des études *in vitro* et *in vivo* ont cependant démontré la toxicité des QDs limitant leur utilisation *in vivo*.

#### 4.2.3 Les nanoparticules métalliques et d'oxydes métalliques

Les NPs métalliques les plus communes sont synthétisées à partir d'une dizaine de métaux : l'aluminium (Al), le cobalt (Co), l'or (Au), l'argent (Ag), le zinc (Zn), le cadmium

(Cd), le fer (Fe), le cuivre (Cu), le titane (Ti) et le plomb (Pb). Les oxydes de certains de ces métaux sont également très utilisés comme l'oxyde de fer ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), le ZnO, le  $\text{TiO}_2$  ou l'oxyde d'aluminium ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). Celles qui dérivent des métaux sont préparées selon des méthodes chimiques, photochimiques ou biologiques (Kumar K *et al.*, 2018). Leur noyau métallique leur confère des propriétés magnétiques et optiques uniques telles que la résonance plasmonique de surface. Ce phénomène d'interaction entre lumière et matière correspond à la formation d'un champ électrique au niveau particulaire en raison de la conduction d'électrons induite par la lumière (Garcia, 2011 ; Kumar K *et al.*, 2018). Ces NPs constituent un outil majeur dans le diagnostic et le traitement des cancers. En effet, un certain nombre de formulations pour injections intraveineuses ou administrations orales sont approuvées par la FDA dans le cadre d'une utilisation comme agent de contraste en imagerie par résonance magnétique (Busquets *et al.*, 2015 ; Z. Li *et al.*, 2015). Le ferumoxsil (GastroMARK<sup>®</sup>) est une suspension aqueuse de NPs de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  de 300 nm recouvertes de siloxane. Elles sont utilisées pour l'observation des organes et des tissus adjacents aux régions supérieures du tractus gastro-intestinal (Leung, 2004 ; Wu and Huang, 2017). L'hyperthermie magnétique et la thérapie photothermique sont des thérapies émergentes pour le traitement du cancer. Bien que leurs mécanismes d'action aient des bases physiques distinctes, les deux approches impliquent la génération de chaleur médiée par des NPs (Espinosa *et al.*, 2018). Les NPs d'or et les SPION (*superparamagnetic iron oxide nanoparticles*) sont les plus utilisées pour ce type de thérapie (Cardinal *et al.*, 2008 ; Chatterjee *et al.*, 2011 ; Vines *et al.*, 2019). Les NPs métalliques constituent également de très bons vecteurs pour les molécules chimiothérapeutiques. Des copolymères ont été développés afin d'immobiliser la doxorubicine sur des NPs superparamagnétiques (Chen *et al.*, 2014). Il a en outre été démontré dans un modèle de cancer colorectal que les NPs chargées de doxorubicine pénètrent plus efficacement la tumeur et induisent une réponse cellulaire aussi efficace que la doxorubicine seule (Augustin *et al.*, 2016).

Les NPs métalliques trouvent bien d'autres applications que dans le domaine médical (**Tableau 2**). Très récemment l'utilisation du  $\text{TiO}_2$  sous forme nanoparticulaire a très largement été médiatisée. Il est notamment employé comme pigment blanc dans de nombreux produits cosmétiques, produits industriels tels que la peinture ou comme agent opacifiant dans des produits agroalimentaires. Le ZnO est également majoritairement utilisé dans les cosmétiques et les produits de peinture. Les NPs d'argent quant à elles entrent très massivement dans la composition des agents antimicrobiens.

<i>Nanomaterial</i>	<i>Product group</i>	<i>% of total use</i>
<i>TiO<sub>2</sub></i>	Cosmetics (incl. sunscreens)	70–80
	Coatings & cleaning agents	<20
	Plastics	<20
	Paints	10–30
	Cement	1
	Others	<10
<i>ZnO</i>	Cosmetics (incl. sunscreens)	70
	Paints	30
<i>CeO<sub>x</sub></i>	Chemical mechanical planarization	45–80
	Fuel catalyst	1–50
	UV-coatings, paints	5–10
<i>Nanotubes de carbone</i>	Composites & polymer additives	20
	Materials	80
	Composites	50
	Batteries	50
<i>Fullerènes</i>	R&D	80
	<i>Argent</i>	
<i>Argent</i>	Paints, coatings & cleaning agents	10–30
	Textiles	30–50
	Consumer electronics & conductivity	10–20
	Cosmetics	20
	Medtech	20
	Antimicrobial coatings	80–100
	<i>QDs</i>	
<i>QDs</i>	Light conversion for LED/OLED	90
	Lab use for imaging	10

Tableau 2 : Utilisation des principales NPs inorganiques. D'après Piccinno et al., 2012.

#### 4.2.4 Les nanoparticules de silice

La silice ou dioxyde de silicium présente une structure tridimensionnelle faite de tétraèdres SiO<sub>4</sub>. Un atome d'oxygène les lie entre eux à chaque sommet. Chaque atome d'oxygène étant commun à deux tétraèdres, il en résulte la formule SiO<sub>2</sub>. Huit formes de cristaux de silice sont aujourd'hui connues, le quartz étant de très loin l'espèce la plus abondante (Encyclopædia Universalis SILICE). Les NPs de silice peuvent être synthétisées selon trois techniques différentes. La première est qualifiée de microémulsion inverse. Les tensioactifs dissous dans les solvants forment des micelles inverses. Les queues hydrophobes sont en effet au contact du solvant alors que les têtes polaires hydrophiles sont au cœur de la micelle. L'un des principaux inconvénients de cette technique est l'élimination des agents de surface (Finnie et al., 2007). La seconde technique utilisée pour produire des NPs de silice est la décomposition à très haute température de précurseurs organométalliques tels que le tétrachlorure de silicium. Cette méthode ne permet pas de contrôler précisément les propriétés physiques des NPs produites. Enfin, le procédé « sol-gel » est la méthode la plus utilisée et la plus étudiée. Elle consiste à réaliser l'hydrolyse et la condensation de tetraethylorthosilicate (TEOS) ou de sels



de silicate en milieu acide. Des gels de silice dont les propriétés dépendent des conditions réactionnelles se forment alors (Rahman and Padavettan, 2012). Le procédé Stöber du nom de son inventeur est un exemple de la méthode « sol-gel ». Elle permet contrairement aux systèmes en catalyse acide de produire des NPs de silice monodispersées. Cette réaction repose sur l'hydrolyse du TEOS dans l'alcool en présence d'ammoniaque (Stöber *et al.*, 1968). Le SiO<sub>2</sub> qui se présente sous forme d'une poudre blanche est utilisé dans l'industrie dans une très grande diversité d'applications. La silice est couramment employée comme additif alimentaire sous la dénomination E551 dans l'industrie agroalimentaire. Etant un excellent agent dessiccant, les propriétés hygroscopiques de la silice en font également un excellent agent antiagglomérant et antimottant dans de nombreuses denrées en poudre telles que le sel, la farine, le cacao mais aussi dans un certain nombre de produits déshydratés comme les soupes en poudre ou les cafés instantanés (Dekkers *et al.*, 2011 ; EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS) *et al.*, 2018 ; Peters *et al.*, 2012 ; Qiu *et al.*, 2017). Également utilisé comme modificateur de viscosité dans les sauces ou agent de clarification dans la bière, son utilisation ne se limite pourtant pas à l'agroalimentaire. En effet, il est employé comme agent texturant dans un certain nombre de produits cosmétiques (maquillage et soins de la peau) et d'hygiène (serviettes hygiéniques et couches pour bébé) (ANSES, 2019). Enfin, la silice entre dans la composition des peintures, des encres et de matériaux élastomères ou résines pour ses propriétés épaississantes notamment.

Quelle que soit la nature des NPs, leur emploi croissant, en particulier dans les produits de consommation courante, nécessite un approfondissement des connaissances quant à leur toxicité potentielle.

## II. VOIES D'EXPOSITION

Les effets des NPs sur le corps humain sont étroitement liés à la voie de pénétration dans l'organisme et à la forme particulière à laquelle celui-ci est exposé. Les NPs peuvent en effet pénétrer dans l'organisme par ingestion, inhalation, pénétration transdermique ou injection intravasculaire et ensuite être distribuées à tous les organes (**Figure 13**).

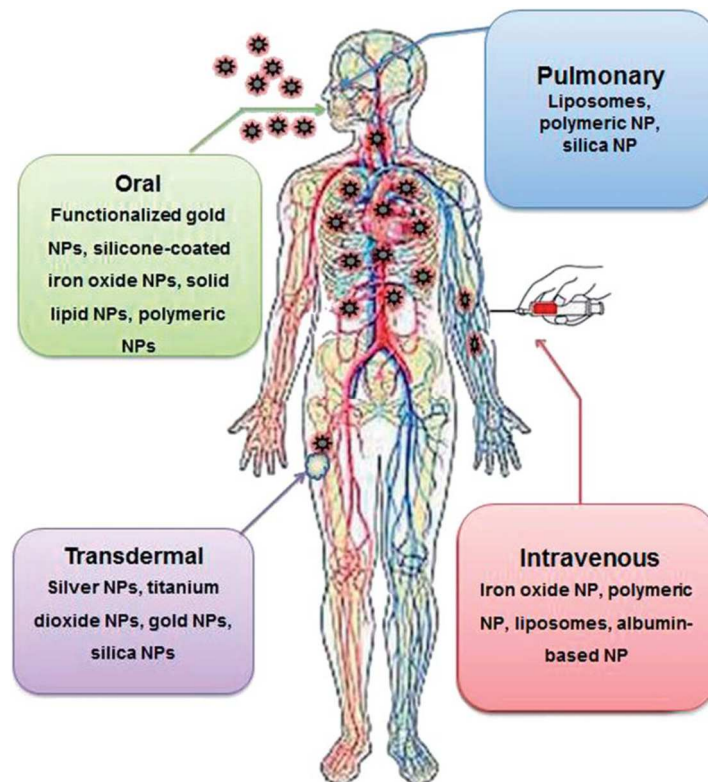


Figure 13 : Principales voies d'exposition de l'organisme aux NPs. D'après Kumar et al., 2013.

### 1. Voie pulmonaire

L'une des voies d'exposition prépondérante est la voie respiratoire. Les particules présentes dans l'air sont susceptibles d'atteindre les voies respiratoires supérieures (nez, bouche, pharynx et larynx) mais aussi inférieures (trachée, bronches, bronchioles et alvéoles pulmonaires) (Buckley *et al.*, 2016). Les particules se déposent dans ces différentes voies selon leur diamètre mais également leur densité (**Figure 14**). Du fait de leur taille nanométrique, les NPs peuvent atteindre les bronchioles et les alvéoles. Après avoir atteint le tissu pulmonaire, le

passage de NPs dans la circulation sanguine et leur distribution dans d'autres organes a été clairement démontré. Berry *et al.* a décrit la translocation à travers l'épithélium alvéolaire de NPs d'or de 30 nm dans le sang après instillation chez le rat (Berry *et al.*, 1977). Les NPs peuvent même atteindre le système olfactif. Il a en effet été montré que des NPs métalliques peuvent atteindre le système nerveux central par translocation le long des axones et des dendrites des neurones (Oberdörster *et al.*, 2005). Plus récemment, il a été montré que les NPs de TiO<sub>2</sub> peuvent également se retrouver dans l'interstitium pulmonaire, engendrer un stress oxydant et une réponse inflammatoire et passer dans la circulation sanguine ou lymphatique (Shi *et al.*, 2013).

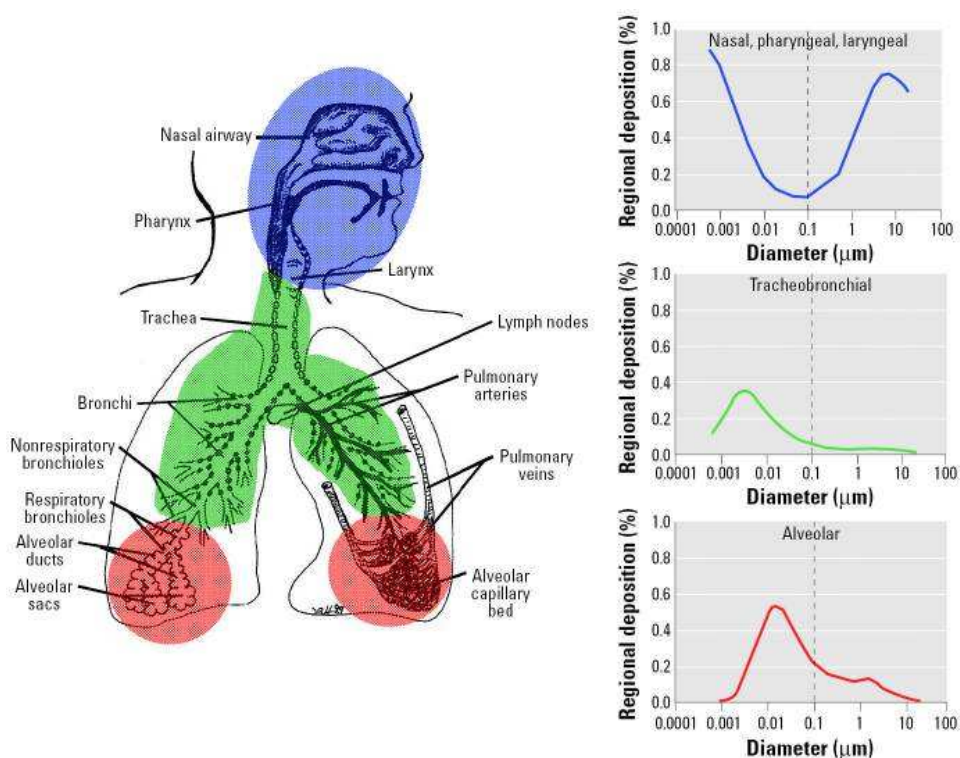


Figure 14 : Dépôt des NPs dans les voies respiratoires en fonction de leur taille. D'après Oberdörster *et al.*, 2005.

## 2. Voie cutanée

L'exposition par voie cutanée concerne principalement les articles manufacturés tels que les cosmétiques, les produits biomédicaux mais aussi les textiles ou les articles de sport (Tableau 3).

Nanomaterials	Properties	Examples of consumer applications with potential dermal exposure
<b>Carbon nanofibres, nanotubes, fullerenes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Increased tensile strength</li> <li>• High chemical resistance</li> <li>• Anti-oxidant</li> <li>• Delivery system</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sporting goods</li> <li>• Textiles</li> <li>• Cosmetics</li> <li>• Therapeutics</li> <li>• Diagnostics</li> </ul>
<b>Carbon black nanoparticles</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Improved abrasion resistance and roughness and high chemical resistance</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sporting goods,</li> <li>• Composites,</li> <li>• Textiles</li> <li>• Cosmetics</li> <li>• Pigment</li> </ul>
<b>Clay nanoparticles</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Electrical, heat and chemical resistance</li> <li>• Block UV light</li> <li>• Flame retardant</li> <li>• Anticorrosive</li> <li>• Adsorbing properties</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Composites</li> <li>• Sunscreens</li> <li>• Textiles</li> </ul>
<b>Metal nanoparticles (Ag, Au, Cu)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antimicrobial</li> <li>• Anti-odour</li> <li>• Self-sterilisation</li> <li>• Others</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Textiles,</li> <li>• Surface coating (handles, pan surfaces etc.),</li> <li>• Burn dressing</li> <li>• Cosmetics</li> <li>• Dietary supplement</li> <li>• Therapeutics</li> </ul>
<b>Metal oxide nanoparticles (TiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ZnO, MgO, CeO<sub>2</sub>)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• UV absorption</li> <li>• Photo-catalytic ability</li> <li>• Photo-oxidising activity against chemicals and biological species</li> <li>• Antimicrobial/self-sterilization</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sunscreen</li> <li>• Cosmetics</li> <li>• Textiles,</li> <li>• Self-cleaning coating (paints etc.)</li> <li>• Cleaning products</li> <li>• Sporting goods</li> <li>• Motor oil</li> <li>• Diesel catalyst</li> </ul>

Tableau 3 : Nanomatériaux présents dans des produits de consommation pouvant conduire à une exposition cutanée. D'après Poland *et al.*, 2013.

La peau humaine a une surface d'environ 2 m<sup>2</sup> et par conséquent, elle représente une zone très large d'exposition et de contact avec différents matériaux, particules et molécules (Tobin, 2006). Trois couches distinctes constituent la peau. Il s'agit de l'épiderme qui est la couche la plus externe, le derme et l'hypoderme, la couche la plus profonde. L'épiderme est un épithélium pluristratifié complexe. Il est lui-même formé d'une couche cornée, d'une couche granuleuse, d'une couche épineuse et d'une couche basale. En raison notamment de sa structure et de son hydrophobicité, l'épiderme assure la fonction de protection de l'organisme contre les xénobiotiques (Poland *et al.*, 2013). Cependant, cette barrière n'est pas totalement infranchissable pour les NPs. En effet, ces dernières pourraient franchir la barrière par la voie paracellulaire en traversant la couche cornée et passer par la matrice lipidique entre les kératinocytes, emprunter la voie transcellulaire, passer le long des follicules pileux ou par leurs glandes annexes (**Figure 15**) (Valenzuela and Simon, 2012). Un certain nombre d'études atteste de la voie cutanée comme voie d'exposition et de passage pour de très nombreux types de NPs.

Vogt *et al.* a montré une pénétration significative de NPs fluorescentes dans l'épithélium folliculaire humain (Vogt *et al.*, 2006). Cette pénétration a été également décrite pour des NPs de polystyrène (Alvarez-Román *et al.*, 2004). Par ailleurs, des études *in vitro* ont permis de montrer l'internalisation de QDs et de nanotubes de carbone dans des kératinocytes (Ryman-Rasmussen *et al.*, 2007 ; Yah *et al.*, 2012).

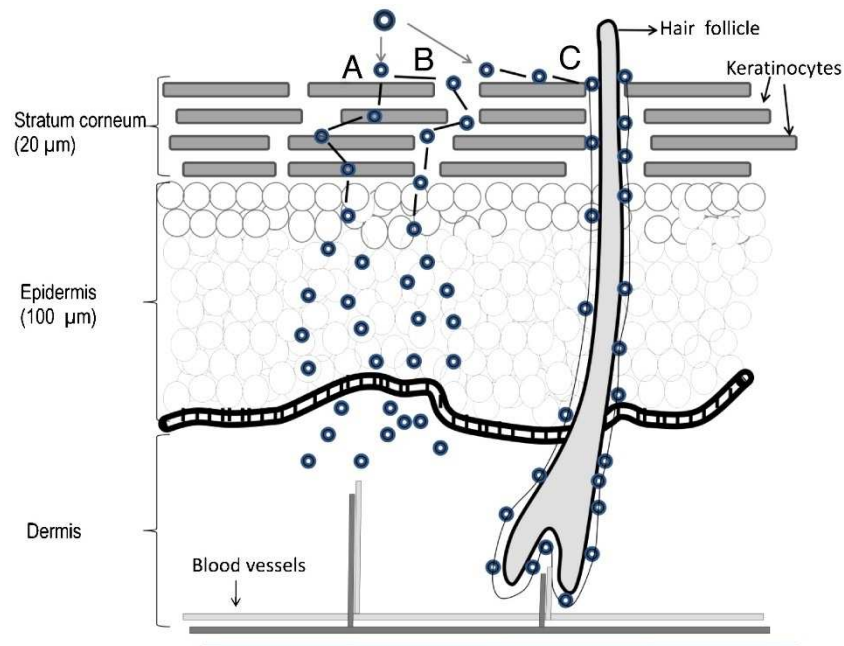


Figure 15 : Voies de passage (A : voie transcellulaire ; B : voie paracellulaire ; C : passage par les follicules pileux) des NPs à travers la peau. D'après Valenzuela and Simon, 2012.

Dans la plupart des études publiées la pénétration et de la distribution des NPs est limitée au stratum corneum et aux zones proches des follicules pileux. Cependant, certaines études suggèrent une pénétration plus profonde des NPs jusqu'au derme. Ceci a par exemple été décrit par Larese Filon *et al.* pour des NPs d'or (Filon *et al.*, 2011). Ces données soulèvent donc la question d'une éventuelle distribution systémique et un impact potentiellement plus significatif sur la santé.

### 3. Voie gastro-intestinale

Le tractus gastro-intestinal constitue une autre voie d'exposition pour de nombreuses NPs, soit directement par ingestion d'aliments, de médicaments ou d'eau en contenant ou par l'ingestion secondaire de particules inhalées et éliminées par le système muco-ciliaire. Certains des produits de consommation contiennent des quantités non-négligeables de NPs. Aux États-Unis, l'apport alimentaire en TiO<sub>2</sub> est estimé entre 1 et 2 mg/kg de poids corporel et par

jour pour les enfants et entre 0,2 et 0,7 mg/kg/jour pour les adultes. Des expositions similaires ont été rapportées dans les populations britannique et allemande (Bachler *et al.*, 2015 ; Weir *et al.*, 2012). Selon l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA), l'exposition journalière au SiO<sub>2</sub> serait de 20 à 50 mg par jour chez une personne de 60 kg soit environ 1 mg/kg/jour (Becker *et al.*, 2004). Ces données révèlent que nous sommes quotidiennement exposés par la voie orale à des quantités plus ou moins importantes de NPs. Plusieurs études *in vitro* rapportent que diverses NPs incluant celles de TiO<sub>2</sub>, de SiO<sub>2</sub>, de dioxyde de cérium (CeO<sub>2</sub>), d'argent et de PLGA peuvent franchir la barrière intestinale (A. Nkabinde *et al.*, 2012 ; Bouwmeester *et al.*, 2018 ; Gaiser *et al.*, 2009). De plus, un certain nombre d'études similaires menées chez l'animal ont aussi confirmé que certaines NPs en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques pouvaient franchir la barrière intestinale et être détectées dans le sang et dans différents organes (Jani *et al.*, 1990 ; Martirosyan *et al.*, 2012 ; Schleh *et al.*, 2012).

Les NPs peuvent franchir la barrière intestinale par la voie paracellulaire ou transcellulaire (**Figure 16**) (Higashisaka *et al.*, 2015). L'espace paracellulaire ne représente cependant que 0.1% de la surface de la barrière intestinale et la taille limite de passage semble comprise entre 0,6 et 5 nm (Patel *et al.*, 2014 ; Ruenraroengsak *et al.*, 2010). En revanche, certaines NPs comme celles de chitosan sont connues pour moduler l'espace paracellulaire en altérant les jonctions épithéliales serrées favorisant ainsi le transport paracellulaire (Amidi *et al.*, 2010 ; Villasaliu *et al.*, 2010). Le second type de passage pour les NPs consiste en la voie transcellulaire. Les entérocytes peuvent en effet prendre en charge les NPs par endocytose au niveau de leur membrane apicale puis les délivrer au niveau basolatéral (Patel *et al.*, 2014). Le rôle des cellules M dans la voie transcellulaire est également avéré (Jani *et al.*, 1989 ; Jepson *et al.*, 1993). Les plaques de Peyer où se localisent les cellules M sont d'ailleurs considérées comme des sites majeurs d'absorption de NPs (Shakweh *et al.*, 2004). Les propriétés physico-chimiques des NPs jouent à nouveau un rôle prépondérant dans les mécanismes de transport et leur efficacité.

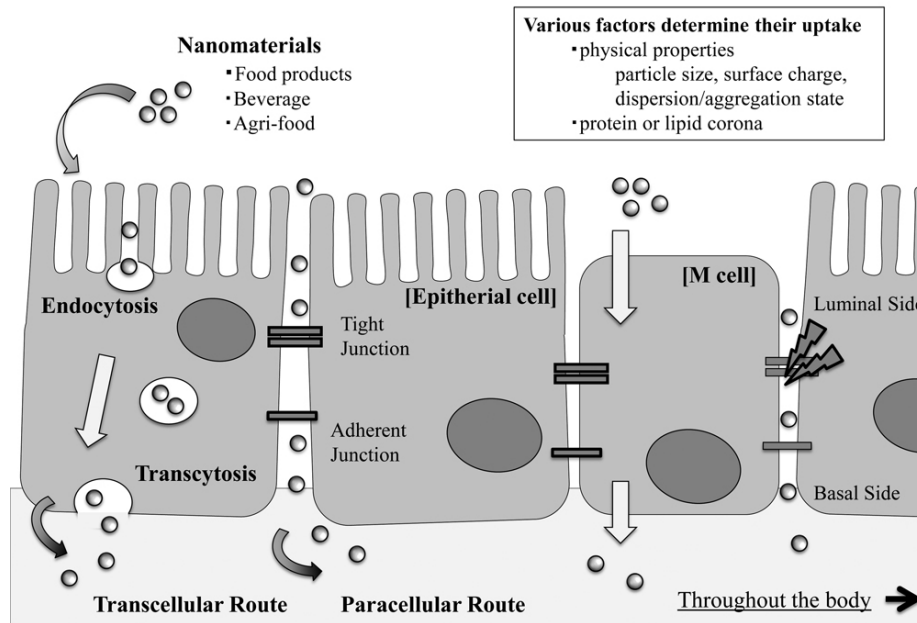


Figure 16 : Voies d'absorption des NPs à travers la barrière intestinale. D'après Higashisaka *et al.*, 2015.

#### 4. Voie parentérale

L'administration parentérale des NPs se fait principalement par les voies intraveineuse (dans la lumière de la veine), sous-cutanée (tissu sous-cutané) et intramusculaire (dans les muscles deltoïde et triceps). Contrairement à toutes les autres voies d'exposition, la voie parentérale est la seule où l'exposition à des NPs est volontaire. Elle est d'ailleurs quasi-exclusivement utilisée pour l'administration de NPs à usage biomédicale. Cette voie permet notamment une distribution et une action systémique des NPs. Bednarski *et al.* ont étudié l'influence de la voie d'administration sur la biodistribution de NPs d'or chez le rat. Leurs données ont montré que 60% de la dose initiale est détectée dans le foie, les poumons, la rate, le cœur, les reins et le cerveau après injection intraveineuse. En revanche, après administration orale de la même dose de NPs d'or, des quantités 50 fois plus faibles ont été observées dans les organes (environ 1,4% de la dose initiale). Les NPs d'or sont en fait largement excrétées (environ 56%) dans les fèces après administration orale du fait de leur difficulté à franchir l'épithélium intestinal alors qu'après injection intraveineuse seul 1 à 2% environ de la dose initiale est éliminée dans l'urine et les fèces (Bednarski *et al.*, 2015). Une étude similaire menée sur des NPs de TiO<sub>2</sub> a abouti à des conclusions similaires (Geraets *et al.*, 2014). Des données indiquent également que la toxicité de NPs d'or dépend non seulement des propriétés des NPs mais aussi de la voie d'administration. Zhang *et al.* ont en effet démontré une incidence plus élevée d'effets indésirables dans le cas d'une injection intrapéritonéale qu'intraveineuse (Zhang,



2010). Ces résultats peuvent avoir des implications pour le développement d'applications cliniques de telles particules.

L'injection de nanoparticules directement dans la circulation systémique contourne le problème des barrières cutanée, intestinale et pulmonaire. Ce type d'administration permet également d'atteindre efficacement certains types de tumeurs (Krishnan *et al.*, 2013 ; Mudshinge *et al.*, 2011). Le phénomène d'opsonisation pose cependant un problème majeur pour les NPs injectées par voie parentérale. En effet, les NPs interagissent fortement avec les protéines du complément, avec l'albumine et toutes les opsonines qui s'adsorbent à leur surface. Ce processus de l'immunité innée rend les NPs visibles par le système réticuloendothélial qui peut ainsi les prendre en charge et les éliminer (Bose *et al.*, 2014). L'ajout du polyéthylène glycol (PEG) à la surface des NPs permet de limiter l'adsorption des protéines plasmatiques empêchant ainsi de réduire leur reconnaissance par les monocytes et les macrophages et augmentant d'autant le temps de résidence dans le compartiment sanguin (**Figure 17**). Ces NPs sont ainsi parfois qualifiées de NPs furtives. Tan *et al.* ont montré que des NPs de latex de 75 nm recouvertes de PEG avaient un temps de résidence de 13h contre seulement 20 minutes pour celles sans PEG (Tan *et al.*, 1993). La FDA a d'ailleurs autorisé l'utilisation d'un certain nombre de NPs comportant du PEG à visée thérapeutique ou pour de l'imagerie (Bobo *et al.*, 2016). L'ajout de PEG permet également de prévenir l'excrétion rénale des plus petites NPs (Jokerst *et al.*, 2011).

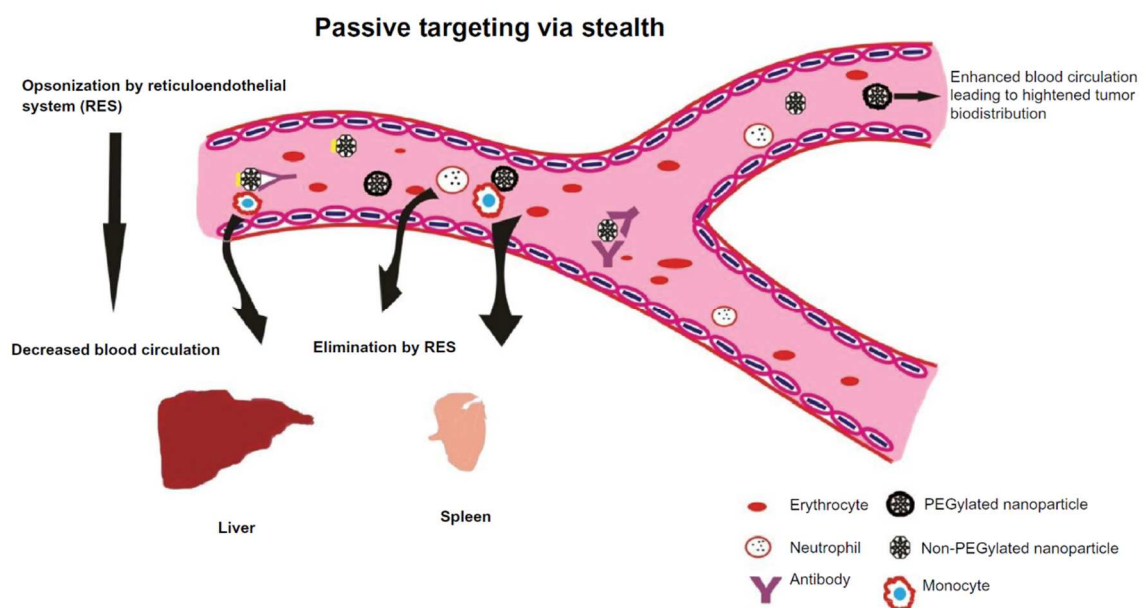


Figure 17 : Ciblage passif avec des NPs PEGylées et non PEGylées. D'après Venkatraman *et al.*, 2012.



## 5. Voie oculaire

Bien qu'étant extrêmement moins prépondérante, la voie oculaire peut également constituer une voie d'exposition aux NPs. Cette voie concerne les particules fines dans l'air mais aussi les NPs à visée thérapeutique. Celles-ci peuvent être administrées par injection périoculaire, intravitréenne ou par absorption au niveau de la cornée (**Figure 18**).

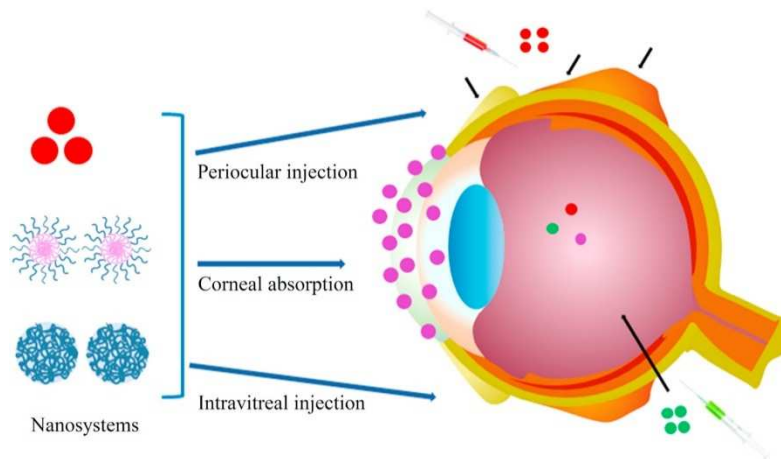


Figure 18 : Voies d'exposition de l'œil aux nanosystèmes. D'après Weng *et al.*, 2017.

## 6. Mécanismes d'entrée dans la cellule

Une NP va interagir avec la membrane plasmique puis entrer dans la cellule par un processus appelé « endocytose ». Dans certains cas, les NPs sont internalisées dans des endosomes précoces initialement formés par une invagination de la membranaire plasmique. Ces endosomes précoces peuvent subir un processus de maturation et devenir des endosomes tardifs. L'endosome peut ensuite fusionner avec d'autres vésicules endosomales et finalement avec le lysosome pour former des endolysosomes. Les enzymes lytiques contenues dans le lysosome conduisent à la dégradation des endosomes tardifs. Dans d'autres cas, les NPs peuvent s'échapper de la voie lysosomale et interagir plutôt avec les organites vésiculaires comme le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi (Beddoes *et al.*, 2015 ; Mao *et al.*, 2013 ; Sahay *et al.*, 2010).

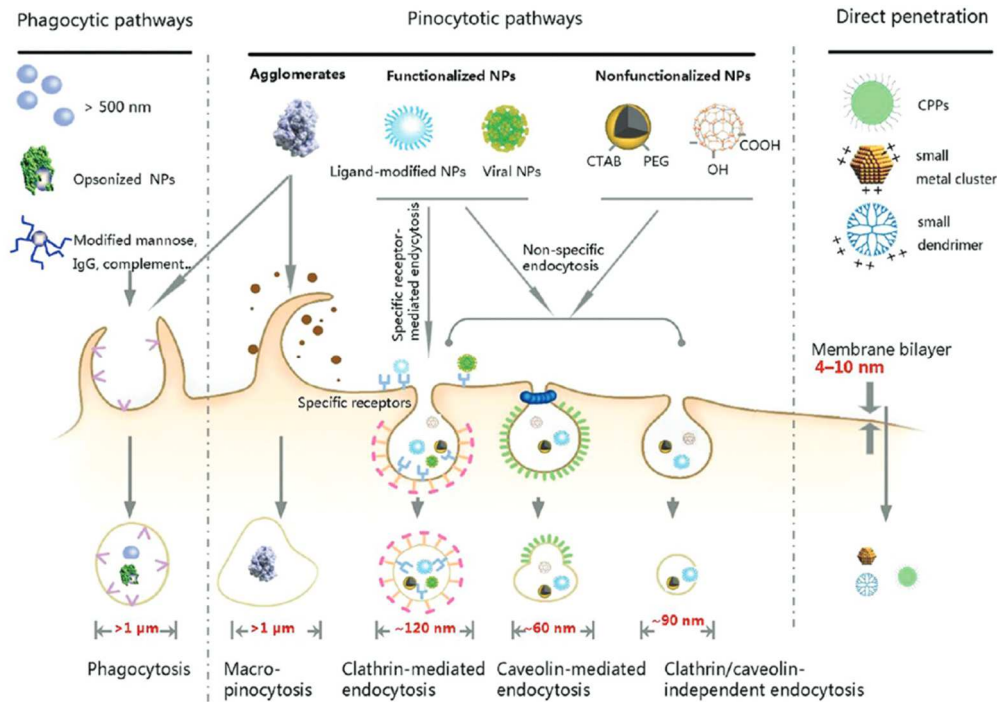


Figure 19 : Voies d'endocytose des NPs. D'après Mao et al., 2013.

Le terme endocytose regroupe en réalité deux grandes familles de mécanismes d'internalisation cellulaire : la phagocytose et la pinocytose (**Figure 19**). La phagocytose est caractéristique des macrophages, neutrophiles, monocytes et cellules dendritiques. Ce sont les particules de plus grandes tailles (supérieures à 500 nm) qui empruntent cette voie.

La pinocytose quant à elle, prend en charge les NPs de plus petite taille (inférieures à 200 nm). Plus précisément, 4 mécanismes de pinocytose sont décrits :

- L'endocytose clathrine-dépendante est la voie privilégiée des NPs de PEG-acide polylactique (PLA), de PLGA, de SiO<sub>2</sub> ou encore de chitosan (Ma and Lim, 2003 ; Nan et al., 2008 ; Sahay et al., 2010 ; Sahin et al., 2017).
- L'endocytose médiée par la cavéoline prend notamment en charge les micelles polymériques, les liposomes PEGylés, les SPION, les QDs et les NPs d'or (Kumawat et al., 2017 ; Lu et al., 2007 ; Ng et al., 2015 ; Sahay et al., 2010).
- La macropinocytose est une voie utilisée par la plupart des cellules excepté les macrophages et les cellules endothéliales au niveau cérébral. Elle permet l'internalisation des NPs larges ou des agglomérats dans les cellules dépourvues de phagocytose (Sahay et al., 2010).

- L'endocytose clathrine et cavéoline indépendante est une voie des NPs polymériques modifiées avec du folate mais aussi des NPs de PLGA (Palocci *et al.*, 2017 ; Sahay *et al.*, 2010).

Les voies d'internalisation ne sont pas spécifiques d'un type donné de NPs. Elles peuvent en effet emprunter plusieurs voies d'internalisation (Sahin *et al.*, 2017). Les propriétés physico-chimiques des NPs notamment leur taille et leur charge de surface sont les facteurs les plus déterminants de la cinétique et du mécanisme d'endocytose.

## 7. Elimination

Les voies d'élimination des NPs sont fonction de leur taille (**Figure 20**). Les NPs dont le diamètre est inférieur à 5/6 nm environ sont principalement éliminées par voie rénale (Longmire *et al.*, 2008). La filtration glomérulaire, la sécrétion tubulaire et la réabsorption tubulaire sont les trois grandes étapes au cours desquelles se forme l'urine définitive (Bose *et al.*, 2014). La filtration des NPs à travers la paroi du capillaire glomérulaire dépend fortement de la taille des NPs. Celles dont la taille est inférieure à 6 nm sont généralement filtrées contrairement à celles de plus de 8 nm de diamètre. La filtration des NPs dont la taille est comprise entre 6 et 8 nm dépend à la fois de la taille et de la charge de la particule (Longmire *et al.*, 2008). Le seuil de taille de filtration est fixé par les pores des podocytes, soit environ 5 à 6 nm (Bose *et al.*, 2014).

Les NPs de taille supérieure sont éliminées par la voie hépatobiliaire et le système des phagocytes mononucléés (**Figure 21**). Les hépatocytes et le système réticulo-endothélial du foie sont impliqués dans cette voie. Lorsque les NPs arrivent au niveau du sinusoiide, elles peuvent être phagocytées et dégradées par les enzymes lytiques des cellules de Kupffer (Bose *et al.*, 2014 ; Petros and DeSimone, 2010). Les NPs ne pouvant être dégradées par les macrophages vont alors s'accumuler. La taille des fenestrations au niveau des cellules sinusoidales étant d'environ 150 à 200 nm, des NPs peuvent également s'infiltrer dans l'espace de Disse et être endocytées par les hépatocytes. Ces NPs sont alors dégradées avant excrétion par le système biliaire. Les NPs non dégradées peuvent également rejoindre le canalicule biliaire par transcytose à travers les hépatocytes. Elles sont alors finalement éliminées par la bile puis les fèces (Zhang *et al.*, 2016).

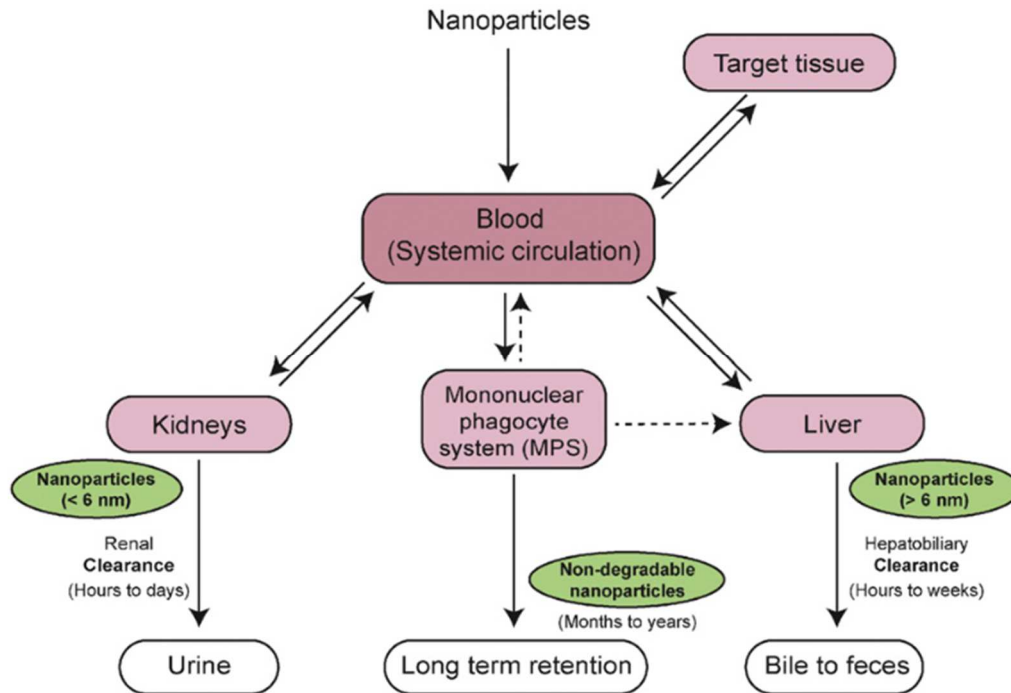


Figure 20 : Voies de clairance des NPs. D'après Zhang et al., 2016.

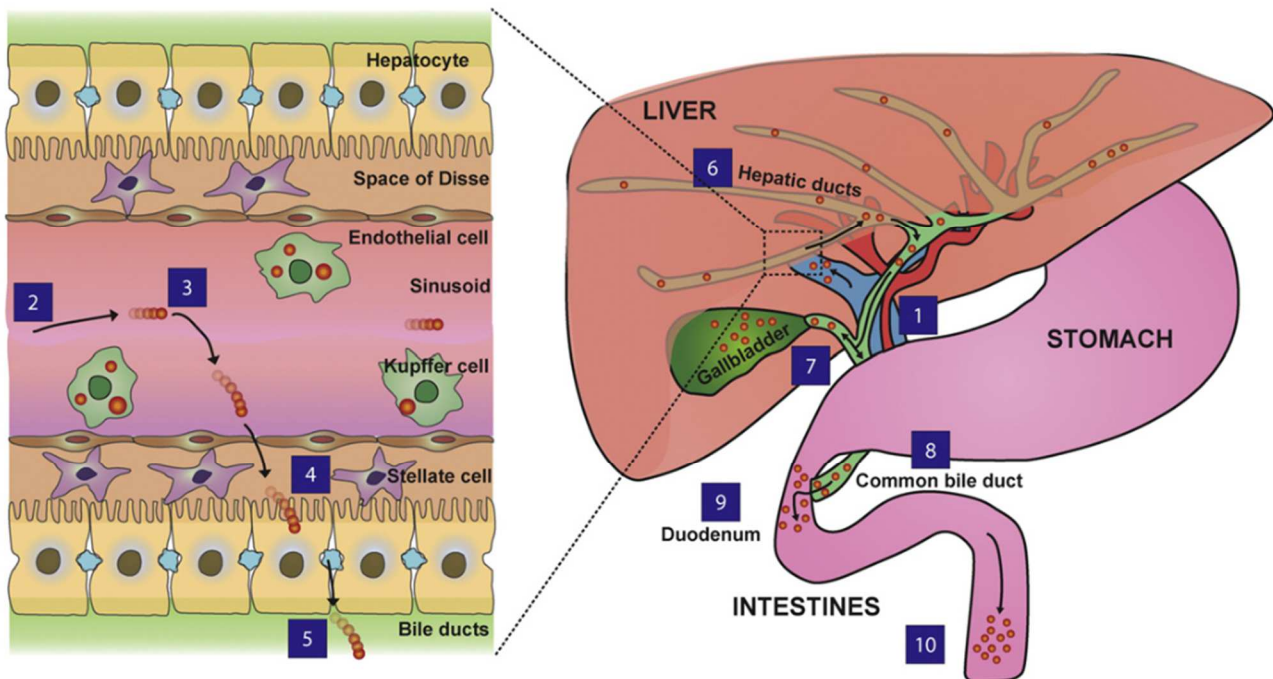


Figure 21 : Elimination des NPs au niveau hépatique. (1) Entrée des NPs dans le foie, (2) Arrivée des NPs dans le sinusoiède hépatique ; (3) Phagocytose des NPs par les cellules de Kupffer ; (4) Passage des NPs dans l'espace de Disse (selon leur taille) ; (6, 7, 8) Excrétion des NPs dans la bile ; (9, 10) Elimination des NPs dans les fèces. D'après Zhang et al., 2016.

Les poumons peuvent également constituer un organe d'excrétion. Les capacités de phagocytose des macrophages alvéolaires et les transporteurs mucociliaires sont les principaux modes d'excrétion par les poumons (He *et al.*, 2010). Cette clairance médiée par les macrophages est sélective en fonction de la taille, de la géométrie et des propriétés de la surface (Bose *et al.*, 2014).

En plus de leur excrétion dans les selles et l'urine, les NPs pourraient également être excrétées dans le lait maternel ou la sueur (Li *et al.*, 2010).

Enfin, lorsque les NPs sont séquestrées, elles peuvent s'accumuler dans certains organes. Sadauskas *et al.* ont montré que des NPs d'or de 40 nm injectées par voie intraveineuse peuvent s'accumuler dans le foie pendant plusieurs mois (Sadauskas *et al.*, 2009).

La taille des NPs est donc l'un des facteurs les plus importants concernant les conditions d'excrétion et l'organe impliqué. Cependant, comme pour les mécanismes d'endocytose, la forme et les propriétés de surface peuvent également l'influencer.

### III. LE FOIE, UN ORGANE CIBLE

#### 1. Anatomie et structure

Le foie est l'organe qui possède la plus grande capacité à se régénérer. Il est situé chez l'Homme dans l'étage sus-mésocolique, dans l'hypocondre droit. Cet organe est totalement indispensable à la survie de l'organisme. Représentant 1/50 de son poids il est le viscère le plus volumineux du corps. Le foie est formé de quatre lobes : les lobes hépatiques droit et gauche séparés par le ligament falciforme, le lobe caudé et le lobe carré, beaucoup plus petits en taille (Abdel-Misih and Bloomston, 2010 ; Vernon and Kasi, 2019). Le foie possède une double vascularisation par l'artère hépatique d'une part (30%) et la veine porte d'autre part (70%) (Poisson *et al.*, 2017). L'artère hépatique apporte un sang riche en oxygène provenant du cœur alors que la veine porte achemine du sang plus pauvre en oxygène mais riche en nutriments provenant de l'estomac, de l'intestin, de la rate et du pancréas. Le débit sanguin hépatique est estimé à 1,5L de sang par minute environ chez l'adulte. Trois veines hépatiques ainsi que la veine cave inférieure assurent la collecte du sang veineux hépatique (Kan and Madoff, 2008). Le foie est également parcouru par des voies biliaires dites intrahépatiques par opposition aux voies biliaires extrahépatiques.

L'unité histologique de base formant le foie est le lobule hépatique (**Figure 22**). Cette unité est majoritairement constituée de travées unicellulaires d'hépatocytes qui convergent des espaces porte à la veine centrolobulaire. Au niveau des espaces porte, on distingue une triade formée par une branche de la veine porte et une de l'artère hépatique ainsi que des canalicules biliaires. Les sinusoides qui séparent les travées d'hépatocytes les unes des autres sont bordés par des cellules endothéliales parmi lesquelles sont dispersées des cellules de Kupffer. Entre les cellules endothéliales et les hépatocytes se situe l'espace de Disse où se localisent notamment les cellules étoilées appelées aussi cellules de Ito. Dans cette architecture cellulaire, le sang circule des espaces porte vers la veine centrolobulaire *via* les sinusoides (**Figure 23**) (Collège des universitaires en hépato-gastro-entérologie *et al.*, 2014)

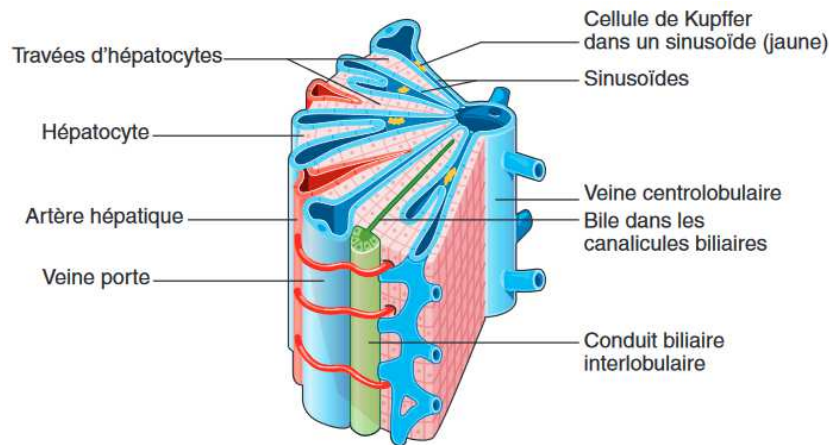


Figure 22 : Organisation générale et histologique du lobule hépatique. D'après Collège des universitaires en hépto-gastro-entérologie et al., 2014.

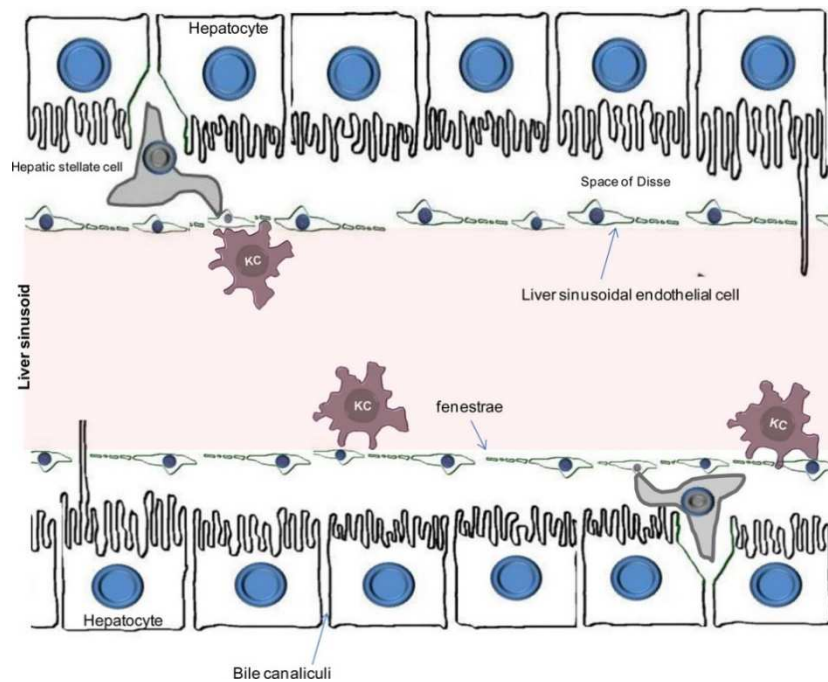


Figure 23 : Localisation des hépatocytes, cellules sinusoidales, cellules de Kupffer et cellules étoilées au sein du parenchyme hépatique. D'après Bogdanos et al., 2013.

## 2. Les différents types cellulaires hépatiques et leurs fonctions

Au niveau du lobule hépatique, plusieurs types cellulaires sont décrits. A l'exception des hépatocytes qui forment les cellules parenchymateuses du foie, toutes les autres cellules sont non-parenchymateuses.

## 2.1 Cellules endothéliales

Les cellules endothéliales des sinusoides (LSECs pour *liver sinusoidal endothelial cells*) représentent environ 45% de toutes les cellules hépatiques (Bogdanos *et al.*, 2013). Un cytoplasme fenestré et l'absence de membrane basale sont les deux particularités qui les caractérisent. Les LSECs constituent une source d'agents vasodilatateurs tels que le monoxyde d'azote (NO), le monoxyde de carbone (CO) et différents métabolites de la cyclooxygénase permettant ainsi la régulation du flux sanguin sinusoidal. Ces molécules agissent également de façon paracrine sur les cellules étoilées : en les maintenant dans un état de quiescence, les LSECs inhibent leur pouvoir vasoconstricteur. Les LSECs assurent aussi un rôle de barrière entre la circulation sanguine et les hépatocytes. En effet, les fenestrations formées par les LSECs ont un diamètre compris entre 50 et 150 nm environ ce qui permet à cette barrière de retenir les cellules sanguines tout en laissant passer dans l'espace de Disse un certain nombre de molécules comme les protéines plasmatiques, les molécules pharmaceutiques ou les lipoprotéines (Poisson *et al.*, 2017). Enfin, les LSECs possédant des capacités d'endocytose importantes et une forte activité lysosomale, elles ont la capacité d'éliminer des macromolécules solubles et des petites particules. Ces capacités d'endocytose permettent également le transfert de molécules des sinusoides à l'espace de Disse *via* un processus de transcytose.

## 2.2 Cellules de Kupffer

Environ 33% des cellules non parenchymateuses hépatiques sont des cellules de Kupffer (Bogdanos *et al.*, 2013). Ce sont des macrophages résidents. Ils représentent d'ailleurs la population la plus abondante de macrophages résidents de l'organisme (plus de 50%). Leur morphologie et leur nombre sont fonction de leur localisation au sein du lobule. Les macrophages présents dans la région périportale sont plus abondants et de taille plus importante (Naito *et al.*, 2004). Des microvillosités et des pseudopodes présents à leur surface témoignent également de leur forte capacité d'endocytose. Ils possèdent des capacités accrues de phagocytose et une meilleure activité enzymatique lysosomale qui leur permettent notamment d'éliminer les bactéries, les cellules apoptotiques, les érythrocytes sénescents et les débris cellulaires transportés par le sang jusqu'au foie. Les cellules de Kupffer situées dans la région centrolobulaire sont quant à elles responsables de la libération d'un certain nombre de cytokines telles que le *Tumor Necrosis Factor* (TNF), les interleukines (IL) 1 $\beta$ , 2, 6, 8, 10 et 12 et de chimiokines (Luyendyk *et al.*, 2010 ; Nguyen-Lefebvre and Horuzsko, 2015). Elles favorisent



ainsi le recrutement de cellules immunitaires et l'installation de l'immunité adaptative. Les macrophages hépatiques jouent donc un rôle essentiel dans la surveillance immunitaire de l'organe.

### ***2.3 Cellules étoilées***

Enfin les cellules les moins abondantes du foie (environ 22% des cellules non parenchymateuses) sont les cellules étoilées ou cellules de Ito (Bogdanos *et al.*, 2013). Leurs longs prolongements cytoplasmiques entourant les sinusoides et leurs propriétés contractiles leur permettent de participer au contrôle hémodynamique des sinusoides. Leur cytoplasme est caractérisé par de nombreuses vacuoles riches en triglycérides permettant le stockage de la vitamine A (Rosenbaum *et al.*, 1991). Elles interviennent également dans la formation de composants de la matrice extracellulaire et la production d'érythropoïétine indispensable à la régénération hépatique. Plus récemment les cellules de Ito ont été assimilées à des cellules présentatrices de l'antigène. Elles peuvent en outre interagir avec de nombreuses cellules immunitaires et moduler leur activité (Weiskirchen and Tacke, 2014). Ces cellules sont également responsables de la sécrétion de cytokines et de chimiokines telles que le *Transforming Growth Factor* (TGF)  $\alpha$  et  $\beta$ , l'*Hepatocyte Growth Factor* (HGF), l'IL-6 ou encore l'IL-10 (Marra, 1999 ; Tsukamoto, 1999).

### ***2.4 Hépatocytes***

Les hépatocytes représentent entre 70% et 80% de la totalité des cellules hépatiques et occupent environ 80% du volume de l'organe (Bioulac-Sage *et al.*, 1984). Les hépatocytes sont de forme polygonale et peuvent être en contact au sein des travées avec des sinusoides ou d'autres hépatocytes. La plupart possèdent un seul noyau mais les cellules binucléées sont communes. Les fonctions métaboliques du foie entre autres des glucides et lipides, de détoxification, la synthèse de protéines plasmatiques et la sécrétion de la bile sont notamment assurées par les hépatocytes. Ce sont des cellules polarisées qui sont en contact avec un canalicule biliaire au niveau du pôle apical et avec le sinusoides au niveau du pôle basal (Zeigerer *et al.*, 2017).

#### ***2.4.1 Métabolisme des glucides***

Le foie reçoit du sang provenant de l'intestin très riche en carbohydrates par la veine porte. Différents transporteurs tels que le *glucose transporter* (GLUT) 2 permettent l'internalisation du glucose au sein de la cellule. L'une des enzymes clefs du métabolisme des

glucides, la glucokinase, phosphoryle alors le glucose en glucose-6-phosphate (G6P). Ce dernier peut alors être converti en glucose-1-phosphate (G1P), précurseur du glycogène (Adeva-Andany *et al.*, 2016). L'utilisation la plus importante du glucose par le foie est d'ailleurs liée à la production de glycogène, une réserve énergétique que le foie peut remobiliser par la voie de la glycogénolyse. Celle-ci consiste en une conversion du glycogène en G1P par la glycogène phosphorylase puis en G6P par la phosphoglucomutase et enfin en glucose par la glucose-6-phosphatase. Le glucose est pris en charge à nouveau par GLUT-2 pour quitter l'hépatocyte et rejoindre la circulation sanguine. Lorsque les réserves en glycogène sont épuisées, la néoglucogenèse prend le relais. Cette autre voie métabolique anabolique des glucides permet la production de glucose à partir de plusieurs précurseurs tels que le glycérol, le lactate ou le pyruvate. Le G6P peut également entrer dans la voie de la glycolyse qui aboutit à la production de pyruvate ou également entrer dans la voie des pentoses phosphate.

#### 2.4.2 Métabolisme des lipides

Le foie joue également un rôle central dans le métabolisme des lipides. En effet, les hépatocytes assurent la synthèse du cholestérol, des phospholipides et des lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et haute densité (HDL). Ils assurent aussi les processus de  $\beta$ -oxydation des lipides au niveau mitochondrial permettant ainsi la transformation des acides gras en source d'énergie cellulaire et celui de la cétoxydation qui permet la conversion de l'acétyl-coenzyme A en excès en corps cétoniques, substitués du glucose (Dhillon and Gupta, 2019). Lorsque la capacité d'oxydation des glucides apportés en excédent par l'alimentation est atteinte, le glucose supplémentaire est converti en triglycérides dans le foie : il s'agit de la lipogénèse. Les acides gras produits sont alors stockés dans des gouttelettes lipidiques ou transportés dans le sang par les VLDL (Enjoji *et al.*, 2016 ; Nguyen *et al.*, 2008).

#### 2.4.3 Synthèse des protéines plasmatiques et fonctions immunitaires

Les hépatocytes interviennent dans l'immunité innée en produisant notamment les protéines du complément et plus particulièrement la protéine C3. D'autres opsonines telles que la protéine C-réactive, les protéines *Serum Amyloid A* (SAA) sont également produites par les hépatocytes (Gao *et al.*, 2007). Ils sont également responsables de la production de la plupart des protéines séquestrant et modulant le fer comme la ferritine ou la transferrine. Ils jouent ainsi un rôle important dans la suppression de la croissance bactérienne *via* l'inhibition de l'absorption du fer par les bactéries (Zhou *et al.*, 2016). Les hépatocytes synthétisent également tous les facteurs de coagulation indispensables à l'hémostase normale tel que le fibrinogène (Fish and Neerman-Arbez, 2012). De plus, les inhibiteurs de protéases comme l'antitrypsine,

l'antichymotrypsine et la  $\alpha$ 2-macroglobuline, qui jouent un rôle important dans l'activation de l'immunité innée en inactivant les protéases libérées par les pathogènes sont également produits par les hépatocytes. Enfin, ils répondent à un certain nombre de cytokines (notamment les IL-6, IL-22, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ ) et peuvent eux-mêmes produire des chimiokines (MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein*) et CXCL1 *Chemokine (C-X-C motif) ligand*) capables d'attirer les cellules de l'immunité innée (Zhou *et al.*, 2016).

#### 2.4.4 Sécrétion de bile

La bile est principalement composée d'eau (97%), d'acides ou de sels biliaires, de cholestérol, de phospholipides et de protéines et est excrétée par les hépatocytes. Les hépatocytes expriment en effet des protéines qui assurent l'entrée des sels biliaires tels que le NTCP (*Na<sup>+</sup> Taurocholate Co-transporting Polypeptide*) qui utilise un gradient de sodium pour assurer sa fonction de transport ou les OATP (*Organic Anion TransPorter*), qui transportent les acides biliaires non-conjugués et la bilirubine. D'autres transporteurs et pompes assurent ensuite la sécrétion dans le canalicule biliaire comme BSEP (*Bile Salt Export Pump*) ou MRP2 (*multidrug resistance-associated protein*). Les hépatocytes assurent près de 60% de la production biliaire journalière. L'unité de sécrétion de bile consiste en un réseau canaliculaire qui est formé par la membrane apicale d'hépatocytes adjacents et scellé par des jonctions serrées. La bile circule d'abord dans le réseau de canalicules biliaires au sein du lobule avant de rejoindre le conduit de Hering puis le conduit biliaire interlobulaire situé dans l'espace porte. Ces conduits rejoignent ensuite les voies biliaires. La bile est finalement excrétée du foie par le conduit hépatique commun (Boyer, 2013).

#### 2.4.5 Métabolisme des xénobiotiques

Constituant l'une des phases majeures de la toxicocinétique (ADME : Absorption, Distribution, Métabolisme et Elimination), le métabolisme des xénobiotiques est un système complexe et essentiel à la protection de l'organisme. Son fonctionnement et ses différents acteurs sont détaillés dans la section suivante.

### 3. Le métabolisme des xénobiotiques

L'organisme est constamment soumis *via* son environnement et notre alimentation à un grand nombre de xénobiotiques, potentiellement toxiques. Aussi, le foie assure une fonction de filtration et d'épuration importante face à ces substances en les éliminant dans la bile et/ou grâce

à des réactions de biotransformation. Les réactions de biotransformation correspondent à un ensemble de réactions enzymatiques qui permettent la transformation d'un composé au départ hydrophobe en une molécule ou des métabolites hydrophiles éliminés par les voies biliaires ou rénales (Michaud and Turgeon, 2002).

Le processus global d'élimination peut être schématisé ainsi :

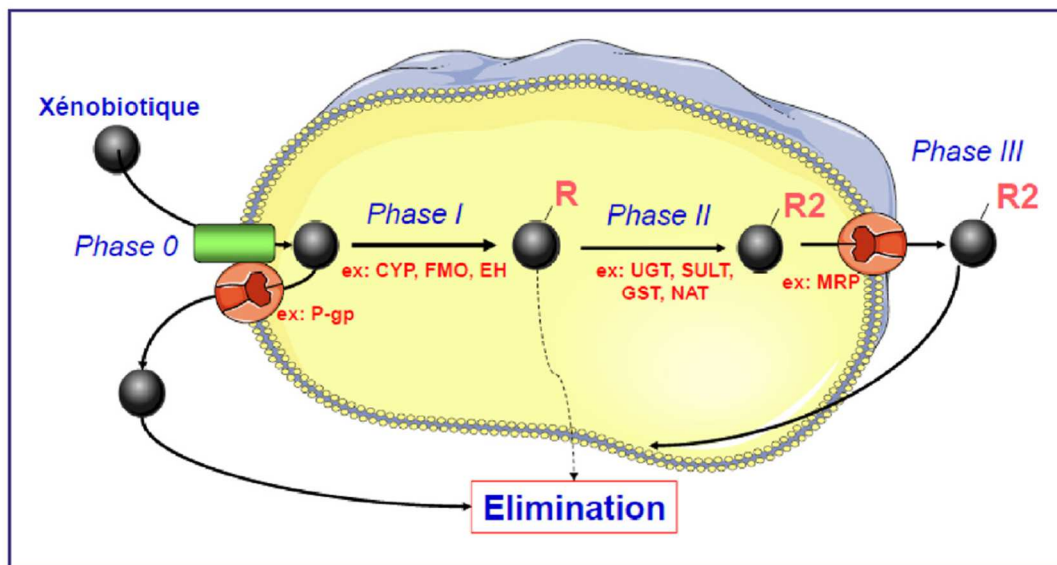


Figure 24 : Représentation schématique des 4 phases du métabolisme d'un xénobiotique dans un hépatocyte. D'après Buatois et al., 2014.

On distingue principalement parmi les réactions de métabolisation des xénobiotiques, les réactions de phase I dites de « fonctionnalisation » et qui sont associées aux CYP et celles de phase II dites de « conjugaison » impliquant diverses transférases. Les phases 0 et III correspondant à des étapes de transport membranaire.

### 3.1 Métabolisme de phase I et cytochromes P450

Le but des enzymes de phase I est de fonctionnaliser le substrat, c'est-à-dire ajouter un groupement chimique, une fonction chimique afin de le rendre plus polaire. Les réactions biochimiques sont de plusieurs natures : oxydation, réduction et hydrolyse. Excepté les hydrolyses, toutes ces réactions sont très majoritairement assurées par les CYP.

#### 3.1.1 Historique

C'est dans les années 1950 que des systèmes enzymatiques capables d'oxyder les médicaments ont été mis en évidence pour la première fois par Brodie *et al.* dans des

microsomes de foie de lapin (Brodie *et al.*, 1958). En 1958, Klingenberg observe une pigmentation orangée lors de la complexion de microsomes de foie de rat avec du CO. Un pic d'absorption à 450 nm en spectre UV visible est mesuré (Klingenberg, 1958). Quelques années plus tard, en 1964, Omura et Sato démontrent que le CO est effectivement fixé par un pigment qui est une hémoprotéine et c'est ainsi qu'apparaît la dénomination actuelle de cytochrome P450 pour Pigment à 450 nm (Omura and Sato, 1964).

### 3.1.2 Structure

Tous les CYP présentent une grande analogie de structure à savoir une hémoprotéine formée par l'association entre une apoprotéine et un noyau héminique. L'atome de fer central de l'hème (protoporphyrine IX) est coordonné aux 4 atomes d'azote pyrroliques de la porphyrine et à un groupement cystéinate qui assure la liaison avec l'apoprotéine dans sa partie C-terminale (**Figure 25**). Cette dernière est une chaîne polypeptidique unique de masse moléculaire comprise entre 40 et 60 kDa selon le cytochrome considéré. D'un point de vue tridimensionnel, la structure du CYP est composée de 12 hélices  $\alpha$  et 5 feuillets  $\beta$  en configuration antiparallèle. Malgré leur très forte analogie structurale, l'identité de séquence entre les CYP peut être inférieure à 20%. Cependant, trois séquences sont particulièrement conservées parmi les CYP. Les deux premières sont situées du côté proximal de l'hème. La séquence consensus (Phe-X-X-Gly-X-Arg-X-Cys-X-Gly) possède le résidu cystéine qui assure la liaison avec l'atome de fer. Elle est appelée « Cys-Pocket ». La seconde, de séquence Glu-X-X-Arg permet de stabiliser le cœur de la structure. Enfin, la séquence (Ala/Gly-Gly-X-Asp/Glu-Thr-Thr/Ser) qui joue un rôle dans le transfert des électrons est située sur la partie distale de l'hème. Les séquences conservées sont toutes situées au niveau du noyau de la protéine, autour de l'hème. Ceci reflète un mécanisme enzymatique commun parmi les CYP (Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000).

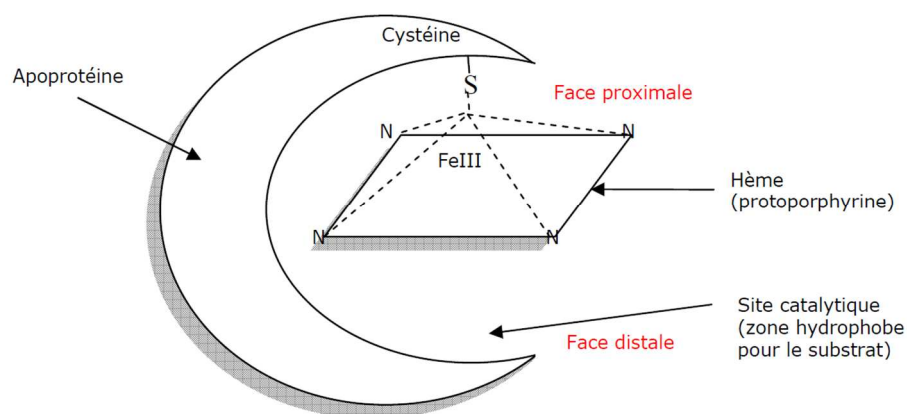


Figure 25 : Schéma de la structure d'un CYP. D'après Nguyen, 2007.

### 3.1.3 Nomenclature et classification

Depuis une trentaine d'années, une nomenclature des CYP a été mise en place. Celle-ci est basée sur le degré d'homologie des CYP et plus particulièrement leur degré de similitude dans la séquence en acides aminés. Le symbole CYP est utilisé pour désigner « cytochrome P450 » suivi d'un chiffre arabe pour l'appartenance à une même famille (plus de 40% d'homologie de séquence) puis une lettre pour indiquer l'appartenance à une même sous-famille (plus de 55% d'homologie de séquence) et enfin un chiffre arabe pour désigner les différentes isoformes de cette même sous-famille (**Figure 26**) (Manikandan and Nagini, 2018).



Figure 26 : Exemple de nomenclature du CYP2D6. D'après Wijnen et al., 2007.

Chez l'Homme, on dénombre 57 gènes et plus de 59 pseudogènes répartis en 18 familles (Mittal et al., 2015) (**Tableau 4**).

Family	Subfamily	Genes/Pseudogenes
CYP1	CYP1A	CYP1A1, CYP1A2
	CYP1B	CYP1B1
	CYP1D	CYP1D1P
CYP2	CYP2A	CYP2A6, CYP2A7, CYP2A13, CYP2AB1P, CYP2AC1P
	CYP2B	CYP2B6, CYP2B7P
	CYP2C	CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2C23P, CYP2C58P, CYP2C59P, CYP2C60P,
	CYP2D	CYP2D6, CYP2D7, CYP2D8P
	CYP2E	CYP2E1
	CYP2F	CYP2F1, CYP2F2P
CYP3	CYP3A	CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43, CYP3A51P, CYP3A52P, CYP3A54P, CYP3A137P
CYP4	CYP4A	CYP4A11, CYP4A22, CYP4A26P, CYP4A27P, CYP4A44P, CYP4B1
	CYP4F	CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F9P, CYP4F10P, CYP4F22, CYP4F23P, CYP4F24P, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F25P
CYP5	CYP5A	CYP5A1
CYP7	CYP7A	CYP7A1
	CYP7B	CYP7B1
CYP8	CYP8A	CYP8A1
	CYP8B	CYP8B1
CYP11	CYP11A	CYP11A1
	CYP11B	CYP11B1, CYP11B2
CYP17	CYP17A	CYP17A1
CYP19	CYP19A	CYP19A1
CYP20	CYP20A	CYP20A1
CYP21	CYP21A	CYP21A2
CYP24	CYP24A	CYP24A1
CYP26	CYP26A	CYP26A1
	CYP26B	CYP26B1
	CYP26C	CYP26C1
CYP27	CYP27A	CYP27A1
	CYP27B	CYP27B1
	CYP27C	CYP27C1
CYP39	CYP39A	CYP39A1
CYP46	CYP46A	CYP46A1
CYP51	CYP51A	CYP51A1

Tableau 4 : Classification des CYP identifiés chez l'Homme. D'après Mittal et al., 2015.

### 3.1.4 Cycle catalytique des cytochromes P450

Le cycle catalytique des CYP comprend quatre grandes étapes (**Figure 27**). La première étape du cycle catalytique est la fixation du substrat R-H. Un changement conformationnel au niveau de l'apoprotéine se répercute au niveau du complexe héminique modifiant son potentiel rédox. Cette différence de potentiel induit l'arrivée d'un premier électron qui est fourni par le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate). L'atome de fer central, dont le degré d'oxydation était de +III, est alors réduit en Fe(II). L'étape suivante consiste en la fixation d'une molécule d'oxygène sur le fer. La dernière étape de ce cycle, est le transfert d'un nouvel électron aboutissant à la production d'un complexe peroxy-ferrique suivie de deux protonations. La première protonation conduit à la formation d'un nouveau complexe hydroperoxo Fe(III) et la seconde, à la rupture de la liaison entre les deux atomes d'oxygène. Un de ces atomes est alors éliminé sous forme d'une molécule d'eau et un composé oxo du fer est produit. Le pouvoir très

oxydant de ce dernier va entraîner l'ajout d'un atome d'oxygène sur le substrat. Celui-ci est alors libéré du site actif sous sa forme d'un produit R-OH (Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000).

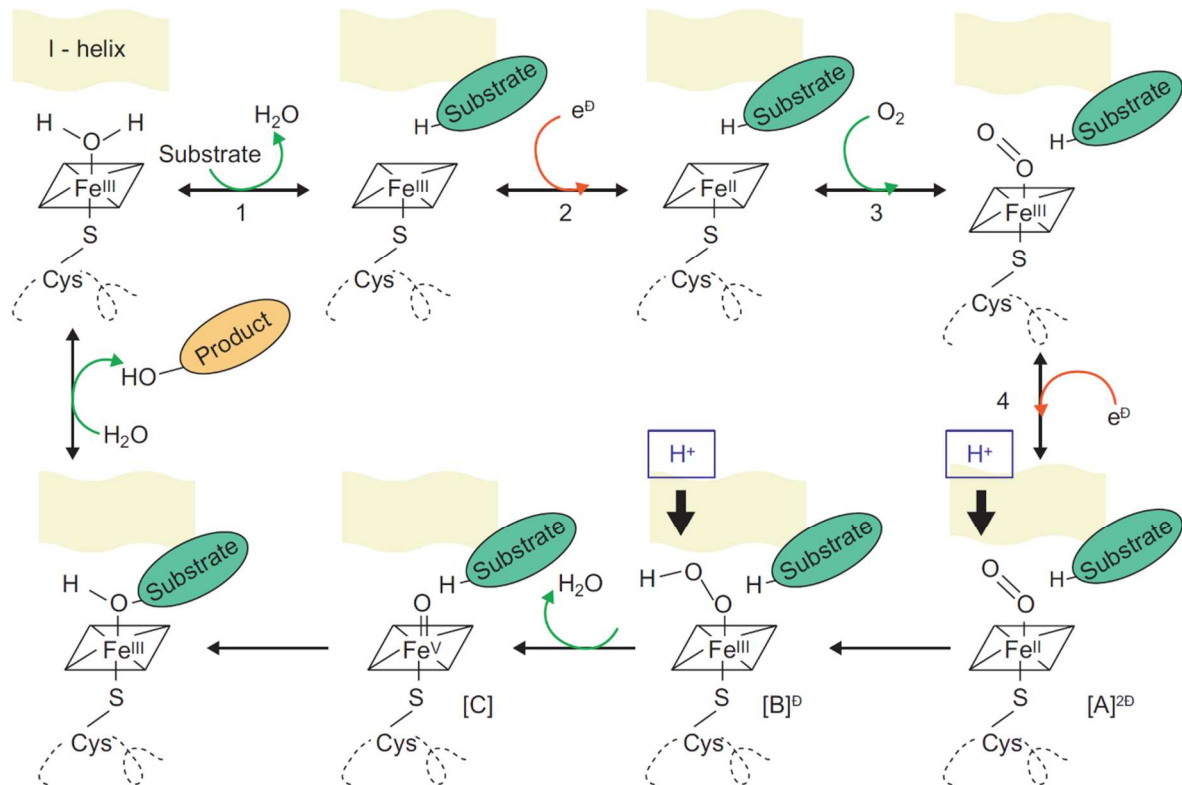


Figure 27 : Mécanisme moléculaire du cycle catalytique des CYP. D'après Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000.

Des enzymes autres que les CYP catalysent des réactions de phase I telles que l'alcool déshydrogénase, l'aldéhyde déshydrogénase, des estérases ou encore la monoamine oxydase. Ces enzymes n'assurent d'ailleurs pas que des réactions de monooxygénation. Elles catalysent des réactions de réduction ou d'hydrolyse. La réduction résulte généralement en l'addition d'un atome d'hydrogène sur le substrat et implique le transfert d'électrons sur une molécule de FAD (flavine adénine dinucléotide) (Mittal *et al.*, 2015).

### 3.1.5 Induction des cytochromes P450

L'induction d'un CYP correspond à une augmentation de son activité. Ce phénomène peut avoir des effets délétères sur la santé. En effet, il peut par exemple aboutir à une inefficacité thérapeutique en réduisant les concentrations plasmatiques d'un médicament. Elle peut également entraîner une bioactivation et la formation de métabolites potentiellement toxiques. Les CYP peuvent être induits par divers produits chimiques ou molécules d'origine naturelle.



Le phénomène d'induction est lié soit à l'augmentation de la transcription d'un gène, soit à la stabilisation des ARNm ou soit à la diminution du taux de dégradation des protéines (Lin and Lu, 1998). L'augmentation de la transcription est médiée par l'activation de différents facteurs de transcription clefs (**Figure 28**) (Tompkins and Wallace, 2007) tels que l'*aryl hydrocarbon receptor* (AhR) pour les CYP1A et CYP1B, le *constitutive androstane receptor* (CAR) ou le *pregnane X receptor* (PXR) pour les CYP2B, CYP3A, CYP2C et CYP2A (Nebert and Karp, 2008; Tolson and Wang, 2010). Les mécanismes d'induction impliquent également d'autres facteurs de transcription tels que le *glucocorticoid receptor* (GR), le *retinoid X receptor* (RXR), le *liver X receptor* (LXR) ou encore le *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR). Un gène codant pour un CYP peut être régulé par plusieurs des facteurs de transcription précédemment évoqués car il existe un chevauchement très important des voies de régulation et des éléments se fixant sur chaque promoteur des gènes des CYP (Pelkonen *et al.*, 2008).

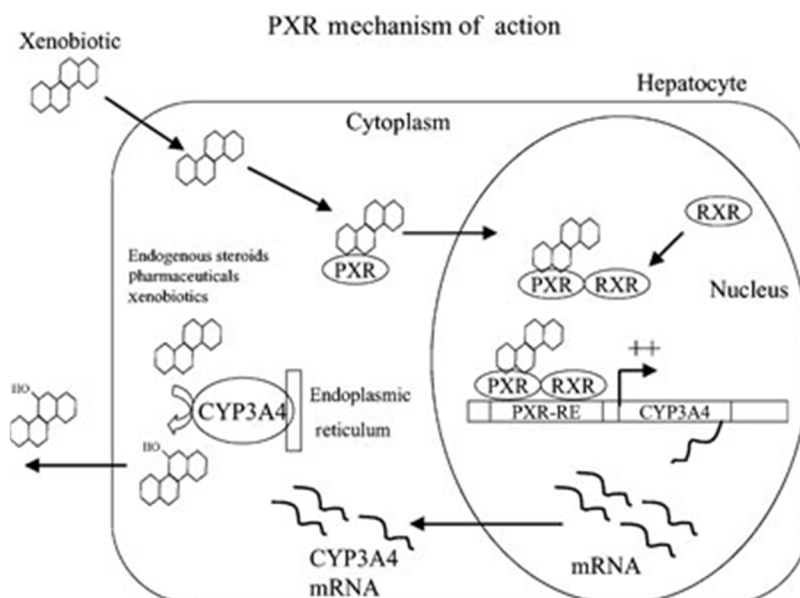


Figure 28 : Représentation schématique de l'induction du CYP3A4 par un xénobiotique et activation de PXR. D'après Tompkins and Wallace, 2007.

### 3.1.6 Inhibition des cytochromes P450

L'inhibition d'un CYP correspond à une diminution de son activité. Ce phénomène peut entraîner dans le cas d'une drogue active, une augmentation de son effet thérapeutique ou des effets secondaires voire même une toxicité sévère. En revanche, dans le cas d'une prodrogue, une diminution de l'effet thérapeutique sera constatée. Cette inhibition peut être réversible, cas le plus courant, ou irréversible.

Quatre types majeurs de mécanismes d'inhibition réversible sont décrits : l'inhibition compétitive, non compétitive, incompétitive et mixte (Pelkonen *et al.*, 2008). La première a lieu lorsque substrat et inhibiteur ont le même site de fixation sur l'enzyme, le site actif. Le  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten ou concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale de la réaction enzymatique est divisée par deux) est augmenté alors que la valeur de  $V_{max}$  (vitesse maximale de la réaction enzymatique) est inchangée. Dans le cas de l'inhibition non compétitive, l'inhibiteur va se fixer sur un site différent du site actif et il peut se lier à l'enzyme libre ou au complexe Enzyme-Substrat (ES). La valeur de  $K_m$  est inchangée alors que celle de  $V_{max}$  diminue. Lorsque l'inhibiteur possède une affinité différente pour l'enzyme et le complexe ES, il s'agit d'une inhibition mixte (Kamel and Harriman, 2013). L'inhibition incompétitive quant à elle est un mécanisme beaucoup plus rare d'inhibition qui correspond à la fixation de l'inhibiteur sur le complexe ES. Un certain nombre de molécules ont été identifiées comme étant des inhibiteurs de CYP ; ce sont généralement des molécules hétéroaromatiques qui contiennent des atomes d'azote et qui peuvent se coordonner directement à l'atome de Fe du noyau héminique ou à la partie lipophile de la protéine (Kamel and Harriman, 2013) (**Figure 29**).

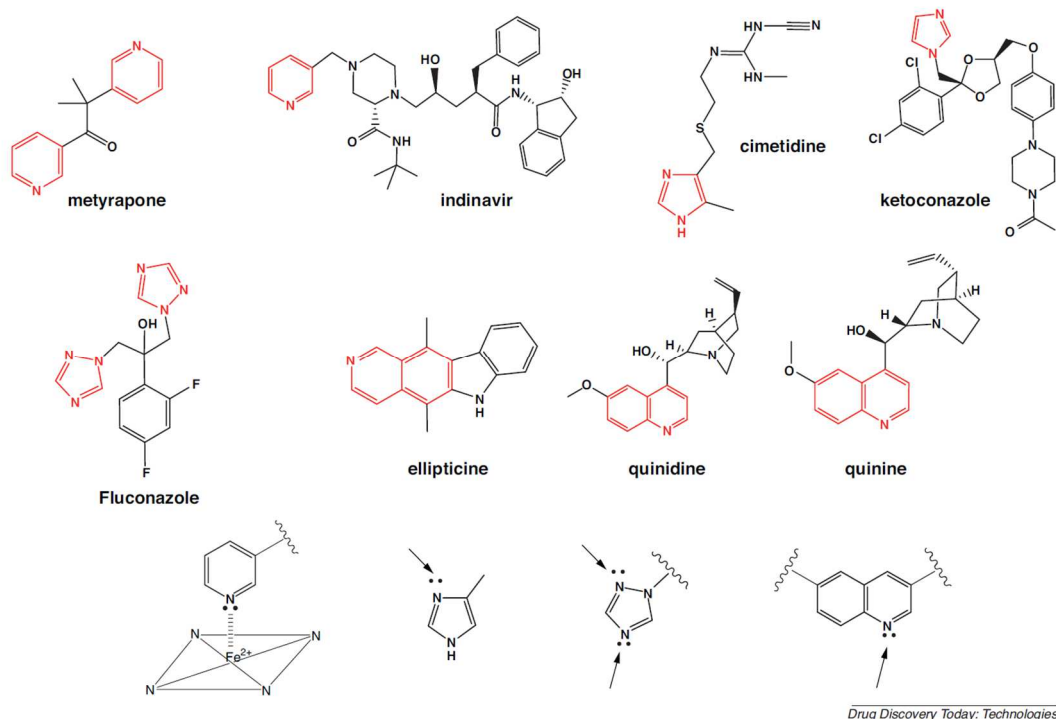


Figure 29 : Structures des principaux inhibiteurs réversibles des CYP. Les flèches noires indiquent les atomes d'oxygène impliqués dans la coordination avec l'atome de Fe de l'hème. D'après Kamel and Harriman, 2013.

Deux types d'inhibition irréversible sont décrits. L'inhibition quasi-irréversible est caractérisée par la fixation d'un réactif intermédiaire sur l'atome de fer de l'hème aboutissant à la formation d'un complexe catalytique inactif. L'inhibition irréversible ou inhibition suicide quant à elle aboutit à la fixation covalente d'un réactif intermédiaire sur les acides aminés du site actif du CYP entraînant une inactivation permanente (Correia and Ortiz de Montellano, 2005 ; Pelkonen *et al.*, 2008). Seule la synthèse *de novo* de l'enzyme peut restaurer une activité enzymatique. De nombreux groupes fonctionnels ont été décrits comme étant présents de façon récurrente dans les molécules capables de tels mécanismes d'inhibition. Les groupements époxydes, les amines, les hydrazines et le méthylènedioxyphényl en sont de parfaits exemples (Kamel and Harriman, 2013).

### 3.1.7 Polymorphisme des cytochromes P450

L'activité enzymatique des CYP peut également être modulée en fonction des mutations sur les gènes codant pour les CYP ; c'est le polymorphisme enzymatique, qui est décrit lorsqu'au moins 1% d'une population présente des variants génétiques. Il peut aboutir à plusieurs phénotypes différents dont la fréquence varie notamment selon les groupes ethniques (Belpaire and Bogaert, 1996 ; Johansson and Ingelman-Sundberg, 2011 ; Pelkonen *et al.*, 2008) :

- Les métaboliseurs ultrarapides présentent plus de deux copies actives du gène.
- Les métaboliseurs rapides (*extensive metabolizers*) possèdent une activité enzymatique normale. Ils sont homozygotes ou hétérozygotes pour un allèle dominant.
- Les métaboliseurs intermédiaires ont une activité enzymatique diminuée. Ils sont hétérozygotes pour un allèle récessif ou portent deux allèles codant pour une enzyme à l'activité réduite.
- Les métaboliseurs lents (*poor metabolizers*) qui présentent une forte baisse de l'activité enzymatique. Ils sont homozygotes pour un allèle récessif.

Le polymorphisme génétique concerne trois principales isoenzymes : les CYP2A6, CYP2D6 et CYP2C19. CYP2D6 (Taburet and Furlan, 2000). Concernant le CYP2D6, les métaboliseurs rapides représentent environ 80% de la population Caucasienne. Les autres phénotypes décrits correspondent chacun à entre 5 et 10% de cette même population (Samer *et al.*, 2004). Le phénotype "métaboliseurs lents" du CYP2C19 est fréquent chez les Orientaux (environ 20%) (Taburet and Furlan, 2000).

### 3.1.8 CYP1

La famille des CYP1 comprend trois membres, les CYP1A1, 1A2 et 1B1. Seul le CYP1A2 est majoritairement exprimé au niveau hépatique. L'expression de leur gène est médiée par le récepteur AhR. Le CYP1A2 est responsable de 5 à 10% des réactions de métabolisation des médicaments. Ses substrats principaux sont l'éthoxyrésorufine, la caféine ou la phénacétine. La fluvoxamine et la ciprofloxacine sont quant à elles connues pour être des inhibiteurs majeurs (Zhou *et al.*, 2009).

### 3.1.9 CYP2

La famille des CYP2 est beaucoup plus vaste que celle des CYP1 et comprend de nombreux CYP impliqués dans la métabolisation des médicaments. Leur spécificité de substrat et leur expression varient très largement. Au niveau hépatique, le CYP2B6 représente jusqu'à 10% des CYP totaux (Pelkonen *et al.*, 2008). Son implication dans la métabolisation de nombreuses molécules pharmaceutiques comme le bupropion, la cyclophosphamide, la kétamine ou le propofol est considérable (Nebert and Russell, 2002). Les CYP de la sous-famille 2C revêtent également une grande importance dans le métabolisme des xénobiotiques. Le CYP2C9 est l'un des membres les plus exprimés au niveau du foie (environ 20%). Il métabolise approximativement 15% des médicaments et notamment la warfarine et le tolbutamide (Zhou *et al.*, 2009). Un autre membre majeur de la famille est le CYP2C19 qui représente près de 10% de l'activité des cytochromes hépatiques (Pelkonen *et al.*, 2008). Ses principaux substrats sont le diazépam, et des inhibiteurs de la pompe à protons comme l'oméprazole ou l'ésoméprazole. Cette dernière molécule est aussi son principal inhibiteur. Le CYP2D6 prend en charge environ 25% des molécules et est lui aussi très fortement exprimé au niveau hépatique. Il contribue au métabolisme du dextrométhorphan, du buffuralol, du propranolol et de certains antidépresseurs et antipsychotiques comme la fluoxétine ou la risperidone. La cimétidine et la quinédine sont des inhibiteurs spécifiques de ce CYP (Nebert and Russell, 2002 ; Zhou *et al.*, 2009). Le CYP2E1 est également très exprimé au niveau hépatique. Il intervient dans le métabolisme de très peu de molécules pharmaceutiques, l'une des plus importantes étant l'acétaminophène. Son substrat principal est l'éthanol (Pelkonen *et al.*, 2008).

### 3.1.10 CYP3

Trois sous-familles composent la famille des CYP3 qui représente au total 30 à 40% des CYP hépatiques. Le CYP3A5 possède une spécificité de substrat très proche de celle du CYP3A4. Le CYP3A7 est l'un des CYP prédominant chez les nouveau-nés alors qu'il est très

minoritaire à l'âge adulte (Nebert and Russell, 2002). Le CYP3A4 est l'un des cytochromes les plus étudiés en raison notamment de son abondance au niveau hépatique et de son implication dans le métabolisme de près de la moitié des molécules pharmaceutiques. Le CYP3A4 possède un large panel de substrats. La cyclosporine, le midazolam, l'érythromycine, la testostérone et la progestérone ne sont que quelques exemples des substrats du CYP3A4 (Zhou *et al.*, 2009). La taille et la structure chimique des inhibiteurs de ce CYP sont tout aussi variées que celles des substrats : différents agents antimicrobiens (ritonavir et érythromycine), agents antifongiques (kétoconazole), agents antihypertenseurs (vérapamil) mais aussi le jus de pamplemousse en raison de sa forte teneur en bergamottine et 6,7-dihydroxybergamottine (AFSSAPS, 2008 ; Pelkonen *et al.*, 2008).

L'abondance, la proportion de médicaments pris en charge ainsi que les différents substrats, inhibiteurs et inducteurs des principaux CYP hépatiques chez l'Homme sont indiqués dans la **Figure 30** et le **Tableau 5**.

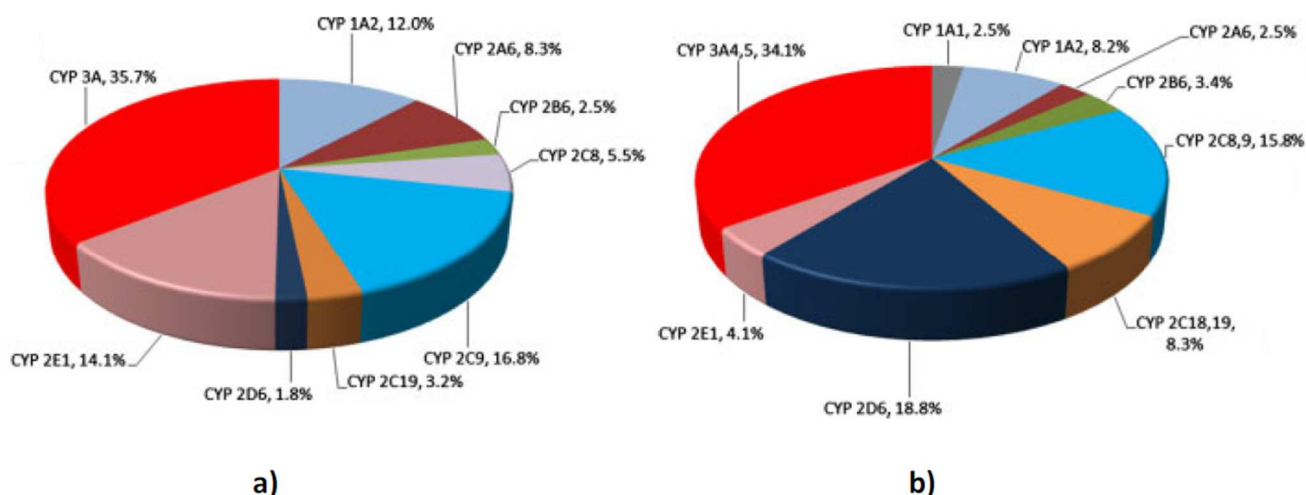


Figure 30 : (a) Abondance des CYP hépatiques chez l'Homme et (b) proportion de médicaments métabolisés par ces mêmes CYP. D'après Kapur *et al.*, 2014.

CYP		Substrates		Inhibitors	Inducers	
<b>CYP 1A2</b>	3° amine TCAs ( <i>N</i> -demethylation)	Duloxetine	Cimetidine	Mibefradil	Char-grilled meat	
	Acetaminophen	Methadone	Fluoroquinolones (cipro- floxacin, norfloxacin)	Moclobemide	Omeprazole	
	Caffeine	Olanzapine	Fluoxetine	Naringenin	Tobacco	
	Clozapine (major)	Phenacetin	Fluvoxamine	Rozeram		
		Propranolol		Ticlopidine		
<b>CYP 2C9</b>	Celecoxib	NSAIDs	Amiodarone	Fluvoxamine	Phenytoin	
	Fluvastatin	Phenytoin (major)	D-propoxyphene	Miconazole	Rifampin	
	Glipizide	Rosiglitazone	Disulfiram	Phenylbutazone	Secobarbital	
	Irbesartan	S-warfarin	Fluconazole	Sulphaphenazole		
	Losartan	Tolbutamide	Fluvastatin	Zafirlukast		
<b>CYP 2C19</b>	3° amine TCAs ( <i>N</i> -demethylation)	Mephobarbital	Cimetidine	Ketoconazole	Rifampin	
	Citalopram (partly)	Moclobemide	Felbamate	Moclobemide		
	Diazepam (partly)	Nelfinavir	Fluoxetine	Omeprazole		
	( <i>N</i> -demethylation)	Omeprazole (5-hydroxylation)	Fluvoxamine	Phenytoin		
	Hexobarbital	Phenytoin (minor)	Imipramine	Tranlycypromine		
	Indomethacin	R-warfarin				
	Lansoprazole	S-mephenytoin				
<b>CYP 2D6</b>	2° and 3° amine TCAs (2, 8, 10-hydroxylation)	Fluphenazine	Amiodarone	Hydroxybupropion	Phenobarbital	
	Alprenolol	Haloperidol (reduction)	Bupropion	Methadone	Rifampin	
	Amphetamine	Hydrocodone	Celecoxib	Moclobemide		
	Aripiprazole	Methadone	Cimetidine	Paroxetine		
	Atomoxetine	Mexiletine	Duloxetine	Perphenazine		
	β-blockers	Mirtazapine (partly)	Fluoxetine	Quinidine		
	Bupropion	Nortriptyline	Fluphenazine	Ritonavir		
	Carvedilol	Oxycodone	Fluvoxamine (weak)	Sertraline (weak)		
	Clozapine (minor)	Paroxetine	Haloperidol	Thioridazine		
	Codeine (hydroxylation, O-demethylation)	Propafenone (IC antiarrhythmics)		Ticlopidine		
	D-fenfluramine	Risperidone				
	Desipramine	Tamoxifen				
	Dextromethorphan (O- demethylation)	Thioridazine				
	Donepezil (partly)	Timolol				
	Duloxetine	Tramadol				
	Fluoxetine (partly)	Trazodone				
	<b>CYP 2E1</b>	Acetaminophen	Isoflurane	Diethyldithiocarbamate		Ethanol
		Chlorzoxazone	Methoxyflurane	(Disulfiram metabolite)		Isoniazid
		Ethanol	Sevoflurane			
		Halothane				
<b>CYP 3A4</b>	3° amine TCAs ( <i>N</i> -demethylation)	Lidocaine	Amiodarone	Ketoconazole (azole anti- fungals)	Barbiturates	
	Acetaminophen	Loratadine	Aprepitant	Mibefradil	Carbamazepine	
	Alfentanil	Lovastatin	Cimetidine	Naringenin	Glucocorticoids	
	Alprazolam	Midazolam	Clarithromycin	Mifepristone	Modafinil	
	Amiodarone	Mifepristone	Dexamethasone	(grapefruit)	Oxcarbazepine	
	Androgens	Mirtazapine (partly)	Amiodarone	Verapamil	Rifampin	
		Nefazodone	Aprepitant		St. John's wort	

Tableau 5 : Substrats, inhibiteurs et inducteurs des CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 et 3A4. D'après Debattista and Schatzberg, 2006.

### 3.2 Métabolisme de phase II

Les réactions de phase II sont des réactions de conjugaison qui ont pour but de rendre les xénobiotiques plus hydrophiles. Concrètement, ces enzymes transfèrent un groupement polaire sur la partie fonctionnelle OH du xénobiotique ou de son métabolite ajouté par les enzymes de phase I. Parmi les enzymes de phase II, figurent notamment les UDP-glucuronosyltransférases (UGT), les glutathion-S-transférases (GST), les sulfotransférases (ST), les N-acétyltransférase (NAT) et les méthyltransférase (TPMT). Les types de réaction et les substrats sont indiqués dans le **Tableau 6**.

Réactions	Enzymes	Substrats
Glucuroconjugaison	UDP-glucuronosyl transférases	Hydroxylamines, arylamines
Sulfoconjugaison	Sulfotransférases	Stéroïdes, phénols, amines hydroxylamines
Acétylation	N-acétyltransférases	Arylamines, hydrazines
Conjugaison avec des acides aminés	N-acyltransférases	Acides carboxyliques aromatiques et aliphatiques
Mercaptoconjugaison	Glutathion S-transférases	Époxydes d'HAP, arylamines
Méthylation	Méthyltransférases	Amines, catécholamines, imidazoles, thiols
Transsulfuration	Thioltransférases	Échange disulfure

UDP : uridine-diphosphate ; HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques

*Tableau 6 : Liste des réactions de phase II, les enzymes impliquées et leurs substrats. D'après Institut national de la santé et de la recherche médicale, 2001.*

Les réactions de phase II les plus fréquentes sont de loin les glucuroconjugaisons, les sulfoconjugaisons et les transferts de groupement glutathion (**Figure 31**).

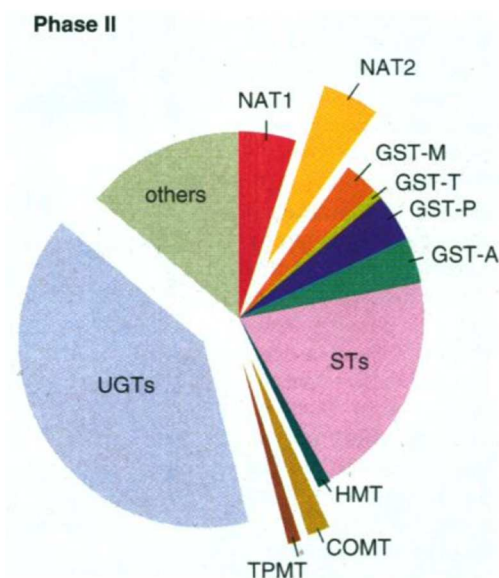


Figure 31 : Proportion de chaque enzyme de phase II chez l'Homme au niveau hépatique. D'après Evans and Relling, 1999.

### 3.3 Phase 0 et phase III

La première et la dernière phase du métabolisme des xénobiotiques correspondent à des étapes de transport (**Figure 32**). Elles sont assurées par des mécanismes d'influx/efflux et médiées par deux grands types de transporteurs : les transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*) et les transporteurs SLC (*solute carrier*). Les transporteurs SLC sont qualifiés d'indirects car ils ne nécessitent pas l'intervention d'ATP pour assurer leur fonction. Ils s'appuient sur un gradient électrochimique ou un gradient d'ions généré par des pompes ATP dépendantes pour transporter des substrats. Les transporteurs SLC peuvent être uniports, antiports et symports si respectivement une seule molécule est transportée, la molécule va dans le sens inverse du gradient ou si deux molécules sont prises en charge simultanément. Les transporteurs SLC sont enchâssés dans la membrane basolatérale de l'hépatocyte et permettent le passage du xénobiotique du compartiment sanguin vers l'hépatocyte (Petzinger and Geyer, 2006). Près de 400 transporteurs répartis en 52 familles sont identifiés parmi lesquels on distingue les transporteurs de monocarboxylates, de monoamines, de cations ou d'anions organiques, de nucléosides et d'oligopeptides protons dépendants (Jaeg, 2013 ; Lin *et al.*, 2015). Dans la famille SLC, certains membres sont des transporteurs spécifiques du foie comme OATP1B1, OATP1B3 et NTCP qui prennent en charge les statines (Döring and Petzinger, 2014). Les transports de phase III sont quant à eux réalisés par les transporteurs ABC. Ils utilisent l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP (adénosine triphosphate) pour transporter diverses molécules à



travers les membranes, c'est pourquoi ils sont qualifiés de directs. Au total, 51 transporteurs subdivisés en sept sous-familles en fonction de leur domaine de fixation à l'ATP sont identifiés chez l'Homme. Parmi les transporteurs ABC, les membres les plus connus sont la P-gp, les transporteurs MRP et les transporteurs BCRP (breast cancer resistance protein) (Estudiante *et al.*, 2013 ; Hediger *et al.*, 2013 ; Jaeg, 2013). Ils permettent le passage du xénobiotique ou de son métabolite de l'hépatocyte vers le sang ou la bile. Afin d'assurer leur fonction d'excrétion, ces transporteurs sont principalement localisés au niveau de la membrane luminaire des hépatocytes. MRP1 et la P-gp assurent le transport de la majeure partie des molécules au niveau basolatéral afin d'assurer leur transport vers le sang. MRP2 est quant à lui particulièrement impliqué dans la prise en charge des groupements glucuronide et sulfonate. D'autres membres de la famille ABC sont exprimés au niveau du foie comme MRP6 mais aussi les transporteurs BCRP (Chandra and Brouwer, 2004 ; Petzinger and Geyer, 2006).

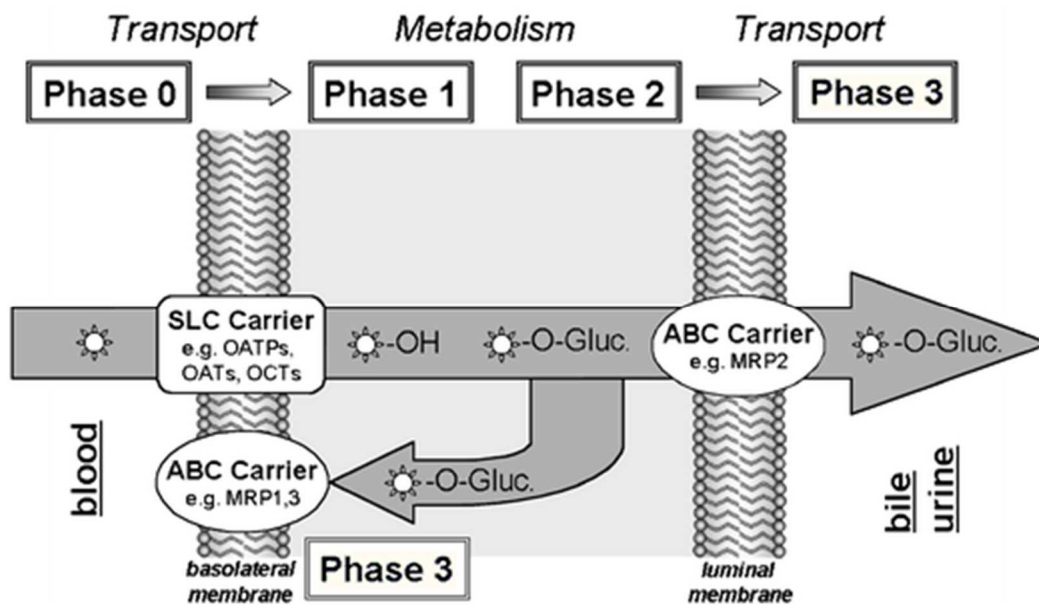


Figure 32 : Schéma représentatif des phases de transport (0 et 3) du métabolisme des xénobiotiques.

D'après Petzinger and Geyer, 2006.

## IV. L'INTESTIN, UN ORGANE CIBLE

### 1. Anatomie et structure

Le tractus gastro-intestinal est formé par la bouche, l'œsophage, l'estomac et l'intestin, le rectum et l'anus. L'intestin comprend le duodénum, le jéjunum et l'iléon qui forment l'intestin grêle et le côlon ou gros intestin. Il assure des fonctions de digestion, d'absorption et de sécrétion et joue un rôle primordial de barrière entre le milieu extérieur que constitue la lumière du tube digestif et le milieu intérieur. La barrière intestinale est constituée du microbiote, d'une couche de mucus, d'un épithélium intestinal et d'une barrière immunitaire (Figure 33).

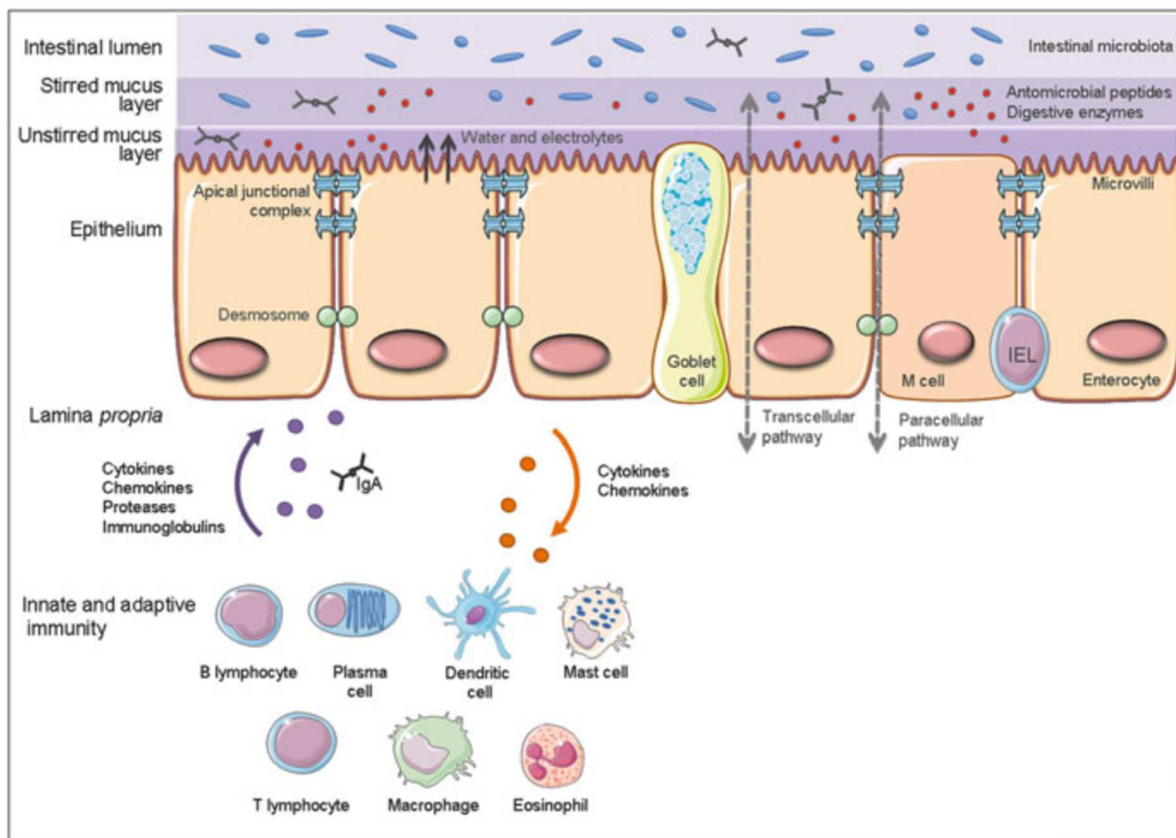


Figure 33 : Structure de la barrière intestinale. D'après Alonso et al., 2014.

### 2. Le microbiote

Le développement du microbiote se produit à la naissance lorsque les bactéries maternelles colonisent le nourrisson et lors de l'allaitement par le lait maternel. Il faut attendre l'âge de 2,5-3 ans environ pour que sa composition et ses fonctions soient comparables à celles

d'un microbiote mature adulte (Rodríguez *et al.*, 2015 ; Thursby and Juge, 2017). La densité et les espèces bactériennes qui composent le microbiote varient sensiblement le long du tractus gastro-intestinal. Elles diffèrent aussi selon leur localisation dans la lumière intestinale, dans le mucus ou au niveau de l'épithélium (Peterson *et al.*, 2008). Les principaux phyla bactériens identifiés sont *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* et *Verrucomicroia* (**Figure 34**) (Donaldson *et al.*, 2016). Le côlon est la partie du tube digestif qui est la plus densément colonisée. A elles seules, les bactéries du tube digestif représenteraient près de 0,2 kg et constitueraient la plus grande population de bactéries de notre organisme (Sender *et al.*, 2016). Les microbiotes à l'âge adulte sont stables mais l'alimentation et les antibiotiques ont été identifiés comme facteurs modifiant la composition du microbiote (Cani, 2018). Une étude de 2011 dans laquelle des individus ont reçu des régimes contenant des glucides non digestibles pendant 3 semaines a montré que la composition des microbiotes variait selon les individus plutôt qu'en fonction du régime alimentaire. Bien que les phyla prépondérants ne changent pas, des modifications dans l'abondance relative d'espèces bactériennes étaient mesurées et notamment celles utilisant l'amidon. Ces changements se sont produits en quelques jours et ont été inversés aussi rapidement par un nouveau changement de régime alimentaire (Walker *et al.*, 2011). Ainsi, l'alimentation affecte la composition du microbiote mais celle-ci est influencée par la composition initiale du microbiote intestinal d'un individu. Il convient également de noter que de nombreux groupes de bactéries dominants, peut-être ceux qui possèdent un degré plus élevé de diversité nutritionnelle ou de flexibilité, ne sont pas affectés par les changements alimentaires (Flint *et al.*, 2012).

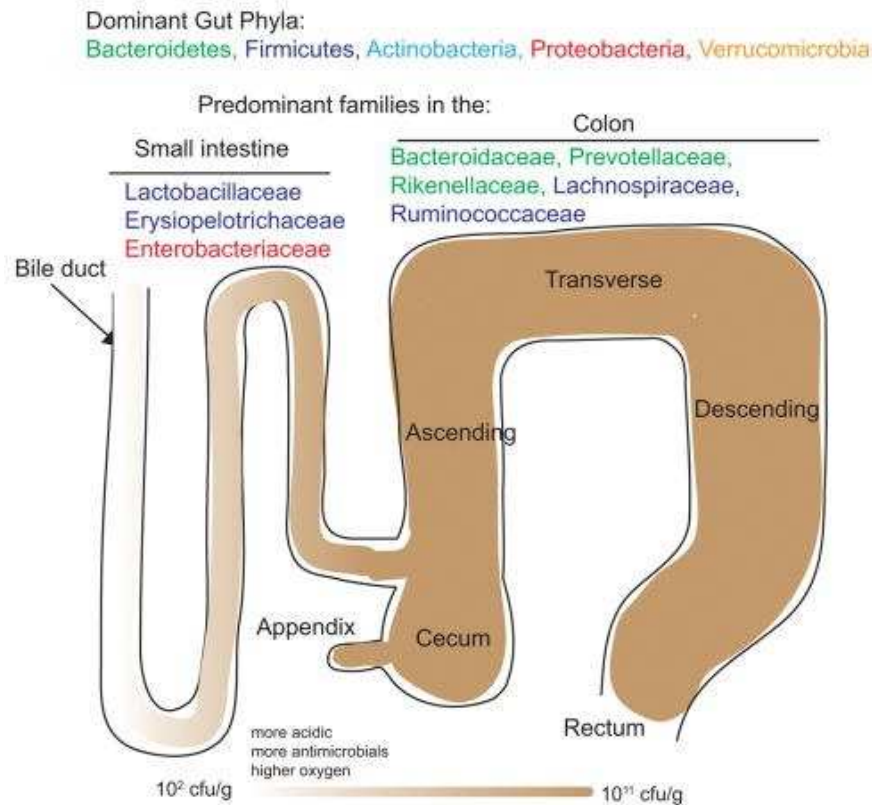


Figure 34 : Composition bactérienne du microbiote intestinal. D'après Donaldson *et al.*, 2016.

Le microbiote est un élément indispensable de protection de l'épithélium intestinal. Il stimule notamment le système immunitaire. Il assure également des fonctions métaboliques car les bactéries peuvent métaboliser certains sucres, peptides et gaz.

### 3. Le mucus

La couche de mucus intestinal permet de protéger l'épithélium de la déshydratation, des dommages mécaniques, des différents agents pathogènes et chimiques mais aussi de fluidifier le transit intestinal (Tarabova *et al.*, 2016). Ainsi, elle constitue après le microbiote une véritable seconde ligne de défense physique entre la lumière du tube et l'épithélium. Les principales cellules impliquées dans la formation de mucus sont les cellules caliciformes (Specian and Oliver, 1991). La sécrétion du mucus est régulée par les systèmes hormonal, immunitaire et nerveux (Tarabova *et al.*, 2016). L'épaisseur de la couche de mucus varie le long des différentes portions de l'intestin (Johansson *et al.*, 2011). Le mucus est très riche en eau, ions et cytokines et ses propriétés rhéologiques sont fonction de sa composition protéique (MacAdam, 1993 ; Tarabova *et al.*, 2016). Les protéines majoritaires sont les mucines (MUC). Elles sont contenues dans des granules cytoplasmiques des cellules caliciformes. Ces dernières sont des protéines

très fortement O-glycosylées ou N-glycosylées. Elles se composent d'un squelette protéique très riche en résidus sérine, thréonine et proline auquel sont liés de nombreux sucres (McGuckin *et al.*, 2011) (**Figure 35**).

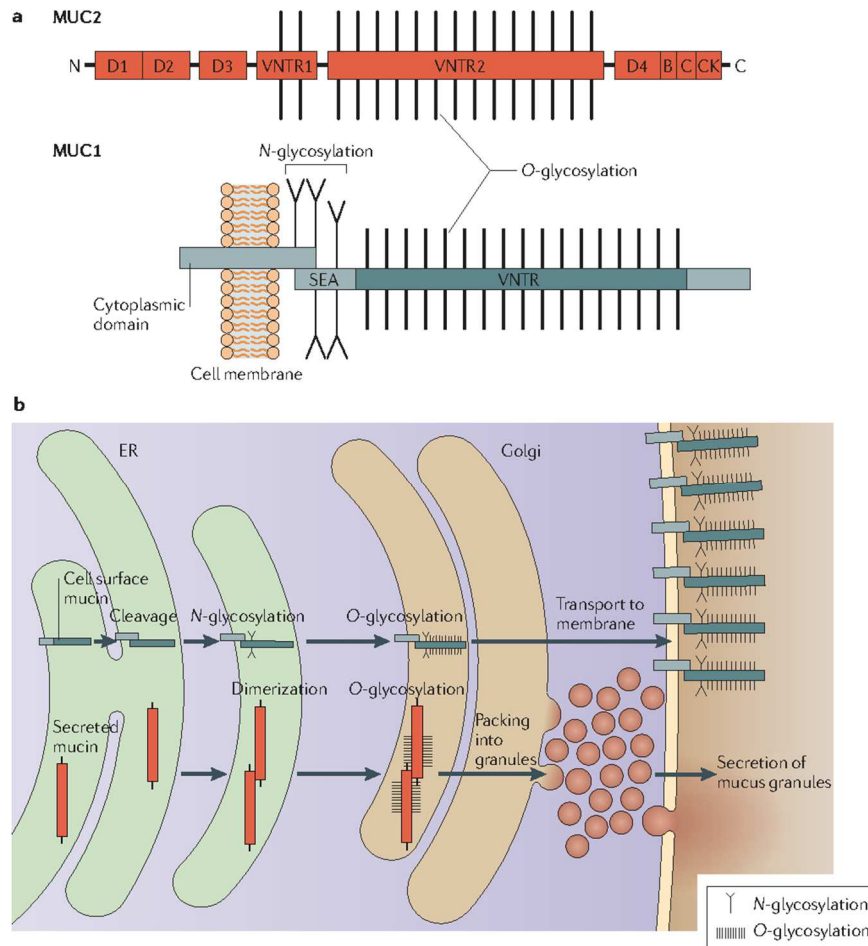


Figure 35 : (a) Structure de MUC2 sécrétée et de MUC1 transmembranaire. (b) Processus de maturation et de transport des MUC. D'après McGuckin *et al.*, 2011.

Selon Corfield *et al.*, on distingue 2 catégories de MUC (Corfield *et al.*, 2001) :

- Les MUC associées aux membranes cellulaires forment une première couche appelée glycocalyx de 1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur environ qui est présente au niveau de la surface apicale des cellules épithéliales. Il est à noter que le glycocalyx, en plus de sa très forte proportion en glycoprotéines contient des glycosaminoglycane et des glycolipides. Une seconde couche dite « interne » de plus grande épaisseur (50 à 100  $\mu\text{m}$  chez la souris) adhère ensuite au glycocalyx. Elles sont principalement composées des MUC1, MUC3, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15 et MUC17.

- Les MUC secrétées, MUC2, MUC5AC, MUC5B et MUC6 composent la couche externe du mucus, MUC2 étant la MUC la plus secrétée elle forme le squelette du mucus.

Le glycocalyx et la couche interne du mucus ne contiennent pas de bactéries du microbiote (Johansson *et al.*, 2011).

Le mucus assure principalement une fonction de défense contre les agents microbiens par sa composition riche en peptides antimicrobiens tels que les lysozymes, les lectines et les défensines. Les glycoprotéines du mucus assurent également une source d'énergie pour les bactéries du microbiote.

#### **4. L'épithélium intestinal**

Grâce à sa structure particulière et la présence de repliements, de villosités et microvillosités, la surface d'absorption de l'épithélium intestinal est considérablement augmentée et est estimée chez l'Homme à environ 300 m<sup>2</sup> selon les données les plus hautes et environ dix fois moins selon les plus faibles (Helander and Fändriks, 2014). Seule la paroi de l'intestin grêle possède ces villosités.

##### ***4.1 Les différents types cellulaires et leurs fonctions***

Quatre types de cellules composent l'épithélium intestinal : d'une part, les entérocytes qui sont des cellules absorptives et d'autre part, les cellules caliciformes, les cellules de Paneth et les cellules endocrines, qui sont toutes trois des cellules sécrétrices (**Figure 36**).

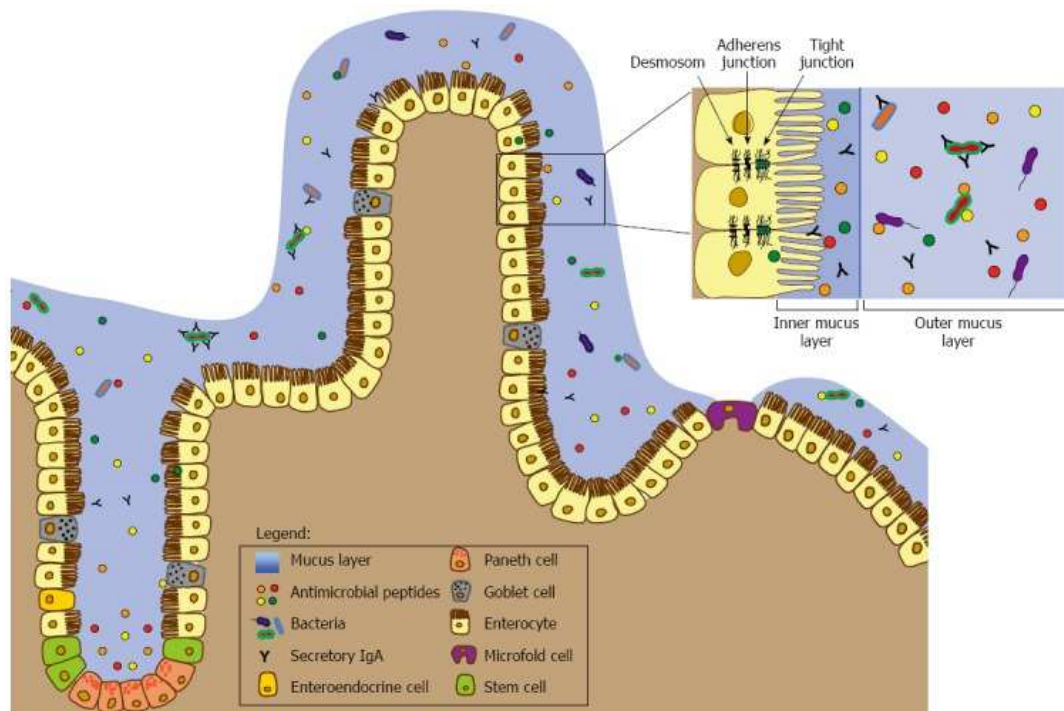


Figure 36 : Structure de l'épithélium intestinal et localisation de chaque type cellulaire. D'après Antoni et al., 2014.

Ces différents types cellulaires présents à la fois au niveau de l'intestin grêle et du côlon dérivent tous de cellules souches présentes au fond des cryptes intestinales appelées cryptes de Lieberkühn. La prolifération des cellules souches assure à l'épithélium intestinal un taux de renouvellement très élevé. Les cellules de ce tissu sont en effet renouvelées tous les 3 à 5 jours environ. Seules les cellules Paneth ont une durée de vie plus longue. Elles résident en moyenne 23 jours avant d'être éliminées par phagocytose dans les cryptes (**Figure 37**).



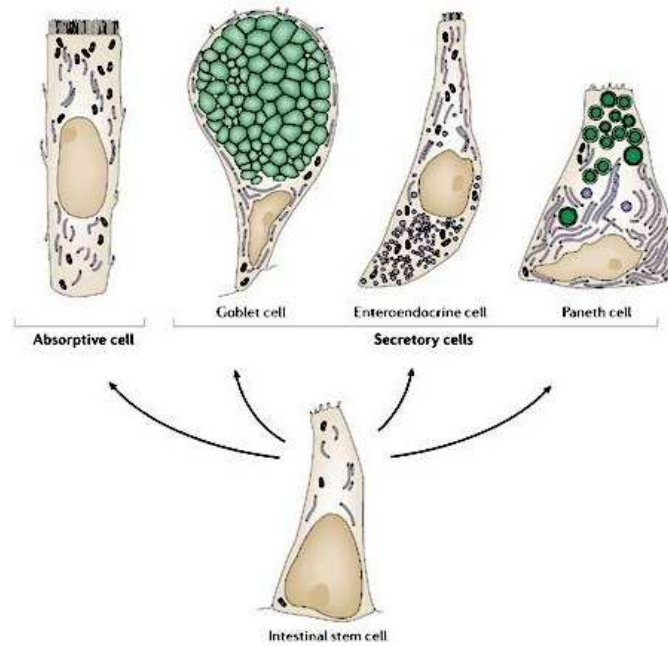


Figure 37 : Différenciation des cellules souches en différentes cellules intestinales. D'après Crosnier et al., 2006.

Les entérocytes constituent le type cellulaire majoritaire au niveau de l'épithélium. Ils assurent notamment l'absorption des nutriments, des électrolytes et de l'eau. La présence de microvillosités au niveau du pôle apical des entérocytes augmente considérablement la surface d'échange avec la lumière intestinale et joue un rôle prépondérant dans ces fonctions d'absorption. Les MUC secrétées par les cellules caliciformes déterminent les propriétés rhéologiques du mucus intestinal. Les cellules à mucus sont également responsables de la sécrétion des peptides en trèfle (*trefoil factors* ou TFF) qui sont impliqués notamment dans la régénération des muqueuses. Les cellules de Paneth localisées au fond des cryptes interagissent avec les cellules souches. Elles jouent un rôle de défense de la muqueuse intestinale en sécrétant des substances à action antimicrobienne telles que le lysozyme, la phospholipase A2 et des défensines. Les cellules endocrines représentent seulement 1% des cellules de l'épithélium digestif. Elles libèrent cependant un certain nombre d'hormones, telles que la sécrétine, la gastrine, la somatostatine, indispensables à la régulation des processus digestifs. Elles sont également impliquées dans les phénomènes d'angiogenèse et de différenciation cellulaire.



## 4.2 Perméabilité et transport

### 4.2.1 Les transporteurs

A l'image du tissu hépatique, de nombreux transporteurs sont également exprimés au niveau intestinal (*cf.* paragraphe 3.3 du métabolisme des xénobiotiques) Ces transporteurs ABC et SLC sont à la fois localisés au niveau des membranes apicale et basolatérale de l'entérocyte. Les transporteurs ABC assurent une fonction d'efflux des molécules de l'entérocyte vers la lumière du tube digestif ou le compartiment sanguin alors qu'à l'inverse, les transporteurs SLC sont en charge de l'influx des molécules du compartiment extracellulaire vers l'entérocyte (Figure 38).

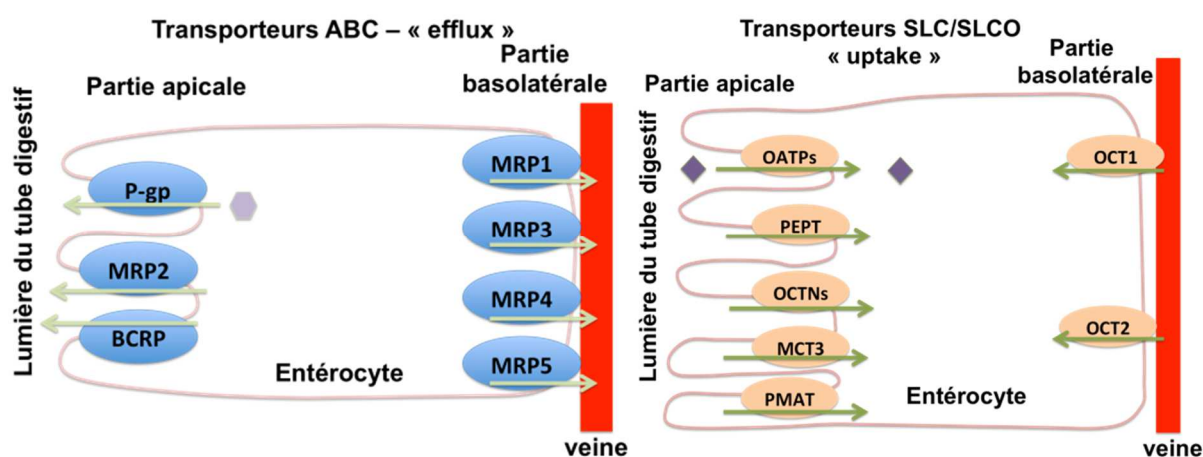


Figure 38 : Schéma représentatif des transporteurs ABC et SLC. D'après Jaeg, 2013.

### 4.2.2 Jonctions cellulaires

Les jonctions cellulaires jouent un rôle prépondérant dans la fonction de barrière de l'épithélium intestinal. Parmi les différents types de jonctions, on distingue les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes et hémidesmosomes ainsi que les jonctions *gap* ou communicantes. Ces jonctions assurent des connexions entre les cellules adjacentes mais permettent également d'établir des liens avec le cytosquelette des cellules formant ainsi un véritable continuum structurel. Les jonctions serrées impliquent deux types de protéines : les claudines et les occludines (Van Itallie and Anderson, 2014). Les occludines sont formées par quatre domaines transmembranaires et deux boucles extracellulaires. Elles jouent un rôle prépondérant dans la structure des jonctions serrées et dans la régulation de la perméabilité intestinale (Lee *et al.*, 2018). Les claudines ont la même structure que les occludines. Leurs boucles extracellulaires interagissent avec les protéines transmembranaires de la cellule adjacente afin de former une barrière ou des pores pour le passage de molécules. A ce jour 24

claudines ont été identifiées. Leur expression varie légèrement en fonction du segment intestinal considéré (Lu *et al.*, 2013). Comme les occludines, elles assurent une fonction clé dans la régulation du transport paracellulaire. Les jonctions serrées font également intervenir d'autres protéines cytoplasmiques comme les Zonula Occludens (ZO). Elles comptent trois membres ZO-1, ZO-2 et ZO-3. Elles jouent le rôle d'adaptateurs protéiques permettant la fixation des claudines et occludines aux filaments d'actine (Garcia *et al.*, 2018 ; Rodgers and Fanning, 2011 ; Van Itallie *et al.*, 2009). Au niveau de leur partie N-terminale se fixent de nombreuses protéines des jonctions serrées alors que leur partie C-terminale interagit avec le cytosquelette d'actine. Elles sont indispensables à la régulation et au maintien de la structure des jonctions serrées (Haskins *et al.*, 1998 ; Lee *et al.*, 2018). Les JAM (*junctional adhesion molecule*) font partie de la superfamille des immunoglobulines (Ig) et sont également impliquées dans les jonctions serrées. Elles sont caractérisées par deux domaines extracellulaires, un domaine transmembranaire et un domaine C-terminal intracellulaire. Ce sont les domaines extracellulaires qui assurent les interactions hémophiliques responsables de la formation et le maintien des jonctions serrées. Ce sont les isoformes JAM-A et JAM-4 qui sont les plus exprimées au niveau de la barrière intestinale (Bazzoni, 2003).

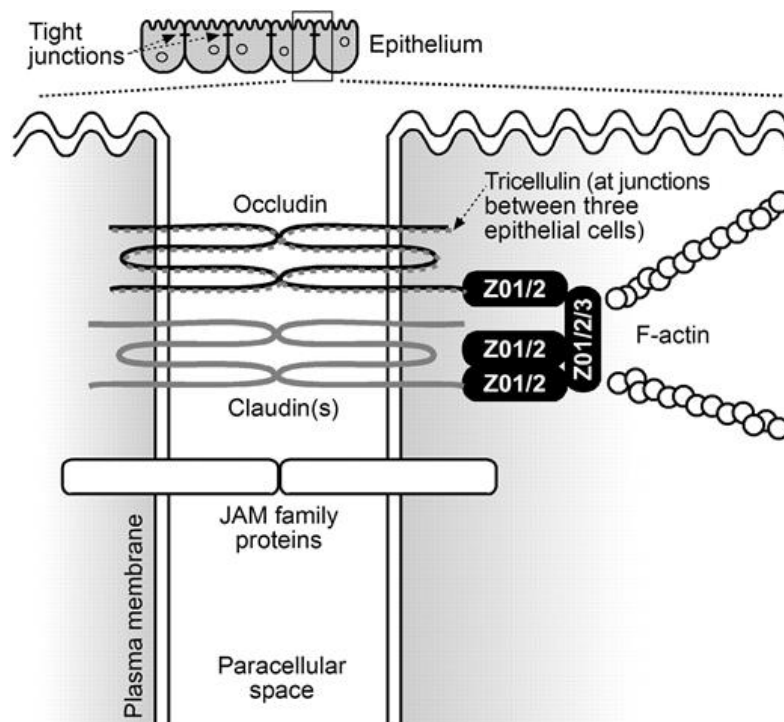


Figure 39 : Structure d'une jonction serrée. D'après Ulluwishewa *et al.*, 2011.

#### 4.2.3 Régulation des jonctions serrées

La régulation des jonctions serrées, c'est-à-dire leur assemblage, leur maintien ou leur désassemblage peut être influencée par différents stimuli. Cette régulation fait intervenir différents acteurs protéiques et notamment des kinases et phosphatases qui vont phosphoryler ou déphosphoryler les occludines. Le maintien des jonctions serrées nécessite la phosphorylation de résidus sérine et thréonine des occludines alors que leur déphosphorylation entraîne le désassemblage des jonctions. De plus, les sites de phosphorylation de l'occludine sont situés dans le domaine d'interaction avec la protéine ZO-1 (Jain, 2011).

La protéine kinase A (PKA) et C (PKC), les protéines G, les protéines Rho GTPases ou encore de la *myosin light-chain kinase* (MLCK) peuvent induire des modifications de la perméabilité intestinale en régulant les niveaux de phosphorylation et déphosphorylation des protéines impliquées dans les jonctions serrées (Ulluwishewa *et al.*, 2011). L'ouverture des jonctions serrées est notamment régulée par la contraction et la décontraction des filaments du cytosquelette. Ce sont les protéines MLCK et PKC qui régulent principalement les jonctions serrées. MLCK phosphoryle la chaîne légère de la myosine (MLC) en réponse à différents stimuli intracellulaires. Le plus important est l'inactivation par la PKC de la phosphatase (MLP) qui déphosphoryle MLC (Van Spaendonk *et al.*, 2017). Les protéines ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) et ROCK (*Rho-associated protein kinase*) régulent également l'activation ou l'inactivation de MLCK (Jacob *et al.*, 2005 ; Riento and Ridley, 2003). Le statut de phosphorylation de MLC induit un changement de conformation du filament de myosine ce qui provoque son déplacement le long du filament d'actine. Le cytosquelette subit alors une tension qui aboutit finalement à une perturbation des jonctions serrées (Rigor *et al.*, 2013).

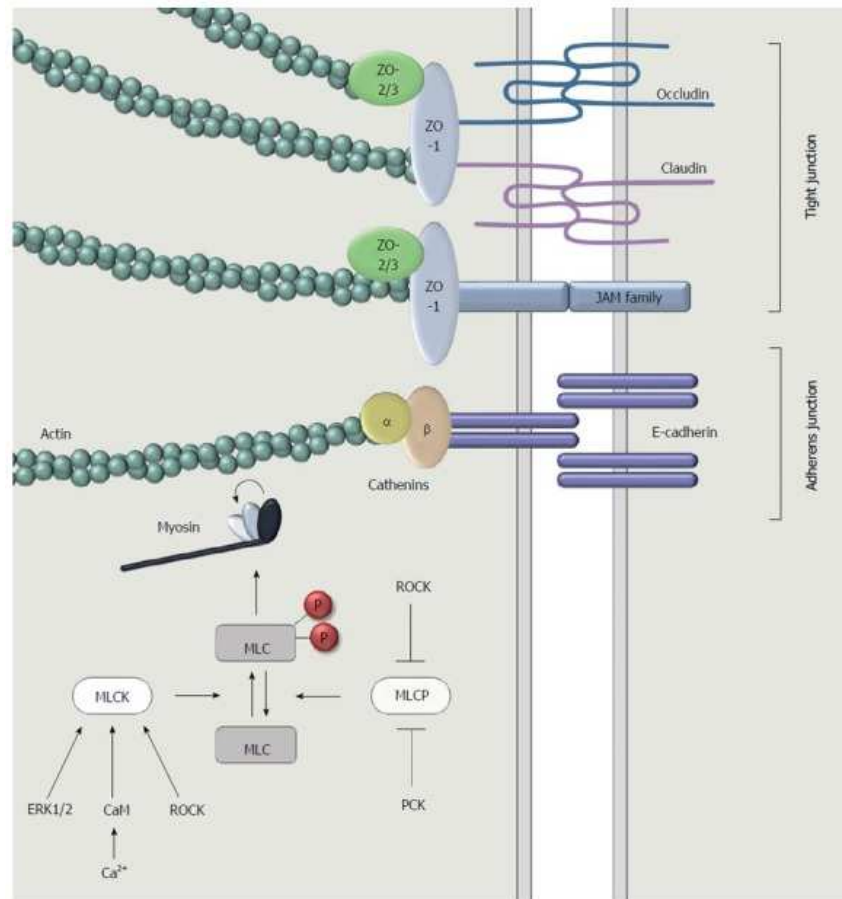


Figure 40 : Régulation des jonctions serrées par les phosphatases et kinases. D'après Van Spaendonk et al., 2017.

#### 4.2.4 Rupture des jonctions serrées

De nombreux facteurs sont connus pour altérer l'homéostasie des jonctions serrées tels que les cytokines pro-inflammatoires, le LPS (lipopolysaccharides) ou certaines pathologies (Lee et al., 2018).

Les médiateurs pro-inflammatoires peuvent en effet augmenter la perméabilité intestinale. C'est le cas de l'interféron (IFN)  $\gamma$  qui induit une redistribution des protéines des jonctions serrées et un réarrangement du cytosquelette d'actine (Bruewer et al., 2005). Le TNF- $\alpha$  est également connu pour réguler l'expression de MLCK. Le mécanisme proposé est le suivant : la région promotrice de MLCK possède un site de liaison à NF- $\kappa$ B. Le TNF- $\alpha$  active la voie NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor Kappa B*) et donc la transcription de MLCK. L'augmentation de MLCK et de son activité aboutit finalement à une augmentation de la perméabilité intestinale (Ma et al., 2005). De nombreuses interleukines telles que l'IL-1 $\beta$  ou l'IL-6 sont aussi décrites comme induisant une augmentation de la perméabilité (Al-Sadi et al., 2008 ; Suzuki et al.,

2011). A contrario, l'IL-10, l'*Epidermal Growth Factor* (EGF) ou le TGF- $\beta$  assurent plutôt un rôle protecteur de la barrière intestinale (Lee, 2015).

Le LPS, un composant des parois extérieures des bactéries gram négatif, a été décrit comme modulant significativement la perméabilité paracellulaire. Il induit une modification de l'expression et de la localisation de ZO-1 et d'occludines de façon dose dépendante. La protéine MLCK semble être impliquée dans le mécanisme de régulation (Sheth *et al.*, 2007). La régulation de l'expression des jonctions serrées par le LPS pourrait également faire intervenir le récepteur *Toll-like* (TLR) 4 (Lee *et al.*, 2018).

Les maladies inflammatoires de l'intestin, l'obésité ou les *Non Alcoholic Steato Hepatitis* (NASH) sont des conditions pathologiques associées à une dérégulation des jonctions serrées et donc une augmentation de la perméabilité intestinale (Lee *et al.*, 2018). En effet, de nombreuses études ont montré que dans le cas de la maladie de Crohn, une maladie inflammatoire de l'intestin, une diminution et une redistribution des claudines 3, 5 et 8, et de JAM-A sont décrites alors que l'expression de la claudine 2, une protéine favorisant la création de pores dans les jonctions est augmentée (Vetrano *et al.*, 2008 ; Zeissig *et al.*, 2007). Par ailleurs, la surexpression de MLCK est également observée (Blair *et al.*, 2006). Ces modifications d'expressions protéiques ont lieu dans un contexte très inflammatoire. Des niveaux importants de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 et IL-1 $\beta$  sont mesurés et décrits comme responsables de modulation des jonctions serrées (Lee, 2015).

L'alimentation peut également influencer la perméabilité de la barrière intestinale. Les flavonoïdes sont connus pour moduler l'expression de nombreuses protéines impliquées dans les jonctions serrées (Lee *et al.*, 2018 ; Suzuki and Hara, 2011). Des extraits de tilleul, d'anis étoilé ou de thé noir permettent de réduire la perméabilité intestinale (Konishi, 2003). Un certain nombre d'épices ont également été identifiées comme pouvant moduler la perméabilité intestinale. C'est le cas du piment de Cayenne ou du paprika qui augmentent la perméabilité (Jensen-Jarolim *et al.*, 1998). A contrario, des extraits de poivre noir ou de noix de muscade semblent favoriser le maintien de la fonction de barrière.

#### 4.2.5 Autres types de jonctions cellulaires

Différents types de jonctions autres que les jonctions serrées ont été identifiés au niveau de l'épithélium intestinal. Elles forment toutes un complexe qui assure le maintien de l'intégrité

de la barrière. On distingue du pôle apical au pôle basal de la cellule (Alberts *et al.*, 2002 ; Zouiten-Mekki *et al.*, 2013) (**Figure 41**) :

- Les jonctions adhérentes sont des jonctions d'ancrage qui ceinturent la cellule. Elles impliquent différentes protéines transmembranaires parmi lesquelles les cadhérines, les caténines et la vinculine. Elles sont situées immédiatement en dessous des jonctions serrées au pôle basolatéral et permettent de réunir entre elles des cellules épithéliales adjacentes par ancrage aux filaments d'actine intracellulaires.
- Les desmosomes sont des jonctions d'ancrage reliées au cytosquelette. Elles permettent le maintien de la forme et de la résistance des cellules. Elles sont formées par un certain nombre de protéines telles que les desmoglénines, desmocollines, plakoglobines et desmoplakines. Ces dernières lient le cytosquelette aux protéines transmembranaires.
- Les jonctions *gap* sont composées de connexines. Ces protéines forment des connexons qui sont en réalité des héli-canaux faisant partie de la membrane cellulaire de chacune des cellules adjacentes. Elles permettent notamment le passage de molécules de faible poids moléculaire tels que des métabolites ou des seconds messagers (calcium et AMPc (adénosine monophosphate cyclique)).
- Les hémidesmosomes qui assurent l'ancrage à la lame basale au niveau du pôle basolatéral des cellules.

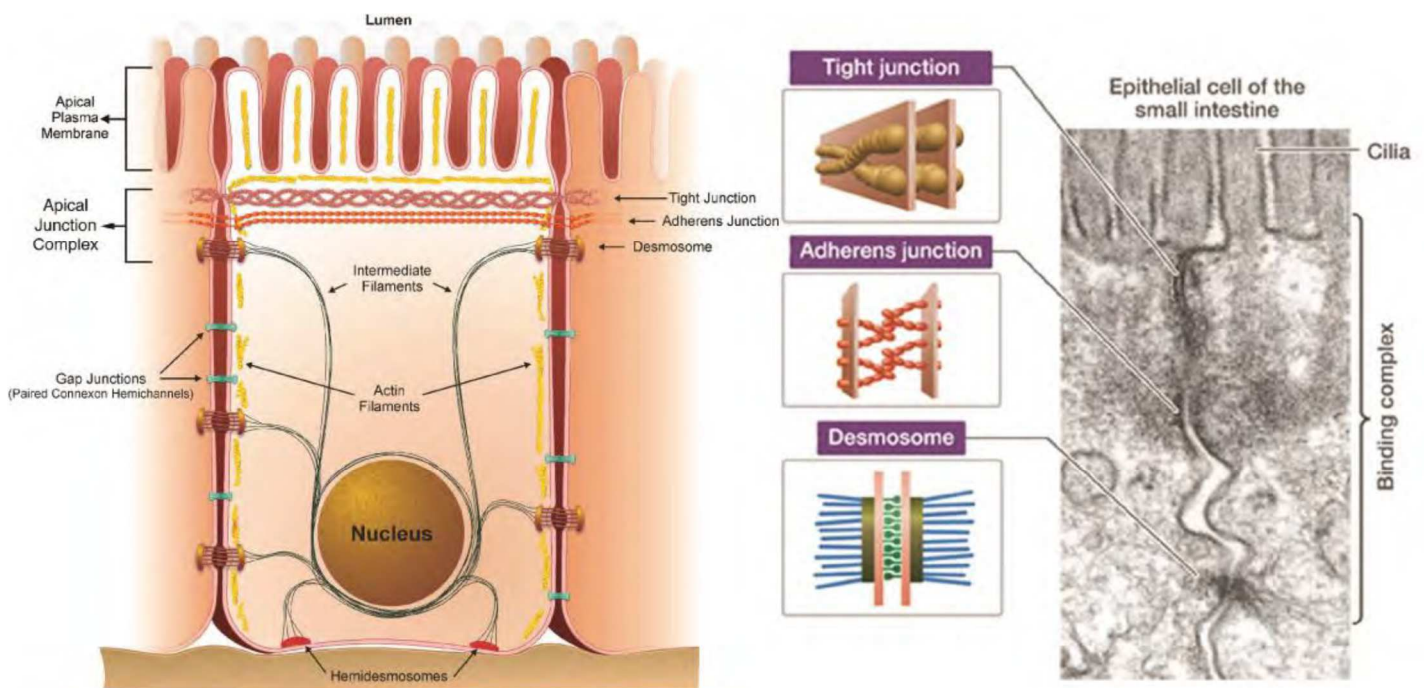


Figure 41 : Les différentes jonctions cellulaires de l'épithélium intestinal. D'après Guerrero, 2016.



## 5. Tissus lymphoïdes associés à l'intestin et plaques de Peyer

Les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT pour *gut associated lymphoid tissue*) constituent la dernière ligne de défense de la barrière intestinale. Les GALT sont constitués de sites dits « inducteurs » de la réponse immunitaire et de sites qualifiés d'« effecteurs ». Les premiers incluent principalement les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques alors que les seconds sont les cellules immunitaires présentes dans la lamina propria (Mowat, 2003) (**Figure 42**). Les plaques de Peyer sont des structures disposées le long de l'épithélium intestinal. Elles sont associées à des follicules lymphoïdes sous-jacents contenant diverses cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques, les macrophages, les lymphocytes T et les lymphocytes B (Da Silva *et al.*, 2017 ; Heel *et al.*, 1997 ; Reboldi and Cyster, 2016). Ces structures sont séparées de la lumière du tube par des cellules M, qui sont des cellules intestinales particulières ne possédant pas de bordure en brosse. De plus, la couche de mucus présente au niveau de ces zones est beaucoup moins épaisse. La lamina propria quant à elle présente des cellules de l'immunité innée et des lymphocytes T prêts à rejoindre l'épithélium

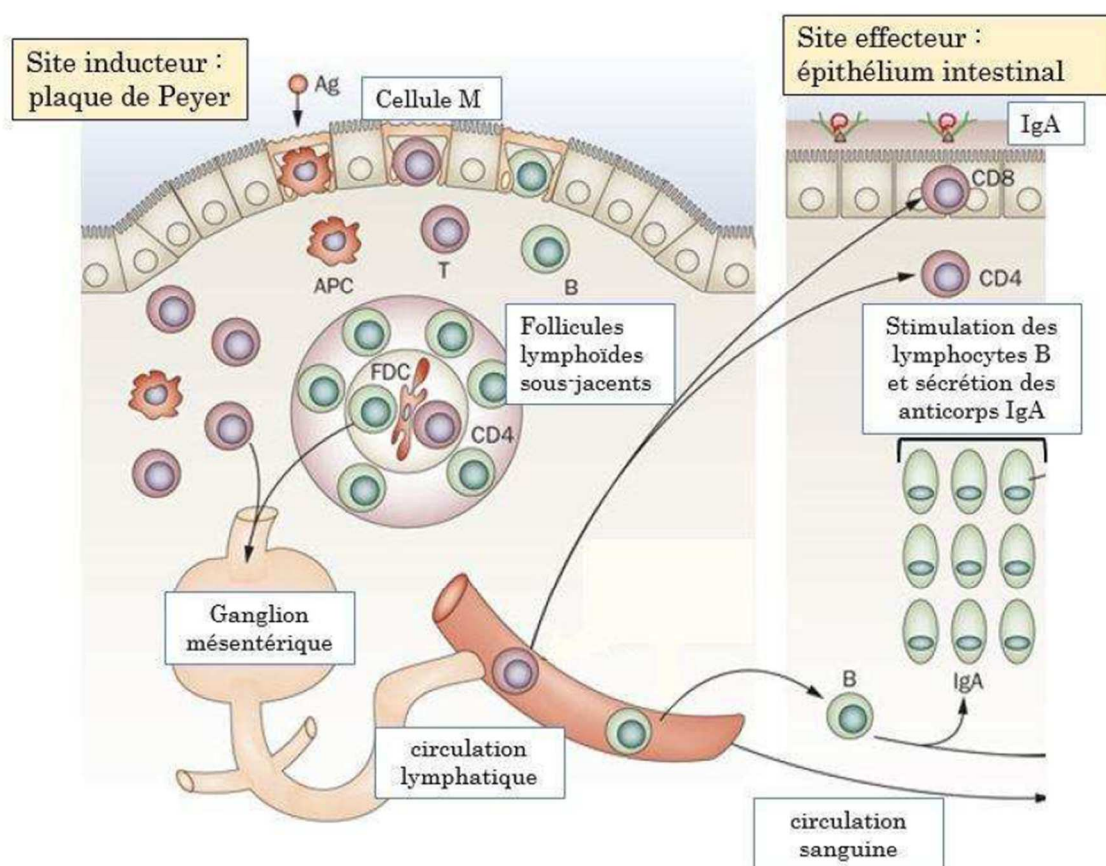


Figure 42 : Organisation des tissus lymphoïdes associés à l'intestin et interactions entre les cellules des sites inducteur et effecteur. D'après Dorier, 2016.

**TOXICITÉ DES  
NANOPARTICULES :  
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

---





## I. LA NANOTOXICOLOGIE

La nanotoxicologie est une science qui vise à étudier les effets sur la santé des NPs et plus généralement des matériaux à échelle nanométrique synthétisés ou non par l'Homme. Cette science qui a émergé dans les années 1980 a connu et connaît encore actuellement un essor significatif dû au développement, à l'utilisation croissante des NPs et au nombre toujours plus conséquent de questions qu'elles soulèvent quant à leurs effets potentiellement néfastes sur notre organisme. Les chiffres relatifs au nombre de publications scientifiques dans ce domaine transcrivent parfaitement cette tendance.

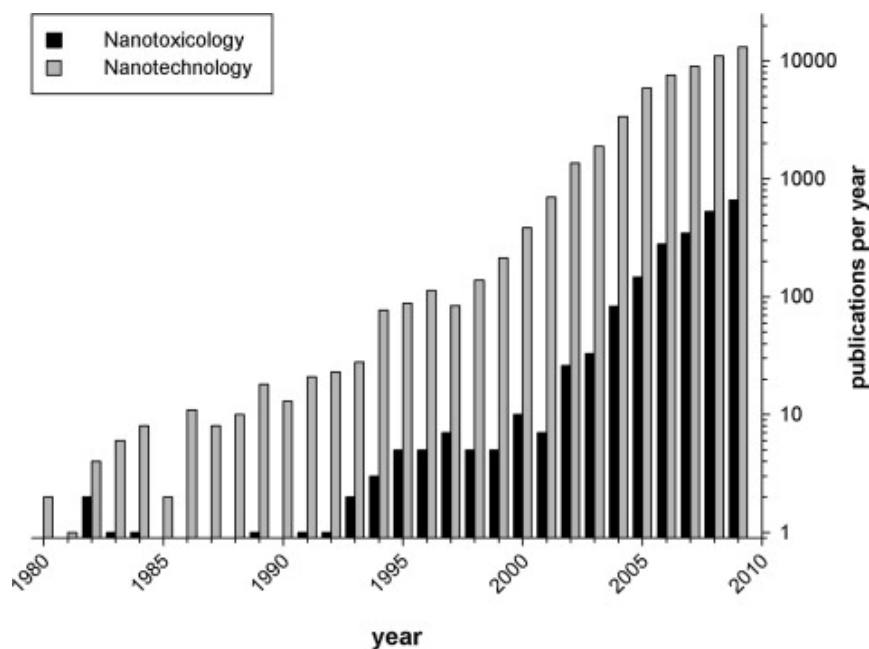


Figure 43 : Evolution du nombre de publications en nanotoxicologie et nanotechnologie de 1980 à 2010. D'après Sauer et al., 2011.

## II. FACTEURS DE TOXICITE DES NANOPARTICULES

En plus des concentrations, doses et durée d'exposition choisies, de nombreux paramètres physico-chimiques des NPs comme leur taille, leur charge de surface, leur forme, leur composition ou encore leur degré d'agrégation peuvent influencer les données de toxicité obtenues (**Figure 44**).

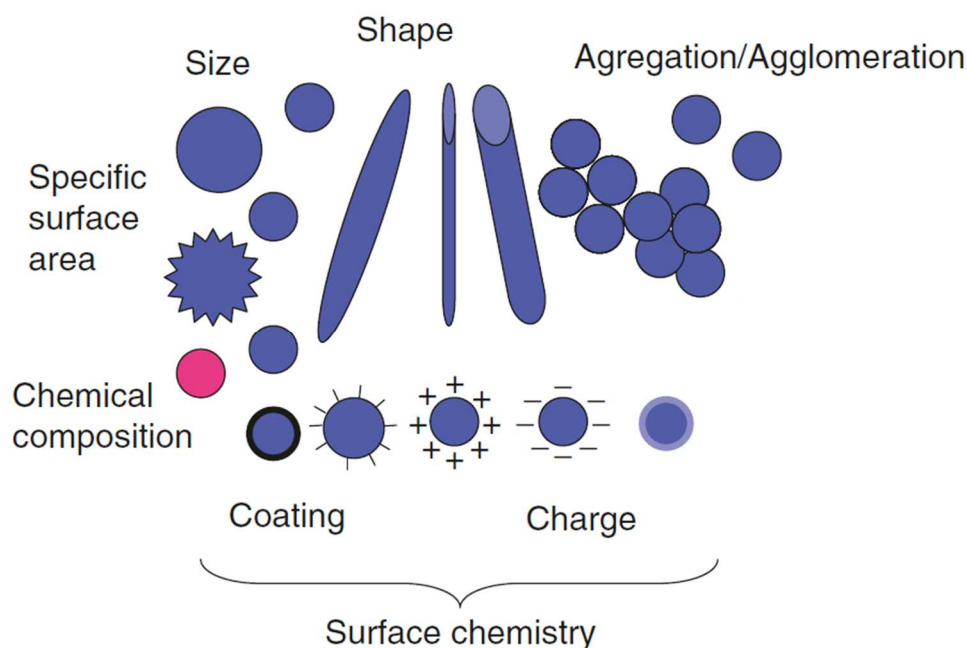


Figure 44 : Caractéristiques physico-chimiques des NPs impliquées dans leur activité biologique.

D'après Marano *et al.*, 2016.

### 1. La taille

La taille des NPs est l'un des facteurs déterminant le plus la toxicité des NPs. Ce paramètre gouverne notamment la profondeur d'atteinte dans l'organisme et le degré d'internalisation au niveau cellulaire des NPs. Braakhuis *et al.* ont démontré que la quantité de NPs d'argent de 14 nm est 3,5 fois supérieure à celle des NPs de 410 nm au niveau des alvéoles pulmonaires (Braakhuis *et al.*, 2014). Par ailleurs, les mécanismes d'internalisation divergent en fonction de la taille des NPs. La phagocytose concerne les très grosses NPs alors que les processus d'endocytose sont plus fréquents pour les NPs dont la taille est inférieure à 200 nm environ. Les voies de la pinocytose et de la macropinocytose prennent en charge des NPs de taille variable. En outre, un certain nombre d'études ont montré qu'un taux maximum

d'internalisation est observé avec une taille spécifique de NPs (50 nm environ). Des NPs plus larges, au-delà de 100 nm et plus petites, en dessous de 30 nm environ, ont un taux d'internalisation significativement réduit (Foroozandeh and Aziz, 2018).

Au regard de la littérature, plus les NPs sont de petite taille plus leur potentiel cytotoxique semble significatif. Ceci s'explique en partie par la surface spécifique des NPs. La surface de contact avec l'environnement biologique est d'autant plus grande que les NPs sont petites. Pan *et al.* ont par exemple étudié la toxicité de NPs d'or dont la taille varie entre 0,8 et 15 nm dans des lignées cellulaires de fibroblastes, de cellules épithéliales, de macrophages et de mélanomes. Leurs résultats montrent que les NPs de 15 nm sont 60 fois moins toxiques que les NPs de 1,4 nm. A noter que la mort cellulaire est également fonction de la taille des NPs. L'apoptose est induite par des NPs de 1,2 nm alors que la nécrose survient après exposition à des NPs de 1,4 nm (Pan *et al.*, 2007). De plus, l'étude de la distribution intracellulaire de NPs d'or de très petite taille par microscopie électronique à transmission dans des cellules de cancer du sein a montré que des NPs de 2 et 6 nm peuvent entrer dans le noyau et induire ainsi un effet génotoxique alors que celles de 10 et 16 nm sont exclusivement présentes dans le cytoplasme (Huo *et al.*, 2014).

## 2. La composition chimique

La composition des NPs est un autre facteur pouvant moduler significativement les effets cytotoxiques des NPs. Une étude menée par Yang *et al.* a comparé l'impact de NPs de TiO<sub>2</sub>, de SiO<sub>2</sub> et de ZnO de taille identiques (20 nm) dans des cultures primaires de fibroblastes de souris. Les NPs de ZnO induisent une mort cellulaire, une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des dommages à l'ADN plus importants que les NPs non métalliques (Yang *et al.*, 2009). La forme cristalline des matériaux composant les NPs peut également modifier leur toxicité. C'est le cas du TiO<sub>2</sub>. Celui-ci existe sous trois formes cristallines différentes : la rutile, l'anatase et la brookite, les deux premières formes étant très prépondérantes. Gurr *et al.* ont montré dans une lignée cellulaire épithéliale bronchique qu'à taille identique (200 nm), des NPs de TiO<sub>2</sub> de forme rutile induisent un stress oxydant et des dommages à l'ADN mais pas les NPs sous forme anatase (Gurr *et al.*, 2005). De plus, dans une étude plus récente, l'impact sur la viabilité cellulaire de sept types de NPs à base de métaux de transition a été analysé dans deux lignées de cellules épithéliales pulmonaires. Les données révèlent que la cytotoxicité est proportionnelle au numéro atomique de l'élément considéré (Chusuei *et al.*, 2013). En modulant significativement la charge de surface des NPs, les groupements chimiques présents à la surface

des NPs constituent aussi un paramètre clé modifiant la stabilité des NPs, leur internalisation cellulaire et *in fine* leur potentielle toxicité (Foroozandeh and Aziz, 2018).

### 3. La charge de surface

La charge de surface joue aussi un rôle clef dans le potentiel cytotoxique des NPs car elle détermine de façon conséquente leur capacité d'interaction avec l'environnement biologique. Les NPs chargées semblent plus cytotoxiques que les formes neutres (Schaeublin *et al.*, 2011). Par ailleurs, les NPs de SiO<sub>2</sub>, de TiO<sub>2</sub> et d'or dont la charge de surface est positive sont plus cytotoxiques que celles de taille similaire de charge négative (Bhattacharjee *et al.*, 2010 ; Goodman *et al.*, 2004 ; Oh *et al.*, 2010). Kai *et al.* ont comparé la toxicité de trois types de NPs d'oxyde de Fe présentant un potentiel zêta de 4,5, 14,4 et 23,7 mV dans des cellules d'hépatocarcinome humain. Les données obtenues suggèrent que la toxicité croît avec le potentiel zêta (Kai *et al.*, 2011). Ceci peut s'expliquer par des différences d'attraction électrostatique. La membrane cellulaire étant chargée négativement, les NPs de potentiel de surface positif peuvent plus facilement interagir et pénétrer dans les cellules que celles qui sont neutres ou chargées négativement. De plus, il a été montré que la charge de surface des NPs peut également avoir un impact direct sur le cycle cellulaire. En effet, des NPs de polystyrène chargées positivement peuvent se fixer à l'ADN qui lui présente des charges négatives. Le cycle cellulaire est alors modifié (Liu *et al.*, 2011). La charge de surface des NPs en raison à nouveau des différences d'attraction électrostatique peut également influencer les processus d'internalisation. Ceci a été démontré dans une étude de Graf *et al.* dans laquelle le taux d'internalisation de NPs de silice dans des cellules HeLa a été évalué. Les NPs de silice fonctionnalisées avec des acides aminés et présentant une charge de surface très positive sont fortement internalisées comparées à des NPs de silice fonctionnalisées avec du PEG ou non fonctionnalisées et dont le potentiel zêta est négatif (Graf *et al.*, 2012).

### 4. Le degré d'agrégation/d'agglomération

Le degré d'agrégation/d'agglomération des NPs est un facteur supplémentaire à considérer au regard de la toxicité des NPs. En effet, celles-ci peuvent former des agrégats ou agglomérats de plusieurs centaines de nm de diamètre. La cohésion entre les NPs au sein des agglomérats résulte des forces de Van der Waals, des forces électrostatiques ou des forces développées par les tensions de surface (Witschger and Fabriès, 2005). La surface de contact avec l'environnement biologique de ces amas de NPs est fonction de leur surface spécifique.

La réactivité biologique de l'agglomérat est potentiellement beaucoup plus importante car sa surface spécifique est la somme des surfaces des NPs qui le composent (Nichols *et al.*, 2002). Des liaisons plus fortes peuvent aussi s'établir entre des NPs libres pour former des agrégats. Contrairement aux agglomérats, la surface spécifique d'un agrégat est inférieure à celle des NPs isolées (Nichols *et al.*, 2002). La formation d'agrégats et agglomérats peut aboutir à l'apparition de phénomènes de sédimentation modulant davantage encore leur internalisation et leur potentiel toxique.

## 5. La forme

La forme est un autre paramètre pouvant influencer la toxicité des NPs. Dans une lignée de macrophages murins, Lee *et al.* ont en effet montré qu'en plus du facteur taille, la forme des NPs est un facteur contribuant à leur toxicité. A concentration égale, les taux de lactate déshydrogénase et le niveau d'induction de nécrose sont très fortement supérieurs après incubation avec des nanorodes (ou nanobâtonnets) d'oxyde de fer que des NPs sphériques de même composition (Lee *et al.*, 2014). Comme d'autres paramètres physico-chimiques, la forme peut aussi impacter les interactions cellulaires et notamment le taux d'internalisation. Chithrani *et al.* ont montré que les NPs d'or de forme sphérique sont plus efficacement endocytées que les NPs en forme de bâtonnets par les cellules HeLa (Chithrani *et al.*, 2006). Enfin, la localisation au niveau cellulaire peut également être fonction de la forme des NPs. Xu *et al.* ont constaté que des nanorodes (50-150 nm de largeur et 10-20 nm d'épaisseur) d'hydroxydes doubles lamellaires sont rapidement transloqués dans le noyau et sont donc potentiellement plus cytotoxiques que les nanofeuillets (30-60 nm de largeur et 100-200 nm de longueur) retenus dans le cytoplasme (Xu *et al.*, 2008).

## 6. Caractérisation

Les propriétés physico-chimiques des NPs pouvant significativement moduler leur impact cytotoxique, il est impératif de parfaitement les caractériser avant toute étude toxicologique. Il existe un certain nombre de techniques qui permettent de définir les paramètres de taille, d'agrégation, de forme et de charge de surface (Jones and Grainger, 2009). Les plus communes sont :

- La microscopie électronique à transmission ou à balayage. En fournissant une image des NPs, un accès direct à leur taille, à leur forme et à leur degré d'agrégation est permis. Cependant, la préparation des échantillons (dessiccation) peut potentiellement générer

des artefacts et l'observation nécessite la mise en œuvre d'équipement très onéreux (Jones and Grainger, 2009).

- La diffusion dynamique de lumière (DLS pour *dynamic light scattering*). Cette technique est basée sur le mouvement Brownien des NPs. Plus les NPs sont petites plus leur mouvement Brownien induit par les molécules de solvant est rapide. Ce mouvement aléatoire est modélisé par la relation de Stokes-Einstein. Il est important de préciser que les mesures de taille sont réalisées sur des particules en solution. Ce qui est donc déterminé par diffusion dynamique de la lumière est la taille hydrodynamique, c'est-à-dire la taille d'une sphère qui diffuserait la lumière de la même façon que sa particule (Stetefeld *et al.*, 2016). Cette technique d'analyse rapide est très couramment utilisée pour tout type de particules à échelle micro ou nanométrique. Elle présente également l'avantage de déterminer la taille dans le milieu d'étude des NPs. Cette technique permet ainsi de mettre en évidence les phénomènes d'agglomération et d'agrégation des NPs.
- La spectroscopie optique UV-visible. Cette technique est exclusivement réservée aux NPs métalliques. Elle utilise les propriétés d'absorption ou de diffusion de la lumière des métaux.
- La microscopie à force atomique (AFM). Une pointe est placée en contact physique avec un échantillon. Une force répulsive apparaît en raison de la répulsion des électrons de la surface de l'échantillon et de la pointe. La pointe est alors déformée. Sa variation de hauteur donne la hauteur de la surface à l'endroit étudié. Le balayage de la pointe permet finalement d'obtenir une image topographique tridimensionnelle de l'échantillon. Cette technique a permis la visualisation d'objets à l'échelle nanométrique où l'optique conventionnelle ne peut pas les résoudre en raison de la nature ondulatoire de la lumière. Toutefois, si les particules sont déposées sur des substrats rugueux, l'analyse de la taille des particules peut être problématique. Le substrat sur lequel sont déposées les NPs peut fortement influencer l'analyse en modifiant la distribution et l'agrégation des NPs (Klapetek *et al.*, 2011).
- D'autres techniques basées sur l'anisotropie (ou polarisation) de fluorescence, la diffraction aux rayons X la spectrométrie de masse ou la spectroscopie RAMAN peuvent permettre de déterminer certains paramètres des NPs tels que la taille et/ou la structure cristalline et/ou la composition des nanomatériaux (Gouadec and Colombari, 2007 ; Zhang *et al.*, 2015).

Le potentiel zêta peut être déterminé par mesure de la mobilité électrophorétique. Pour ce faire, un champ électrique est appliqué à une suspension de NPs. Celles-ci se déplacent plus ou moins rapidement en fonction de leur potentiel zêta. Le déplacement des NPs ou mobilité électrophorétique est mesurée à l'aide d'une technique interférométrique laser (Caputo, 2016).



### III. OUTILS ET TESTS POUR L'ÉVALUATION TOXICOLOGIQUE

#### 1. Modèles hépatiques

Un certain nombre de modèles *in vitro* de foie ont été développés afin de tester entre autres la toxicité de composés et ceci dans le but de prédire les résultats obtenus *in vivo* mais aussi afin de limiter le recours à l'expérimentation animale.

##### 1.1 Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires constituent l'un des outils les plus exploités dans les études toxicologiques. Les lignées cellulaires d'hépatocytes humains les plus communes dérivent de tumeurs, par exemple les lignées HepG2, Hep3B, PLC/PRFs Huh7, HBG ou encore F2N-4 alors que les lignées murines les plus connues sont les cellules BRL 3A ou H4 II EC3 (Guguen-Guillouzo and Guillouzo, 2010). La première d'entre elles à avoir été utilisée comme modèle dans une étude toxicologique est la lignée HepG2 développée dans les années 1970 (Knowles and Aden, 1983). Selon, l'article de Diamond *et al.* paru en 1980, cette lignée pourrait permettre d'étudier l'activation métabolique de xénobiotiques par le tissu humain et être utilisée dans des tests permettant l'identification de composés présentant un potentiel cancérigène pour l'Homme (Diamond *et al.*, 1980). Les cellules HepG2 expriment de nombreux gènes spécifiques du tissu hépatique. Cependant, ces cellules expriment peu ou de façon variable les principaux CYP impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques. La lignée HepaRG a été développée plus récemment dans les années 2000. Ces cellules présentent une morphologie similaire aux hépatocytes en cultures primaires, expriment des enzymes de phase I et de phase II, différents transporteurs d'influx et d'efflux et des facteurs nucléaires (Guguen-Guillouzo and Guillouzo, 2010). Ce haut degré de ressemblance phénotypique avec les hépatocytes primaires peut en partie s'expliquer par le fait que les cellules HepaRG expriment près de 85% des gènes constitutivement exprimés dans des hépatocytes primaires (Guguen-Guillouzo *et al.*, 2010). Les lignées cellulaires sont représentatives d'un seul phénotype, les données obtenues grâce à elles ne permettent donc pas de prendre en considération les variabilités interindividuelles limitant donc leur valeur prédictive dans la population générale.

##### 1.2 Cultures primaires

Les hépatocytes primaires sont obtenus à partir de fragments de foie ou de foie entier. Les hépatocytes sont obtenus après digestion du tissu à l'aide d'enzymes telles que la collagénase.

Contrairement aux lignées cellulaires, la culture primaire d'hépatocytes de différents donneurs et espèces permet de mettre rapidement en évidence des différences interindividuelles et interspèces. Les fonctions et le phénotype des hépatocytes primaires sont très similaires à ceux de leurs homologues *in vivo*. Cependant, la modification des jonctions intercellulaires et la disparition des canaux biliaires constituent deux différences notables (Guguen-Guillouzo and Guillouzo, 2010). Le paramètre le plus limitant de ce modèle est sa durée de vie. En effet, l'expression des ARNm des principaux cytochromes P450 peut décroître très rapidement (LeCluyse, 2001 ; Nelson *et al.*, 1982). De façon générale, les capacités métaboliques de ces cellules peuvent être maintenues jusqu'à 72 heures environ. Des méthodes ont été développées afin de conserver sur un plus long terme les propriétés des hépatocytes primaires. L'une d'elles consiste à placer les hépatocytes entre deux matrices de collagène. Ainsi, la viabilité cellulaire, la morphologie, l'excrétion de bile et d'albumine et l'activité des enzymes de phase II sont maintenues (Dunn *et al.*, 1989).

Les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) peuvent être différenciées en hépatocytes en supplémentant le milieu à l'aide de HGF, EGF, oncostatine M et *fibroblast growth factor* (FGF), activine A, dexaméthasone et insuline (LeCluyse *et al.*, 2012 ; Soldatow *et al.*, 2013). Cependant, leur utilisation présente plusieurs inconvénients. L'expression des enzymes hépatiques est plus proche de celle des hépatocytes fœtaux que des hépatocytes matures (LeCluyse *et al.*, 2012). Comme les hépatocytes primaires, leur activité décroît rapidement. Enfin, le processus de différenciation et l'expression des gènes sont également très variables en fonction de l'origine des cellules souches (Marchetto *et al.*, 2009). Ainsi, ces divers inconvénients limitent drastiquement leur utilisation comme modèle pour le développement et l'évaluation toxicologique de composés.

### **1.3 Les modèles 3D**

Le microenvironnement cellulaire hépatique est primordial pour maintenir les fonctions normales des hépatocytes, c'est pourquoi depuis une vingtaine d'années environ des modèles en trois dimensions ont été développés. Les sphéroïdes sont des petits amas de cellules qui se forment après ensemencement sur des surfaces de faible adhérence ou, dans des cultures rotatives ou selon la méthode de la goutte suspendue. Leur utilisation présente plusieurs avantages tels que le rétablissement de la polarité cellulaire et un niveau d'expression des enzymes de biotransformation maintenu pendant plusieurs mois (Nemoto *et al.*, 1995 ; Riccalton-Banks *et al.*, 2003 ; Soldatow *et al.*, 2013). Aritomi *et al.* a par ailleurs montré que la

réponse après traitement à l'acétaminophène de sphéroïdes d'hépatocytes est comparable à celle mesurée *in vivo*, c'est-à-dire, une hausse de la mortalité cellulaire, une diminution du taux intracellulaire de glutathion et du potentiel membranaire mitochondrial (Aritomi *et al.*, 2014). Des modèles plus complexes ont été mis au point. Ils consistent par exemple en la formation d'agrégats cellulaires dans des gels. Les hépatocytes ainsi cultivés montrent des taux de sécrétion d'albumine bien supérieurs aux modèles 2D et peuvent être maintenus pendant 21 jours en culture (Ise *et al.*, 1999). De plus, l'expression des enzymes de phase I est maintenue et est comparable à celle mesurée *in vivo* (Shen *et al.*, 2006). Bomo *et al.* ont également montré qu'à l'aide d'un gel de collagène rigide, les interactions entre cellules et matrice sont maintenues. Les cellules hépatiques peuvent alors former un sphéroïde, proliférer et se différencier (Bomo *et al.*, 2016).

#### ***1.4 Les coupes de foie***

Les coupes de foie (100 à 250  $\mu\text{m}$  d'épaisseur) ont été développées comme modèle *ex vivo* (Orbach *et al.*, 2017 ; Starokozhko *et al.*, 2015). Ces coupes ont l'avantage de présenter la même composition cellulaire et la même architecture tissulaire ainsi qu'une activité métabolique semblable à celle de l'organe d'origine (Soldatow *et al.*, 2013). D'ailleurs, plusieurs études ont montré que les résultats obtenus grâce à des coupes de foie sur la toxicité, l'activité et la clairance métabolique de plusieurs molécules à usage pharmaceutique peuvent être extrapolés à des conditions *in vivo* avec succès (Olinga and Schuppan, 2013). Cependant, ces coupes ont une durée de vie limitée, puisqu'elles ne peuvent être maintenues en culture que pendant 72 heures environ. L'activité métabolique peut être réduite après 6h seulement en culture. Plus tardivement après 48-72 heures environ, des phénomènes de nécrose peuvent également apparaître (Soldatow *et al.*, 2013).

En conclusion, les monocouches de lignées cellulaires d'origine hépatique constituent les modèles les plus simples à mettre en œuvre mais présentent de nombreuses différences phénotypiques comparées aux hépatocytes *in vivo*. Les cultures en monocouche d'hépatocytes primaires sont plus fidèles aux caractéristiques des hépatocytes que les lignées cellulaires mais leur durée de vie est très limitée tout comme celle des coupes de foie. Les modèles 3D permettent d'améliorer les interactions cellules-cellules. Enfin, à l'image des coupes de foie incluant tous les types de cellules hépatiques, les modèles 2D et 3D *in vitro* peuvent être optimisés en établissant des cocultures.

## 2. Modèles intestinaux

### 2.1 Lignées cellulaires

Développée dans les années 1970, la lignée Caco-2 dérive d'un adénocarcinome colorectal humain et est l'une des plus utilisées comme modèle d'épithélium intestinal *in vitro*. Cette lignée est reconnue comme modèle standard par les autorités et les industries pharmaceutiques pour les études de perméabilité intestinale chez l'Homme (Hidalgo *et al.*, 1989 ; Hilgers *et al.*, 1990). En culture, les Caco-2 se différencient spontanément en exprimant des caractéristiques biochimiques et morphologiques comparables à celles des entérocytes qui composent la barrière intestinale du petit intestin et forment une monocouche de cellules. Après 21 jours, les cellules sont complètement différenciées, polarisées, présentent une bordure en brosse au niveau apical, sont connectées entre elles par des jonctions serrées et expriment diverses enzymes telles que la lactase ou l'aminopeptidase N, des récepteurs à des facteurs de croissance et des transporteurs membranaires comme GLUT-5 (Lea, 2015 ; Sambuy *et al.*, 2005). Ce modèle ne présente cependant pas toutes les caractéristiques *in vivo* de la barrière intestinale et notamment la sécrétion de mucus. C'est la raison pour laquelle d'autres modèles ont été développés comme la coculture de cellules Caco-2 et HT29. Les cellules HT29 dérivent également d'un adénocarcinome colorectal. Elles apportent au modèle une propriété essentielle de la barrière : la sécrétion de mucus. Les cellules HT29-MTX, qui sont des cellules HT-29 sélectionnées après traitement au méthotrexate (MTX), expriment dans des proportions plus importantes un phénotype semblable à celui des cellules caliciformes sécrétrices de mucus (Béduneau *et al.*, 2014). Des études ont d'ailleurs montré l'intérêt de ce modèle présentant du mucus pour étudier les phénomènes d'absorption au niveau intestinal (Pontier *et al.*, 2001 ; Sarmiento *et al.*, 2012). D'autres modèles *in vitro* ont été mis au point afin d'y inclure les cellules M. Lorsque les cellules Caco-2 sont mises en culture avec les cellules Raji B, elles ont la capacité d'acquérir un phénotype similaire aux cellules M. Ainsi une tri-culture Caco-2/HT29/Raji B permet de mimer les entérocytes, les cellules caliciformes et les cellules M (Lozoya-Agullo *et al.*, 2017).

Ces modèles de lignées cellulaires sont notamment utilisés pour étudier les mécanismes de transport de molécules et les voies de passages paracellulaires ou transcellulaires à travers la barrière, déterminer les potentiels effets toxiques de composés au niveau intestinal ou encore étudier les processus d'efflux au niveau de la barrière intestinale (Lea, 2015).

L'un des modèles les plus utilisés pour recréer *in vitro* une double interface avec les cellules intestinales est le Transwell®. En effet, ce support permet de mimer la configuration *in vivo* de l'intestin. Il consiste en un compartiment apical qui représente la lumière du tube intestinal et un compartiment basolatéral correspondant aux vaisseaux sanguins. Ces deux compartiments sont séparés par une membrane sur laquelle sont ensemencées les cellules formant la barrière intestinale. Le Transwell® est notamment utilisé pour étudier la perméabilité intestinale de médicaments ou le passage de toxines (Gao *et al.*, 2017 ; Pereira *et al.*, 2015).

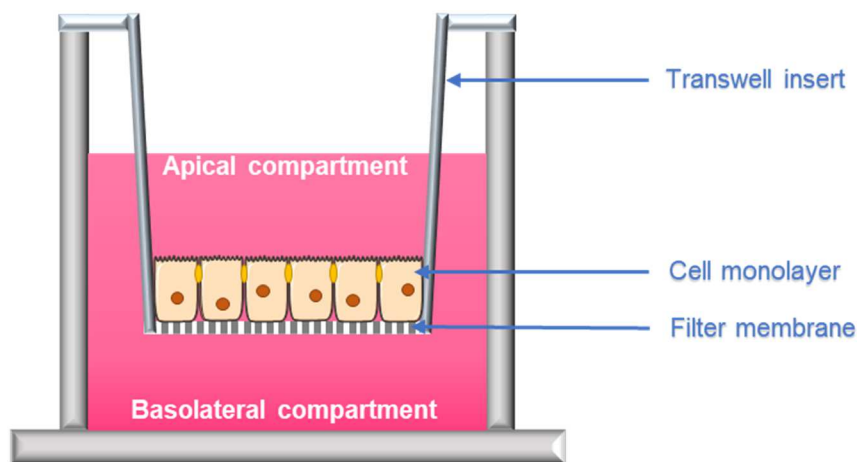


Figure 45 : Représentation schématique d'un Transwell®.

Des supports plus complexes ont été développés pour recréer la structure des villosités intestinales. Sung et al ont développé un support synthétique recouvert de cellules Caco-2 imitant ainsi la densité et la taille des villosités intestinales humaines (Sung *et al.*, 2011).

## 2.2 Cellules primaires

Les modèles intestinaux formés à partir de cellules primaires sont moins développés que les modèles hépatiques. Seules quelques études décrivent des protocoles plus ou moins complexes afin d'obtenir de tels outils. En 2011, Lahar *et al.* ont décrit une technique nécessitant l'utilisation de facteurs de croissance et l'interaction avec des myofibroblastes pour maintenir en culture des cellules intestinales primaires provenant de résections chirurgicales (Lahar *et al.*, 2011).

### **2.3 Organoïdes**

Les cellules souches Lrg5<sup>+</sup> sont des cellules souches intestinales qui peuvent être mises en culture et se différencier en tous types de cellules intestinales en formant spontanément des structures tridimensionnelles appelées organoïdes. Ces derniers possèdent la plupart des caractéristiques physiques et biochimiques du tissu natif. Des cryptes et des villosités sont en effet observables. Leur utilisation est orientée vers la médecine régénérative et le criblage de drogues (Liu *et al.*, 2016 ; Sato *et al.*, 2009 ; Shaker and Rubin, 2012).

### **2.4 Modèle ex-vivo**

La chambre d'Ussing fournit un système permettant de mesurer le transport des ions, des nutriments et des médicaments à travers l'épithélium intestinal. Il se compose de deux compartiments séparés par un fragment d'épithélium prélevé chez l'animal. La chambre d'Ussing, comme le modèle en Transwell<sup>®</sup>, est constituée d'un compartiment accepteur et d'un compartiment receveur. C'est un modèle qui mime fidèlement le transport intestinal mais son intérêt est limité car il conserve ses propriétés fonctionnelles seulement sur une courte durée (Westerhout *et al.*, 2015).

## **3. Tests de toxicité**

### **3.1 In vitro**

Il est possible de distinguer deux pics de mort cellulaire liées à l'apoptose et à la nécrose dans les cultures primaires d'hépatocytes. Le premier reflète les dommages liés au protocole d'isolement des cellules alors que le second est plutôt provoqué par les conditions de culture et l'absence du micro-environnement cellulaire (Vinken *et al.*, 2011). C'est pourquoi, on considérera qu'au moins 80-90% des cellules doivent être vivantes, avant de tester l'effet des NPs ou du toxique.

Les tests réalisés dans le cadre des études de nanotoxicologie sont semblables aux tests pratiqués dans une étude classique de toxicité. Ainsi, parmi les tests de toxicité réalisés *in vitro* on distingue trois grandes catégories : les tests de viabilité cellulaire, les tests relatifs au stress oxydant et à la réponse inflammatoire et enfin les tests de génotoxicité.

Les tests de viabilité cellulaire regroupent les mesures de viabilité et de prolifération cellulaire à proprement parler et les tests d'apoptose et de nécrose. Le MTT ou 3-(4,5-Dimethyl-

thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide est l'un des réactifs les plus utilisés pour déterminer la viabilité cellulaire. Le MTT (de couleur jaune) étant métabolisé par les enzymes mitochondriales des cellules vivantes en cristaux de formazan (de couleur violette), il est possible par dosage colorimétrique de déterminer l'effet toxique dû aux NPs. Cependant, une étude de cytotoxicité réalisée sur des nanomatériaux carbonés a montré des résultats faux positifs lors des tests réalisés avec le MTT (Monteiro-Riviere *et al.*, 2009) ; en effet, certains nanomatériaux peuvent se lier aux cristaux de formazan et empêcher leur solubilisation en stabilisant leur structure chimique. Par ailleurs, la présence intracellulaire de nanoparticules peut interférer avec le dosage par spectrophotométrie après la lyse des cellules. C'est pourquoi l'utilisation d'autres dérivés de sel de tétrazolium tels que le MTS ou le WST, donnant des formes solubles de formazan est préférable (Passagne, 2010). Au niveau méthodologique, le type et la nature des nanomatériaux constituent donc un point critique dans la fiabilité des tests de cytotoxicité. Il convient donc de tenir compte des propriétés physico-chimiques des NPs mais aussi de leur comportement dans le milieu afin de choisir le test de cytotoxicité le plus adéquat.

Afin de déterminer les effets toxiques des NPs, il est également possible d'évaluer le phénomène d'apoptose. L'incidence de l'apoptose spontanée dans les cellules hépatiques est de 0,1% environ (Vinken and Hengstler, 2018). Elle peut être étudiée par dosage de l'activité des Caspases mais aussi par marquage des cellules à l'aide d'Annexine V-FITC (Lee *et al.*, 2007). De nombreuses études ont également démontré que les NPs induisent un stress oxydant. La production excessive d'espèces réactives de l'oxygène peut conduire notamment à l'apparition de dommages à l'ADN (Ryter *et al.*, 2007). Un certain nombre de tests permettent d'étudier les effets génotoxiques des NPs parmi lesquels le test des Comets (Li *et al.*, 2017) ou des micronoyaux alors que les ROS sont généralement quantifiés à l'aide d'une sonde fluorescente, le 2',7'-dichlorofluorescein diacétate (DCFDA) qui réagit avec les espèces HO·, RO·, ROO· and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 3.2 *In vivo*

Comme pour toute autre étude toxicologique, les évaluations *in vivo* concernant les NPs sont généralement réalisées en première intention sur des rongeurs tels que les souris ou les rats. Plusieurs paramètres sont pris en compte après exposition aux nanomatériaux :

- L'étude histopathologique des différents tissus et organes (Yu *et al.*, 2013)

- L'analyse biochimique du sang et la numération cellulaire de chaque type de cellule (Abdelhalim and Abdelmottaleb Moussa, 2013)
- La biodistribution des NPs dans les différents organes à l'aide d'un traceur radiologique ou fluorescent (Panagi *et al.*, 2001).
- La clairance des NPs en étudiant l'excrétion à divers moments après exposition (Li *et al.*, 2001)



#### **IV. ORGANOTOXICITE DES NANOPARTICULES**

##### **1. Au niveau hépatique**

Le foie, un organe majeur de détoxification est l'un des tissus les plus exposés aux NPs. Quand elles rejoignent la circulation sanguine, les NPs sont principalement internalisées au niveau hépatique. Un certain nombre d'études menées *in vitro* et *in vivo* se sont intéressées à la toxicité des NPs sur le foie. Nous avons réalisé une revue de la littérature récente sur les effets cytotoxiques, génotoxiques, sur le stress oxydant, la réponse inflammatoire et les modifications métaboliques induits par différents types de NPs au niveau hépatique.

Cette revue intitulée « Influence of nanoparticles on the liver tissue and the hepatic functions: a review » et ayant pour co-auteurs Raphaël Cornu, Arnaud Béduneau et Hélène Martin a été soumise au journal Toxicology.

**PUBLICATION : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

**Influence of nanoparticles on the liver tissue and the hepatic functions: a review**

**Raphaël Cornu, Arnaud Béduneau, Hélène Martin**

Article soumis dans Toxicology (FI : 3,547)



## **Influence of nanoparticles on liver tissue and hepatic functions: a review**

*Raphaël Cornu, Arnaud Béduneau, Hélène Martin\**

Raphaël Cornu

PEPITE EA4267, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France  
raphael.cornu@univ-fcomte.fr

Dr. Arnaud Béduneau

PEPITE EA4267, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France  
arnaud.beduneau@univ-fcomte.fr

\*Corresponding author:

Dr. Hélène Martin

PEPITE EA4267, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France  
E-mail: helene.martin@univ-fcomte.fr

**Keywords**

liver, nanoparticles, cytochrome P450, genotoxicity, inflammation, oxidative stress

**Abstract**

Due to the increasing interest in nanotechnology in very large application fields, including biotechnology, electronics and food industries, humans are increasingly exposed to nanoparticles (NPs). Consequently, the question about the safety of these nanomaterials and their impact on human health is a legitimate concern. The liver is the primary organ of detoxification and is one of the tissues that is most exposed to NPs. When they reach the bloodstream, NPs are mainly internalized by liver cells. This review focuses on recent *in vitro* and *in vivo* studies addressing the effects of organic and inorganic NPs on the liver. Specifically, the impact of the NPs on hepatic enzyme activities, the inflammatory response and genotoxicity processes will be described. Depending on the physicochemical parameters of the NPs and the conditions of exposure, NPs could lead to global liver injury.

## **1. Introduction**

Nanoparticles (NPs) are used in many fields of science and technology. NPs are defined as spherical objects with a diameter ranging from 1 to 100 nm. According to their physicochemical specifications, NPs are divided into different classes. Inorganic NPs, which include silver (Ag), gold (Au), zinc (ZnO) and silica oxide (SiO<sub>2</sub>) NPs, are the most studied and are used in cancer research, specific analysis, molecular labels, antibacterial agents or food (Salata, 2004) (Wang *et al.*, 2013). Synthetic-based polymer NPs are used for medical and pharmaceutical research; polymeric NPs are especially used as drug delivery systems, and they show promising therapeutic potential. NPs can be administered by various routes, including oral, pulmonary, cutaneous and intravenous routes. The unique properties of NPs, including their size, surface area and surface charge, confer a particular tropism on the NPs, which could be a real advantage for drug targeting but also deleterious for the body due to a lack of control. Moreover, NPs are increasingly present in daily human products. Considering that the liver acts as a biological filtration system by retaining up to 80% of NPs in the blood (Keservani and Sharma, 2019), the effects of the NPs on the liver need to be considered. Although the number of scientific publications on PubMed linked to the keywords “nanoparticles” and “liver” has increased by a factor of 10 in the last 15 years, the effects of NPs on hepatic functions are still unclear and need to be discussed. In this context, the present review will focus on the major and recent findings about the impact of NPs on liver cells and hepatic function.

### **1.1. The liver**

The liver is the organ with the greatest capacity for regeneration. This organ is essential for the survival of the organism and represents 1/50 of its weight. The liver is located in the upper right part of the abdomen and is partially protected by the rib cage (Abdel-Misih and Bloomston, 2010)(Abdel-Misih and Bloomston, 2010). The liver consists of four asymmetrical lobes, named the right and left hepatic lobes, the square lobe and the caudate lobe. Vascularized by

the hepatic artery and the portal vein, the liver is one of the most perfused organs of the body, receiving 1.5 L of blood per minute, divided between the hepatic artery and the portal vein, which supply 70% and 30% of liver blood flow, respectively. Oxygen-rich blood arrives by the hepatic artery, and the portal vein supplies the nutritive blood and blood to the perihepatic organs (Kan and Madoff, 2008). In the hepatic sinusoids, the blood from the hepatic artery and portal vein are mixed and drained out of the organ by the central vein.

At the cellular level, several cell types have been described. First, the parenchymal cells, called hepatocytes, constitute the major cell type of the liver, since they represent 70% of the total cellular content and occupy 80% of the liver volume (Bogdanos *et al.*, 2013). Hepatocytes are organized in unicellular spans that converge towards the center of the lobule and are in contact with the sinusoids in which the blood circulates. Endothelial cells and hepatocytes are separated by a small area called the space of Disse. Second, there are three types of non-parenchymal cells: (i) endothelial cells of the liver sinusoids (LSECs, corresponding to 45% of non-parenchymal cells) (Bogdanos *et al.*, 2013), which serve as a filter facilitating access of the hepatocytes to plasma nutrients and macromolecules; (ii) Kupffer cells (corresponding to 33% of non-parenchymal cells), which are hepatic macrophages with phagocytic capabilities (Bilzer *et al.*, 2006; Bogdanos *et al.*, 2013) and are dispersed among the endothelial cells; and finally, (iii) Ito cells, also called the stellate cells (corresponding to 22% of non-parenchymal cells), which are loaded with lipid droplets, provide storage for vitamin A and form components of the extracellular matrix (Bogdanos *et al.*, 2013; Trefts *et al.*, 2017).

The liver plays several predominant roles within the body, beginning with the process of digestion, as it ensures the production of bile. Bile is composed of a mixture of water, mucopolysaccharides, phospholipids, amino acids, bile salts, and pigments. Bile produced by hepatocytes is stored in the gall bladder and is excreted in the duodenum to allow the digestion of dietary lipids (Boyer, 2013). The liver is also an organ of storage, since it ensures the storage

of sugars such as glucose (in the form of glycogen), fructose or galactose. These sugars arrive through the portal vein and then transit through the sinusoids before they enter into the hepatocytes by using specific protein transporters. Under the action of insulin, sugars can either be stored or released to regulate blood sugar levels. Hepatocytes also possess a very high protein synthesis capacity for numerous factors involved in coagulation, such as prothrombin and fibrinogen, ceruloplasmin or C-reactive protein (CRP). Regarding lipids, the liver is the main organ for the synthesis and storage of cholesterol and the apoproteins necessary for the assembly of lipoproteins. The liver also ensures storage of vitamins A, D, E, K and B12 and a number of minerals (Collège des universitaires en hépato-gastro-entérologie *et al.*, 2014). The liver also plays an important role in immunity through the action of Kupffer cells, since their phagocytic capacity allows for the capture and elimination of many parasites, bacteria and cellular debris (Kubes and Jenne, 2018). This immune function is very important, as the liver receives a considerable blood volume, thus allowing efficient and rapid filtration. Finally, the liver plays a pivotal role in detoxification of the organism due to specific enzyme systems. Indeed, the organism is constantly subjected *via* its environment and diet to a large number of potentially toxic xenobiotics. Therefore, the liver performs a critical filtration and purification function in relation to these substances by direct elimination in the bile or biotransformation into more hydrophilic compounds that can be easily excreted in the bile or the urine. The reactions that metabolize xenobiotics are mainly catalyzed by a superfamily of enzymes, the cytochrome P450 (CYP) family (Manikandan and Nagini, 2018; McDonnell and Dang, 2013), which is composed of 57 isoforms in humans. This multienzymatic complex mainly catalyzes the oxidation of xenobiotics *via* a catalytic cycle involving four main stages: binding of the substrate near the heme group of the enzyme and reduction of the iron atom, uptake of molecular oxygen and formation of an iron-oxygen complex, scission of the molecular oxygen and



protonation of the peroxo-ferric intermediate, and finally oxidation of the substrate and release of the oxidized product (Guengerich, 2007).

## **1.2. Organic and inorganic nanoparticles**

### **1.2.1 Inorganic nanoparticles**

NPs derived from different metallic oxides can be prepared by several techniques, such as chemical, physical or biological methods (Iravani *et al.*, 2014; Pantidos, 2014). Their size is in the nanometer range, and their high surface energy and magnetic properties confer on them promising properties for the diagnosis and treatment of cancer. Small iron-based NPs (approximately 10 nm) are used as contrast agents in magnetic resonance imaging (MRI) and as therapeutic agents in hyperthermia-based treatments (Hadjipanayis *et al.*, 2008). Au NPs with a broad range of core sizes, ranging from 1 to 150 nm, are used as drug carriers, especially in cancer chemotherapies and in gene therapy (Giljohann *et al.*, 2009; Mody *et al.*, 2010). Ag NPs with a size range of 40-100 nm are used for cellular and molecular labelling (Hadjipanayis *et al.*, 2008; Schultz *et al.*, 2000). Because of their specific tropism, these systems can deliver a large dose of anticancer drug in the tumor site (Maeda *et al.*, 2016; Shukla *et al.*, 2012). They allow high drug accumulation in the target tissues and minimize the toxic side effects induced by chemotherapy. SiO<sub>2</sub> and titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) NPs serve as food additives and pharmaceutical excipients and are mainly administered by the oral route. SiO<sub>2</sub> NPs are used as a glidant in the production of tablets and also as an anti-caking agent in powdered foods under the name of additive E551 (Dekkers *et al.*, 2011; EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS) *et al.*, 2018). Additive E171, composed of TiO<sub>2</sub> particles, is an inescapable ingredient in a very large number of daily use products for whitening and texture (Wang *et al.*, 2013). Another important type of metallic oxide NP is ZnO NPs. These NPs are used in cosmetics and in biomedicine, especially in the anticancer and antibacterial fields (Jiang *et al.*, 2018).

### 1.2.2. Organic nanoparticles

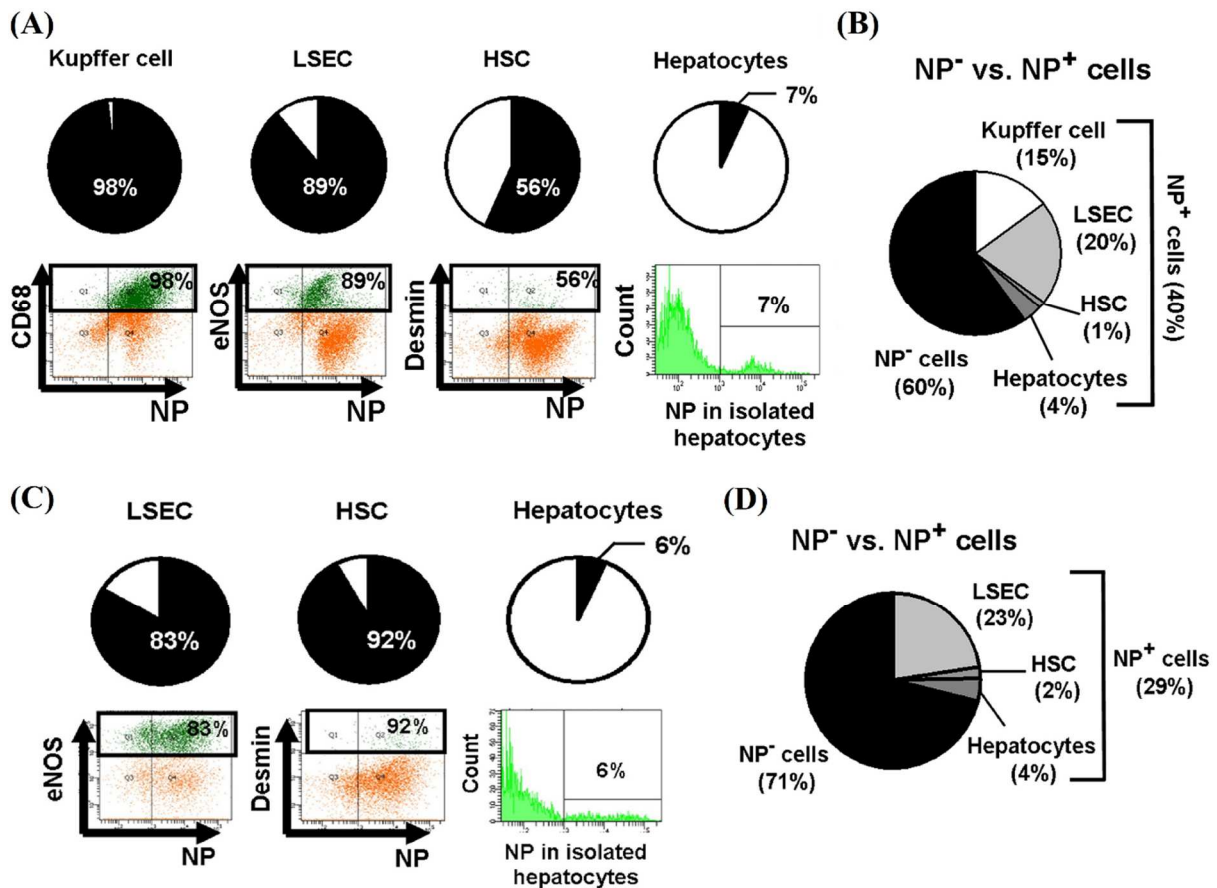
Liposomes, polymeric NPs and dendrimers are the main types of organic NPs. A very large number of polymeric NPs have been developed. Many types of polymers have been used, such as polylactic-co-glycolic acid (PLGA), polylactic acid (PLA), methacrylate acid (Eudragit), chitosan, polystyrene, polycaprolactone (PCL), polyalkylcyanoacrylate (PACA) and ethyl cellulose. This type of NP presents interesting properties, especially for medical applications such as delivery systems for drugs and diagnostic agents (Ensign *et al.*, 2012; Pandey *et al.*, 2013). In addition to their biocompatibility, these NPs can encapsulate and protect an active compound from degradation caused by a low pH environment or by the enzymes of the gastrointestinal tract (Pridgen *et al.*, 2014). Depending on the method of preparation, the active compounds are encapsulated in the core of a nanocapsule surrounded by a polymeric shell or dispersed in the polymer matrix of a nanosphere (Guterres *et al.*, 2007). Surface modifications for targeting and controlled drug release induced by polymer erosion are other key characteristics of polymeric NPs (Moritz and Geszke-Moritz, 2015). Moreover, their pharmacokinetic characteristics, especially plasma half-life, can be improved by the addition of hydrophilic polymers such as polyethylene glycol (PEG). PEGylated nanoparticles are often called “stealth” NPs. Liposomes are another major type of organic NP. Liposomes are produced from cholesterol and other phospholipids and exhibit a very large size range between 25 nm to 2.5  $\mu\text{m}$  (Akbarzadeh *et al.*, 2013). Due to their high biocompatibility and complete biodegradability, liposomes are very good candidates as drug delivery systems. Liposomes improve the efficacy of encapsulated drugs and reduce the toxicity of encapsulated active compounds (Akbarzadeh *et al.*, 2013; Bookstaver *et al.*, 2018). However, liposomes present some disadvantages, such as a short half-life and a high cost of production (Akbarzadeh *et al.*, 2013). PEGylation of phospholipids is often required to prolong their vascular residence time. Dendrimers are radially symmetric molecules composed of a central core of a single atom or

group of atoms from which repeating units form branches, also known as dendrons (Abbasi *et al.*, 2014). In addition to their biocompatibility, dendrimers have excellent structural uniformity and variable chemical composition. The large number of functional groups at the periphery of dendrimers gives them a wide range of potential applications (Noriega-Luna *et al.*, 2014). Polymeric micelles are spherical self-arrangements of amphiphilic polymers and are composed of a hydrophobic core surrounded by a hydrophilic corona (Richards *et al.*, 2017). Micelles represent a suitable delivery system. Lipophilic drugs can be loaded into micelles by covalent conjugation to the polymer or by physical entrapment (Mukherjee *et al.*, 2016). Moreover, the small size of micelles, between 10 and 100 nm, and their hydrophilic surface properties limit their recognition by the reticuloendothelial system, allowing a long plasma half-life (Zhang *et al.*, 2014).

## **2. Biodistribution of nanoparticles**

After intravenous administration, NPs are distributed in many organs, including the spleen, kidney, brain, heart and lung. However, the majority of the injected dose is located in the liver when the NP size is above 6 nm, preventing renal excretion (Dogra *et al.*, 2018; Sa *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2017). Within 5 minutes of intravenous injection, up to 60% of polymeric nanospheres are sequestered in the liver. Yang *et al.* showed that small Ag and Au NPs with diameters of 12.2 and 15.1 nm, respectively, were localized in the liver at very high concentrations compared to levels in other organs (Yang *et al.*, 2017). At least 30% and 45% of 200 nm and 500 nm PLGA NPs, respectively, were detected in the liver 3 h after injection, (Mohammad and Reineke, 2013). NPs were located in parenchymal cells and Kupffer cells. An *in vivo* study showed that fluorescent PLGA NPs (271 nm) were internalized in 56% of stellate cells, 89% of LSECs and 98% of Kupffer cells (Park *et al.*, 2016). Physicochemical properties, including size, surface, zeta potential and chemical composition, can largely influence the

biodistribution and uptake of NPs. As previously discussed, strategies consisting of coating or conjugating hydrophilic polymers on the surface of NPs can prolong their half-life up to several hours. The aim of these modifications was to reduce the opsonization process responsible for the rapid recognition of NPs by the mononuclear phagocyte system (Beck-Broichsitter *et al.*, 2015). For example, the density of PEG on the surface of Au NPs limited macrophage uptake by modulating the adsorption of serum proteins (Walkey *et al.*, 2012). Verrecchia *et al.* compared the plasma concentration of PEGylated and non-PEGylated NPs. The plasma half-life of the PEG PLA NPs was approximately 6 h and only a few minutes for the non-PEGylated NPs (Verrecchia *et al.*, 1995). However, despite the presence of the hydrophilic corona, long-circulating NPs eventually reach the liver. Panagi *et al.* showed that at least 40% of injected PLGA NPs and poly(lactide-co-glycolide)-monomethoxy poly(ethylene glycol) PLGA-mPEG NPs were sequestered in the spleen and the liver after several seconds and several hours, respectively (Panagi *et al.*, 2001). Similar to most mammalian cells, hepatocytes also interact with NPs but to a lower extent than macrophages. Hepatocyte uptake increases for NPs with positive zeta potential, contrary to macrophages that preferentially take up negatively charged NPs (Wang *et al.*, 2015). Park and colleagues demonstrated that 4% of the hepatocytes in an entire liver colocalized with fluorescent PLGA NPs (271 nm) (**Figure 1**) (Park *et al.*, 2016). For smaller NPs, the space of Disse plays a critical role for passage from the blood circulation to the hepatocytes. NPs smaller than 200 nm in diameter can pass the sinusoidal fenestrations, and a deeper diffusion in the space of Disse was reported for NPs smaller than 50 nm, suggesting an enhanced localization of small NPs with hepatocytes (Ogawara *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2015).



**Figure 1. Distribution of NPs in cell liver.** One day after NP injection in mice, liver cells were isolated and evaluated for NP uptake (**A and B**). The same experiment was performed after Kupffer cell depletion (**C and D**). (**A and C**) Ratios of NP-positive cells of each cell type. (**B and D**) Ratios of NP-positive cells in the total liver cell population. Flow cytometry analysis was performed on non-parenchymal cell fractions using CD68 for Kupffer cells, eNOS for LSECs and desmin for HSCs, as well as in hepatocyte fractions. Hepatocytes were isolated separately. Each cell type is indicated in green. Figures are reproduced with permission from reference (Park et al., 2016).

While the interaction of intravenously administered NPs with the liver has been clearly demonstrated, the evidence is less clear for the oral route. NPs must pass through the mucus barrier and the intestinal epithelium to finally reach the liver during the hepatic first-pass or

later for stealth NPs. The physicochemical properties of NPs, such as their size, surface charge and surface chemistry, govern their ability to cross the intestinal mucosa. Jani *et al.* compared the gastrointestinal uptake of polystyrene particles with different sizes, ranging from 50 nm to 3 000 nm, in an *in vivo* study. Size-dependent uptake was clearly demonstrated, since 34% of 50 nm particles were taken up by cells, whereas 26% of the 100 nm particles were taken up (Jani *et al.*, 1990). Gaumet *et al.* compared the interaction of PLGA and polystyrene NPs in a Caco-2 cell model. Small NPs in the range of 100 nm had the highest interaction rate with cells (Gaumet *et al.*, 2009). Lai *et al.* investigated the diffusion of different polystyrene particles covalently modified with PEG in human mucus. Their study demonstrated that the diffusion rate of near-neutral particles was increased compared to that of negatively charged particles (Lai *et al.*, 2007). It was also shown that the interaction between mucins and mucoadhesive NPs can lead to a disruption in the mucus barrier (Wang *et al.*, 2011). After diffusion in the mucus layer, NPs can cross the enterocyte monolayer using the transcellular route. Depending on the characteristics of the NPs, this route suggests direct penetration into the cells or by different mechanisms of pinocytosis (Mao *et al.*, 2013). The paracellular route seems to be excluded for the passage of NPs across the intestinal barrier because a considerable difference exists between the penetration area of these routes (1 000 D) and the size of the NPs (several tens of kD) (Fröhlich and Roblegg, 2012). Thus, very few NPs with specific properties can reach the liver after oral administration (Yildirim *et al.*, 2011).

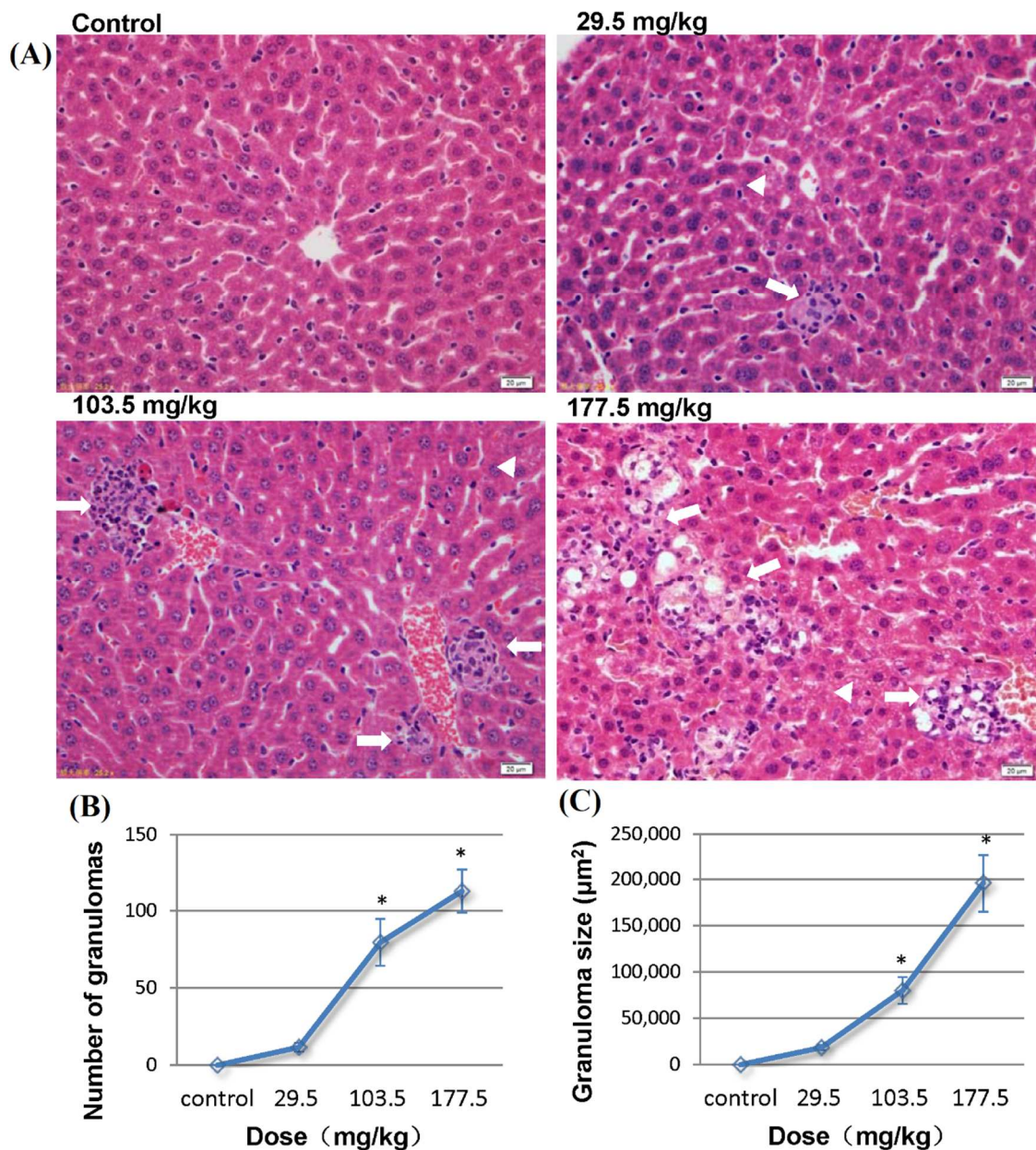
### **3. Histopathological changes and effects on hematology**

*In vivo* studies identified liver injury caused by NPs at the histologic and hematologic levels. Mice exposed to SiO<sub>2</sub> NPs showed a dose-dependent increase in alanine aminotransferase (ALT) levels (Yu *et al.*, 2013). The aspartate aminotransferase (AST) rate increased slightly, whereas the most significant enzyme modulation was observed for lactate dehydrogenase

(LDH) (Yu *et al.*, 2013), suggesting cell membrane disruption in liver cells. Moreover, the histopathological examination of liver tissues revealed that lymphocytic infiltration, cellular swelling and granuloma formation increased with the dose of SiO<sub>2</sub> NPs (Yu *et al.*, 2013). Similar results were obtained in another study after rat exposure to SiO<sub>2</sub> NPs (Ivanov *et al.*, 2012). Granuloma formation, inflammatory cell infiltration, especially Kupffer cells, and structural damage such as hepatocellular hydropic degeneration were identified after histopathological analysis of liver sections in animals exposed to SiO<sub>2</sub> NPs (**Figure 2**) (Ivanov *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2017, 2013). However, histopathological damage do not always correlate with biochemical markers of liver injury (Chan *et al.*, 2017; Ivanov *et al.*, 2012). While granulomas were detected in rat liver following exposure to SiO<sub>2</sub> NPs, no significant difference in ALT, in alkaline phosphatase (ALP), and total bilirubin was measured compared to that of the control rat group. Similar to SiO<sub>2</sub> NPs, the effect of Ag NPs was clearly identified at the histological level, leading to nuclear swelling, vacuole formation, hemorrhage and some necrosis, whereas the impact of Ag NPs on biochemical markers was not as clear (Parang and Moghadamnia, 2018). A recent study showed no impact on serum markers in mice exposed to 5 mg/kg once per week for 8 weeks, while a high level of AST, ALT and ALP was measured in rats exposed for 14 days to an increased dose of 25 mg/kg of Ag NPs (Parang and Moghadamnia, 2018; Weaver *et al.*, 2017). Biomarkers of liver injury were also detected after ZnO NP treatment. A notable increase in ALP and gamma-glutamyl transferase was measured (Ansari *et al.*, 2015; Hua-Qiao *et al.*, 2016). Cell toxicity and inflammatory responses were reported in the livers of animals exposed to ZnO NPs. In a recent study, Hua-Qiao *et al.* measured a significant increase in monocytes and granulocyte neutrophils in the group exposed to these same NPs (Hua-Qiao *et al.*, 2016). Cell swelling, hemorrhage, and some obvious signs of hepatocellular injury were also observed (Hua-Qiao *et al.*, 2016; Najafzadeh *et al.*, 2013). Moreover, electron microscopic observations revealed some changes in liver cell organelles,

especially hypervacuolization, dilation of the endoplasmic reticulum, and condensation of chromatin in hepatocytes of animals exposed to ZnO NPs (Ansari *et al.*, 2015). An inflammatory response in murine hepatic tissue was also triggered by Au NPs. Kupffer cells and multiple inflammatory cells infiltrated the liver sections after a single exposure to Au NPs (Ibrahim *et al.*, 2018). Steatosis, vacuolization and necrotic foci were also observed. However, these findings were not consistent with another study that showed no significant histopathological abnormalities after repeated exposure to Au NPs with the same size range (Yang *et al.*, 2017). Again, the data regarding biochemical markers differ. No significant differences in serum markers were found in mice and rats after subacute and subchronic intravenous injection of Au NPs of 10 and 12.8 nm diameters, while clear modifications of AST, ALP and ALT rates were reported in rats exposed to acute intraperitoneal injections of Au NPs of 10 and 50 nm diameters (Abdelhalim and Abdelmottaleb Moussa, 2013; J. H. Lee *et al.*, 2018; Weaver *et al.*, 2017). In conclusion, data on the effects of NPs on biochemical markers diverge significantly from each other, regardless of the type of NPs considered. Moreover, according to the physicochemical parameters and time and route of exposure of NPs, correlation between histological observations and blood serum biochemistry cannot be systematically performed.





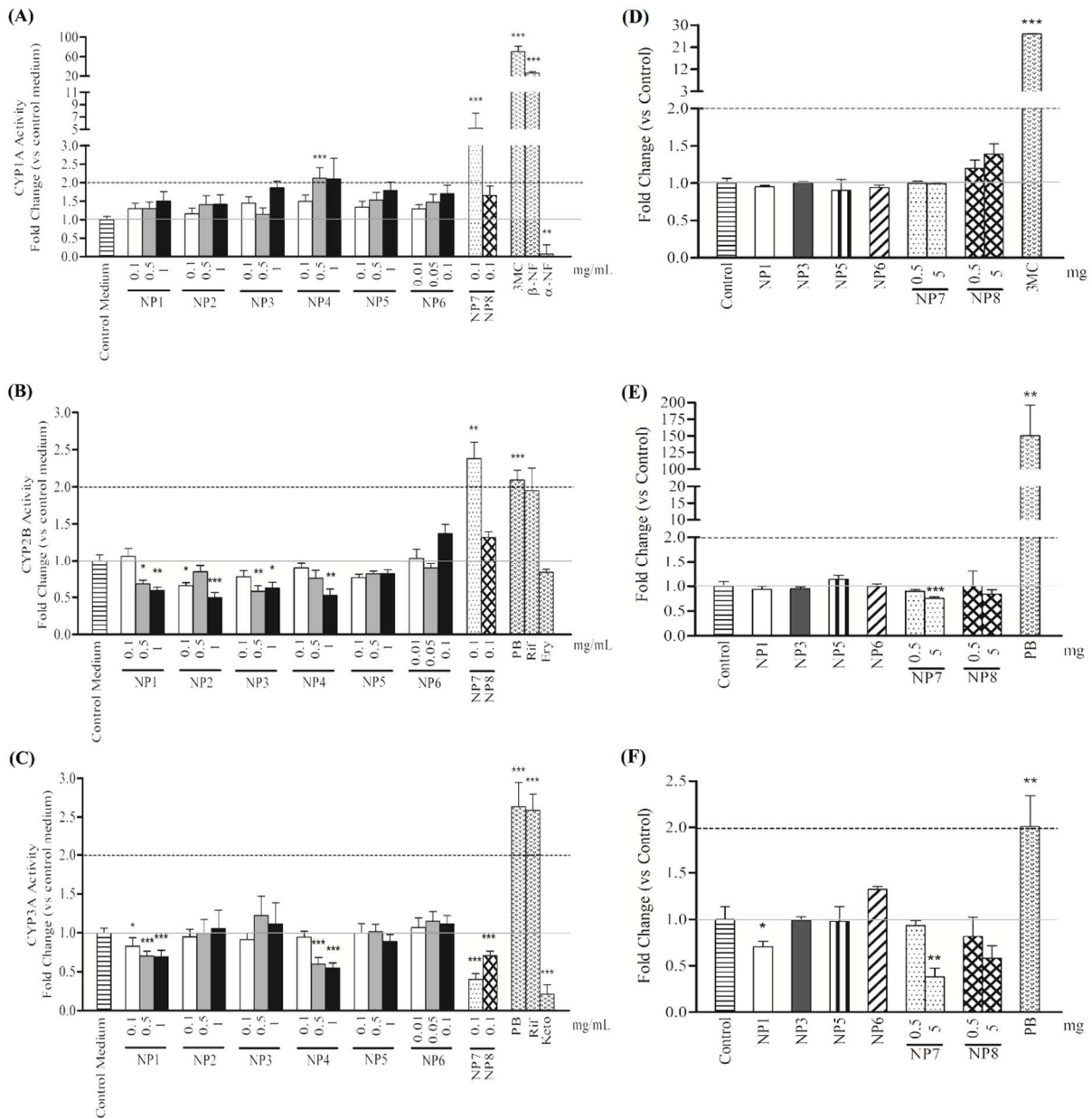
**Figure 2. Histological changes in the liver after NPs exposure.** Histological analyses of the liver in silica NP-treated mice. **(A)** Representative liver sections taken from the control mice and mice administered 29.5 mg/kg, 103.5 mg/kg and 177.5 mg/kg are shown at 400 $\times$  magnification. White arrows denote granuloma and lymphocytic infiltration in the liver, and white triangles denote hydropic degeneration in hepatocytes. **(B)** The number of granulomas and **(C)** the granuloma size in the silica NP-treated mice increased in a dose-dependent manner in the silica NP-treated groups. \*  $p < 0.05$  compared with the control group using ANOVA. Data

are representative of at least eight mice. Figures are reproduced with permission from reference (Yu *et al.*, 2013)

#### **4. Modification of xenobiotic-metabolizing enzymes in the liver**

When NPs are taken up by hepatocytes, they can interact with a variety of enzymes, including CYPs, a very important family of enzymes that are involved in the metabolism of xenobiotics (**Table 1**). This interaction can affect the enzyme activity of hepatocytes, playing a major role in the detoxification process of the body. Imai and colleagues reported that SiO<sub>2</sub> NPs with mean sizes of 30 and 70 nm significantly inhibited CYP3A4 in human liver microsomes. This effect was significantly reduced by the carboxyl modification on NPs (Imai *et al.*, 2014) and was absolutely not significant using larger NPs, with diameter greater than 300 nm. Serreemasun *et al.* showed that 9 nm Au NPs decreased the activity of CYP1A2, 2C9, 2C19 and 3A4 (Sereemasun *et al.*, 2008). In contrast to the large NPs, a very pronounced inhibitory effect of small Au NPs (5 nm) on CYP2C9, CYP2C19, CYP2D and CYP3A4 activity was observed (Ye *et al.*, 2014). Similar effects were obtained with 12 nm Ag NPs on CYP3A4, 2C19, 2C9 and 1A2 activity (Warisnoich *et al.*, 2011). Moreover, in a previous study, it was shown that similar Ag NPs (15 nm) strongly inhibited the activity of CYP1A2, 2C9, 2C19 and 3A4 (Sereemasun *et al.*, 2008). It was also noteworthy that small carboxyl polystyrene NPs (20 and 60 nm) were able to inhibit the activity of CYP2C9 and 3A4, while 200 and 500 nm NPs had no significant impact. All of these studies suggest that size is the major parameter that governs the interaction of NPs with CYPs. The impact of NPs on CYP activity is inversely proportional to the size of the NPs. In fact, hepatobiliary elimination was reported for NPs with sizes below 150-200 nm. Small NPs can pass through the sinusoids *via* the fenestrations and have access to the space of Disse, where they are internalized by hepatocytes (Arami *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016). This is supported by an *in vivo* comparative study between micro- and nanocopper particles.

Nanocopper particles severely inhibited the expression and activity of major CYP isoforms compared to that of copper microparticles after 7 consecutive days of oral exposure (Tang *et al.*, 2018a). However, few studies have reported the effects of larger NPs. Indeed, large SiO<sub>2</sub> NPs, ranging from 160 to 180 nm, significantly inhibited the catalytic activity of human liver microsomes. Moreover, Kulthong and colleagues showed in rat liver microsomes that 180 nm Ag NPs reduced CYP2C and 2D activities, whereas no modulation was observed on CYP3A4 (Kulthong *et al.*, 2012). This study highlights that the effects of NPs differ according to the CYP isoforms. Concerning polymeric NPs, PLGA NPs inhibited the activities of CYP2B and 3A in human hepatocytes, whereas no effect on CYP1A was observed (**Figure 3**) (Cornu *et al.*, 2018). Moreover, it has been shown that one type of NP with a given size may have an opposite effect on CYP activities. For example, 30 nm SiO<sub>2</sub> NPs induce CYP2B activity, whereas they inhibit CYP3A4 activity (Cornu *et al.*, 2018). This study also emphasized interspecies differences in the detoxification function of hepatocytes, since human hepatocytes were more sensitive to NP exposure than rat hepatocytes. The relationship between *in vitro* and *in vivo* experiments is not always obvious. In an *in vivo* study carried out on rats fed Ag NPs, no significant change in the activities of CYP1A, 2C, 2D, 2E1 and 3A was reported after a treatment of 1 g/kg/day (Kulthong *et al.*, 2012). In contrast, a toxicological study using the SiO<sub>2</sub> NPs showed a good correlation in the modulation of CYP1A, 2B and 3A activities between *in vitro* experiments using rat liver microsomes and *in vivo* studies consisting of the intravenous administration of NPs in animals (**Figure 3**) (Cornu *et al.*, 2018).



**Figure 3. Effect of NPs on CYP activity.** Effect of PLGA (0.1 to 1 mg/mL) and silica (0.1 mg/mL) nanoparticles on CYP1A (A), CYP2B (B) and CYP3A (C) activities in primary human hepatocyte cultures after 72 h of exposure.  $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ -NF 50  $\mu$ M), 3-methylcholanthrene (3MC 5  $\mu$ M), phenobarbital (PB 1 mM), dexamethasone (Dex 50  $\mu$ M) and rifampicin (Rif 10  $\mu$ M) were used for 72 h of treatment as reference CYP inducers.  $\alpha$ -naphthoflavone ( $\alpha$ -NF 10  $\mu$ M), erythromycin (Ery 10  $\mu$ M) and ketoconazole (Keto 25  $\mu$ M) were used for 2 h ( $\alpha$ -NF) or 24 h (Ery and Keto) of treatment as reference CYP inhibitors. Effect of PLGA (5 mg) and silica (0.5 and 5 mg) nanoparticles on CYP1A (D), CYP2B (E) and CYP3A

**(F)** activities in rat liver microsomes. Nanoparticles were injected in rats every 24 h for up to 72 h. 3MC (20 mg/kg/d) and PB (80 mg/kg/d) were used for 72 h of treatment as reference CYP inducers. CYP activities are expressed as fold change versus control medium, which was set to 1. Data are the means  $\pm$  SEM from triplicate of at least 3 independent cultures. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  and \*\*\* $p \leq 0.001$  with respect to control medium.

Most of the studies on NP-induced hepatic enzyme alterations reported an inhibitory effect on CYP activity. More than the surface properties and composition, the key parameter influencing CYP catalytic activity was the size of the NPs. Hypotheses were formulated to explain the effect of NPs on CYP activity. The first requires the internalization of NPs in hepatocytes to trigger the modulation of CYP activity, and the difference in cellular uptake is dependent on the size of the NPs. The second hypothesis is based on a physical disruption of the electrons implicated in CYP oxidation (Lamb *et al.*, 2010). The third is based on the adsorption of NPs on CYP isoenzymes at sites other than the catalytic site, which could lead to a modification of CYP structure and thus its catalytic activity (Fröhlich *et al.*, 2010). The fourth hypothesis involves the binding of NPs to the catalytic site. However, the dimensions of CYP substrate pockets are much smaller than NP size (Fröhlich *et al.*, 2010; Lamb *et al.*, 2010). The volume of the CYP3A4 active site seems to vary greatly from 1386 Å<sup>3</sup> to 520 Å<sup>3</sup> (Otyepka *et al.*, 2007), negating the hypothesis of a competitive inhibition mechanism. The last hypothesis is a possible modulation of CYP activity through activation of the NF-κB pathway, which has been shown to regulate CYP at the mRNA and activity levels (Tang *et al.*, 2018).

<b>TYPE OF NPS</b>	<b>SIZE (NM)</b>	<b>DOSE OR CONCENTRATION</b>	<b>CELL MODEL OR ROUTE OF ADMINISTRATION</b>	<b>CYP ACTIVITY</b>	<b>REFERENCE</b>
<b>CARBOXYL POLYSTYRENE</b>	200 500	50 to 200 µg/mL	Baculosomes	No effect	(Fröhlich <i>et al.</i> , 2010)
	80	200 to 400 mg/kg	<i>Oral</i>	Inhibition of CYP1A2, 2C11, 2D6, 2E1 and 3A1	(Tang <i>et al.</i> , 2018)
<b>COPPER</b>	1000	400 mg/kg	<i>Oral</i>	Inhibition of CYP2D6 No effect on CYP1A2, 2C11, 2E1 and 3A1	(Tang <i>et al.</i> , 2018)
	5	317.5 µM	Human liver microsomes	Inhibition of CYP2C9, 2C19, 2D6, 3A4 No significant effect on CYP1A2	(Ye <i>et al.</i> , 2014)
<b>GOLD</b>	100	317.5 µM	Human liver microsomes	Minimal effect on CYP2C9, 2C19, 2D6, 3A4	(Ye <i>et al.</i> , 2014)
	9	44 ppm	Baculosomes	Inhibition of CYP1A2, 2C9, 2C19, 3A4	(Sereemasapun <i>et al.</i> , 2008)
<b>PLGA</b>	80-240	0.1 to 1 mg/mL	Primary rat hepatocytes	No effect	(Cornu <i>et al.</i> , 2018)
	80-220	0.5 to 1 mg/mL	Primary human hepatocytes	Inhibition of CYP2B and CYP3A	(Cornu <i>et al.</i> , 2018)
<b>SILICA</b>	30 70	50 to 800 µg/mL	Human liver microsomes	Inhibition of CYP3A4	(Imai <i>et al.</i> , 2014)

300					
1000	2 to 800 µg/mL	Human liver microsomes	No effect	(Imai <i>et al.</i> , 2014)	
160-180	1 mg/mL	Human liver microsomes	Inhibition of CYP1A2, 2D6 and 3A4	(Ollikainen <i>et al.</i> , 2017)	
30	0.1 mg/mL	Primary rat hepatocytes	Inhibition of CYP3A	(Cornu <i>et al.</i> , 2018)	
30 70	0.1 mg/mL	Primary human hepatocytes	Induction of CYP1A, 2B Inhibition of CYP3A	(Cornu <i>et al.</i> , 2018)	
30 70	5 mg	<i>Intravenous</i>	Inhibition of CYP2B and CYP3A No effect on CYP1A	(Cornu <i>et al.</i> , 2018)	
15	50 ppm	Baculosomes	No effect Inhibition of CYP1A2, 2C9, 2C19, 3A4	(Sereemasapun <i>et al.</i> , 2008)	
12	10-80 µM	Baculosomes	Inhibition of CYP3A4, 2C19, 2C9 and 1A2	(Warisnoich <i>et al.</i> , 2011)	
180	100 µg/mL	Rat liver microsomes	Inhibition of CYP2C and 2D Weak inhibition of CYP1A and 2E1 No effect on 3A4	(Kulthong <i>et al.</i> , 2012)	

**SILVER**

**Table 1:** Effect of several types of NPs on the cytochrome P450 activities

## 5. Inflammation and oxidative stress

Oxidative stress and inflammation can appear in hepatic tissue subsequent to NP exposure. Modulation of the expression of proinflammatory cytokines induced by NPs has been widely reported in the literature (**Table 2**). Gaiser *et al.* studied mRNA expression of cytokines and receptors, both in C3A cell cultures and in rat liver (Gaiser *et al.*, 2013). The researchers showed that Ag NPs induced an upregulation of mRNA expression of different inflammatory cytokines, especially IL-8 (or MIP2, the murine homologue of IL-8), TNF- $\alpha$  and the receptor IL-1RI. Moreover, sICAM-1, the circulating form of ICAM-1, which is involved in cell-cell interactions between immune and endothelial cells, was increased following Ag NP exposure. This study suggests a significant hepatic inflammatory response initiated by Ag NP exposure both *in vitro* and *in vivo*. Repeated exposure to Ag NPs induced an increase in serum levels of proinflammatory cytokines such as IL-1 and IL-6, THP-1 and THP-2 cytokines (IL-12 and IL-10, respectively) and TGF- $\beta$  (Park *et al.*, 2010). In addition, an increase in B cell distribution and inflammatory cell infiltrates was observed.

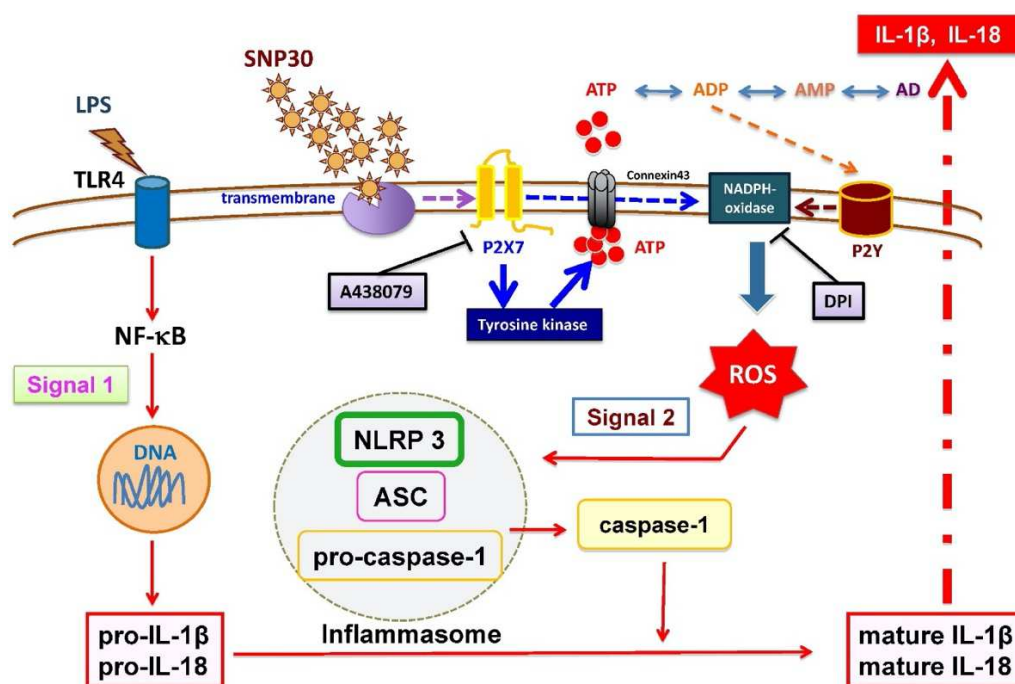
Some signs of Kupffer cell activation and an increase in their number were clearly identified in rat liver following exposure to Au NPs (10 and 20 nm) by intraperitoneal infusion (Abdelhalim and Jarrar, 2011). These cytologic inflammatory markers were confirmed by Cho *et al.*, who showed an upregulation in genes involved in the inflammatory and immune response in mouse liver after exposure to PEG-coated Au NPs (100 nm) (Cho *et al.*, 2009b). The same coated NPs with a smaller size (13 nm in diameter) induced liver inflammation with neutrophil influx. The level of adhesion molecules, chemokines and inflammatory cytokines increased up to 24 h after intravenous injection (Cho *et al.*, 2009a). Histopathological sections showed an infiltration of inflammatory cells. Induction of inflammatory cytokines was also demonstrated at the mRNA and protein levels in the mouse liver after exposure to TiO<sub>2</sub> NPs. Inflammation induced by TiO<sub>2</sub> NPs led to global liver injury *via* the apoptosis pathway, starting with upregulation of Toll-like



receptors TLR2 and TLR4 and activation of a subsequent cytokine pathway (Cui *et al.*, 2011). Moreover, TiO<sub>2</sub> NPs changed the expression levels of many genes involved in liver metabolic processes, especially genes encoding metallothioneins, which are involved in protection against oxidative stress (Li *et al.*, 2017).

Kupffer cells, the resident macrophages of the liver, play a critical role in NP-induced inflammation because of their localization, uptake functions and capacity to secrete certain cytokines. Kupffer cells line the hepatic sinusoid, where NPs with a size less than 150-200 nm can pass through the fenestrations (Arami *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016). These NPs may be recognized by different components of NPs (*e.g.* shell, core, surface-decorating moieties, and cargoes) as foreign (Elsabahy and Wooley, 2013). Macrophages take up the NPs, and internalization has also been clearly demonstrated for inorganic NPs (Chen *et al.*, 2013; Hussein and Sarhan, 2014; Sun *et al.*, 2013). Activated Kupffer cells release different signaling molecules and inflammatory mediators, such as cytokines, chemokines, nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS), leading to the inhibition of specific complexes (I and IV) of the mitochondrial respiratory chain (Dixon *et al.*, 2013; Hussein and Sarhan, 2014; Sun *et al.*, 2014). Activation of Kupffer cells is associated with a major infiltration of inflammatory cells in the liver upon exposure to NPs. Some lymphocytic infiltration has been observed in the livers of rats exposed to Au NPs (Abdelhalim and Jarrar, 2012). In addition to the infiltration of inflammatory cells, increases in serum levels of white blood cells, neutrophils, lymphocytes and monocytes were also reported after SiO<sub>2</sub> NP administration (Sun *et al.*, 2013). This cell recruitment is also involved in NP elimination from the liver (Abdelhalim and Jarrar, 2011). Moreover, a direct link between inflammation and oxidative stress has already been reported and consists of activation of some transcription factors involved in the oxidative stress response (Donaldson *et al.*, 2001). Small SiO<sub>2</sub> NPs (30 nm) induced ROS production *via* an ATP-P2X7-dependent pathway in Kupffer cells (**Figure 4**) (Kojima *et al.*, 2014; Nakanishi *et al.*, 2016).

This was followed by activation of NLRP3, an activator protein of the inflammasome, and then IL-1 $\beta$  was released. Finally, both the inflammatory response and oxidative stress were responsible for cell death and global liver injury (Hussein and Sarhan, 2014). The proinflammatory response mediated by Kupffer cells is usually described as the origin of liver injury following exposure to NPs.



**Figure 4. Proposed production signaling of IL-1 $\beta$  and IL-18 in cells exposed to silica NPs.**

Figures are reproduced with permission from reference (Nakanishi *et al.*, 2016).

## 6. Genotoxicity

Genotoxicity is usually evaluated by the conventional comet assay, the fgp-modified comet assay and the micronucleus test. DNA damage due to NPs, including TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub> and ZnO NPs, has been reported in hepatic cells (Yazdimamaghani *et al.*, 2019) (Table 2). Shukla *et al.* demonstrated by comet assay that an increase in oxidative DNA alteration occurred in HepG2 cells after 6 h of incubation with TiO<sub>2</sub> NPs (Shukla *et al.*, 2013). The effect was dependent on NP concentration. In a C3A hepatic cell line model, some DNA damage was also reported after

4 h of exposure to small positively charged TiO<sub>2</sub> NPs (Kermanizadeh *et al.*, 2012). The effects of inorganic NPs were evaluated using a human 3D liver microtissue model. NPs composed of Ag and ZnO were the most genotoxic compared with the genotoxicity of TiO<sub>2</sub> NPs. The effect was exacerbated after repeated exposure compared to that of a single administration (Kermanizadeh *et al.*, 2014). Comet assays indicated that 10 nm uncoated anatase TiO<sub>2</sub> NPs increased DNA strand breaks in the livers of mice exposed to 50 mg/kg/day for 3 days (Li *et al.*, 2017). Additionally, some repeated respiratory exposure of rats to 25 nm TiO<sub>2</sub> NPs led to a significant increase in DNA damage (Relier *et al.*, 2017). Suzuki *et al.* showed a lack of genotoxicity in rats using 3 different genotoxic assays after intravenous administration of 2 to 50 mg/kg TiO<sub>2</sub> NPs once a week for 4 weeks (Suzuki *et al.*, 2016). Although experimental design could be discussed (route of administration, doses or concentrations and type of DNA damage assay), all of these studies showed some genotoxic effects of TiO<sub>2</sub> NPs on hepatic cell lines or in animal models. The genotoxicity of NPs used in the cosmetic industry was also studied. Significant DNA damage was reported in HepG2 cells incubated for 6 h with ZnO NPs at non-cytotoxic concentrations (Sharma *et al.*, 2012). Oxidative DNA damage was also detected in hepatic tissue after oral administration of ZnO NPs in mice. Only the highest dose of 300 mg/kg led to DNA alterations. Pfuhler *et al.* showed by using a standard comet assay that intravenous injection of 15 nm SiO<sub>2</sub> NPs in rats did not affect the DNA, while slight genotoxicity was measured using the hOGG1 assay (Pfuhler *et al.*, 2017). However, DNA damage was clearly reported after intraperitoneal injection of 50 nm SiO<sub>2</sub> NPs in mice (0.25 mg/kg) (Nemmar *et al.*, 2016).

The genotoxic effects of NPs may occur through direct interaction with DNA, which implies nuclear translocation of NPs. In addition, some NPs have been localized in the nucleus (Shukla *et al.*, 2013). Another explanation is an indirect effect of NPs, resulting in an imbalance in the antioxidant and free radical levels in the cells, since DNA damage was caused by excessive

oxidative stress. In HepG2 cells, Shukla *et al.* measured significant ROS production and decreased glutathione (GSH) content after 6 h of incubation with TiO<sub>2</sub> NPs (Shukla *et al.*, 2013). After 24 h of incubation, a significant alteration in mitochondrial membrane integrity was observed, followed by necrosis and apoptosis of cells when NP exposure was prolonged up to 48 h. Using the same hepatic cell model, it has been shown that SiO<sub>2</sub> NPs induce apoptosis through the production of ROS, which affects the expression of essential genes involved in the apoptotic mechanism, such as upregulation of p53, bax and caspase-3 expression and downregulation of bcl-2 expression (Ahmad *et al.*, 2012). The link between ROS production, DNA damage and apoptosis activation in hepatic cell lines is also clearly demonstrated for cobalt, ZnO and Ag NPs (Y. K. Liu *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2016).

Data on liver inflammatory effects and the liver genotoxicity process are less well described for the organic NPs. Kermanizadeh *et al.* demonstrated that *in vitro* and *in vivo* cationic liposomes (approximately 200 nm in complete medium) caused no adverse effects to hepatocytes, up to 39 µg/cm<sup>2</sup> *in vitro* and 200 µg per mouse *in vivo* (Kermanizadeh *et al.*, 2017). mRNA levels of the chemokine CCL2 (a monocyte chemoattractant), the proinflammatory cytokine IL-6 and the DNA glycosylase OGG1 were significantly upregulated in liver tissue of rats exposed to repeated doses of micelles for 7 days. Cationic liposomes of 92 nm induce an increase in CCL2 and IL-6 mRNA. However, other data indicate no effect of micelles and liposomes on serum biochemical markers and DNA damage in the liver (Knudsen *et al.*, 2015). Cationic liposomes (approximately 180 nm) and different types of dendrimers, such as poly(amido amine) (PAMAM) dendrimers (approximately 20 nm) and poly(propyleneimine) (PPI) dendrimers (approximately 20 nm), have significant genotoxic effects on cells. The influence of surface charge on genotoxicity was analyzed, and a strong positive linear correlation was established between the value of the zeta potential and the genotoxicity of the positively charged NPs (Shah *et al.*, 2013).

<b>TYPE OF NPS</b>	<b>SIZE (NM)</b>	<b>DOSE OR CONCENTRATION</b>	<b>CELL MODEL OR ROUTE OF ADMINISTRATION</b>	<b>GENOTOXICITY INFLAMMATION</b>	<b>REFERENCE</b>
<b>COBALT</b>	50	1-500 $\mu$ M	BRL-3A cell line (rat liver fibroblast)	ROS production Apoptosis activation DNA damage	(Y. K. Liu <i>et al.</i> , 2016)
	10-20		<i>Intraperitoneal</i>	Inflammatory cells infiltration Prominent Kupffer cells	(Abdelhalim and Jarrar, 2011)
<b>GOLD</b>	4 100	4.26 mg/kg	<i>Intravenous</i>	Induction of apoptosis Microarray and RT-PCR: Upregulation of genes involved in inflammatory and immune response	(Cho <i>et al.</i> , 2009b)
	13	0.17 to 4.26 mg/kg	<i>Intravenous</i>	Increase of mRNA of ICAM-1 and E-selectin IL-1B, IL-6, IL-10 and TNF-alpha increased Increase of mRNA of chemokines CCL-2, 3, 4 and 5	(Cho <i>et al.</i> , 2009a)
<b>SILICA</b>	15	50 mg/kg	<i>Intravenous</i>	ROS production Secretion of TNF-alpha Inflammatory cells infiltrations Increase of CD68-positive Kupffer cells	(Chen <i>et al.</i> , 2013)
	20	0.5 to 2 mg/mL	Kupffer cell (Rat, primary culture)  BRL cell line (rat liver fibroblast)	Upregulation of the secretion of inflammatory mediators from Kupffer cells Decrease of the activity of the mitochondrial respiratory chain complexes I, III, and IV	(Xue <i>et al.</i> , 2014)
	53	20 mg/kg	<i>Intravenous</i>	Increase of macrophages	(Waegeneers <i>et al.</i> , 2018)

34						Increase of IL-1Beta	(Kojima <i>et al.</i> , 2014)
230	1-20 µg/cm <sup>2</sup>	KUP5 clone Kupffer cell line			Silica NP30 induced ROS generation		
309							
70	30 mg/kg	<i>Intravenous</i>			IL-6 and TNF alpha increase		(Nishimori <i>et al.</i> , 2009)
15	1.25-12.5 mg/kg	<i>Intravenous</i>			Alkaline Comet assay: no effect OGG1-modified Comet assay: increase of tail DNA		(Pfuhrer <i>et al.</i> , 2017)
50	0.25 mg/kg	<i>Intraperitoneal</i>			DNA damage		(Nemmar <i>et al.</i> , 2016)
17	1 µg/mL	C3A cell line (human hepatocytes)			IL-8 and TNF-alpha secretion		(Gaiser <i>et al.</i> , 2013)
17	50 µg per animal	<i>Intravenous</i>			Increase of mRNA of IL-1RI, MIP-2 and TNF-alpha		(Gaiser <i>et al.</i> , 2013)
22					IL-1, IL-6 and TNF-alpha secretion		
42	1 mg/kg	<i>Oral</i>			IL-12, TGF-beta and IgE secretion		(Park <i>et al.</i> , 2010)
71					Increase B cell distribution		
323							
2	5-20 µg/mL	HepG2 cell line (human hepatocytes)			ROS generation DNA damage Apoptosis		(Zhu <i>et al.</i> , 2016)
17.5	0.5-256 µg/mL	C3A cell line (human hepatocytes)			Tail DNA No ROS		(Kermanızadeh <i>et al.</i> , 2012)
10	0.5-8 µg/mL	3D liver microtissue			DNA strand breaks Cytokine secretion Lipid peroxidation		(Kermanızadeh <i>et al.</i> , 2014)
30-70	1 to 80 µg/mL	HepG2 (human hepatocytes)			DNA damage Micronucleated cells Alteration of mitochondrial membrane Intracellular ROS		(Shukla <i>et al.</i> , 2013)

**SILVER**

**TITANIUM  
DIOXIDE**

7 10	0.5-256 µg/mL	C3A cell line (human hepatocytes)	DNA damage Tail DNA damage	(Kermanizadeh <i>et al.</i> , 2012)
10	50 mg/kg	Mouse liver	Oxidative DNA damage Modification of metabolic processes genes	(Li <i>et al.</i> , 2017)
23	0.5 to 10 mg/kg	<i>Endotracheal instillation</i>	Comet assay: DNA damage at 35 days, no DNA damage before Gamme-H2AX assay: no genotoxic damage Micronucleus assay: no effect immediately after exposure, increase of micronuclei at 35 days	(Relier <i>et al.</i> , 2017)
150	2-50 mg/kg	<i>Intravenous</i>	No effect	(Suzuki <i>et al.</i> , 2011)
5	5 to 50 mg/kg	<i>Intragastric</i>	RT-PCR and ELISA: increase of TLR2 et 4 expression RT-PCR and ELISA: down regulation of IκB and IL-2 and up-regulation of IKK1, IKK2, NF-κB, TNF-alpha	(Cui <i>et al.</i> , 2011)
30	50-300 mg/kg	<i>Oral</i>	Lipid peroxidation, oxidative DNA damage, apoptotic cells for 300 mg/kg dose No effect for 50 mg/kg	(Sharma <i>et al.</i> , 2012)
20-250	0.5-256 µg/mL	C3A cell line (human hepatocytes)	Tail DNA No ROS	(Kermanizadeh <i>et al.</i> , 2012)
20-250	0.5-8 µg/mL	3D liver microtissue	DNA strand breaks Cytokine secretion Lipid peroxidation	(Kermanizadeh <i>et al.</i> , 2014)

## ZINC OXIDE

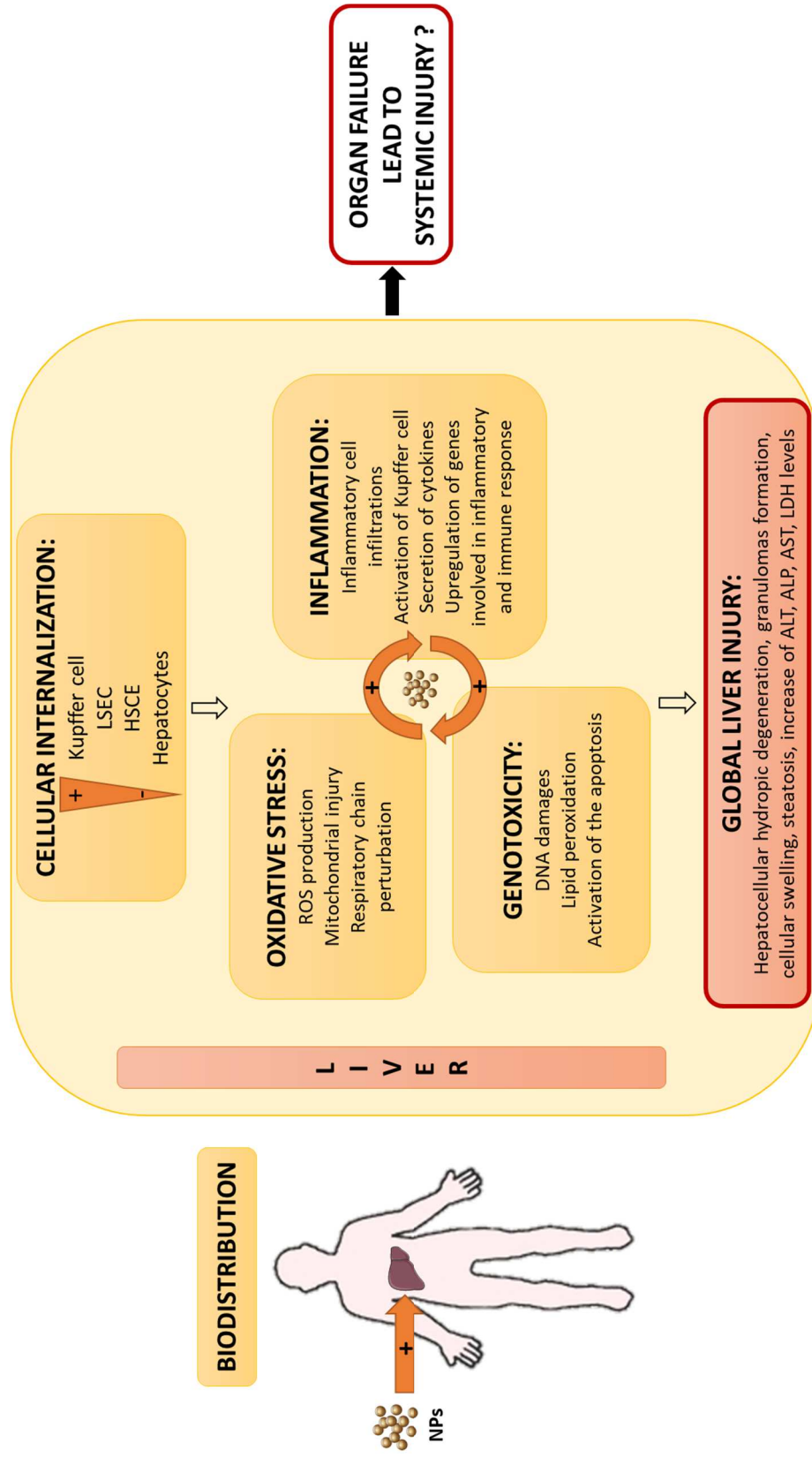
**Table 2:** Genotoxic effects and inflammation response induced by various types of NPs

## 7. Conclusion

The overview of the literature suggests that many of the NPs present some potential to modulate CYP activity and induce an inflammatory response and some genotoxic effects, which can lead to hepatic cell death. These possibilities are more or less pronounced, depending on the physicochemical parameters of the NPs. The literature suggests that the CYP superfamily of xenobiotic metabolizing enzymes is modified, mainly by inhibiting CYP activity, but the precise mechanism of action remains unclear. Inflammatory processes, especially the release of certain cytokines, inflammatory cell infiltration, Kupffer activation and genotoxic effects, were also clearly identified after NP exposure (**Figure 5**). Increased rates of intracellular ROS have been identified as a fundamental precursor to these mechanisms. If we compare inorganic and organic NPs, many studies report more deleterious effects on the liver due to inorganic NPs, but the scientific literature is less abundant for organic NPs. Organic NPs are composed of biocompatible materials, which are therefore less cytotoxic, but we should keep in mind that at the nanometric scale, significant interactions with the biological environment can still occur. Four key parameters must be considered. First, the physicochemical properties of NPs, such as the surface coating, zeta potential and composition, are key factors to understand and explain their effects on the liver, and the most influential parameter to consider for hepatotoxicity is NP size. Second, *in vivo* studies highlight the importance of taking into consideration the route of administration, the time of exposure and the dose, since these factors determine how quickly NPs reach the liver and the amount of NPs present in the liver. Third, the choice of biological assays is also a key factor. For example, considering the available genotoxicity tests, the power of the micronucleus assay to detect a low level of genotoxic potential is superior to that of the comet assay (Kawaguchi *et al.*, 2010). Additionally, it has been shown that histopathological damage did not always correlate with biochemical markers of liver injury. Finally, the choice of the model used is very important since *in vitro* and *in vivo* results are not systematically



correlated, and some differences can also appear with different species. In conclusion, the large and very rapidly expanding nanotechnologies bring very promising new perspectives to a wide spectrum of applications. However, considering the increasing use of NPs in daily human products, their impact on human health must be thoroughly evaluated after acute and chronic exposure by using relevant models and biological assays to ensure human safety.



**Figure 5:** Schematic representation of the effects of nanoparticles on the liver.

## Acknowledgements

Raphaël Cornu is supported by a fellowship from the “Communauté d’Agglomération du Grand Besançon (CAGB)”.

## Bibliography

Abbasi, E., Aval, S., Akbarzadeh, A., Milani, M., Nasrabadi, H., Joo, S., Hanifehpour, Y., Nejati-Koshki, K., Pashaei-Asl, R., 2014. Dendrimers: synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Res. Lett.* 9, 247. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-247>

Abdelhalim, M., Jarrar, B.M., 2012. Histological alterations in the liver of rats induced by different gold nanoparticle sizes, doses and exposure duration. *J. Nanobiotechnology* 10, 5. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-10-5>

Abdelhalim, M., Jarrar, B.M., 2011. Gold nanoparticles administration induced prominent inflammatory, central vein intima disruption, fatty change and Kupffer cells hyperplasia. *Lipids Health Dis.* 10, 133. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-133>

Abdelhalim, M.A.K., Abdelmottaleb Moussa, S.A., 2013. The gold nanoparticle size and exposure duration effect on the liver and kidney function of rats: In vivo. *Saudi J. Biol. Sci.* 20, 177–181. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.01.007>

Abdel-Misih, S.R.Z., Bloomston, M., 2010. Liver Anatomy. *Surg. Clin. North Am.* 90, 643–653. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2010.04.017>

Ahmad, J., Ahamed, M., Akhtar, M.J., Alrokayan, S.A., Siddiqui, M.A., Musarrat, J., Al-Khedhairy, A.A., 2012. Apoptosis induction by silica nanoparticles mediated through reactive oxygen species in human liver cell line HepG2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 259, 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.12.020>

Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S.W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., Nejati-Koshki, K., 2013. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res. Lett.* 8, 102. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>

Ansari, M.A., Khan, H.M., Khan, A.A., Alzohairy, M.A., 2015. Biochemical and histopathological ultrastructural changes caused by ZnO nanoparticles in mice. *Toxicol. Environ. Chem.* 1–16. <https://doi.org/10.1080/02772248.2015.1077960>

Arami, H., Khandhar, A., Liggitt, D., Krishnan, K.M., 2015. In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* 44, 8576–8607. <https://doi.org/10.1039/C5CS00541H>

Beck-Broichsitter, M., Nicolas, J., Couvreur, P., 2015. Design attributes of long-circulating polymeric drug delivery vehicles. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV* 97, 304–317. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.03.033>

- Bilzer, M., Roggel, F., Gerbes, A.L., 2006. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int.* 26, 1175–1186. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2006.01342.x>
- Bogdanos, D.P., Gao, B., Gershwin, M.E., 2013. Liver Immunology, in: Terjung, R. (Ed.), *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, p. c120011. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120011>
- Bookstaver, M.L., Tsai, S.J., Bromberg, J.S., Jewell, C.M., 2018. Improving Vaccine and Immunotherapy Design Using Biomaterials. *Trends Immunol.* 39, 135–150. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.10.002>
- Boyer, J.L., 2013. Bile Formation and Secretion, in: Terjung, R. (Ed.), *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, p. c120027. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120027>
- Chan, W.-T., Liu, C.-C., Chiang Chiau, J.-S., Tsai, S.-T., Liang, C.-K., Cheng, M.-L., Lee, H.-C., Yeung, C.-Y., Hou, S.-Y., 2017. In vivo toxicologic study of larger silica nanoparticles in mice. *Int. J. Nanomedicine Volume 12*, 3421–3432. <https://doi.org/10.2147/IJN.S126823>
- Chen, H., Dorrigan, A., Saad, S., Hare, D.J., Cortie, M.B., Valenzuela, S.M., 2013. In Vivo Study of Spherical Gold Nanoparticles: Inflammatory Effects and Distribution in Mice. *PLoS ONE* 8, e58208. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058208>
- Cho, W.-S., Cho, M., Jeong, Jinyoung, Choi, M., Cho, H.-Y., Han, B.S., Kim, S.H., Kim, H.O., Lim, Y.T., Chung, B.H., Jeong, Jayoung, 2009a. Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 236, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.12.023>
- Cho, W.-S., Kim, S., Han, B.S., Son, W.C., Jeong, J., 2009b. Comparison of gene expression profiles in mice liver following intravenous injection of 4 and 100nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicol. Lett.* 191, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.08.010>
- Collège des universitaires en hépato-gastro-entérologie, Beaugerie, L., Sokol, H., 2014. *Les fondamentaux de la pathologie digestive: enseignement intégré, appareil digestif*. Elsevier Masson, Issy-les-Moulineaux.
- Cornu, R., Rougier, N., Pellequer, Y., Lamprecht, A., Hamon, P., Li, R., Beduneau, A., Martin, H., 2018. Interspecies differences in the cytochrome P450 activity of hepatocytes exposed to PLGA and silica nanoparticles: an in vitro and in vivo investigation. *Nanoscale* 10, 5171–5181. <https://doi.org/10.1039/C8NR00226F>
- Cui, Y., Liu, H., Zhou, M., Duan, Y., Li, N., Gong, X., Hu, R., Hong, M., Hong, F., 2011. Signaling pathway of inflammatory responses in the mouse liver caused by TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. A* 96A, 221–229. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32976>
- Dekkers, S., Krystek, P., Peters, R.J.B., Lankveld, D.P.K., Bokkers, B.G.H., van Hoeven-Arentzen, P.H., Bouwmeester, H., Oomen, A.G., 2011. Presence and risks of nanosilica in food products. *Nanotoxicology* 5, 393–405. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.519836>
- Dixon, L.J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M.T., Nagy, L.E., 2013. Kupffer Cells in the Liver, in: Terjung, R. (Ed.), *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, p. c120026. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120026>

Dogra, P., Adolph, N.L., Wang, Z., Lin, Y.-S., Butler, K.S., Durfee, P.N., Croissant, J.G., Nouredine, A., Coker, E.N., Bearer, E.L., Cristini, V., Brinker, C.J., 2018. Establishing the effects of mesoporous silica nanoparticle properties on in vivo disposition using imaging-based pharmacokinetics. *Nat. Commun.* 9, 4551. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06730-z>

Donaldson, K., Stone, V., Seaton, A., MacNee, W., 2001. Ambient particle inhalation and the cardiovascular system: potential mechanisms. *Environ. Health Perspect.* 109, 523–527. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109s4523>

EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), Younes, M., Aggett, P., Aguilar, F., Crebelli, R., Dusemund, B., Filipic, M., Frutos, M.J., Galtier, P., Gott, D., Gundert-Remy, U., Kuhnle, G.G., Leblanc, J.-C., Lillegaard, I.T., Moldeus, P., Mortensen, A., Oskarsson, A., Stankovic, I., Waalkens-Berendsen, I., Woutersen, R.A., Wright, M., Boon, P., Chrysafidis, D., Gürtler, R., Mosesso, P., Parent-Massin, D., Tobbäck, P., Kovalkovicova, N., Rincon, A.M., Tard, A., Lambré, C., 2018. Re-evaluation of silicon dioxide (E 551) as a food additive. *EFSA J.* 16. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5088>

Elsabehy, M., Wooley, K.L., 2013. Cytokines as biomarkers of nanoparticle immunotoxicity. *Chem. Soc. Rev.* 42, 5552. <https://doi.org/10.1039/c3cs60064e>

Ensign, L.M., Cone, R., Hanes, J., 2012. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 557–570. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.12.009>

Fröhlich, E., Kueznik, T., Samberger, C., Roblegg, E., Wrighton, C., Pieber, T.R., 2010. Size-dependent effects of nanoparticles on the activity of cytochrome P450 isoenzymes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 242, 326–332. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.11.002>

Fröhlich, E., Roblegg, E., 2012. Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products. *Toxicology* 291, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.11.004>

Gaiser, B.K., Hirn, S., Kermanizadeh, A., Kanase, N., Fytianos, K., Wenk, A., Haberl, N., Brunelli, A., Kreyling, W.G., Stone, V., 2013. Effects of Silver Nanoparticles on the Liver and Hepatocytes In Vitro. *Toxicol. Sci.* 131, 537–547. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs306>

Gaumet, M., Gurny, R., Delie, F., 2009. Localization and quantification of biodegradable particles in an intestinal cell model: The influence of particle size. *Eur. J. Pharm. Sci.* 36, 465–473. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.11.015>

Giljohann, D.A., Seferos, D.S., Prigodich, A.E., Patel, P.C., Mirkin, C.A., 2009. Gene Regulation with Polyvalent siRNA–Nanoparticle Conjugates. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 2072–2073. <https://doi.org/10.1021/ja808719p>

Guengerich, F.P., 2007. Mechanisms of cytochrome P450 substrate oxidation: MiniReview. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 21, 163–168.

Guterres, S.S., Alves, M.P., Pohlmann, A.R., 2007. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. *Drug Target Insights* 2, 147–157.

Hadjipanayis, C.G., Bonder, M.J., Balakrishnan, S., Wang, X., Mao, H., Hadjipanayis, G.C., 2008. Metallic Iron Nanoparticles for MRI Contrast Enhancement and Local Hyperthermia. *Small* 4, 1925–1929. <https://doi.org/10.1002/sml.200800261>

Hua-Qiao, T., Min, X., Qian, R., Ru-Wen, J., Qi-Ji, L., Li, Y., 2016. The effect of ZnO nanoparticles on liver function in rats. *Int. J. Nanomedicine* Volume 11, 4275–4285. <https://doi.org/10.2147/IJN.S109031>

Hussein, R., Sarhan, O., 2014. Effects of intraperitoneally injected silver nanoparticles on histological structures and blood parameters in the albino rat. *Int. J. Nanomedicine* 1505. <https://doi.org/10.2147/IJN.S56729>

Ibrahim, K., Al-Mutary, M., Bakhiet, A., Khan, H., 2018. Histopathology of the Liver, Kidney, and Spleen of Mice Exposed to Gold Nanoparticles. *Molecules* 23, 1848. <https://doi.org/10.3390/molecules23081848>

Imai, S., Yoshioka, Y., Morishita, Y., Yoshida, T., Uji, M., Nagano, K., Mukai, Y., Kamada, H., Tsunoda, S.-I., Higashisaka, K., Tsutsumi, Y., 2014. Size and surface modification of amorphous silica particles determine their effects on the activity of human CYP3A4 in vitro. *Nanoscale Res. Lett.* 9, 651. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-651>

Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S.V., Zolfaghari, B., 2014. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Res. Pharm. Sci.* 9, 385–406.

Ivanov, S., Zhuravsky, S., Yukina, G., Tomson, V., Korolev, D., Galagudza, M., 2012. In Vivo Toxicity of Intravenously Administered Silica and Silicon Nanoparticles. *Materials* 5, 1873–1889. <https://doi.org/10.3390/ma5101873>

Jani, P., Halbert, G.W., Langridge, J., Florence, A.T., 1990. Nanoparticle Uptake by the Rat Gastrointestinal Mucosa: Quantitation and Particle Size Dependency. *J. Pharm. Pharmacol.* 42, 821–826. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1990.tb07033.x>

Jiang, J., Pi, J., Cai, J., 2018. The Advancing of Zinc Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Bioinorg. Chem. Appl.* 2018, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2018/1062562>

Kan, Z., Madoff, D., 2008. Liver Anatomy: Microcirculation of the Liver. *Semin. Interv. Radiol.* 25, 077–085. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1076685>

Kawaguchi, S., Nakamura, T., Yamamoto, A., Honda, G., Sasaki, Y.F., 2010. Is the Comet Assay a Sensitive Procedure for Detecting Genotoxicity? *J. Nucleic Acids* 2010, 1–8. <https://doi.org/10.4061/2010/541050>

Kermanizadeh, A., Gaiser, B.K., Hutchison, G.R., Stone, V., 2012. An in vitro liver model - assessing oxidative stress and genotoxicity following exposure of hepatocytes to a panel of engineered nanomaterials. *Part. Fibre Toxicol.* 9, 28. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-9-28>

Kermanizadeh, A., Jacobsen, N.R., Roursgaard, M., Loft, S., Møller, P., 2017. Hepatic toxicity assessment of cationic liposome exposure in healthy and chronic alcohol fed mice. *Heliyon* 3, e00458. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00458>

Kermanizadeh, A., L hr, M., Roursgaard, M., Messner, S., Gunness, P., Kelm, J.M., Møller, P., Stone, V., Loft, S., 2014. Hepatic toxicology following single and multiple exposure of engineered nanomaterials utilising a novel primary human 3D liver microtissue model. *Part. Fibre Toxicol.* 11, 56. <https://doi.org/10.1186/s12989-014-0056-2>

Keservani, R.K., Sharma, A.K. (Eds.), 2019. Nanoparticulate drug delivery systems. Apple Academic Press, Toronto ; New Jersey.

Knudsen, K.B., Northeved, H., Kumar EK, P., Permin, A., Gjetting, T., Andresen, T.L., Larsen, S., Wegener, K.M., Lykkesfeldt, J., Jantzen, K., Loft, S., Møller, P., Roursgaard, M., 2015. In vivo toxicity of cationic micelles and liposomes. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 11, 467–477. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.08.004>

Kojima, S., Negishi, Y., Tsukimoto, M., Takenouchi, T., Kitani, H., Takeda, K., 2014. Purinergic signaling via P2X7 receptor mediates IL-1 $\beta$  production in Kupffer cells exposed to silica nanoparticle. *Toxicology* 321, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.03.008>

Kubes, P., Jenne, C., 2018. Immune Responses in the Liver. *Annu. Rev. Immunol.* 36, 247–277. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052415>

Kulthong, K., Maniratanachote, R., Kobayashi, Y., Fukami, T., Yokoi, T., 2012. Effects of silver nanoparticles on rat hepatic cytochrome P450 enzyme activity. *Xenobiotica* 42, 854–862. <https://doi.org/10.3109/00498254.2012.670312>

Lai, S.K., O’Hanlon, D.E., Harrold, S., Man, S.T., Wang, Y.-Y., Cone, R., Hanes, J., 2007. Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 1482–1487. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608611104>

Lamb, J.G., Hathaway, L.B., Munger, M.A., Raucy, J.L., Franklin, M.R., 2010. Nanosilver Particle Effects on Drug Metabolism In Vitro. *Drug Metab. Dispos.* 38, 2246–2251. <https://doi.org/10.1124/dmd.110.035238>

Lee, J.H., Gulumian, M., Faustman, E.M., Workman, T., Jeon, K., Yu, I.J., 2018. Blood Biochemical and Hematological Study after Subacute Intravenous Injection of Gold and Silver Nanoparticles and Coadministered Gold and Silver Nanoparticles of Similar Sizes. *BioMed Res. Int.* 2018, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2018/8460910>

Li, Y., Yan, J., Ding, W., Chen, Y., Pack, L.M., Chen, T., 2017. Genotoxicity and gene expression analyses of liver and lung tissues of mice treated with titanium dioxide nanoparticles. *Mutagenesis* 32, 33–46. <https://doi.org/10.1093/mutage/gew065>

Liu, Y.K., Deng, X.X., Yang, H.L., 2016. Cytotoxicity and genotoxicity in liver cells induced by cobalt nanoparticles and ions. *Bone Jt. Res.* 5, 461–469. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.510.BJR-2016-0016.R1>

Maeda, H., Tsukigawa, K., Fang, J., 2016. A Retrospective 30 Years After Discovery of the Enhanced Permeability and Retention Effect of Solid Tumors: Next-Generation Chemotherapeutics and Photodynamic Therapy-Problems, Solutions, and Prospects. *Microcirculation* 23, 173–182. <https://doi.org/10.1111/micc.12228>

Manikandan, P., Nagini, S., 2018. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Curr. Drug Targets* 19. <https://doi.org/10.2174/1389450118666170125144557>

Mao, Z., Zhou, X., Gao, C., 2013. Influence of structure and properties of colloidal biomaterials on cellular uptake and cell functions. *Biomater. Sci.* 1, 896. <https://doi.org/10.1039/c3bm00137g>

McDonnell, A.M., Dang, C.H., 2013. Basic review of the cytochrome p450 system. *J. Adv. Pract. Oncol.* 4, 263–268.

Mody, V., Siwale, R., Singh, A., Mody, H., 2010. Introduction to metallic nanoparticles. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2, 282. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.72127>

Mohammad, A.K., Reineke, J.J., 2013. Quantitative Detection of PLGA Nanoparticle Degradation in Tissues following Intravenous Administration. *Mol. Pharm.* 10, 2183–2189. <https://doi.org/10.1021/mp300559v>

Moritz, M., Geszke-Moritz, M., 2015. Recent Developments in Application of Polymeric Nanoparticles as Drug Carriers. *Adv. Clin. Exp. Med.* 24, 749–758. <https://doi.org/10.17219/acem/31802>

Mukherjee, B., Chakraborty, S., Mondal, L., Satapathy, B.S., Sengupta, S., Dutta, L., Choudhury, A., Mandal, D., 2016. Multifunctional drug nanocarriers facilitate more specific entry of therapeutic payload into tumors and control multiple drug resistance in cancer, in: *Nanobiomaterials in Cancer Therapy*. Elsevier, pp. 203–251. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42863-7.00007-4>

Najafzadeh, H., Ghoreishi, S., Mohammadian, B., Rahimi, E., Afzalzadeh, M., Kazemivarnamkhasti, M., Ganjealidarani, H., 2013. Serum biochemical and histopathological changes in liver and kidney in lambs after zinc oxide nanoparticles administration. *Vet. World* 6, 534. <https://doi.org/10.5455/vetworld.2013.534-537>

Nakanishi, K., Tsukimoto, M., Tanuma, S., Takeda, K., Kojima, S., 2016. Silica nanoparticles activate purinergic signaling via P2X 7 receptor in dendritic cells, leading to production of pro-inflammatory cytokines. *Toxicol. In Vitro* 35, 202–211. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.06.003>

Nemmar, A., Yuvaraju, P., Beegam, S., Pathan, J., Kazzam, E.E., Ali, B.H., 2016. Oxidative stress, inflammation, and DNA damage in multiple organs of mice acutely exposed to amorphous silica nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* 919. <https://doi.org/10.2147/IJN.S92278>

Nishimori, H., Kondoh, M., Isoda, K., Tsunoda, S., Tsutsumi, Y., Yagi, K., 2009. Silica nanoparticles as hepatotoxicants. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72, 496–501. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2009.02.005>

Noriega-Luna, B., Godínez, L.A., Rodríguez, F.J., Rodríguez, A., Zaldívar-Lelo de Larrea, G., Sosa-Ferreyra, C.F., Mercado-Curiel, R.F., Manríquez, J., Bustos, E., 2014. Applications of Dendrimers in Drug Delivery Agents, Diagnosis, Therapy, and Detection. *J. Nanomater.* 2014, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2014/507273>

Ogawara, K., Yoshida, M., Higaki, K., Toshikiro Kimura, Shiraishi, K., Nishikawa, M., Takakura, Y., Hashida, M., 1999. Hepatic uptake of polystyrene microspheres in rats: Effect of particle size on intrahepatic distribution. *J. Controlled Release* 59, 15–22. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00015-2](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00015-2)

Ollikainen, E., Liu, D., Kallio, A., Mäkilä, E., Zhang, H., Salonen, J., Santos, H.A., Sikanen, T.M., 2017. The impact of porous silicon nanoparticles on human cytochrome P450 metabolism in human liver microsomes in vitro. *Eur. J. Pharm. Sci.* 104, 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.03.039>



- Otyepka, M., Skopalík, J., Anzenbacherová, E., Anzenbacher, P., 2007. What common structural features and variations of mammalian P450s are known to date? *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1770, 376–389. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.09.013>
- Panagi, Z., Beletsi, A., Evangelatos, G., Livaniou, E., Ithakissios, D.S., Avgoustakis, K., 2001. Effect of dose on the biodistribution and pharmacokinetics of PLGA and PLGA-mPEG nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 221, 143–152.
- Pandey, S.K., Haldar, C., Patel, D.K., Maiti, P., 2013. Biodegradable Polymers for Potential Delivery Systems for Therapeutics, in: Dutta, P.K., Dutta, J. (Eds.), *Multifaceted Development and Application of Biopolymers for Biology, Biomedicine and Nanotechnology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 169–202. [https://doi.org/10.1007/12\\_2012\\_198](https://doi.org/10.1007/12_2012_198)
- Pantidos, N., 2014. Biological Synthesis of Metallic Nanoparticles by Bacteria, Fungi and Plants. *J. Nanomedicine Nanotechnol.* 05. <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000233>
- Parang, Z., Moghadamnia, D., 2018. Effects of silver nanoparticles on the functional tests of liver and its histological changes in adult male rats. *Nanomedicine Res. J.* 3. <https://doi.org/10.22034/nmrj.2018.03.005>
- Park, E.-J., Bae, E., Yi, J., Kim, Y., Choi, K., Lee, S.H., Yoon, J., Lee, B.C., Park, K., 2010. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 30, 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2010.05.004>
- Park, J.-K., Utsumi, T., Seo, Y.-E., Deng, Y., Satoh, A., Saltzman, W.M., Iwakiri, Y., 2016. Cellular distribution of injected PLGA-nanoparticles in the liver. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 12, 1365–1374. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.01.013>
- Pfuhler, S., Downs, T.R., Allemang, A.J., Shan, Y., Crosby, M.E., 2017. Weak silica nanomaterial-induced genotoxicity can be explained by indirect DNA damage as shown by the OGG1-modified comet assay and genomic analysis. *Mutagenesis* 32, 5–12. <https://doi.org/10.1093/mutage/gew064>
- Pridgen, E.M., Alexis, F., Farokhzad, O.C., 2014. Polymeric Nanoparticle Technologies for Oral Drug Delivery. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 1605–1610. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2014.06.018>
- Relier, C., Dubreuil, M., Lozano Garcia, O., Cordelli, E., Mejia, J., Eleuteri, P., Robidel, F., Loret, T., Pacchierotti, F., Lucas, S., Lacroix, G., Trouiller, B., 2017. Study of TiO<sub>2</sub> P25 nanoparticles genotoxicity on lung, blood and liver cells in lung overload and non-overload conditions after repeated respiratory exposure in rats. *Toxicol. Sci.* kfx006. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx006>
- Richards, D.A., Maruani, A., Chudasama, V., 2017. Antibody fragments as nanoparticle targeting ligands: a step in the right direction. *Chem. Sci.* 8, 63–77. <https://doi.org/10.1039/C6SC02403C>
- Sa, L.T.M., Albernaz, M. de S., Patricio, B.F. de C., Junior, M.V.F., Coelho, B.F., Bordim, A., Almeida, J.C., Santos-Oliveira, R., 2012. Biodistribution of nanoparticles: Initial considerations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 70, 602–604. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.06.008>

Salata, O.V., 2004. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J. Nanobiotechnology* 2, 3. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-2-3>

Schultz, S., Smith, D.R., Mock, J.J., Schultz, D.A., 2000. Single-target molecule detection with nonbleaching multicolor optical immunolabels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 996–1001. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.3.996>

Sereemaspun, A., Hongpiticharoen, P., Rojanathanes, R., Maneewattanapinyo, P., Ekgasit, S., Warisnoicharoen, W., 2008. Inhibition of Human Cytochrome P450 Enzymes by Metallic Nanoparticles: A Preliminary to Nanogenomics. *Int. J. Pharmacol.* 4, 492–495. <https://doi.org/10.3923/ijp.2008.492.495>

Shah, V., Taratula, O., Garbuzenko, O.B., Patil, M.L., Savla, R., Zhang, M., Minko, T., 2013. Genotoxicity of different nanocarriers: possible modifications for the delivery of nucleic acids. *Curr. Drug Discov. Technol.* 10, 8–15.

Sharma, V., Anderson, D., Dhawan, A., 2011. Zinc Oxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress and Genotoxicity in Human Liver Cells (HepG2). *J. Biomed. Nanotechnol.* 7, 98–99. <https://doi.org/10.1166/jbn.2011.1220>

Sharma, V., Singh, P., Pandey, A.K., Dhawan, A., 2012. Induction of oxidative stress, DNA damage and apoptosis in mouse liver after sub-acute oral exposure to zinc oxide nanoparticles. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 745, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.12.009>

Shukla, R., Chanda, N., Zambre, A., Upendran, A., Katti, K., Kulkarni, R.R., Nune, S.K., Casteel, S.W., Smith, C.J., Vimal, J., Boote, E., Robertson, J.D., Kan, P., Engelbrecht, H., Watkinson, L.D., Carmack, T.L., Lever, J.R., Cutler, C.S., Caldwell, C., Kannan, R., Katti, K.V., 2012. Laminin receptor specific therapeutic gold nanoparticles (198AuNP-EGCg) show efficacy in treating prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 12426–12431. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121174109>

Shukla, R.K., Kumar, A., Gurbani, D., Pandey, A.K., Singh, S., Dhawan, A., 2013. TiO<sub>2</sub> nanoparticles induce oxidative DNA damage and apoptosis in human liver cells. *Nanotoxicology* 7, 48–60. <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.629747>

Sun, J., Chen, Xue, 2013. Kupffer cell-mediated hepatic injury induced by silica nanoparticles in vitro and in vivo. *Int. J. Nanomedicine* 1129. <https://doi.org/10.2147/IJN.S42242>

Sun, J., xue, yang, Chen, Q., Ding, T., 2014. SiO<sub>2</sub> nanoparticle-induced impairment of mitochondrial energy metabolism in hepatocytes directly and through a Kupffer cell-mediated pathway in vitro. *Int. J. Nanomedicine* 2891. <https://doi.org/10.2147/IJN.S60661>

Suzuki, T., Miura, N., Hojo, R., Yanagiba, Y., Suda, M., Hasegawa, T., Miyagawa, M., Wang, R.-S., 2016. Genotoxicity assessment of intravenously injected titanium dioxide nanoparticles in gpt delta transgenic mice. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 802, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.03.007>

Suzuki, T., Yoshinaga, N., Tanabe, S., 2011. Interleukin-6 (IL-6) Regulates Claudin-2 Expression and Tight Junction Permeability in Intestinal Epithelium. *J. Biol. Chem.* 286, 31263–31271. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.238147>

Tang, H., Xu, M., Shi, F., Ye, G., Lv, C., Luo, J., Zhao, L., Li, Y., 2018. Effects and Mechanism of Nano-Copper Exposure on Hepatic Cytochrome P450 Enzymes in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 2140. <https://doi.org/10.3390/ijms19072140>

Trefts, E., Gannon, M., Wasserman, D.H., 2017. The liver. *Curr. Biol.* 27, R1147–R1151. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>

Verrecchia, T., Spenlehauer, G., Bazile, D.V., Murry-Brelier, A., Archimbaud, Y., Veillard, M., 1995. Non-stealth (poly(lactic acid/albumin)) and stealth (poly(lactic acid-polyethylene glycol)) nanoparticles as injectable drug carriers. *J. Controlled Release* 36, 49–61. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(95\)00053-B](https://doi.org/10.1016/0168-3659(95)00053-B)

Waegeneers, N., Brasseur, A., Van Doren, E., Van der Heyden, S., Serreyn, P.-J., Pussemier, L., Mast, J., Schneider, Y.-J., Ruttens, A., Roels, S., 2018. Short-term biodistribution and clearance of intravenously administered silica nanoparticles. *Toxicol. Rep.* 5, 632–638. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.05.004>

Walkey, C.D., Olsen, J.B., Guo, H., Emili, A., Chan, W.C.W., 2012. Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 2139–2147. <https://doi.org/10.1021/ja2084338>

Wang, H., Du, L.-J., Song, Z.-M., Chen, X.-X., 2013. Progress in the characterization and safety evaluation of engineered inorganic nanomaterials in food. *Nanomed.* 8, 2007–2025. <https://doi.org/10.2217/nmm.13.176>

Wang, H., Thorling, C.A., Liang, X., Bridle, K.R., Grice, J.E., Zhu, Y., Crawford, D.H.G., Xu, Z.P., Liu, X., Roberts, M.S., 2015. Diagnostic imaging and therapeutic application of nanoparticles targeting the liver. *J. Mater. Chem. B* 3, 939–958. <https://doi.org/10.1039/C4TB01611D>

Wang, Y.-Y., Lai, S.K., So, C., Schneider, C., Cone, R., Hanes, J., 2011. Mucoadhesive Nanoparticles May Disrupt the Protective Human Mucus Barrier by Altering Its Microstructure. *PLoS ONE* 6, e21547. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021547>

Warisnoich, W., Hongpitich, P., Lawanprase, S., 2011. Alteration in Enzymatic Function of Human Cytochrome P450 by Silver Nanoparticles. *Res. J. Environ. Toxicol.* 5, 58–64. <https://doi.org/10.3923/rjet.2011.58.64>

Weaver, J.L., Tobin, G.A., Ingle, T., Bancos, S., Stevens, D., Rouse, R., Howard, K.E., Goodwin, D., Knapton, A., Li, X., Shea, K., Stewart, S., Xu, L., Goering, P.L., Zhang, Q., Howard, P.C., Collins, J., Khan, S., Sung, K., Tyner, K.M., 2017. Evaluating the potential of gold, silver, and silica nanoparticles to saturate mononuclear phagocytic system tissues under repeat dosing conditions. *Part. Fibre Toxicol.* 14, 25. <https://doi.org/10.1186/s12989-017-0206-4>

Xue, Y., Chen, Q., Ding, T., Sun, J., 2014. SiO<sub>2</sub> nanoparticle-induced impairment of mitochondrial energy metabolism in hepatocytes directly and through a Kupffer cell-mediated pathway in vitro. *Int. J. Nanomedicine* 9, 2891–2903. <https://doi.org/10.2147/IJN.S60661>

- Yang, L., Kuang, H., Zhang, W., Aguilar, Z.P., Wei, H., Xu, H., 2017. Comparisons of the biodistribution and toxicological examinations after repeated intravenous administration of silver and gold nanoparticles in mice. *Sci. Rep.* 7, 3303. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03015-1>
- Yazdimamaghani, M., Moos, P.J., Dobrovolskaia, M.A., Ghandehari, H., 2019. Genotoxicity of amorphous silica nanoparticles: Status and prospects. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 16, 106–125. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.11.013>
- Ye, M., Tang, L., Luo, M., Zhou, J., Guo, B., Liu, Y., Chen, B., 2014. Size- and time-dependent alteration in metabolic activities of human hepatic cytochrome P450 isozymes by gold nanoparticles via microsomal coincubations. *Nanoscale Res. Lett.* 9, 642. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-642>
- Yildirim, L., Thanh, N.T.K., Loizidou, M., Seifalian, A.M., 2011. Toxicology and clinical potential of nanoparticles. *Nano Today* 6, 585–607. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2011.10.001>
- Yu, Y., Duan, J., Li, Yang, Li, Yanbo, Jing, L., Yang, M., Wang, J., Sun, Z., 2017. Silica nanoparticles induce liver fibrosis via TGF- $\beta$ 1/Smad3 pathway in ICR mice. *Int. J. Nanomedicine* Volume 12, 6045–6057. <https://doi.org/10.2147/IJN.S132304>
- Yu, Yang, Li, Yang, Wang, W., Jin, M., Du, Z., Li, Yanbo, Duan, J., Yu, Yongbo, Sun, Z., 2013. Acute Toxicity of Amorphous Silica Nanoparticles in Intravenously Exposed ICR Mice. *PLoS ONE* 8, e61346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061346>
- Zhang, Y., Huang, Y., Li, S., 2014. Polymeric Micelles: Nanocarriers for Cancer-Targeted Drug Delivery. *AAPS PharmSciTech* 15, 862–871. <https://doi.org/10.1208/s12249-014-0113-z>
- Zhang, Y.-N., Poon, W., Tavares, A.J., McGilvray, I.D., Chan, W.C.W., 2016. Nanoparticle–liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination. *J. Controlled Release.* <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.020>
- Zhu, B., Li, Y., Lin, Z., Zhao, M., Xu, T., Wang, C., Deng, N., 2016. Silver Nanoparticles Induce HePG-2 Cells Apoptosis Through ROS-Mediated Signaling Pathways. *Nanoscale Res. Lett.* 11, 198. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1419-4>

## 2. Au niveau intestinal

### 2.1 Exposition par voie orale aux nanoparticules

Les NPs inorganiques notamment d'argent, de SiO<sub>2</sub>, de TiO<sub>2</sub> et de ZnO sont les plus utilisées dans la préparation des produits alimentaires et produits de santé. Les NPs d'argent jouent le rôle d'agents antimicrobiens dans les emballages alimentaires et servent également à prévenir la perte d'eau de certains légumes (Kahru and Ivask, 2013). Leur présence dans les emballages alimentaires plastiques peut induire une interaction contenant/contenu en diffusant dans la nourriture. Les quantités sont estimées entre 1,66 et 31,46 ng/cm<sup>2</sup> (Echegoyen and Nerín, 2013). La consommation quotidienne d'argent sous forme nanoparticulaire serait de 7,1 µg en moyenne. D'autres chiffres ont été rapportés, allant de 20 à 80 µg par jour (World Health Organization, 1993). Ces valeurs sont inférieures à la NOAEL qui a été fixée à 125 mg/kg après l'exposition d'animaux à des NPs d'argent de 60 nm pendant 90 jours. Les effets observés à cette dose sont une augmentation du taux de cholestérol et des enzymes cholestatiques ainsi qu'une hyperplasie biliaire (Kim *et al.*, 2010). Aux États-Unis, l'apport alimentaire en TiO<sub>2</sub> a été estimé entre 1 et 2 mg/kg de poids corporel et par jour pour les enfants et entre 0,2 et 0,7 mg/kg/jour pour les adultes (Bachler *et al.*, 2015). Les bonbons, chewing-gums et cookies ont les teneurs en TiO<sub>2</sub> les plus élevées, entre 1 et 5 µg/mg pour l'additif E171 (Weir *et al.*, 2012). Des valeurs de 2,5 mg et 5,9 mg pour un adulte de 70 kg ont été rapportées dans deux études de Lomer *et al.* (Lomer *et al.*, 2000, 2004). Des expositions similaires ont été rapportées dans les populations britannique et allemande (Bachler *et al.*, 2015 ; Weir *et al.*, 2012). Selon l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA), l'exposition orale journalière au SiO<sub>2</sub> serait estimée entre 20 et 50 mg par jour chez une personne de 60 kg (Becker *et al.*, 2004). Les NPs de ZnO sont quant à elles utilisées dans les compléments alimentaires mais aussi dans les emballages de produits alimentaires. L'apport en zinc recommandé est de 5 à 20 mg par personne et par jour. Cette valeur est relative à une exposition volontaire et ne tient pas compte des apports non souhaités. D'ailleurs, peu de données relatives à l'exposition orale de NPs de ZnO sont disponibles. Une NOAEL, c'est-à-dire une dose sans effet toxique observable (*No Observable Adverse Effect Level*) de 50 mg/jour a été déterminée (European Commission, 2003). En supposant qu'un volume de 2,5 L de nourriture (solides et fluides) soit ingéré et en se basant sur les ingestions quotidiennes les plus élevées et les plus basses, les concentrations suivantes peuvent être estimées : 0,008–0,032 µg/mL NPs d'argent, 9,3 à 50,4 µg/mL de NPs de SiO<sub>2</sub> et 0,12 à 12,6 µg/mL de NPs de TiO<sub>2</sub> (Fröhlich and Fröhlich, 2016).

Afin d'estimer les effets sur la barrière intestinale des NPs auxquelles nous sommes exposés par voie orale, il faut tenir compte du fait que les NPs ont un contact direct avec les bactéries de la lumière et peuvent donc impacter le microbiote. Il faut aussi prendre en considération la présence du mucus qui forme une barrière pouvant fortement limiter la diffusion des NPs et donc diminuer leur capacité d'interaction avec les cellules épithéliales et donc leur potentiel cytotoxique (Fröhlich and Roblegg, 2012). Enfin, il faut également tenir compte des effets des fluides gastriques, de l'alimentation et des temps d'exposition aux aliments dans les différents segments du tractus gastrointestinal. En effet, le temps d'exposition et donc de contact avec les NPs est de 3 à 5h dans l'estomac contre 20 à 30h dans le gros intestin.

## ***2.2 Impact des fluides biologiques et du bol alimentaire sur les nanoparticules***

Les paramètres physico-chimiques des NPs peuvent être modifiés après contact avec les différents fluides du tractus gastrointestinal tels que la salive ou les sucs gastriques. Il convient notamment de prendre en compte les changements de pH et les mouvements péristaltiques du tractus. Ainsi des contractions allant de quelques millimètres de mercure à plus d'une centaine, ont été mesurées le long du tractus (Bellmann *et al.*, 2015 ; Floch *et al.*, 2019). Cependant, leurs effets sur l'agglomération et l'agrégation des NPs sont en grande partie inconnus. En ce qui concerne, les variations de pH le long du tractus gastro-intestinal, elles sont importantes selon le segment du tractus considéré et selon les périodes de jeûne ou de prise alimentaire. Axson *et al.* ont montré que les phénomènes d'agrégation de NPs d'argent dans les fluides gastriques sont fonction de la taille initiale des NPs et du pH. Leurs données indiquent en effet que les NPs de petite taille sont plus sensibles aux phénomènes d'agrégation lors de la baisse du pH. Ils ont constaté que l'augmentation de taille des NPs de 20 nm est d'autant plus importante que le pH diminue. Des NPs plus grosses de 110 nm augmentent en taille pour un pH inférieur à 3,5 mais aucun changement n'est observé à un pH plus élevé. Ce phénomène d'agrégation est dû à la formation de chlorure d'argent (AgCl). Les ions Cl<sup>-</sup> présents dans l'estomac interagissent avec les ions Ag<sup>+</sup> et précipitent sous forme d'AgCl. Celui-ci se lie à la surface des NPs d'argent entraînant leur agrégation (Axson *et al.*, 2015 ; Rogers *et al.*, 2012). Ceci explique aussi pourquoi les petites NPs de 20 nm sont plus sensibles à ce phénomène, leur surface étant plus importante. Les NPs de SiO<sub>2</sub> ont quant à elles également été décrites comme subissant des phénomènes d'agrégation dans les fluides gastriques car les conditions acides et les fortes concentrations salines induisent une diminution de la répulsion électrostatique entre les charges négatives des NPs de silice. (Sakai-Kato *et al.*, 2014). La composition des NPs joue également

un rôle primordial. Dans les liquides gastriques acides, la dissolution des NPs de ZnO se produit en quelques minutes alors que celle des NPs de TiO<sub>2</sub> est très faible (Cho *et al.*, 2013).

Peters *et al.* ont simulé trois étapes de digestion : buccale, stomachale et intestinale, avec pour chacune d'elles les fluides de digestion synthétiques correspondants (**Figure 46**). Plusieurs produits alimentaires ont subi cette procédure de digestion *in vitro* et la présence de NPs de silice dans les différents fluides a ensuite été étudiée. Dans le cas des produits contenant l'additif E551, des quantités relatives de 5 à 40% de NPs de silice (entre 5 et 200 nm) ont été mesurées dans la salive. En revanche, aucune particule de taille nanométrique n'est détectée dans les fluides de digestion de l'estomac (faible pH et concentrations élevées en électrolytes) et de l'intestin en ce qui concerne le café et la soupe instantanée. Lorsque le pH réaugmente lors du passage dans l'intestin, la silice de taille nanométrique est à nouveau détectée et cette fois, dans des quantités encore plus élevées que lors de la première étape de digestion (salive). Après les trois étapes de digestion, les analyses montrent que pour certains produits (denrées en poudre), environ 80% de la silice est sous forme nanoparticulaire. Pour les solides, la quantité de silice nanométrique après digestion complète est plus limitée, soit environ 15% (Peters *et al.*, 2012).

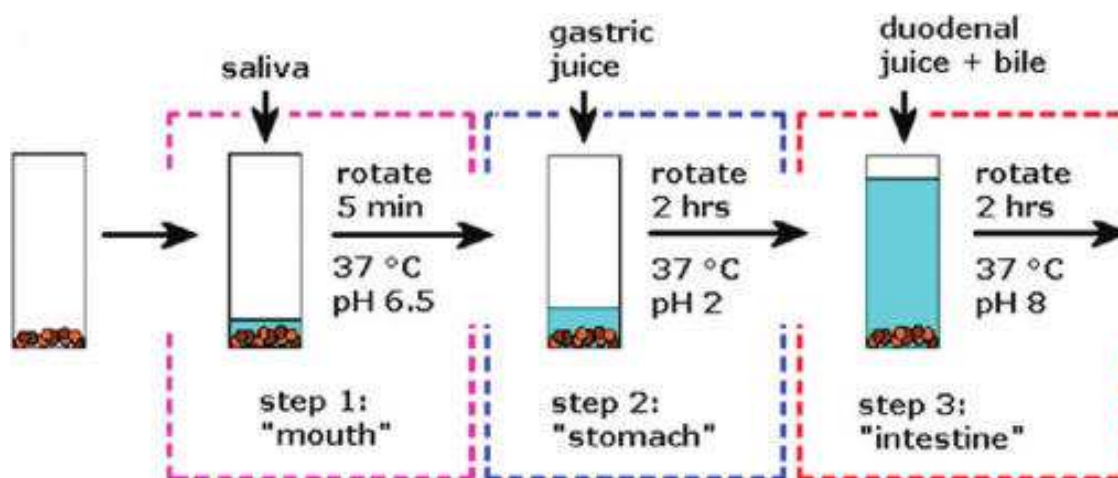


Figure 46 : Représentation schématique de la procédure de digestion *in vitro*. D'après Peters *et al.*, 2012.

Le devenir des NPs au cours des processus de digestion peut également être influencé par la matrice alimentaire dans laquelle elles sont incorporées. Lichtenstein *et al.* rapportent que des particules d'argent natives et digérées dans des fluides synthétiques en présence de composants alimentaires ont été assimilées de manière comparable par les cellules Caco-2. En revanche, l'absorption de particules digérées sans composant alimentaire est réduite de 60%, suggérant que dans des conditions *in vivo*, les NPs d'argent même incluses dans les aliments

peuvent atteindre l'intestin sous une forme nanométrique (Lichtenstein *et al.*, 2015). Cao *et al.* ont aussi montré que les effets cytotoxiques des NPs de ZnO sont décuplés lorsqu'elles sont co-incubées avec des acides gras car l'exposition de NPs de ZnO et d'acide palmitique dans des cellules Caco-2 induit notamment une production mitochondriale d'espèces réactives de l'oxygène (Cao *et al.*, 2015). Les données relatives à l'impact des composés alimentaires sur l'absorption des NPs et leurs effets sur les entérocytes ne sont cependant pas tous unanimes. En effet, Sinnecker *et al.* ont, d'une part, montré que l'adsorption de protéines telles que la BSA ou la caséine sur des NPs de polystyrène carboxylées réduit significativement les interactions et l'adhésion des NPs aux entérocytes. D'autre part, l'incubation des NPs avec de l'extrait de viande n'a pas d'effet sur leur adhésion contrairement au liquide intestinal pour lequel les interactions entre cellules et NPs de 20 et 100 nm sont augmentées (Sinnecker *et al.*, 2014).

### ***2.3 Passage des nanoparticules à travers la barrière intestinale***

Les cellules Caco-2 sont généralement utilisées comme modèle *in vitro* pour étudier le transport à travers l'épithélium intestinal. De nombreuses études rapportent que les NPs peuvent franchir cet épithélium. C'est le cas des NPs d'argent ou de SiO<sub>2</sub> mais aussi de TiO<sub>2</sub> (Bellmann *et al.*, 2015 ; Walczak *et al.*, 2012). Le passage et l'accumulation de ces NPs sont le plus souvent constatés au niveau des plaques de Peyer. Ces sites présentent une capacité remarquable de transport de molécules, protéines et particules qui sont ensuite acheminées aux cellules du tissu lymphoïde sous-jacent (Clark *et al.*, 2001). Une étude *in vivo* de 1994 prouve d'ailleurs après analyse histologique et chimique le passage et l'accumulation de TiO<sub>2</sub>, dans les principaux tissus lymphoïdes associés à l'intestin chez des rats exposés par voie orale à des NPs de TiO<sub>2</sub> (Jani *et al.*, 1994). D'autres travaux corroborent le fait que l'une des voies privilégiées pour le passage des NPs à travers l'épithélium est le passage transcellulaire *via* les cellules M présentes dans les plaques de Peyer (Bachhav *et al.*, 2018 ; Borges *et al.*, 2006 ; Florence *et al.*, 1994). Une étude de 2016 a montré que la présence de cellules M dans un modèle de barrière intestinale augmente le passage de NPs lipidiques solides (Hu *et al.*, 2016). Cependant, le franchissement des plaques de Peyer ne signifie pas nécessairement que les nanomatériaux atteignent la circulation sanguine, car les cellules M sont étroitement associées aux cellules immunitaires. Une étude décrit que des NPs de glucane et de PLGA administrées par voie orale chez des souris ont été transportées à travers les cellules M, puis endocytées par des cellules dendritiques (CD) (De Jesus *et al.*, 2014). Les cellules M ne sont pas les seules cellules de la barrière intestinale capable d'internaliser les NPs. Cela a en effet été également décrit pour les



entérocytes. Ils sont capables d'internaliser différents types de NPs telles que les NPs de SiO<sub>2</sub>, de TiO<sub>2</sub>, de chitosan, de polystyrene ou encore de PLGA (Desai *et al.*, 1997 ; Docter *et al.*, 2014 ; He *et al.*, 2013 ; Krüger *et al.*, 2017 ; Ma and Lim, 2003 ; Win and Feng, 2005). Les mécanismes d'internalisation des NPs sont dépendants de leurs propriétés physico-chimiques. Les NPs chargées positivement sont davantage internalisées dans des cellules Caco-2 par endocytose clathrine-dépendante ou par macropinocytose, tandis que les NPs chargées négativement sont prises en charge par endocytose cavéoline-dépendante (Bannunah *et al.*, 2014). La taille est également un autre facteur influençant l'internalisation de NPs par les cellules Caco-2. Desai *et al.* ont montré que des NPs de PLGA de 100 nm sont 2,5 fois plus internalisées que les NPs de 1000 nm et 6 fois plus que les NPs de 10 µm (Desai *et al.*, 1997).

Avant d'atteindre l'épithélium cellulaire, les NPs doivent d'abord franchir la couche de mucus présente à sa surface. Celle-ci limite le passage des particules en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Les NPs de petite taille sont susceptibles de pénétrer davantage la barrière ainsi que celles qui présentent une charge de surface positive car elles possèdent des propriétés muco-adhésives (Behrens *et al.*, 2002). La capacité du mucus à bloquer ou limiter la translocation des NPs ne dépend pas uniquement de leurs propriétés physico-chimiques. Les données de Crater et Carrier révèlent que l'épaisseur et les caractéristiques de renouvellement du mucus sont deux facteurs à prendre également en considération. Ils ont constaté que le temps de passage de NPs fluorescentes à travers une couche de mucus de 100 µm est de plusieurs dizaines d'heures et que la sécrétion continue du mucus gastro-intestinal associée à sa clairance par les forces péristaltiques entraînent des temps de renouvellement compris entre 4 et 6 h. Ce sont des durées suffisamment courtes pour éliminer les particules dans les couches de mucus les plus épaisses telles que celles de l'estomac, du côlon et du rectum qui présentent des épaisseurs moyennes respectives de 170, 100 et 125 µm. Néanmoins, les temps de passage estimés indiquent également que certaines particules pourraient être capables de traverser les couches de mucus dans des régions spécifiques du tractus gastro-intestinal où l'épaisseur moyenne de mucus est plus faible telles que celle de l'iléon et du caecum avec 10 et 37 µm respectivement (Crater and Carrier, 2010).

## ***2.4 Effets des nanoparticules sur la barrière intestinale***

### *2.4.1 Nanoparticules d'argent*

Williams *et al.* ont étudié l'effet de NPs d'argent de taille comprise entre 10 et 110 nm sur la perméabilité intestinale dans un modèle de lignée cellulaire colorectale (cellules T84).

Les résultats montrent que ces NPs d'argent n'induisent pas de mort cellulaire mais ont un effet sur la perméabilité intestinale dépendant de la concentration et de la taille. Les plus petites NPs (10 nm) induisent la chute de TEER la plus importante après 48 heures d'exposition à 20 µg/mL et après seulement 2 heures à plus forte concentration (100 µg/mL) (**Figure 47**). Ces effets s'expliquent par la modification de l'expression des gènes impliqués dans les jonctions serrées tels que *TJP2* qui code la protéine ZO-2 ou *DSG3*, *DSC3* et *JUP* qui codent des protéines impliquées dans la structure des desmosomes et des jonctions intercellulaires (Williams *et al.*, 2016).

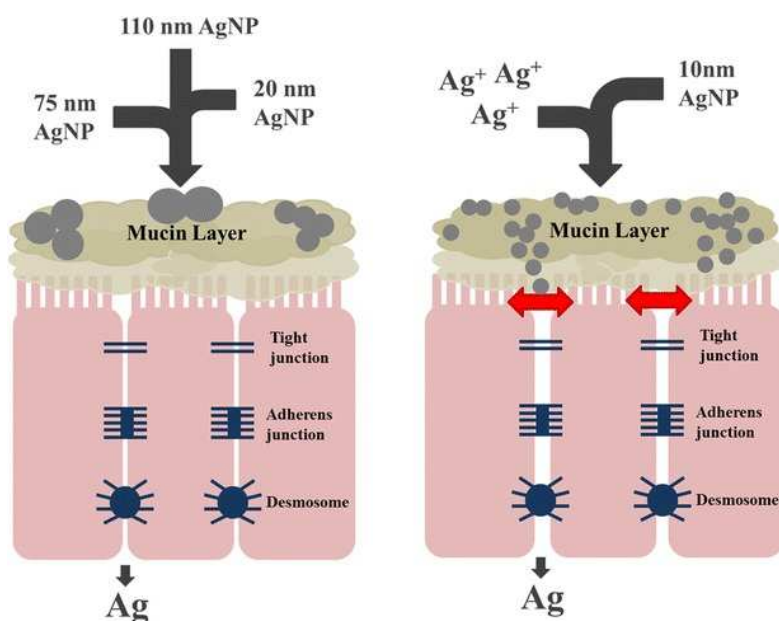


Figure 47 : Les petites NPs d'argent peuvent moduler la perméabilité intestinale en l'absence de tout effet cytotoxique sur les cellules. D'après Williams *et al.*, 2016.

Ces résultats sont corroborés avec des données obtenues précédemment dans des modèles Caco-2 et Caco-2/Raji B. Des NPs d'argent de taille inférieure à 20 nm affectent l'intégrité de la barrière épithéliale à travers une diminution de la résistance électrique transépithéliale et une augmentation du passage paracellulaire. Des études d'immunofluorescence ont par ailleurs démontré que la distribution d'occludine et de ZO-1 était modifiée, suggérant l'ouverture de jonctions serrées (Martirosyan *et al.*, 2014).

Les résultats d'une étude dans laquelle des souris ont été exposées par voie orale à une dose de 1 mg/kg de NPs d'argent de 42 nm sur une période de 28 jours au total ont montré que les taux de cytokines pro-inflammatoires sont augmentés de façon dose-dépendante. Les taux de lymphocytes B et d'IgE sont également plus importants chez les animaux exposés (Park *et*

*al.*, 2010). Des résultats contradictoires ont cependant été obtenus dans une étude menée avec des rats souffrant de colite et exposés à des NPs d'argent, puisqu'une diminution de l'inflammation et des cytokines inflammatoires a été obtenue (Bhol and Schechter, 2007).

L'effet des NPs et le rôle des bactéries du microbiote ont été en partie mis en évidence par une étude de Garuglieri *et al.* Ils ont utilisé un modèle simulant les compartiments anaérobies et aérobies nécessaires à la croissance des bactéries et des cellules intestinales pour étudier l'effet de NPs d'argent sur la barrière intestinale. Le modèle utilisé est constitué de cellules Caco-2 exposées aux métabolites issus d'un biofilm d'*Escherichia coli* après son exposition aux NP d'argent. Les résultats obtenus montrent que le biofilm est davantage impacté après exposition aux NPs que les cellules Caco-2. Les tests réalisés suggèrent que le biofilm protège les cellules contre des effets génotoxiques (Garuglieri *et al.*, 2017). L'impact des NPs d'argent sur le microbiote intestinal a également été évalué chez l'animal. Les résultats divergent toutefois d'une étude à l'autre. Selon l'étude de Hadrup *et al.*, la balance et les quantités de *Bacteroidetes* et de *Firmicutes* ne sont pas modifiées après exposition aux NPs d'argent de 14 nm alors que Van den Brule *et al.* ont montré que des NPs plus grosses de 55 nm induisent une augmentation du ratio entre *Firmicutes* et *Bacteroidetes* (Hadrup *et al.*, 2012 ; van den Brule *et al.*, 2015). En exposant des rats à des NPs d'argent cubiques ou sphériques pendant 14 jours, Javurek *et al.* ont montré que selon la forme des NPs d'argent considérée, l'effet sur le microbiote est différent. Les populations d'espèces bactériennes *Bacteroides uniformis*, *Clostridium spp.*, *Christensenellaceae* et *Coprococcus eutactus* diminuent après exposition aux NPs cubiques alors que ce sont les espèces *Oscillospira spp.*, *Dehalobacterium spp.*, *Peptococcaceae*, *Corynebacterium spp.* et *Aggregatibacter pneumotropica* qui diminuent après incubation avec les NPs sphériques (Javurek *et al.*, 2017).

#### 2.4.2 Nanoparticules de dioxyde de titane

Dans un modèle de cellules Caco-2, les NPs de TiO<sub>2</sub> induisent une sécrétion d'IL-8 pro-inflammatoire de façon dose dépendante (Abbott Chalew and Schwab, 2013). Gerloff *et al.* ont montré par ailleurs dans des cellules Caco-2 que les effets toxiques des NPs de TiO<sub>2</sub> dépendent de leur forme cristalline et de leur surface spécifique. En effet, les échantillons contenant un mélange de la forme rutile et anatase du TiO<sub>2</sub> induisent des niveaux de toxicité cellulaire et de dommage à l'ADN plus élevés que ceux contenant uniquement la forme anatase. L'évaluation de l'activité métabolique des cellules a révélé une corrélation entre la surface spécifique et la toxicité des NPs. Les mélanges de la forme rutile et anatase ont une toxicité par unité de surface plus importante que celle du TiO<sub>2</sub> sous forme anatase. Les auteurs ont également montré que la

génétoxicité des NPs de TiO<sub>2</sub> n'est pas médiée par le stress oxydant et la production de ROS (Gerloff *et al.*, 2012). L'intégrité de la barrière intestinale après exposition au TiO<sub>2</sub> a également été étudiée. Lors d'une exposition aiguë à de faibles concentrations, 10 ou 100 µg/mL de NPs de TiO<sub>2</sub> l'intégrité épithéliale n'est pas modifiée. Cependant, au-delà de cette concentration et dans le cas d'une exposition chronique (jusqu'à 10 jours), l'impact des NPs sur la barrière intestinale est beaucoup plus significatif. En effet, une baisse du TEER est constatée ainsi qu'un changement de localisation de la  $\gamma$ -caténine suggérant une perturbation des jonctions adhérentes. De plus, les auteurs ont constaté que les NPs de TiO<sub>2</sub> induisent une modification de l'organisation des microvillosités situées au pôle apical des cellules Caco-2. En effet, en moins de 24h, le nombre de microvillosités a diminué, elles ne dressent plus à la surface des cellules et ont perdu leur forme de cylindre. A forte dose, les microvillosités semblent quasi absentes de la surface cellulaire (**Figure 48**) (Koeneman *et al.*, 2010).

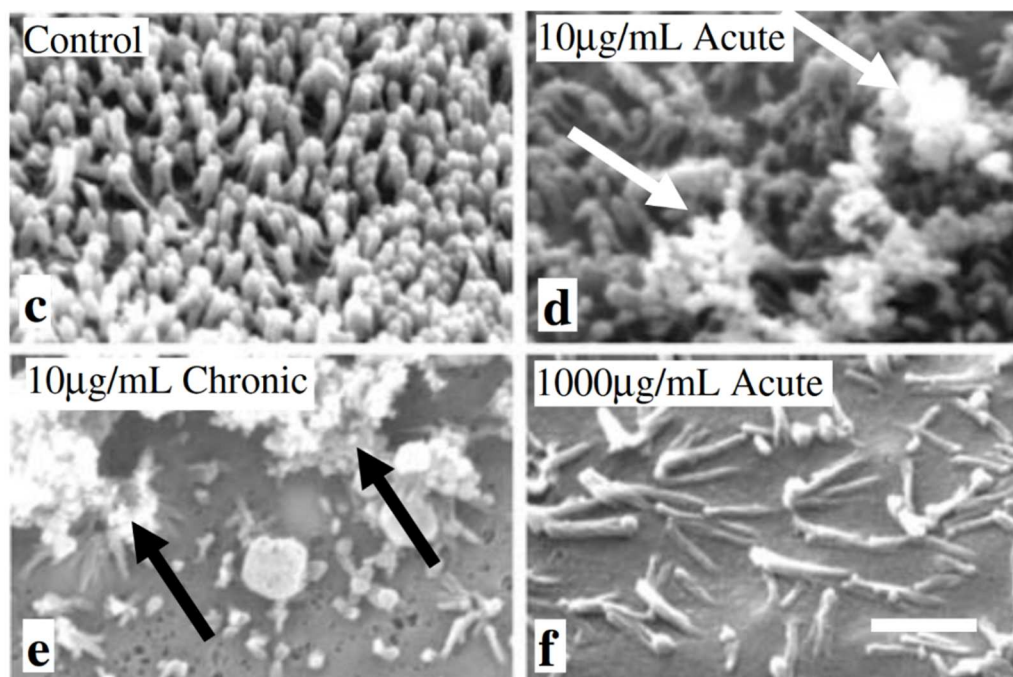


Figure 48 : Observation en microscopie électronique des villosités après traitement avec les NPs de TiO<sub>2</sub>. D'après Koeneman *et al.*, 2010.

Des résultats similaires ont été obtenus par Faust *et al.* dans une étude *in vitro*. Une perte de 42% des microvillosités a été constatée dans des cellules Caco-2 exposées à du TiO<sub>2</sub> obtenu à partir de l'enrobage de chewing-gums (Faust *et al.*, 2014).

L'impact génotoxique et pro-inflammatoire des NPs de TiO<sub>2</sub> a également été étudié chez l'animal. Trouiller *et al.* décrivent chez des souris exposées par leur eau de boisson à des NPs de 25 nm de grade industriel, une génotoxicité significative qui est dose dépendante. La quantification des transcrits du TNF- $\alpha$ , de l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et de l'orthologue murin de l'IL-8 a par ailleurs montré des niveaux supérieurs dans les groupes traités, confirmant ainsi le caractère pro-inflammatoire des NPs de TiO<sub>2</sub> observé *in vitro* (Trouiller *et al.*, 2009). Ces données sont par ailleurs confirmées par l'étude de Bettini *et al.* dans laquelle des rats ont été exposés 100 jours (par administration dans l'eau de boisson) à un lot de E171. Près de 40% des animaux exposés ont développé des lésions préneoplasiques dans le côlon suggérant un fort potentiel cancérigène du TiO<sub>2</sub> (Bettini *et al.*, 2017). Comme les NPs d'argent, les NPs de TiO<sub>2</sub> semblent également avoir un impact sur le microbiote intestinal. L'étude de Taylor *et al.* rapporte qu'après exposition aux NPs, les bactéries subissent des changements phénotypiques. La production d'acides gras à chaînes courtes, l'hydrophobicité et la teneur en sucre de la matrice extracellulaire sont affectées entraînant des modifications de la stabilité des communautés microbiennes (Taylor *et al.*, 2015).

Trois études rapportent les effets des NPs de TiO<sub>2</sub> étudiées chez l'Homme. Dans l'étude de Jones *et al.* neuf personnes ont reçu une dose unique de 5 mg/kg de NPs de TiO<sub>2</sub> (15 nm, 100 nm ou inférieur à 5  $\mu$ m) ; la quantité de TiO<sub>2</sub> mesurée par spectroscopie de masse dans le sang et les urines ne présente pas de différence significative avant et après exposition. Dans les fluides gastriques simulés, les NPs présentaient toutes des phénomènes d'agrégation limitant drastiquement leur translocation à travers l'épithélium intestinal (Jones *et al.*, 2015). Dans une autre étude de la même année menée sur 7 volontaires exposés à 100 mg de TiO<sub>2</sub> de qualité alimentaire et pharmaceutique, du TiO<sub>2</sub> dans le sang a été retrouvé plusieurs heures après ingestion (Pele *et al.*, 2015). Ces résultats sont corroborés avec ceux de Böckmann *et al.* qui avaient précédemment retrouvé du TiO<sub>2</sub> dans le sang plusieurs heures après ingestion de NPs de TiO<sub>2</sub> de 160-380 nm dans des capsules de gélatine (Böckmann *et al.*, 2000)

#### 2.4.3 Nanoparticules de dioxyde de silice

L'internalisation des NPs de silice par les cellules Caco-2 a été démontrée. Une pénétration de NPs de 32 nm dans le noyau est obtenue, sans pour autant induire d'effets cytotoxiques ou génotoxiques (Schübbe *et al.*, 2012). L'absence d'effet cytotoxique a également été rapportée par McCracken *et al.* (McCracken *et al.*, 2013). Dans une récente étude, l'exposition aiguë et chronique de NPs de SiO<sub>2</sub> de 30 nm a été étudiée dans un modèle de cellules Caco-2. Les données attestent d'une modification significative de l'absorption de

différents minéraux tels que le Zn et le Fe. Les NPs de SiO<sub>2</sub> modulent en effet l'expression de différents gènes impliqués dans le transport de ces minéraux. L'absorption de glucose et de lipides est également impactée par les NPs de SiO<sub>2</sub>. L'expression du gène GLUT2 est augmentée significativement après une exposition aiguë (Guo *et al.*, 2018). Les effets des NPs sont également constatés au niveau morphologique ; en effet, les microvillosités présentes au pôle apical des cellules sont réduites. Une baisse de la perméabilité intestinale n'est cependant mesurée qu'après une exposition chronique. En parallèle, l'activité de la phosphatase alcaline intestinale, une enzyme clef de l'homéostasie cellulaire, est augmentée en réponse à l'incubation avec les NPs. Les auteurs suggèrent que son activité est induite afin de tenter de maintenir la fonction de barrière. De plus, quel que soit le type d'exposition, les NPs de SiO<sub>2</sub> induisent un stress oxydant significatif (Guo *et al.*, 2018).

#### 2.4.4 Nanoparticules polymériques et métalliques

Les NPs de chitosan sont décrites comme modulant fortement la perméabilité intestinale (Vilasaliu *et al.*, 2010). Le chitosan induit en raison d'interactions électrostatiques un regroupement de l'intégrine  $\alpha(V)\beta(3)$ , une réorganisation de l'actine F et une régulation de la claudine 4 aboutissant à la perturbation des jonctions serrées (Hsu *et al.*, 2013). La conjugaison de méthoxyPEG sur des NPs de PLGA facilite la diffusion à travers la couche de mucus en réduisant les interactions avec le mucus. En pouvant atteindre ainsi les cellules épithéliales, elles influencent le passage paracellulaire en induisant notamment une modification de la distribution cellulaire de la protéine ZO-1 (Wen *et al.*, 2013). Enfin, il a également été montré que des NPs polymériques (polyphosphoramidate-dipropylamine) ou des NPs lipidiques peuvent moduler la perméabilité intestinale par le biais d'interactions électrostatiques avec les protéines des jonctions serrées (Loo *et al.*, 2012). La modulation de la perméabilité est alors dépendante de la charge de surface. L'étude des effets des NPs d'or sur la barrière intestinale a montré que plus leur diamètre diminuait, plus leur absorption était rapide, mais leur accumulation dans les cellules Caco-2 diminuait. Les NPs d'or s'accumulent finalement dans différents organites cellulaires tels que les endosomes, les lysosomes, l'appareil de Golgi, les mitochondries mais aussi dans le noyau. L'accumulation des NPs d'or entraîne une dépolarisation de la membrane des mitochondries qui, à terme, aboutit à une cytotoxicité des entérocytes (Yao *et al.*, 2015). La cytotoxicité des NPs de ZnO a également été décrite dans le modèle cellulaire Caco-2. Des dommages de l'ADN et un stress oxydant ont été constatés (Barone *et al.*, 2011 ; De Berardis *et al.*, 2010 ; Gerloff *et al.*, 2009). Le mécanisme proposé est semblable à celui des NPs d'argent. Les effets seraient dus aux particules en combinaison avec

la libération d'ions  $Zn^{2+}$ . Ces derniers perturbent significativement l'homéostasie des cellules intestinales en interférant avec l'activité de certaines enzymes comme les métalloprotéinases et des facteurs de transcription tels que AP-1 and NF- $\kappa$ B (Vandebriel and De Jong, 2012).

Déterminer les effets NPs sur la barrière intestinale est rendu difficile par le manque de précision des doses d'exposition par voie orale aux différents types de NPs. Le relargage des NPs par les emballages est par exemple difficilement quantifiable. Ces valeurs ne sont que des estimations car elles sont très dépendantes des habitudes alimentaires. Une alimentation riche en produits agroalimentaires transformés est susceptible d'augmenter les quantités d'exposition. Etablir des corrélations avec les doses testées dans les études *in vitro* est alors d'autant plus difficile et incertain. Il est aussi compliqué de conclure quant aux effets des NPs sur la barrière intestinale en raison de sa complexité structurelle. Il faudrait en effet prendre en considération l'impact sur le microbiote, le mucus, l'épithélium cellulaire et le tissu sous-jacent. Il s'avère cependant que les propriétés physico-chimiques des NPs sont des paramètres extrêmement importants quant à leur toxicité intestinale car elles conditionnent les capacités des NPs à franchir la couche de mucus et à interagir avec les cellules de l'épithélium. Enfin, la matrice alimentaire et les fluides gastriques pourraient aussi jouer un rôle significatif dans le devenir des NPs et moduler leurs effets. Les réponses aux NPs sont parfois contradictoires. Cela s'explique par la méthodologie et les outils qui nécessitent d'être harmonisés.

**TOXICITÉ DES  
NANOPARTICULES :  
PARTIE EXPÉRIMENTALE**

---





**PUBLICATION 1**

**Interspecies differences in the cytochrome P450 activity of hepatocytes exposed to PLGA and silica nanoparticles: an *in vitro* and *in vivo* investigation**

**Raphaël Cornu**, Nathalie Rougier, Yann Pellequer, Alf Lamprecht, Paul Hamon,  
Ruoya Li, Arnaud Béduneau, Hélène Martin

Article publié dans *Nanoscale*, 2018, 10 5171-5181 (FI : 7,367)



## I. CONTEXTE ET OBJECTIFS

Au regard des nombreux essais cliniques sur les nanomédicaments, les NPs représentent une avancée prometteuse dans le cadre de la recherche médicale. Cependant, leurs propriétés uniques leur confèrent un tropisme particulier qui pourrait avoir des conséquences délétères pour l'organisme. Ces nanomédicaments sont généralement administrés par voie intraveineuse. Jusqu'à 80% de la dose injectée par cette voie est séquestrée au niveau du tissu hépatique. Un certain nombre d'études ont d'ores et déjà montré que des NPs inorganiques peuvent induire une modulation de l'activité des CYP hépatiques mais aucune n'était consacrée aux NPs organiques. Une modulation de l'activité des CYP pourrait présenter un risque pour la santé humaine en modifiant le mécanisme d'élimination de la substance active transportée par la NP ou induire de potentielles interactions médicamenteuses dans le cas d'une polythérapie.

Le premier objectif de cette étude a été d'évaluer les effets d'une exposition aiguë à des NPs sur l'activité des CYP 1A, 2B et 3A dans des modèles *in vitro* d'hépatocytes murins et humains. Le second objectif était de comprendre l'influence des propriétés physico-chimiques (taille, charge de surface, composition des NPs) sur l'activité des CYP. Enfin, le dernier but de cette étude était de déterminer si des différences interspèces existaient (rat *vs* Homme) et d'établir ou non une corrélation entre les activités mesurées *in vitro* et *in vivo*.

## II. METHODOLOGIE

Les effets des NPs de PLGA et de silice sur la fonction hépatique ont d'abord été évalués *in vitro* dans des cultures primaires d'hépatocytes d'origines murine et humaine. Les cellules ont été incubées pendant 72h avec des NPs de PLGA ou de silice, de taille et de charge de surface différentes. Après étude de la viabilité cellulaire par test au MTT, les activités des CYP 1A, 2B et 3A ont été évaluées par fluorimétrie ou luminométrie. Concernant l'étude *in vivo*, les rats ont été exposés par administration intrapéritonéale de NPs toutes les 24h pendant 72h. Les activités des CYP ont ensuite été mesurées par fluorimétrie ou luminométrie, à partir de microsomes de foie obtenus par ultracentrifugation différentielle.

### III. PRINCIPAUX RESULTATS / CONCLUSIONS

Cette étude a notamment permis de montrer que :

- La réponse métabolique est dépendante des caractéristiques physico-chimiques et de la composition (organique *vs* inorganique) des NPs.
- La modulation de l'activité des CYP par les NPs de PLGA est faible comparée à celle induite par les NPs de silice.
- Les effets observés dépendent de l'isoforme du CYP étudié ainsi que de l'espèce considérée.
- La fonction de détoxification des hépatocytes humains est beaucoup plus sensible que celle des hépatocytes murins.
- Il est important de développer des modèles d'étude *in vitro* adaptés aux systèmes nanoparticulaires à partir de tissus ou cellules d'origine humaine.

### IV. PUBLICATION I



Cite this: *Nanoscale*, 2018, **10**, 5171

## Interspecies differences in the cytochrome P450 activity of hepatocytes exposed to PLGA and silica nanoparticles: an *in vitro* and *in vivo* investigation

Raphaël Cornu,<sup>a</sup> Nathalie Rougier,<sup>b</sup> Yann Pellequer,<sup>a</sup> Alf Lamprecht,<sup>a,c</sup> Paul Hamon,<sup>a</sup> Ruoya Li,<sup>b</sup> Arnaud Beduneau<sup>†a</sup> and Hélène Martin  \*<sup>†a</sup>

Nanomedicines represent a promising approach in the treatment and diagnosis of numerous disorders. The majority of the injected dose of nanoparticles (NPs) is sequestered in the liver. Despite this hepatic tropism, the interaction of NPs with the detoxification function of the liver remains unclear. The present study consists of evaluating the impact of biodegradable poly(lactide-*co*-glycolide) (PLGA) and silica NPs on cytochrome P450 (CYP) activities. The effects of NPs were evaluated *in vitro* on human and rat hepatocytes in primary cultures and *in vivo* by intravenous injections in healthy rats. More than the physicochemical properties, the composition of NPs (organic, inorganic) dramatically influenced the detoxification function of the liver. Silica NPs modulated the CYP activity both in rat and human hepatocytes, in contrast to PLGA NPs. A CYP isoform-dependent effect was reported and the modulation of the metabolic hepatic activity was species-dependent. Human hepatocytes were sensitive to an exposure to PLGA NPs, whereas no marked effect was detected in rat hepatocytes. The *in vitro* data obtained in rat hepatocytes were correlated with the *in vivo* data. This study emphasizes the interest to set up relevant *in vitro* models using human hepatic cells to evaluate the hepatotoxicity of nanomedicines.

Received 9th January 2018,  
Accepted 2nd February 2018

DOI: 10.1039/c8nr00226f

rsc.li/nanoscale

## Introduction

In the last decade, the strong development of nanomedicines has contributed to a significant advance in the fields of therapy and diagnosis due to their original physicochemical properties. They can carry and modify tremendously the pharmacokinetics of drugs, antigens and molecular imaging by prolonging their vascular residence and/or by targeting a cell type, an organ or a pathological tissue. Polymeric nanoparticles (NPs) represent one of the major nanomedicine classes approved by the FDA or transferred in clinical trials.<sup>1</sup> They are mainly administered by the intravenous route. Poly

(lactide-*co*-glycolide) (PLGA) is extensively used for the synthesis of polymeric NPs due to its biocompatible and biodegradable features. Successful applications of PLGA NPs in the vaccination, and the treatment of cancer and inflammatory diseases have been widely reported in the literature.<sup>2</sup> However, the use of nanomaterials not only in the health field but also in the food and cosmetics sectors is more and more questioned due to their potential toxicity in humans.<sup>3</sup> The majority of the injected NPs with a size above 6 nm, preventing the renal excretion, is found in the liver. Only 5 minutes after an intravenous injection, around 60% of PLGA nanospheres can be located in the liver.<sup>4</sup> Additionally, at least 30% and 45% of the injected doses were detected in the liver 3 h after the injection of 200 nm and 500 nm PLGA NPs, respectively, suggesting a size-dependent tropism.<sup>5</sup> Strategies consisting of coating or conjugating hydrophilic polymers on the surface of NPs allowed prolonging their half-life up to several hours. The aim was to reduce the opsonisation process responsible for the rapid recognition of NPs by the mononuclear phagocyte system.<sup>6</sup> However, despite the presence of the hydrophilic corona, long-circulating NPs can finally reach the liver. Panagi *et al.* showed that at least 40% of both injected PLGA NPs and poly(lactide-*co*-glycolide)-monomethoxypoly(ethyleneglycol) PLGA-mPEG NPs were sequestered in the spleen and the liver after several seconds and several hours, respectively.<sup>7</sup> Two

<sup>a</sup>PEPITE EA4267, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France.

E-mail: raphael.cornu@univ-fcomte.fr, yann.pellequer@univ-fcomte.fr, alf.lamprecht@uni-bonn.de, paul.hamon@univ-fcomte.fr, arnaud.beduneau@univ-fcomte.fr, helene.martin@univ-fcomte.fr  
Tel: +33(0)381665553, +33(0)363082320, +49 228735243, +33(0)381665553, +33(0)381665291, +33(0)363082318

<sup>b</sup>Biopredic International, 35760 Saint-Grégoire, France.

E-mail: nathalie.rougier@biopredic.com, ruoya.li@biopredic.com;  
Tel: +33(0)299143613, +33(0)299143219

<sup>c</sup>Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, University of Bonn, Germany

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.



major mechanisms are involved in the hepatic elimination of NPs and depend of the physicochemical properties of NPs such as the size, the composition (organic, inorganic) and the surface properties (charge, ligands). NPs can be phagocytosed by the hepatic macrophages so-called Kupffer cells after the opsonisation process. After an intravenous injection, the majority of the large PLGA NPs characterized by a size of 271 nm were located in Kupffer cells.<sup>8</sup> The hepatobiliary elimination was also reported for NPs with a size below 150–200 nm. Small NPs can pass through the sinusoids *via* the fenestrations and have access to the Disse space where they are internalized by hepatocytes.<sup>9,10</sup> Pinocytosis and clathrin-mediated endocytosis are involved in the cell uptake of PLGA NPs.<sup>2</sup>

Due to their hepatic tropism and the key role of the liver in the body's detoxification process, the safety evaluation of NPs such as PLGA NPs requires considering their interaction with the hepatic function, especially the metabolic activity. A modification of the expression level or the activity of enzymes involved in the xenobiotic metabolism such as the cytochromes P450 (CYPs) could modulate the metabolism and the elimination of encapsulated drugs. Drug interactions could also occur in the case of polytherapy strategies. Biocompatibility of PLGA NPs was clearly demonstrated through cytotoxicity and immunogenicity studies,<sup>11</sup> but very few data regarding their effect on the hepatic metabolic activity have been reported until now. Because this major concern is due to the unique properties of NPs, it becomes necessary and urgent to adapt the conventional drug approval process to nanomedicines. This present study focuses on the evaluation of the nanohepatotoxicity of PLGA and silica NPs, especially the liver detoxification function using human hepatocytes in primary cultures. They were preferred to hepatic cell lines such as HepG2 which exhibit a low activity level of phase I enzymes compared with the human hepatocytes.<sup>12</sup> A comparison was performed with the isolated rat hepatocytes to consider the interspecies differences which represent a major concern in the hepatic metabolism studies.<sup>13</sup> The rat and human hepatocytes in primary cultures were incubated with PLGA NPs at concentrations consistent with the clinical applications. Surfactant free NPs with sizes between 80 and 180 nm were synthesized in order to distinguish the influence of emulsifiers and the particle size on the nanohepatotoxicity. NPs coated with a hydrophilic and nonionic polymer, poly(vinyl alcohol) (PVA), a cationic polyelectrolyte, poly(ethyleneimine) (PEI) and opsonins were also prepared to evaluate the influence of surface properties on the hepatic metabolism. In order to compare the potential toxicity degree of PLGA NPs with other nanomaterials, 30 and 70 nm commercial silica NPs were included in the present study. The activity of CYP1A, 2B and 3A was then assessed after 72 h of exposure to NPs. These CYP isoforms are strongly involved in the metabolism of xenobiotics classically loaded in PLGA NPs such as anti-cancer agents and anti-inflammatory drugs. Finally, an *in vivo/in vitro* correlation was also performed in rats.

## Methods

### Chemicals

All chemicals used in our experiments were from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany), unless stated otherwise. Silica NPs (Sicastar® 30 nm and Sicastar® 70 nm) were obtained from Micromod (Rostock, Germany).

### Preparation of PLGA nanoparticles

PLGA Resomer RG502H (Evonik, Essen, Germany) NPs were prepared by a nanoprecipitation method.<sup>14,15</sup> One volume of a PLGA solution in acetone was added to 3 volumes of deionized water leading to the formation of PLGA NPs. Acetone was then evaporated at 40 °C under reduced pressure. A prolonged treatment under the same conditions was performed to reach a final PLGA concentration close to 10 mg mL<sup>-1</sup> for all the formulations. The size of the NPs was modified according to the PLGA concentration in acetone; thereby hydrodynamic diameters of approximately 80 nm, 120 nm and 180 nm were obtained using 1.25, 10 and 26.25 mg PLGA per mL of acetone, respectively. Polymer concentrations were slightly adjusted according to the batch of Resomer RG502H. Polyvinyl alcohol (PVA) or serum coatings were obtained by incubating the 180 nm particles at 10 mg mL<sup>-1</sup> for 5 minutes with 0.5% PVA (87–90 hydrolyzed, average molecular weight 30 000–70 000) in water or with fetal calf serum (FCS), respectively. PEI-PLGA NPs were prepared by adding polymer solution at 26.25 mg mL<sup>-1</sup> in acetone to deionized water with 0.87 mg mL<sup>-1</sup> PVA and 4.37 mg mL<sup>-1</sup> PEIb (polyethyleneimine, branched, average molecular weight 25 000). To remove free PEI, FCS or PVA, all coated NPs were washed with deionized water and centrifuged at 20 000g for 10 min. This process was repeated three times. Finally, formulations were freeze-dried overnight with maltose as a cryoprotectant, at a PLGA/maltose ratio of 1/10 and then stored at -20 °C. NP suspensions were reconstituted in culture medium or deionized water.

### Preparation of fluorescent nanoparticles

To determine the cellular uptake in PLGA NPs by the rat hepatocytes, fluoresceinamine-labeled NPs (FA NPs) were prepared as described in a previous study.<sup>16</sup> Briefly, PLGA and fluoresceinamine (FA) at a ratio of 1/0.02 were dissolved in 1.3 mg mL<sup>-1</sup> of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride in acetonitrile. After 24 h of incubation under gentle agitation, the resulting FA-PLGA conjugate was precipitated with purified water. Then, the FA-PLGA was centrifuged and washed 4 times by dissolution in acetone followed by a precipitation in ethanol. The conjugate was then immediately freeze-dried. Fluorescent NPs were prepared by replacing 10% of PLGA by FA-PLGA according to the protocol previously described.

### Physicochemical characterization of PLGA and silica nanoparticles

The size and zeta potential of NPs were characterized using a ZetaSizer Nano-ZS90 (Malvern, UK). Hydrodynamic diameter



means and PDI were determined by dynamic light scattering and zeta potential by laser Doppler electrophoresis. Samples were prepared in culture medium at a final concentration of  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  and measurements were performed at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### Quantification of PVA and PEI associated with nanoparticles

The amount of PVA adsorbed on the surface of NPs was assessed using a colorimetric method based on the formation of a PVA-iodine complex.<sup>17</sup> Briefly, 10 mg of freeze-dried PLGA NPs were treated with 0.5 M NaOH for 15 min at  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  followed by a neutralization with 1 N HCl. Then, 0.65 M boric acid, 0.05 M  $\text{I}_2$ /0.15 M KI and distilled water were added to the PLGA solutions. After 15 min of incubation, the absorbance of the samples was measured at 690 nm. The amount of PEI associated with NPs was also determined colorimetrically by complexing PEI with copper II. Briefly, 10 mg of freeze-dried PLGA NPs was treated with 1 M NaOH for 15 min at  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ . The solution was mixed with an equal part of 1 M acetic acid. Finally, 0.1 M sodium acetate adjusted at pH 4.5 and 1% (w/v) copper II sulfate were then added to the PLGA solutions. The absorbance value of each sample was measured at 281 nm. For the two assays, blanks were performed with plain PLGA NPs.

#### Physical stability of PLGA and silica nanoparticles in culture medium

The physical stability of NPs was assessed at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  in William's E medium, *i.e.* the medium used for the primary culture of the rat hepatocytes. NP suspensions at a concentration of  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  were prepared. Hydrodynamic diameters, PDI and zeta potential were measured before and after 24 h incubation.

#### Isolation and culture of rat hepatocytes

This study was performed in strict accordance with the NIH guidelines for the care and use of laboratory animals (NIH Publication No. 85-23 Rev.1985) and was approved (No. 2015/003-CD) by the Institutional Animal Care and Use Committee of Besançon (CEBEA No. 58, Besançon, France). Six weeks old male Wistar rats (Janvier, France) were anesthetized by *i.p.* injection of sodium pentobarbital ( $50 \text{ mg kg}^{-1}$ ). The liver was perfused for 10 min at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  using a flow rate of 25 mL per minute with a washing solution consisting of 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 25 mM HEPES and 0.5 mM EGTA. Then the liver was perfused with a digest buffer consisting of 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 25 mM HEPES, 5 mM  $\text{CaCl}_2$  and 0.03% collagenase for 7.5 min at  $25 \text{ mL min}^{-1}$  and  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . The liver was then removed to recover release cells. They were filtered to remove undigested aggre-

gates and washed with PBS. After Percoll purification, the cell viability was estimated by trypan blue exclusion. The isolated hepatocytes were resuspended in William's Medium E supplemented with FCS (10%), insulin ( $4 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ), hydrocortisone ( $10 \text{ } \mu\text{M}$ ) and  $10 \text{ U mL}^{-1}$  penicillin/ $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  streptomycin and seeded in 96-well plates at a density of  $0.7 \times 10^6$  cells per well. Cell incubations were performed at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  under a humidified atmosphere of 95% air/5%  $\text{CO}_2$ . After 4 h, the medium was shifted to a serum-free medium consisting of William's Medium E supplemented with insulin ( $4 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ), hydrocortisone ( $10 \text{ } \mu\text{M}$ ) and  $10 \text{ U mL}^{-1}$  penicillin/ $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  streptomycin. Cultures were exposed to various NPs at different concentrations for 72 h, the treatment medium being renewed every 24 h.  $\beta$ -Naphthoflavone ( $50 \text{ } \mu\text{M}$   $\beta$ -NF), 3-methylcholantrene ( $5 \text{ } \mu\text{M}$  3MC), phenobarbital (1 mM PB) and dexamethasone ( $50 \text{ } \mu\text{M}$  Dex) were used for 72 h of treatment as reference CYP inducers.  $\alpha$ -Naphthoflavone ( $10 \text{ } \mu\text{M}$   $\alpha$ -NF), erythromycin ( $10 \text{ } \mu\text{M}$  Ery) and ketoconazole ( $25 \text{ } \mu\text{M}$  Keto) were used for 2 h ( $\alpha$ -NF) or 24 h (Ery and Keto) of treatment as reference CYP inhibitors.

#### Culture of human hepatocytes

Human hepatocytes obtained from Biopredic International (St Grégoire, France) were isolated from the resected liver specimens designated as surgical waste. The human liver resections were collected in accordance with Article L.1211-2 of the French Public Health Code, amended by Law No. 2004-800 of August 6, 2004. The Biopredic International tissue collection authorized by the French Research Ministry (AC-2013-1754) included written informed consent in compliance with the French ethical rules. Information relative to the human donors is given in Table 1. DMEM supplemented with insulin ( $4 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ), hydrocortisone ( $10 \text{ } \mu\text{M}$ ) and  $10 \text{ U mL}^{-1}$  penicillin/ $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  streptomycin was used for the exposure of these cells to various NPs at different concentrations for 72 h. The treatment medium was renewed daily.  $\beta$ -NF ( $50 \text{ } \mu\text{M}$ ), 3MC ( $5 \text{ } \mu\text{M}$ ), PB (1 mM) and rifampicin (Rif  $10 \text{ } \mu\text{M}$ ) were used for 72 h of treatment as reference CYP inducers.  $\alpha$ -NF ( $10 \text{ } \mu\text{M}$ ), Ery ( $10 \text{ } \mu\text{M}$ ) and Keto ( $25 \text{ } \mu\text{M}$ ) were used for 2 h ( $\alpha$ -NF) or 24 h (Ery and Keto) of treatment as reference CYP inhibitors.

#### Flow cytometry

For the flow cytometry analysis, cells were incubated 1 h at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  or  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  with FA-NPs at  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ . The rat hepatocytes were washed with PBS and detached with trypsin EDTA. After centrifugation (3 min, 70g), cells were resuspended in PBS. The cell fluorescence intensity calculated from at least 10 000

**Table 1** Information relative to the human donors

Donor ID	Gender	Race	Age (Years)	Cell viability (%)	Liver pathology
D1	F	Unknown	60	91	Cholangiocarcinoma and liver metastasis
D2	F	African	59	88	Hydatid cyst
D3	M	Unknown	59	83	Liver metastasis



events was analyzed by using a Beckman Coulter FC500 flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, USA).

### Cell viability assay

The evaluation of the cell viability after NP exposure of rat and human hepatocytes in primary cultures was assessed using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method. In brief, cell cultures were washed to remove NPs and incubated with MTT ( $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) for 2 h at  $37^\circ\text{C}$ . The formazan crystals were then dissolved in DMSO and the absorbance was measured at 570 nm.

### Cytochrome P450-dependent activities in rat and human hepatocyte cultures

In rat hepatocytes, CYP1A and CYP2B activities were evaluated by measuring the ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) and the benzyloxyresorufin-*O*-dealkylase (BROD) activity, respectively. Briefly, cell cultures were washed several times with PBS to remove NPs and incubated for 1 h at  $37^\circ\text{C}$  in rat hepatocyte culture medium supplemented with salicylamide (1 mM) and ethoxyresorufin (10  $\mu\text{M}$ ) or benzyloxyresorufin (4.1  $\mu\text{M}$ ). The quantity of the resorufin produced was measured at  $\lambda_{\text{excitation}}$  530 nm and  $\lambda_{\text{emission}}$  580 nm. CYP1A and 2B activities were expressed as pmol resorufin per min per mg cellular protein. CYP3A activity was assayed using the P450-Glo™ CYP3A4 assay (Luciferin-IPA) kit (Promega, Charbonnières-les-bains, France), according to the manufacturer's instructions. Hepatocytes were incubated with the luciferin-IPA for 1 h at  $37^\circ\text{C}$ . After 20 min of incubation at room temperature with the luciferin detection reagent, the level of luminescence was read. The CYP3A activity was expressed as RLU per min per mg cellular protein.

In human hepatocytes, CYP1A and 3A activities were assayed as described above for rat hepatocytes. The CYP2B activity was evaluated using the P450-Glo™ CYP2B6 assay kit (Promega, Charbonnières-les-bains, France), according to the manufacturer's instructions using a 2 h incubation period of the cultured cells with the luciferin-2B6.

### In vivo experiment

This study was performed in strict accordance with the NIH guidelines for the care and use of laboratory animals (NIH Publication No. 85-23 Rev.1985) and was approved (No. 2015/003-CD) by the Institutional Animal Care and Use Committee of Besançon (CEBEA No. 58, Besançon, France). Six weeks old male Wistar rats (Janvier, France) were randomly divided into 11 groups (4 rats per group except for NP5 and for the control group where 6 rats per group were used) and kept under a 12 h light/dark cycle. They have free access to distilled water and fed *ad libitum*. After one week, rats were anesthetized with isoflurane, weighed and treated by i.v. injections every 24 h for up to 72 h as follows: 5 mg of NP1, NP3, NP5 and NP6, and 0.5 mg or 5 mg of NP7 and NP8. Some of the animal groups received by i.p. injections a reference CYP inducer compound, *i.e.* PB at  $80 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$  in maltose solution or 3MC at  $20 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$  in Miglyol® 812 (Sasol Chemical Industries,

Homburg, Germany) every 24 h for up to 72 h. Finally, a control rat group received by i.v. injection the vehicle (maltose) solution. Rats were sacrificed and the livers were rapidly removed and weighed. Small parts of the liver were immediately flash-frozen in liquid nitrogen and kept frozen until used for analysis.

### Cytochrome P450-dependent activities in rat liver microsomes

Rat livers were homogenized in a buffer consisting of 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM KCl and 2 mM EDTA. The homogenates were centrifuged at  $9000g$  for 25 min at  $4^\circ\text{C}$ . The supernatant fractions were centrifuged twice at  $100\,000g$  for 1 h at  $4^\circ\text{C}$ . The pellets which represented the microsomal fraction were suspended in sucrose solution (0.25 M) and immediately frozen at  $-80^\circ\text{C}$  until use. In rat liver microsomes, CYP1A and CYP2B activities were evaluated by measuring the EROD and BROD activities, respectively. Rat liver microsomes (4 mg proteins per mL) were preincubated for 5 min at  $37^\circ\text{C}$  in Tris buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 150 mM KCl) with ethoxyresorufin at 0.13 mM or benzyloxyresorufin at 0.41 mM. The enzymatic reaction was initiated by the addition of  $\beta$ -NADPH at 10 mM. After 2 min (EROD) or 3 min (BROD) of incubation, the reaction was stopped by adding  $\text{ZnSO}_4$  (87 mM) and  $\text{Ba(OH)}_2$  (79 mM). After centrifugation for 5 min at  $1700g$ , the fluorescence of the supernatant was measured at  $\lambda_{\text{excitation}}$  530 nm and  $\lambda_{\text{emission}}$  580 nm. CYP1A and 2B activities were expressed as pmol resorufin per min per mg microsomal proteins. The CYP3A activity was assayed by using the P450-Glo™ CYP3A4 assay (Luciferin-IPA) kit (Promega, Charbonnières-les-bains, France) as described above for the rat hepatocytes.

### Statistics

All data are means  $\pm$  SEM. The data expressed in fold change *versus* the control were processed statistically when the fold change was  $<1$  and  $\geq 2$  in accordance with the OECD Guidelines for the testing of chemicals.<sup>18</sup> Comparisons between the experimental groups and control were performed by one-way ANOVA analysis and the Holm Sidak test (Sigmastat software). A difference was considered significant at  $p \leq 0.05$ .

## Results

### Physicochemical properties of the nanoparticles

The mean diameter and surface charge of PLGA NPs were measured in William's E culture medium on at least 3 different batches of NPs. The physicochemical characterization of these PLGA NPs is reported in Table 2. The mean size of NP1, NP2 and NP3 measured by the dynamic light scattering method was respectively 178, 122 and 78 nm. NP4, NP5 and NP6 were larger than the surfactant free NPs with sizes of 216, 241 and 242 nm, respectively. The zeta potential measured by laser Doppler electrophoresis was around  $-30 \text{ mV}$  for all surfactant free NPs and  $-11$ ,  $-1.7$  and  $+5.4 \text{ mV}$  for NP4, NP5 and NP6, respectively. The properties of the commercial silica NPs were also checked using the same experimental conditions. As



**Table 2** Physicochemical properties of freeze-dried nanoparticles reconstituted in culture medium using a ZetaSizer. Measurements were performed on at least 3 different batches of NPs. NA = not applicable

NPs	Description	Mean diameter (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)	Adsorbed PVA or PEI ( $\mu\text{g per mg of PLGA}$ )
<b>Synthesized NPs</b>					
NP1	Surfactant free	178 $\pm$ 7	0.105 $\pm$ 0.033	-31.5 $\pm$ 1.4	NA
NP2	Surfactant free	122 $\pm$ 4	0.128 $\pm$ 0.036	-30.1 $\pm$ 1.6	NA
NP3	Surfactant free	78 $\pm$ 2	0.106 $\pm$ 0.070	-29.2 $\pm$ 1.5	NA
NP4	Opsonization	216 $\pm$ 6	0.101 $\pm$ 0.017	-11.0 $\pm$ 0.6	NA
NP5	PVA coating	241 $\pm$ 19	0.097 $\pm$ 0.027	-1.7 $\pm$ 0.4	47.7 $\pm$ 8.3
NP6	PEI coating	242 $\pm$ 8	0.099 $\pm$ 0.035	+5.4 $\pm$ 0.4	45.9 $\pm$ 3.2
<b>Commercial NPs</b>					
NP7	Silica	33 $\pm$ 1	0.153 $\pm$ 0.034	-8.4 $\pm$ 0.6	NA
NP8	Silica	67 $\pm$ 0.3	0.043 $\pm$ 0.013	-21.1 $\pm$ 0.4	NA

expected, the mean sizes of NP7 and NP8 were 33 nm and 67 nm, respectively. The zeta potentials were -8.4 mV for NP7 and -21.1 mV for NP8.

The size, the PDI and the zeta potential of all NPs were monitored for 24 h in William's E culture medium (Fig. 1). The hydrodynamic diameter and the size distribution were stable for all NPs, except for NP4. After 24 h incubation, the size increased from 216 to 1105 nm and the PDI reached 1. For all other PLGA NPs, the values of PDI were around 0.1, demonstrating a narrow size distribution. The surface charge of surfactant free NPs was stable in contrast to NP6 and NP7. The positive surface charge of NP6 decreased from 5 mV to 2.3 mV whereas the values passed from -8.4 mV to 0 mV for NP7.

#### Cellular interaction of PLGA NPs with rat hepatocytes

The interaction of PLGA NPs with rat hepatocytes was determined after 1 h-exposure using fluorescent NPs (Fig. 2). At 37 °C, NP1 interacted strongly with hepatocytes (Fig. 2B). A marked decrease of this interaction was observed with NP5 (Fig. 2C), due to the PVA coating and after NP1 incubation at 4 °C (Fig. 2D).

#### Effect of the nanoparticles on rat and human hepatocyte viability

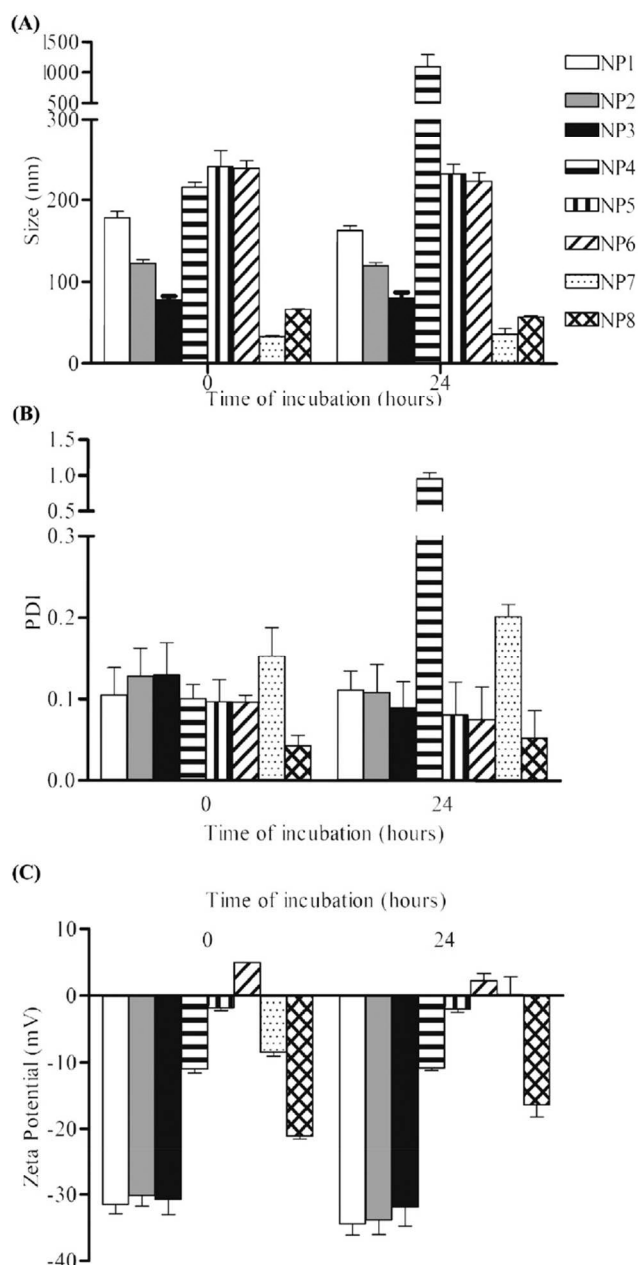
Rat and human hepatocytes in primary cultures were exposed to PLGA and silica NPs for 72 h, the culture medium with NPs being renewed every 24 h. The effect of the NPs on cell viability was evaluated at three concentrations (0.1, 0.5 and 1 mg mL<sup>-1</sup>) except for NP6 which was 10-fold lower concentrated as compared to the other NPs considering the well-known cytotoxicity of PEI (Fig. 3). In rat and human hepatocytes, the PLGA NPs did not induce cytotoxicity, even at the highest concentration. By contrast, silica NP7 decreased the cell viability at 65% in rat hepatocytes. In human hepatocytes, the values were of 50% and 75% for NP7 and NP8, respectively.

#### Effect of the nanoparticles on CYP1A, 2B and 3A activities in rat and human hepatocyte cultures

CYP-dependent activities were determined in rat and human hepatocytes after 72 h of exposure in culture. Untreated cells

were used as the control and their activity values were set at 1 (referred to as "control medium" in Fig. 4). In order to both assess the selectivity and the magnitude of response of NPs, reference inducers and inhibitors of CYPs were also tested.

Fig. 4A, B, and C show the data obtained in the rat hepatocyte cultures. As expected, 3MC and  $\beta$ -NF strongly increased the CYP1A activity with a mean of 31- and 15-fold respectively, whereas  $\alpha$ -NF had the opposite effect. PLGA NP1 to NP4 have no significant effect on the CYP1A activity, whatever the concentration used. The CYP2B activity was increased by 11- to 15-fold after treatment with PB and Dex, chosen as reference inducers for this activity. No effect of PLGA NP1 to NP4 was observed on the CYP2B activity except a decrease of 35% by using NP2 at the highest concentration. Finally, PB and Dex markedly increased (51- and 105-fold) the CYP3A activity, whereas Keto strongly decreased it. No significant effect of PLGA NP1 to NP4 was observed considering the CYP3A activity, except by using NP1 at 0.5 mg mL<sup>-1</sup>, that led to a significant 17% decrease of the CYP3A activity. The coated PLGA NPs (NP5 and 6) have no effect on the CYP activity, whatever the concentration used and the CYP isoform considered. Finally, silica NPs have no effect on CYP1A and 2B activities, but NP7 in contrast to NP8, caused a 73% decrease in the CYP3A activity. The reference compounds used in this study were similar in rat and human hepatocyte cultures, except that Dex was replaced by Rif for CYP2B and 3A activities in human hepatocytes (Fig. 4D-F). As expected, 3MC and  $\beta$ -NF caused strong increases (70- and 26-fold increases) of the CYP1A activity, and PB and Rif treatment led to mean 2- to 2.6-fold increases of CYP2B and 3A activities. Also as expected,  $\alpha$ -NF and Keto decreased the CYP1A (92% of decrease) and 3A (79% decrease) activities, respectively. No significant effect on the CYP1A activity was observed after PLGA NP1 to NP4 exposure, except for NP4 treatment at 0.5 mg mL<sup>-1</sup>, leading to a 2-fold induction. By contrast, NP1, NP2, NP3 and NP4 inhibited the CYP2B activity in a range from 32% to 51%. Regarding CYP3A, a 31-45% activity decrease was observed with NP1 and NP4 treatments, at the three concentrations. As already mentioned for rats, the coated PLGA NPs (NP5 and 6) have no effect on any CYP activity. Silica NP7 treatment had a significant effect on

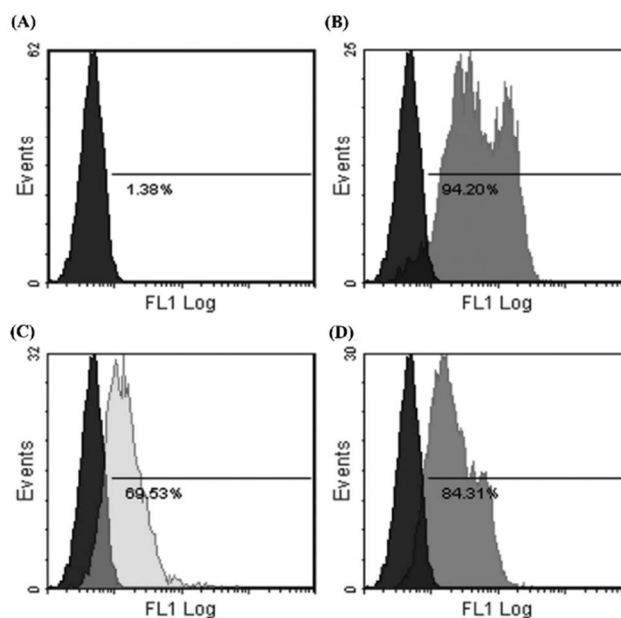


**Fig. 1** Stability of the PLGA and silica nanoparticles at  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  for 24 h in culture medium using a ZetaSizer. The mean diameter (A), the polydispersity index (B) and the zeta potential (C) were measured in at least 3 different batches of NPs.

the three CYP isoforms. CYP1A and 2B activities increased 5.2- and 2.4-fold while the CYP3A activity decreased of 60%. Silica NP8 only modified the CYP3A activity, leading to a 29% decrease of this activity.

#### Effect of the nanoparticles on CYP1A, 2B and 3A activities in rat liver microsomes

CYP-dependent activities were also determined in liver microsomes after daily i.v. injections of NPs for 3 days in healthy rats. An untreated animal group was used as a control and set



**Fig. 2** Cellular interaction of PLGA nanoparticles with rat hepatocytes analyzed by flow cytometry analysis. Fluorescent NP1 (B) and NP5 (C) were incubated at  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  with hepatocytes for 1 h at  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  whereas fluorescent NP1 (D) was incubated at  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . The fluorescence intensity was compared with a cell control (A). Representative data from one rat hepatocyte culture.

at 1 (referred to as “control” in Fig. 5). 3MC was chosen as a reference inducer compound for the CYP1A activity (Fig. 5A) and PB for CYP2B and 3A activities (Fig. 5B and C). As expected, 3MC caused a significant induction (26-fold increase) of CYP1A activity, while PB significantly increased CYP2B (150-fold) and CYP3A (2-fold) activities. As also described in rat hepatocyte cultures, PLGA NPs did not modify the three CYP-dependent activities, except NP1 that decreased the CYP3A activity by 29%. By contrast, silica NP7 but not NP8 significantly decreased both CYP2B (24% decrease) and 3A (62% decrease) activities at the highest dose used.

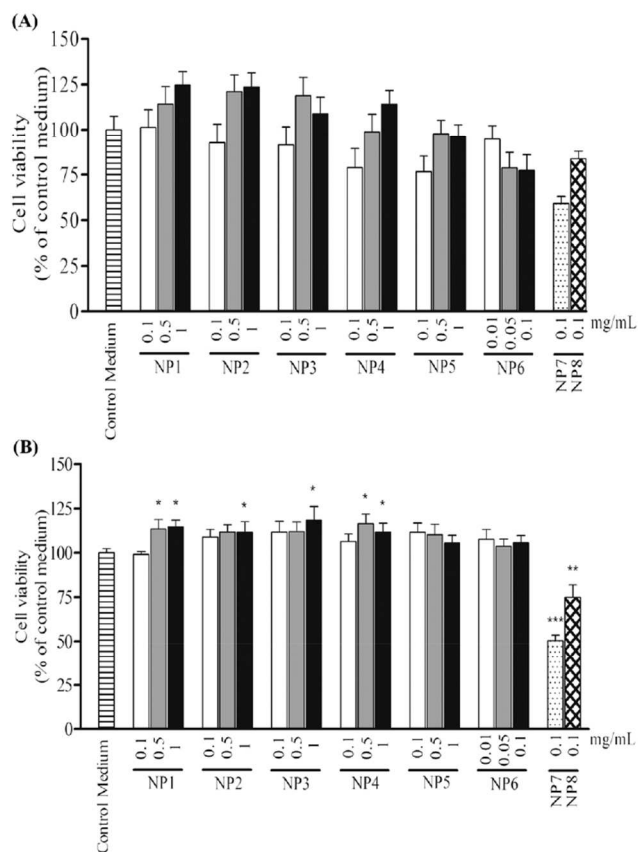
#### Effect of the nanoparticles on body weight gain in rats

The rats were weighed just before the first injection of NPs and the day of sacrifice. The body weight gain of the animals after 3 days of injection is reported in Fig. 6. A mean body weight gain of 5% was noted in all animal groups, except in the group receiving NP7 for which a lower gain (only 2.5%) was obtained. Also, the reference CYP inducer compound PB slowed the weight gain of the animals and 3MC significantly decreased the rat body weight after 3 days of treatment.

## Discussion

The liver sequestration of NPs intravenously injected has been clearly and tremendously demonstrated in the literature. Their cellular distribution in the liver is strongly dependent on their physicochemical properties. The first generation of NPs was





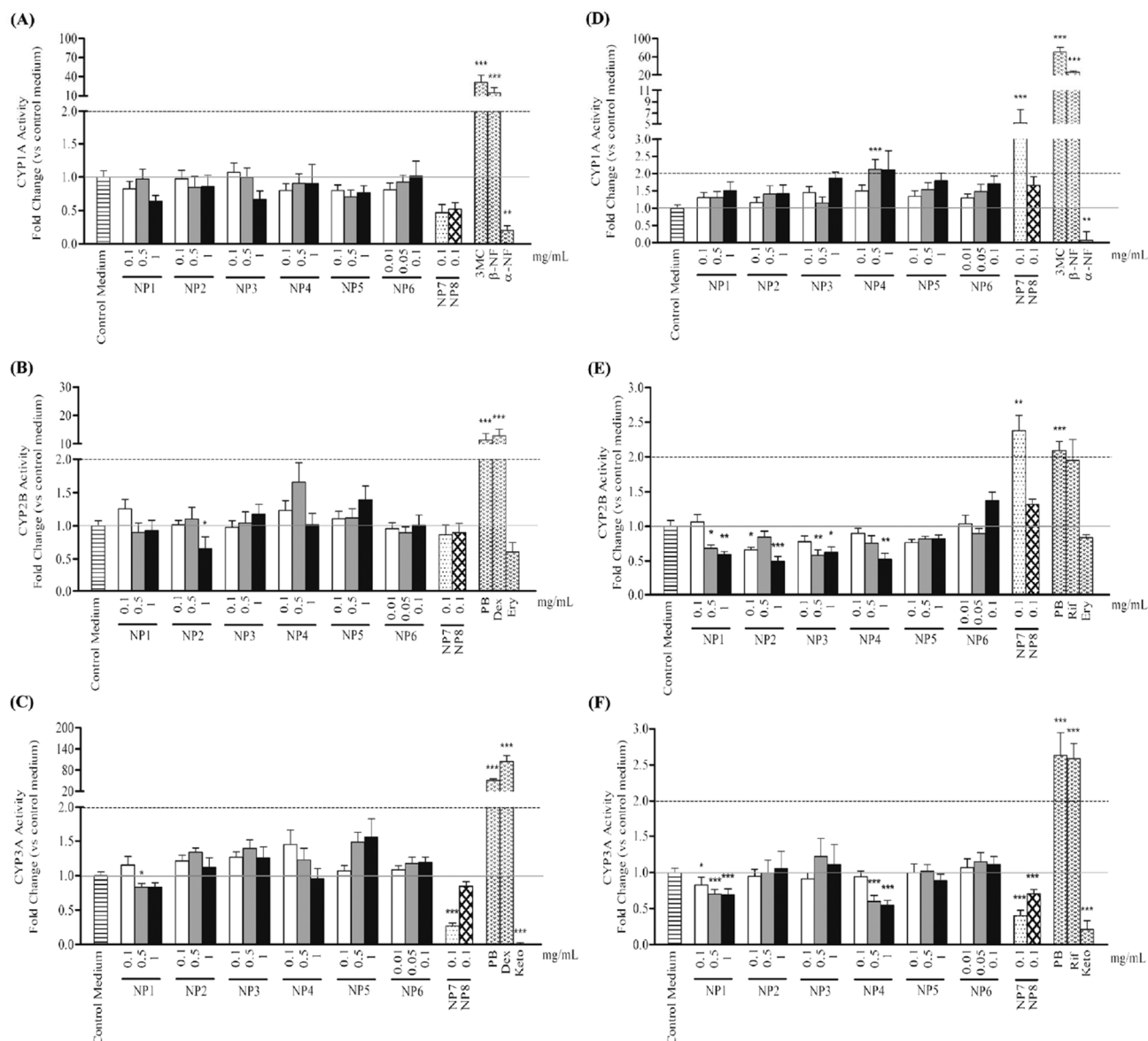
**Fig. 3** Effect of PLGA (0.1 to 1 mg mL<sup>-1</sup>) and silica (0.1 mg mL<sup>-1</sup>) nanoparticles on cell viability in primary rat (A) and human (B) hepatocyte cultures after 72 h of exposure. Cell viability was determined by a MTT assay and expressed as a percent of control medium (culture medium without any NPs). Data are means  $\pm$  SEM from triplicate of 6 (for rat hepatocytes) and 3 (for human hepatocytes) independent cultures. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  and \*\*\* $p \leq 0.001$  with respect to the control medium.

rapidly recognized by the Mononuclear Phagocyte System due to their hydrophobic surface responsible for the opsonization process. They were mainly removed from the bloodstream by the Kupffer cells. Numerous previous toxicological studies have therefore focused on the interaction of NPs with macrophages. The second generation of NPs was characterized by a hydrophilic surface coating, decreasing the interaction with phagocytes and consequently extending the half-time of the NPs. These long-circulating properties do not prevent the sequestration of NPs in the liver<sup>7</sup> but can modulate their cellular distribution. Indeed, the NPs characterized by a reduced Kupffer cell uptake and a size allowing passing through the fenestrated sinusoidal endothelium (150–200 nm) can reach the Disse's space and then interact with the hepatocytes.<sup>9,19</sup> This major cell type, which represents around 70% of the liver cell population, supports the metabolism of xenobiotics playing therefore a key role in the detoxification of the body. For these last two reasons, the interactions of NPs with hepatocytes need to be elucidated in nanotoxicological studies.

In the present work, the size, the surface charge and the composition (organic vs. inorganic) of the NPs were modulated, since all of these parameters could influence the adverse effects of NPs. Most of the surfactants usually used in the manufacturing process both to control the size and to stabilize the NPs can interact with the cells<sup>20,21</sup> owing to their amphiphilic properties and could therefore contribute to a toxic effect. Considering these physicochemical features, the hydrodynamic diameter of PLGA NPs was modulated from 78 to 178 nm using a surfactant-free process. Only the polymer concentration in the organic phase was adjusted to obtain the NP1, NP2 and NP3 formulations. The NPs prepared with PVA, a non-ionic polymer widely used in the production of PLGA NPs were also prepared to evaluate the potential toxicity of the adsorbed surfactant (NP5). Cationic NPs (NP6) were also produced by incubating NP1 with a PEI solution. Also, the culture medium of hepatocytes being serum-free, serum protein-coated NPs were prepared (NP4) to mimic the opsonization process occurring when NPs are intravenously injected. Finally, the use of commercial silica NPs of 30 and 70 nm (NP7 and 8) completed the study by considering the composition parameter (organic vs. inorganic).

In the present study, primary cell cultures were exposed to NPs for 72 h. This incubation time has been chosen, taking into account the short-term maintenance of cell viability in this type of culture and also the residence time of PLGA particles in the hepatic tissue. Considering this last point, the data in the literature are still controversial. Whereas Simon and Sabliov (2014) demonstrated that PLGA NPs were not detected in the liver 24 h after injection,<sup>22</sup> some studies showed that 40 to 50% of PLGA NPs loaded in rhodamine and coumarin were still located in the liver 3 days after administration.<sup>23</sup> Additionally, the molecular weight PLGA NPs with a mean diameter of 200 nm slightly decreased from 44 000 to 31 192 Da after 72 h in the liver, suggesting that the polymer has been only partially biodegraded.<sup>5</sup> Our *in vivo* experiment has also been performed for up to 72 h to allow an easier comparison of *in vivo/in vitro* data. Moreover, based on the stability study for 24 h, the NP suspensions were replaced by fresh particles everyday up to 72 h, both *in vitro* and *in vivo*. Physicochemical characterization showed indeed that most of the differences in terms of size and of zeta potential between the various formulations were maintained in culture medium. Indeed, all NPs except the serum-coated NP4 were still stable after 24 h incubation, allowing an accurate evaluation of the size effect. The stability of the surfactant-free and PEI-coated NPs was conferred by the surface electrostatic barrier. PVA-NPs were also stable despite a zeta potential close to 0 due to a steric barrier generated by the high molecular weight non-ionic surfactant coated on the particle surface. By contrast, the aggregation of NP4 could be due to the formation of protein bridges between the particles.<sup>24</sup>

The quantity of PLGA used to treat hepatocyte cultures and to inject in rats was based both on the conventional drug-loading rate in PLGA NPs, and on their therapeutic concentrations by the i.v. route.<sup>7,22,25,26</sup> Viability evaluation based on

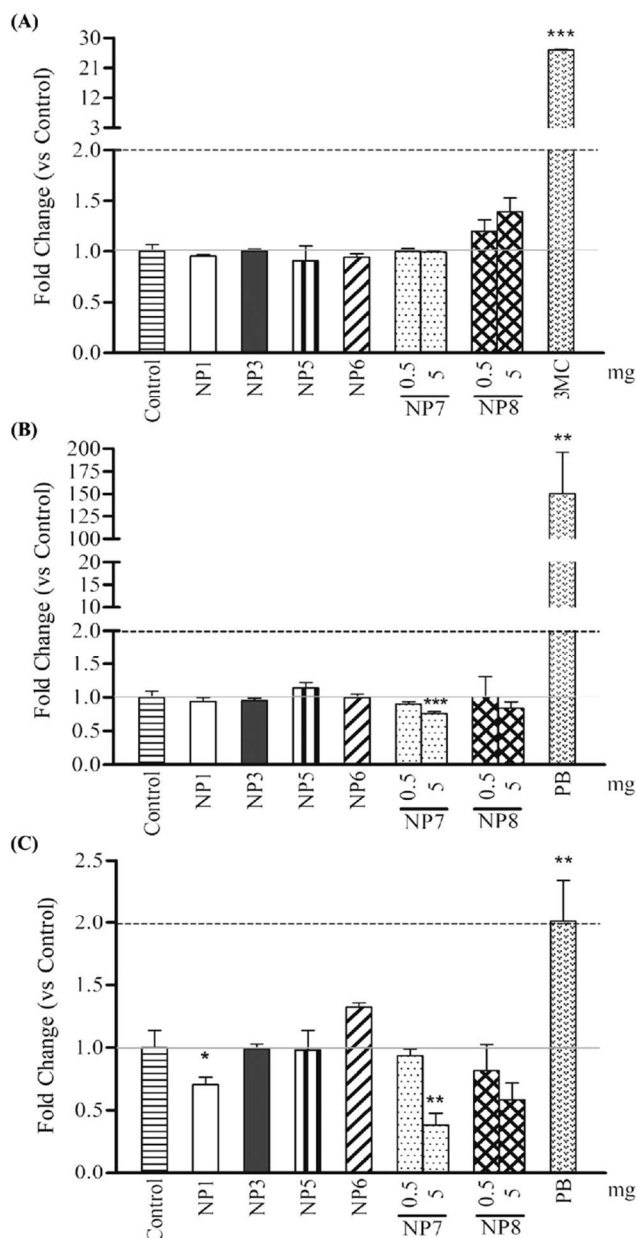


**Fig. 4** Effect of PLGA (0.1 to 1 mg mL<sup>-1</sup>) and silica (0.1 mg mL<sup>-1</sup>) nanoparticles on CYP1A (A and D), CYP2B (B and E) and CYP3A (C and F) activities in primary rat (A, B and C), and human (D, E and F) hepatocyte cultures after 72 h of exposure.  $\beta$ -Naphthoflavone ( $\beta$ -NF 50  $\mu$ M), 3-methylcholantrene (3MC 5  $\mu$ M), phenobarbital (PB 1 mM), dexamethasone (Dex 50  $\mu$ M) and rifampicin (Rif 10  $\mu$ M) were used for 72 h of treatment as reference CYP inducers.  $\alpha$ -Naphthoflavone ( $\alpha$ -NF 10  $\mu$ M), erythromycin (Ery 10  $\mu$ M) and ketoconazole (Keto 25  $\mu$ M) were used for 2 h ( $\alpha$ -NF) or 24 h (Ery and Keto) of treatment as reference CYP inhibitors. CYP activities were expressed as fold change versus control medium, which was set at 1. Data are means  $\pm$  SEM from triplicate of at least 3 independent cultures. \* $p$   $\leq$  0.05, \*\* $p$   $\leq$  0.01 and \*\*\* $p$   $\leq$  0.001 with respect to the control medium.

the MTT assay demonstrated that such concentrations (0.1, 0.5 and 1 mg mL<sup>-1</sup>, except for NP6) were not cytotoxic for rat and human hepatocytes after 72 h of exposure to PLGA NPs. For NP5 and NP6 formulations, washing steps were added to remove free PVA or PEI not absorbed on the surface of NPs, in order to limit the toxic effect of the free surfactant caused by the insertion in the cell membrane.<sup>20</sup> Moreover, the concentrations of NP6 were 10-fold lower considering the marked cytotoxicity of PEI. The positive zeta potential of NP6 promotes the interaction with negatively charged cell membranes and thereby facilitates their cellular uptake.<sup>27,28</sup> For silica NPs, a

previous study dealing with HepG2, a human hepatocyte cell line, showed a lack of cytotoxicity at a concentration of 0.1 mg mL<sup>-1</sup>.<sup>29</sup> The same concentration was therefore used in the present study (NP7 and 8). A low decrease of rat hepatocyte viability but without statistical significance was obtained, whereas silica NPs were significantly cytotoxic in human hepatocyte cultures. Discrepancies between the data from the human cell line and from our primary cultures of human hepatocytes, in addition to the cell type difference, are probably due to the time exposure (48 h vs. 72 h in our study) to silica NPs. In order to take into account the cytotoxic effect of silica

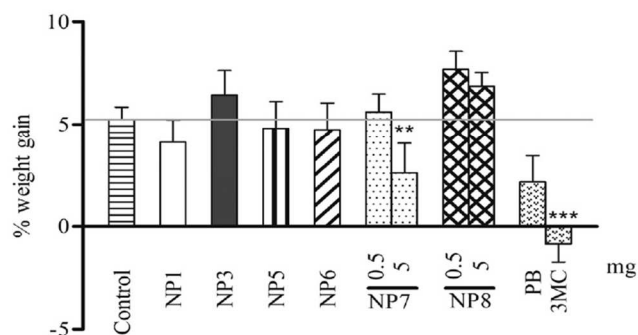




**Fig. 5** Effect of PLGA (5 mg) and silica (0.5 and 5 mg) nanoparticles on CYP1A (A), CYP2B (B) and CYP3A (C) activities in rat liver microsomes. Nanoparticles were injected in rats every 24 h for up to 72 h. 3MC (20 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) and PB (80 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) were used for 72 h of treatment as reference CYP inducers. CYP activities were expressed as fold change versus the control group, which was set at 1. Data are means  $\pm$  SEM. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  and \*\*\* $p \leq 0.001$  with respect to the control group.

NPs when processing the CYP activities, we normalized all the data per the quantity of total proteins, which usually correlated with the number of viable cells.

The activity of major CYP isoforms including CYP1A, CYP2B and CYP3A was evaluated after 72 h incubation with NPs. Significant interspecies differences were obtained as well as a CYP isoform-dependent effect. In rat hepatocytes, only a



**Fig. 6** Body weight gain of the rats after 3 days of injections. Nanoparticles were injected in rats every 24 h for up to 72 h. 3MC (20 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) and PB (80 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) were used for 72 h of treatment as reference CYP inducers. Data are means  $\pm$  SEM \* $p \leq 0.05$  and \*\*\* $p \leq 0.001$  with respect to the control group.

few PLGA NPs inhibited partially the activity of some CYPs. Indeed, NP2 at 1 mg mL<sup>-1</sup> and NP1 at 0.5 mg mL<sup>-1</sup> slightly decreased the activity of CYP2B and CYP3A, respectively. In contrast, silica NPs with a mean diameter of 30 nm (NP7) were responsible for a marked decrease of 73% of the CYP3A activity. These *in vitro* results are perfectly consistent with the *in vivo* data. Indeed among the injected PLGA NPs (NP1, NP3, NP5 and NP6), only NP1 showed a slight inhibition of the CYP3A activity. NP7 also decreased the activity of this isoform, but the effect was very marked, leading to a 62% decrease of the CYP3A activity. It is noteworthy that a lower body weight gain of rats treated with 5 mg of NP7 was obtained as compared to the control and to the PLGA NP groups, but the level was similar to the PB group. A loss of weight was even noticed with the 3MC group, in agreement with another study.<sup>30</sup> Neither differences in the liver weight, nor macroscopic morphological changes were noted when rats were sacrificed. The differences in the weight gain in the animals could be explained by a lower food intake of these animals when exposed to a toxic and/or a modification of the overall metabolism. These differences could at least partly explain the inhibition of the hepatic detoxification function. Also the size and the composition of NPs (organic vs. inorganic) could contribute in a synergistic way to this effect.

In humans, the effects of NPs on the CYP activity were more significant than in rat hepatocytes. However, PVA-coated NPs (NP5) did not alter the metabolic activity of both rat and human hepatocytes under any experimental conditions. Flow cytometry analysis revealed that the interaction of NP1 with hepatocytes was much higher compared with NP5 likely due to the PVA coating. The hydrophilic steric barrier conferred by the PVA could hinder the adhesion of NP5 to the cell membrane. Additionally, the cell interaction of NP1 was partially inhibited at 4 °C, suggesting both a binding and an uptake by hepatocytes. In humans, opsonized PLGA NPs (NP4) modified significantly the activity of all the CYP isoforms. This represents a major finding because numerous NPs intravenously injected are opsonized and consequently could be identified



to NP4. Considering the CYP2B activity, all surfactant-free NPs inhibited partially this activity, whereas an induction was observed with silica NPs, especially NP7 with a mean diameter of 30 nm. These major differences observed between organic and inorganic particles suggest two distinct interaction mechanisms. Moreover, these NPs have different effects depending on the CYP isoform, underlying a CYP isoform-dependent effect of PLGA NPs. This was consistent with the work of Ye *et al.* (2014) that showed that CYP isoforms were not inhibited in the same manner after exposure to small Au NPs.<sup>31</sup> This was explained by differences in the structure, the heterogeneity and the plasticity of eukaryotic microsomal CYPs.<sup>32</sup> Since CYP3A represents around 60% of the total hepatic CYPs and is involved in the metabolism of more than 50% of drugs such as anti-cancer agents, a modulation of its activity can lead to severe adverse drug–drug interactions. Such a modification by NPs should be therefore a major concern,<sup>13,33,34</sup> since this could impact the elimination process of the encapsulated drugs or cause adverse effects in the case of polytherapy. Among the surfactant-free NPs tested, only NP1 with the largest size (178 nm) significantly reduced the enzymatic activity of CYP3A. Altogether, these results showed that the largest PLGA NPs including NP1 and NP4 generated the strongest effects on CYP3A. The opposite effect was observed with silica NPs where the CYP3A modulation was higher with the lowest size of silica NPs (30 nm). Accordingly, Imai *et al.* (2014) showed a 60% inhibition of CYP3A4 activity in HepG2 cells after 48 h exposure to 30 nm-silica NPs at 0.1 mg mL<sup>-1</sup>, but no significant effect was observed with the largest size (70 nm) of NPs.<sup>29</sup>

NPs should be internalized by hepatocytes to trigger the process leading to the modulation of the CYP activity. One can expect that differences in cellular uptake could be dependent on the size of NPs. However, the literature dealing with this topic is still controversial. Yin Win and Feng (2005) showed a higher cellular uptake of 100 and 200 nm polystyrene NPs compared with 50 nm.<sup>35</sup> By contrast, another study demonstrated that the cell uptake of 50 nm silica NPs was two-fold higher than 30 nm NPs.<sup>36</sup> The effects of NPs on the metabolic activity of hepatocytes do not seem exclusively dependent on the internalization level of NPs. Other mechanisms involving the complex structure of the CYPs, as compared to the structure and the physicochemical parameters of NPs may act. First, a competitive inhibition implying the active site of CYP could be involved. But it was not consistent considering the low size of this catalytic site as compared to NPs.<sup>37</sup> Second, NPs could adsorb CYP isoforms on their surface.<sup>31</sup> Wang *et al.* (2011) showed that the interaction of silica NPs with a serine protease called Subtilisin Carlsberg could alter the conformation and then the activity of this enzyme in a size-dependent manner.<sup>38</sup> Effects were higher for the smallest NPs due to their large specific surface area and high mobility. However the mechanism is likely different with PLGA NPs, since CYP inhibition was higher with large NPs and serum protein-coated NPs limit interactions with these enzymes. Further experiments are needed

to explain the complex regulations of CYP by NPs especially in humans.

## Conclusions

The present study represents a significant advance in the toxicological evaluation of NPs. First, the metabolic response was dependent on the physicochemical features and the composition (organic *vs.* inorganic) of the NPs. In particular, the modulation of the CYP activity by PLGA NPs was slight as compared to silica NPs, and could be overcome by the addition of a hydrophilic surfactant such as PVA. Second, the effects were different according to the CYP isoform. Third, the results clearly demonstrated that the detoxification function of the human hepatocytes is more sensitive to NP exposure than the rat hepatocytes. This last finding suggests that the human hepatocytes in primary cultures could be designated as a relevant *in vitro* model in nanotoxicology studies, which could be required in the approval process of nanomedicines.

## Conflicts of interest

The authors report no conflicts of interest.

## Acknowledgements

R. Cornu is supported by a fellowship from the “Communauté d'Agglomération du Grand Besançon (CAGB)”. The authors would like to thank Claire Chrétien and Alexandre Bonet for their technical assistance.

## References

- 1 D. Bobo, K. J. Robinson, J. Islam, K. J. Thurecht and S. R. Corrie, *Pharm. Res.*, 2016, **33**, 2373–2387.
- 2 F. Danhier, E. Ansorena, J. M. Silva, R. Coco, A. Le Breton and V. Préat, *J. Controlled Release*, 2012, **161**, 505–522.
- 3 S. K. Sohaebuddin, P. T. Thevenot, D. Baker, J. W. Eaton and L. Tang, *Part. Fibre Toxicol.*, 2010, **7**, 22.
- 4 R. Gref, M. Lück, P. Quellec, M. Marchand, E. Dellacherie, S. Harnisch, T. Blunk and R. H. Müller, *Colloids Surf., B*, 2000, **18**, 301–313.
- 5 A. K. Mohammad and J. J. Reineke, *Mol. Pharm.*, 2013, **10**, 2183–2189.
- 6 M. Beck-Broichsitter, J. Nicolas and P. Couvreur, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2015, **97**, 304–317.
- 7 Z. Panagi, A. Beletsi, G. Evangelatos, E. Livaniou, D. S. Ithakissios and K. Avgoustakis, *Int. J. Pharm.*, 2001, **221**, 143–152.
- 8 J.-K. Park, T. Utsumi, Y.-E. Seo, Y. Deng, A. Satoh, W. M. Saltzman and Y. Iwakiri, *Nanomedicine*, 2016, **12**, 1365–1374.

- 9 Y.-N. Zhang, W. Poon, A. J. Tavares, I. D. McGilvray and W. C. W. Chan, *J. Controlled Release*, 2016, **240**, 332–348.
- 10 N. Mishra, N. P. Yadav, V. K. Rai, P. Sinha, K. S. Yadav, S. Jain and S. Arora, *BioMed Res. Int.*, 2013, **2013**, 382184.
- 11 B. Semete, L. Booyesen, L. Kalombo, B. Ramalapa, R. Hayeshi and H. S. Swai, *Int. J. Pharm.*, 2012, **424**, 115–120.
- 12 W. M. A. Westerink and W. G. E. J. Schoonen, *Toxicol. in Vitro*, 2007, **21**, 1581–1591.
- 13 M. Martignoni, G. M. M. Groothuis and R. de Kanter, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 2006, **2**, 875–894.
- 14 H. Fessi, F. Puisieux, J. P. Devissaguet, N. Ammoury and S. Benita, *Int. J. Pharm.*, 1989, **55**, R1–R4.
- 15 D. Moinard-Checot, Y. Chevalier, S. Briançon, H. Fessi and S. Guinebrière, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2006, **6**, 2664–2681.
- 16 E. Horisawa, K. Kubota, I. Tuboi, K. Sato, H. Yamamoto, H. Takeuchi and Y. Kawashima, *Pharm. Res.*, 2002, **19**, 132–139.
- 17 S. K. Sahoo, J. Panyam, S. Prabha and V. Labhasetwar, *J. Controlled Release*, 2002, **82**, 105–114.
- 18 OECD Guidelines for the testing of chemicals, human cytochrome P450 (CYP) *n*-fold induction *in vitro* test method, 2014.
- 19 S. Gupta, A. Agarwal, N. K. Gupta, G. Saraogi, H. Agrawal and G. P. Agrawal, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2013, **39**, 1866–1873.
- 20 C. Maupas, B. Moulari, A. Béduneau, A. Lamprecht and Y. Pellequer, *Int. J. Pharm.*, 2011, **411**, 136–141.
- 21 R. C. Bravo González, J. Huwyler, F. Boess, I. Walter and B. Bittner, *Biopharm. Drug Dispos.*, 2004, **25**, 37–49.
- 22 L. C. Simon and C. M. Sabliov, *Drug Metab. Rev.*, 2014, **46**, 128–141.
- 23 B. Semete, L. Booyesen, Y. Lemmer, L. Kalombo, L. Katata, J. Verschoor and H. S. Swai, *Nanomedicine*, 2010, **6**, 662–671.
- 24 M. Kendall, P. Ding and K. Kendall, *Nanotoxicology*, 2011, **5**, 55–65.
- 25 F. Danhier, N. Lecouturier, B. Vroman, C. Jérôme, J. Marchand-Brynaert, O. Feron and V. Préat, *J. Controlled Release*, 2009, **133**, 11–17.
- 26 R. Dinarvand, N. Sepehri, S. Manoochehri, H. Rouhani and F. Atyabi, *Int. J. Nanomed.*, 2011, **6**, 877–895.
- 27 E. Fröhlich, *Int. J. Nanomed.*, 2012, **7**, 5577–5591.
- 28 G. J. Pillai, M. M. Greeshma and D. Menon, *Colloids Surf., B*, 2015, **136**, 1058–1066.
- 29 S. Imai, Y. Yoshioka, Y. Morishita, T. Yoshida, M. Uji, K. Nagano, Y. Mukai, H. Kamada, S.-I. Tsunoda, K. Higashisaka and Y. Tsutsumi, *Nanoscale Res. Lett.*, 2014, **9**, 651.
- 30 J. A. Jacobus, B. Wang, C. Maddox, H. Esch, L. Lehmann, L. W. Robertson, K. Wang, P. Kirby and G. Ludewig, *Environ. Int.*, 2010, **36**, 970–979.
- 31 M. Ye, L. Tang, M. Luo, J. Zhou, B. Guo, Y. Liu and B. Chen, *Nanoscale Res. Lett.*, 2014, **9**, 642.
- 32 E. F. Johnson and C. D. Stout, *J. Biol. Chem.*, 2013, **288**, 17082–17090.
- 33 D. S. Sonnichsen, Q. Liu, E. G. Schuetz, J. D. Schuetz, A. Pappo and M. V. Relling, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1995, **275**, 566–575.
- 34 K. T. Kivistö, H. K. Kroemer and M. Eichelbaum, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1995, **40**, 523–530.
- 35 K. Yin Win and S.-S. Feng, *Biomaterials*, 2005, **26**, 2713–2722.
- 36 F. Lu, S.-H. Wu, Y. Hung and C.-Y. Mou, *Small*, 2009, **5**, 1408–1413.
- 37 E. Fröhlich, T. Kueznik, C. Samberger, E. Roblegg, C. Wrighton and T. R. Pieber, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2010, **242**, 326–332.
- 38 J. Wang, U. B. Jensen, G. V. Jensen, S. Shipovskov, V. S. Balakrishnan, D. Otzen, J. S. Pedersen, F. Besenbacher and D. S. Sutherland, *Nano Lett.*, 2011, **11**, 4985–4991.





**PUBLICATION 2**

**Small silica nanoparticles transiently modulate the intestinal permeability  
by actin cytoskeleton disruption**

**Raphaël Cornu, Claire Chrétien, Hélène Martin, Arnaud Béduneau**

Article soumis dans Nanotoxicology (FI : 5,955)



## I. CONTEXTE ET OBJECTIFS

Les NPs sont très largement utilisées comme additif alimentaire ou excipient pharmaceutique notamment. Des données récentes ont mis en évidence le risque potentiel pour la santé d'une exposition à ces additifs. Ainsi, des effets toxiques tels qu'une modification de la régulation des histones et des anomalies du développement chez la drosophile, ainsi que des effets génotoxiques après exposition orale à l'additif E171 (TiO<sub>2</sub>) ont en effet été rapportés dans la littérature. Une autre étude menée sur des rats exposés par voie orale à ce même additif à des doses proches de l'exposition alimentaire humaine a également alerté sur les dangers d'une exposition chez l'Homme. Un autre additif, le E551 (SiO<sub>2</sub>) est largement utilisé dans l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique, notamment comme agent antiagglomérant et antimottant dans les denrées en poudre et comme lubrifiant dans la fabrication des comprimés pharmaceutiques. Malgré les risques évidents encourus, très peu de données concernant la toxicité orale de l'additif E551 sont actuellement disponibles. L'évaluation du risque nécessite une étude rigoureuse de sa toxicité, notamment sur la barrière intestinale ; en effet, une augmentation de la perméabilité intestinale pourrait favoriser le passage dans l'organisme de molécules potentiellement toxiques pour l'Homme.

Dans cette deuxième étude, nous nous sommes intéressés aux effets d'une exposition aiguë à des NPs de silice de différentes tailles et à l'additif E551, sur la barrière intestinale en répondant notamment aux questions suivantes : les NPs de silice modifient-elles la perméabilité intestinale ? Est-ce un phénomène réversible ou non ? Quels sont les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués ?

## II. METHODOLOGIE

Pour évaluer les effets des NPs de silice, deux modèles de barrière intestinale humaine ont été utilisés, une monoculture de cellules Caco-2 et une coculture de cellules Caco-2/HT29-MTX toutes deux cultivées sur support Transwell®. Après 21 jours, la monocouche de Caco-2 forme un épithélium différencié d'entérocytes jointifs. Dans le cas de la coculture, un épithélium composé d'entérocytes et de cellules caliciformes sécrétant du mucus est obtenu. Les cellules ont été incubées avec des NPs de silice de taille définie entre 10 et 200 nm ou l'additif E551 pendant 2h. L'impact des NPs sur la viabilité cellulaire a été déterminé par test au MTT et mesure du taux de lactate déshydrogénase. L'évaluation de la

perméabilité intestinale a ensuite été réalisée par mesure de la résistance électrique transépithéliale et par évaluation du transport paracellulaire du Lucifer-Yellow. Le mécanisme responsable de la modulation de la perméabilité intestinale a été identifié en étudiant l'expression des jonctions serrées par western-blotting et immunomarquage des filaments d'actine du cytosquelette.

### III. PRINCIPAUX RESULTATS / CONCLUSIONS

Cette étude a notamment permis de montrer que :

- Une augmentation de la perméabilité intestinale, dépendante de la taille et de la concentration en NPs, est observée dans les deux modèles de barrière intestinale humaine.
- L'impact des NPs est totalement réversible en 22h, ce qui suggère un mécanisme dynamique.
- Le rôle protecteur du mucus doit être considéré pour établir de façon pertinente la toxicité de NPs administrées par voie orale. Le mucus présent dans le modèle Caco-2/HT29-MTX réduit la modulation de la perméabilité et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires en limitant l'internalisation cellulaire des NPs.
- L'augmentation de la perméabilité intestinale par les NPs est expliquée par la rupture du cytosquelette d'actine sans modification de l'expression des protéines des jonctions serrées. La dépolymérisation des filaments d'actine altère la liaison entre les *zonula occludens* et l'actine impliqués dans la stabilité du réseau de jonctions serrées. Le réarrangement de ZO-1 observé par immunomarquage ainsi que la récupération concomitante des filaments d'actine et de la perméabilité intestinale confortent cette conclusion.
- Le ratio NPs/microparticules dans l'additif E551 qui varie en fonction des lots et des fabricants doit être considéré comme un facteur de toxicité.

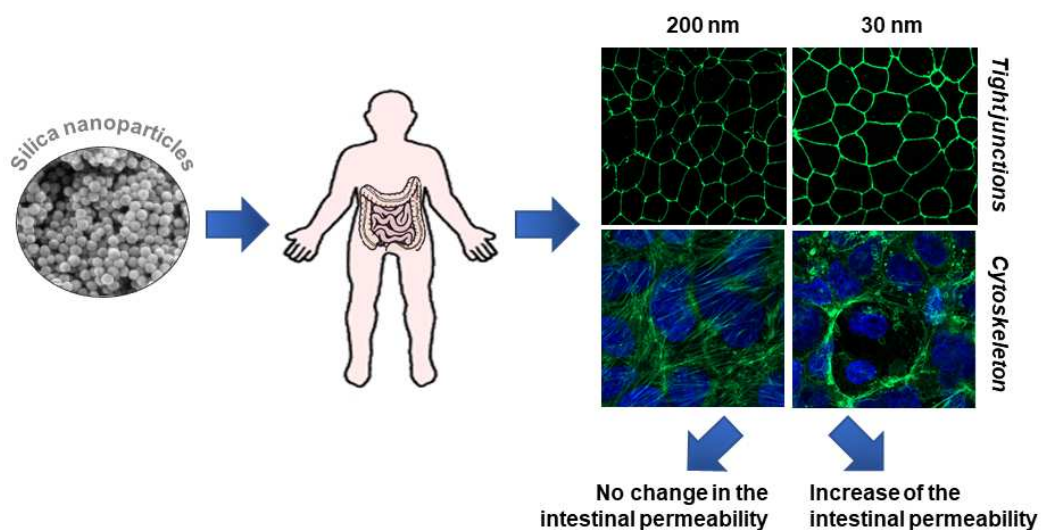
- Il est important de ne pas évaluer la toxicité des systèmes nanoparticulaires au regard de leurs seuls effets cytotoxiques mais plutôt de façon plus complexe à l'échelle de l'épithélium entier.

#### **IV. PUBLICATION II**



## ABSTRACT

Amorphous silica nanoparticles are widely used as pharmaceutical excipients and food additive (E551). Despite the potential human health risks of mineral nanoparticles, very few data regarding their oral toxicity are currently available. This study aims to evaluate and to understand the interactions of silica particles with the intestinal barrier using a Caco-2 monolayer and a Caco-2/HT29-MTX co-culture to consider the mucus protective barrier. A size- and concentration-dependent reversible increase of the paracellular permeability is identified after a short-term exposure to silica nanoparticles. Nanoparticles of 30 nm induce the highest transepithelial electrical resistance drop whereas no effect is observed 200 nm particles. Additive E551 affect the Caco-2 monolayer permeability. In co-culture, mucus layer reduces the permeability modulation by limiting the cellular uptake of silica. After nanoparticle exposure, tight junction expression including Zonula occludens 1 (ZO-1) and Claudin 2 is not affected, whereas the actin cytoskeleton disruption of enterocytes and the widening of ZO-1 staining bands are observed. A complete permeability recovery is concomitant with the *de novo* filament actin assembly and the reduction of ZO-1 bands. These findings suggest the paracellular modulation by small silica particles is directly correlated to the alteration of the ZO-actin binding strongly involved in the stability of the tight junction network.





## KEYWORDS

silica nanoparticles, intestinal permeability, actin cytoskeleton, tight junctions, Caco-2 cells, nanotoxicology

Amorphous silica nanoparticles (NPs) represent one of the most common manufactured nanomaterial. Their unique physicochemical properties such as the surface area and the porosity, their great stability and their low cost confer them a major interest in various application fields including pharmaceutical and food industries (He *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2018). Silicate NPs are used as flow agent in the preparation of solid dosage forms and as anti-caking agent in many powdered foods due to their hygroscopic characteristics (Pradhan *et al.*, 2015). Food additive E551 is a mixture of silica NPs with a diameter inferior to 100 nm and microparticles (Barahona *et al.*, 2016; EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS) *et al.*, 2018). Spherical silica nanoparticles of approximately 10–50 nm in size was clearly identified in food (Athinarayanan *et al.*, 2014). The nanoparticle/microparticle ratio is often different according to the manufacturer.

The use of nanomaterials is more and more questioned due to their potential toxicity in Humans (Jackson *et al.*, 2017; Sahu and Hayes, 2017). Recent findings emphasized the potential human health risk induced by food additives composed of nanoparticles. Many scientific studies focused on the additive E171 composed of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) NPs. *In vitro* and *in vivo* studies showed that TiO<sub>2</sub> NPs impaired tight junctions and led to an increase of the intestinal permeability (Brun *et al.*, 2014; Pedata *et al.*, 2019). However, very few data regarding the oral toxicity of the additive E551 are available. Concentration-dependent cytotoxicity and oxidative stress caused by the silica NPs were mainly reported (Athinarayanan *et al.*, 2014). However, their effects on the function and the integrity of the intestinal barrier stay little studied. A

disruption of the intestinal barrier or an increase of the epithelial permeability could facilitate the transport of toxic agents, modify the bioavailability of drugs and allow the bacterial translocation (Vancamelbeke and Vermeire, 2017). A recent study published by Liu *et al.* reported a dysfunction of the blood-brain barrier by silica NPs, demonstrating the potential toxic effect of the silica on the biological barriers (Liu *et al.*, 2017).

In the present study, the oral toxicity of the additive E551 and silica nanoparticles with sizes ranging from 10 nm to 200 nm was investigated. Two *in vitro* models of the intestinal barrier were compared: a Caco-2 monolayer, considered as the gold standard for predicting intestinal absorption of drugs and a co-culture Caco-2/HT29-MTX. Caco-2 is a human colon carcinoma cell line, exhibiting a phenotype similar to the enterocytes of small intestine. HT29-MTX is a sub-population of human carcinoma cell-lines HT29 isolated by treatment with methotrexate. HT29-MTX play the role of goblet cells in the co-culture to consider the protective mucus barrier in the toxicity studies. After exposure of NPs to *in vitro* models of intestinal barrier, the oxidative stress, the inflammatory response and the paracellular permeability were evaluated. The influence of the NP size, the presence of mucus and the intracellular mechanisms involved in the nanotoxicity were also discussed through molecular biology and immunostaining experiments.

## RESULTS

### Physicochemical properties of the nanoparticles

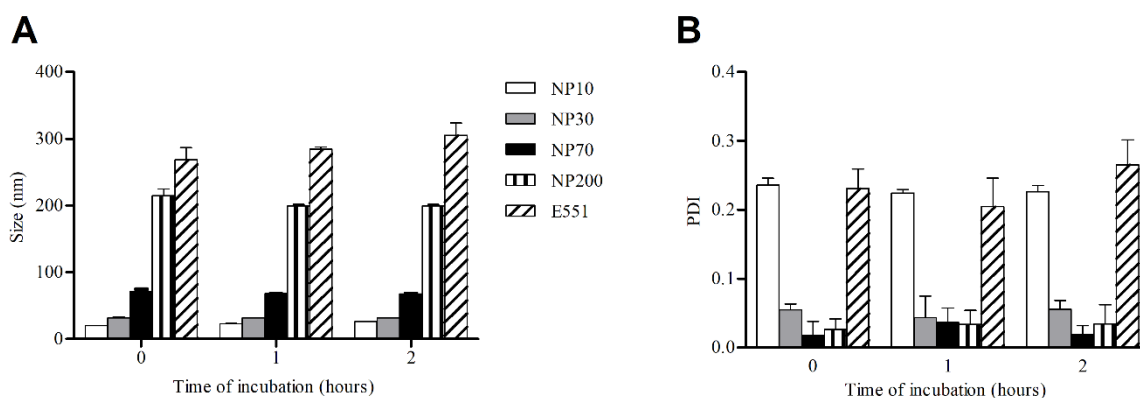
The physicochemical properties of silica NPs were determined in saline transport buffer (TB). The size was measured by dynamic light scattering and the zeta potential by laser Doppler electrophoresis. The physicochemical characterization of silica NPs was reported in **Table 1**. Mean size of NP200, NP70, NP30 and NP10 were respectively 215, 71, 32 and 20 nm. The additive E551 was characterized by a hydrodynamic diameter of 268 nm. The polydispersity

index (PDI) of E551 and NP10 was around 0.23 suggesting a wider size distribution compared to NP200, NP70 and NP30 which is less than 0.1. The zeta potential was around of -20 mV for all silica particles including the E551.

**Table 1.** Physicochemical properties of silica nanoparticles in transport buffer using a ZetaSizer.

Silica NPs	Mean diameter (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)
<b>NP200</b>	215 ± 7	0.026 ± 0.15	-21.3 ± 0.6
<b>NP70</b>	71 ± 4	0.018 ± 0.019	-19.0 ± 2.6
<b>NP30</b>	32 ± 2	0.055 ± 0.031	-17.7 ± 0.7
<b>NP10</b>	20 ± 6	0.236 ± 0.010	-18.5 ± 1.1
<b>E551</b>	268 ± 19	0.231 ± 0.029	-20.5 ± 0.6

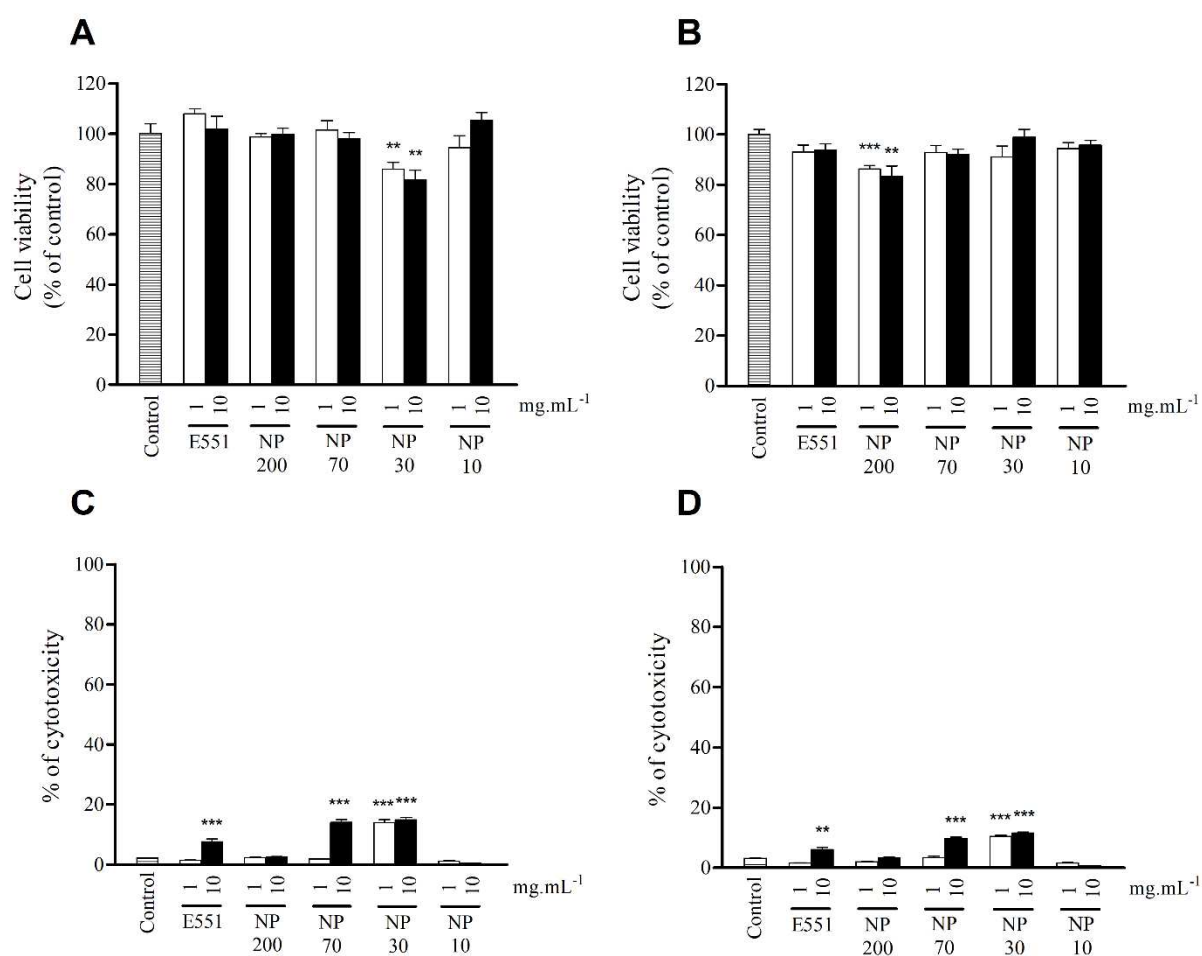
Physicochemical characteristics of silica NPs were monitored for 2h in TB to evaluate their physical stability for *in vitro* studies (**Figure 1**). The hydrodynamic diameters and the size distributions were stable for all silica NPs.



**Figure 1.** Physical stability of silica nanoparticles at 1 mg.mL<sup>-1</sup> for 2h in transport buffer at 37°C. The mean diameter (A) and the polydispersity index (B) were measured on at least 2 different batches of silica NPs using a Zetasizer. Data are means ± SEM from triplicate.

## Effect of nanoparticles on Caco-2 and co-culture Caco-2/HT29-MTX cell viability

Caco-2 and co-culture were exposed for 2h to silica NPs at two concentrations in TB (1 and 10 mg.mL<sup>-1</sup>). The cell viability was then determined by MTT assay (**Figures 2A and 2B**). For the two *in vitro* models, the viability stayed above 80%, suggesting the lack of cytotoxic effect of silica particles including E551. The cytotoxicity of silica NPs was also determined by measuring the lactate dehydrogenase (LDH) release (**Figures 2C and 2D**). In Caco-2, E551, NP70 and NP30 at high concentration induced a light cytotoxicity of 7%, 14% and 15% respectively, as compared to the control. Cytotoxicity of NP30 was not concentration-dependent with similar values at 1 and 10 mg.mL<sup>-1</sup>. The same results were obtained with the co-culture.



**Figure 2.** Effect of the silica NPs (1 and 10 mg.mL<sup>-1</sup>) on cell viability in Caco-2 (**A and C**) and co-culture Caco-2/HT29-MTX (**B and D**) after 2h exposure. Cell viability was determined by an MTT assay (**A and B**) and cytotoxicity was determined by an LDH assay (**C and D**). Results are expressed as percent of control medium (transport buffer without any NP) for cell viability assay. For LDH activity, results were expressed as % of cytotoxicity. Data are means  $\pm$  SEM from triplicate of 3 independent cultures. \*\* $p \leq 0.01$  and \*\*\* $p \leq 0.001$  with respect to control.

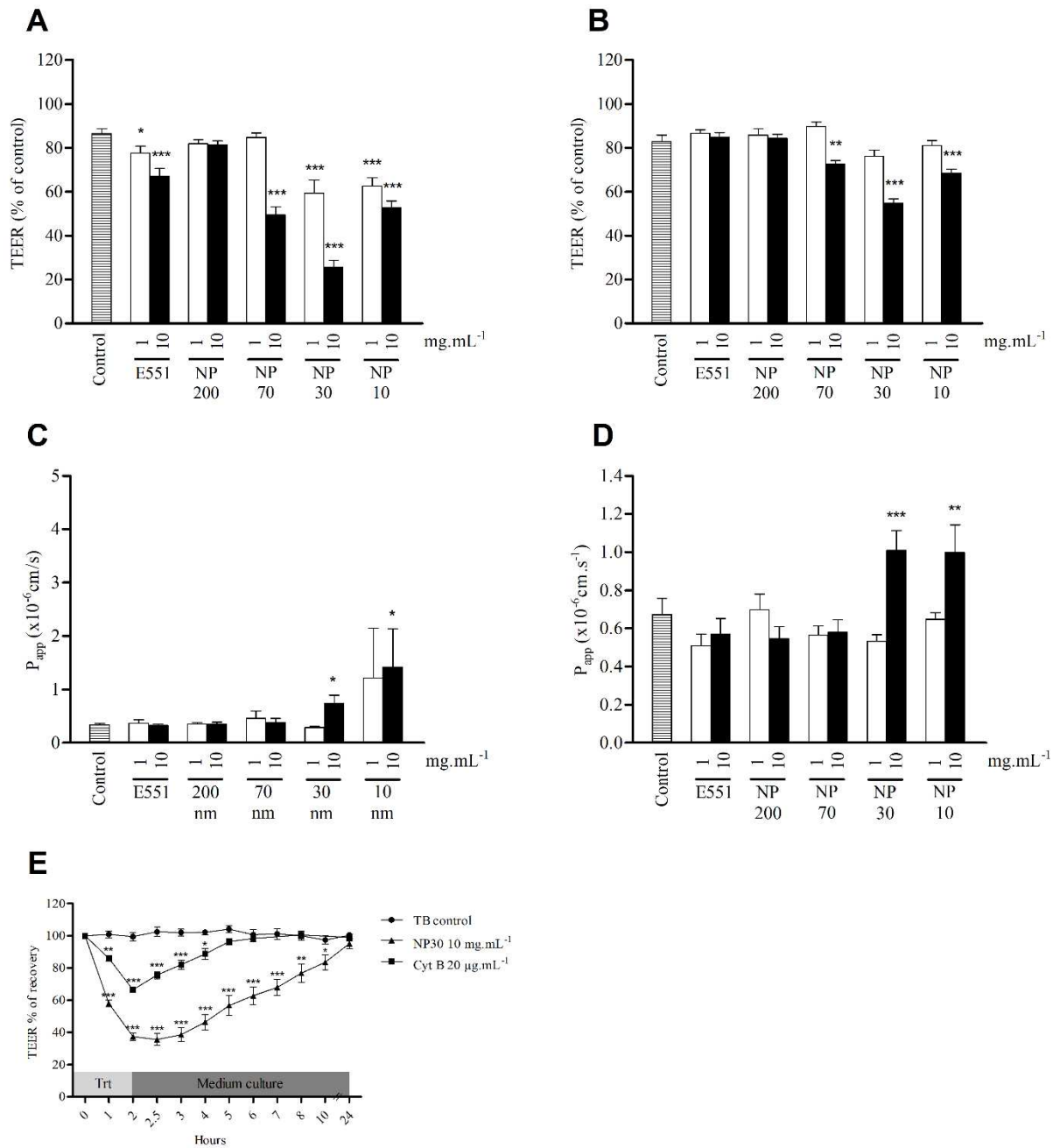
### **Effect of nanoparticles on the intestinal permeability**

Caco-2 and co-culture were exposed to silica NPs for 2h in TB and then, the permeability was monitored by transepithelial electrical resistance (TEER) measurement (**Figures 3A and 3B**). In co-culture model, the smallest NPs including NP70, NP30 and NP10 at 10 mg.mL<sup>-1</sup> led to a TEER decrease comprised between 10% and 30% of the control. The TEER drop was exacerbated with the Caco-2 monolayer and especially in presence of NP30. A TEER decrease of 27% and 61% was measured at 1 and 10 mg.mL<sup>-1</sup> of NP30, respectively. No effect of NP200 and E551 was obtained with the co-culture, whereas a TEER decrease of 9% and 20% was observed with E551 at 1 and 10 mg.mL<sup>-1</sup> respectively in Caco-2 monolayer.

The paracellular transport of Lucifer-Yellow (LY) through the Caco-2 monolayer and the co-culture was evaluated after 2h incubation with silica NPs (**Figures 3C and 3D**). NP30 and NP10 at 10 mg.mL<sup>-1</sup> facilitated the LY transport across the intestinal barrier in the two *in vitro* models. The apparent permeability was 1.5-fold higher in the co-culture compared with the control medium. No significant effect of NP200, NP70 and E551 was reported in both *in vitro* models.

### **Reversible effect of silica NPs on Caco-2 permeability**

The TEER of the Caco-2 monolayer was monitored 22h after 2h exposure to NP30 at  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  and Cytochalasin B (Cyt B) at  $20 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  (**Figure 3E**). As previously observed, NP30 induced a significant TEER decrease. Cyt B also altered the TEER values at a lower degree than NP30 at  $10 \text{ mg.ml}^{-1}$  (34%). After Cyt B treatment, at least 4h were necessary for a full TEER recovery. Regarding the NP30 treatment, TEER increased steadily over 22h to finally reach the values of control.

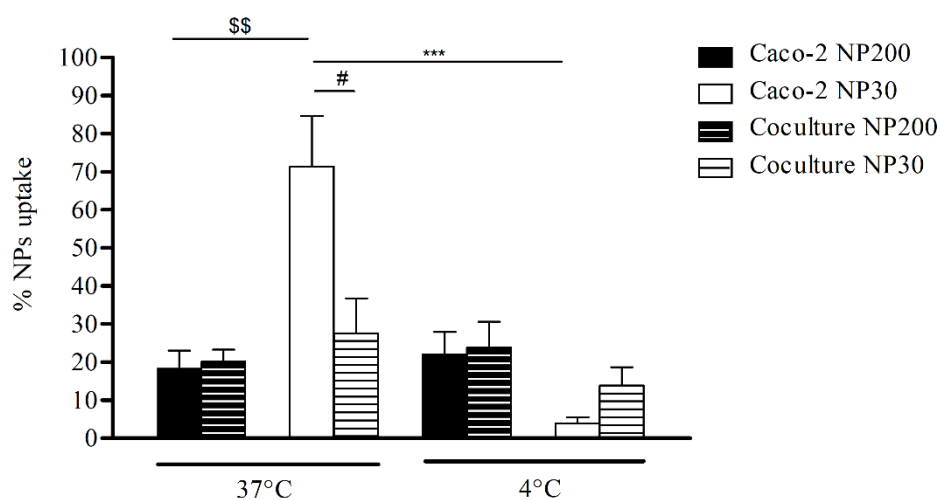


**Figure 3.** Effect of the silica NPs (1 and 10 mg.mL<sup>-1</sup>) on cell permeability in Caco-2 (A and C) and co-culture Caco-2/HT29-MTX (B and D) after 2h exposure. Cell permeability was determined by TEER measurement (A and B) and assessment of Lucifer-Yellow paracellular transport (C and D) ; data are means ± SEM from triplicate of at least 4 independent cultures. TEER monitoring of Caco-2 cells exposed to NP30 (10 mg.mL<sup>-1</sup>) and Cyt B (20 μg.mL<sup>-1</sup>) (E) ;

data are means  $\pm$  SEM from duplicate of at least 3 independent cultures. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  and \*\*\* $p \leq 0.001$  with respect to control.

### Uptake of silica NPs in Caco-2 cells and co-culture

The uptake of silica NPs in Caco-2 cells was determined after 2h exposure using fluorescent NPs (**Figure 4**). At 37°C, 71% of NP30 were taken up by Caco-2 cells *versus* 18% for the NP200 ( $p \leq 0.01$ ). At 4°C, only 4% of NP30 were adsorbed on Caco-2 cells as compared with 37°C ( $p \leq 0.001$ ) whereas no temperature effect was reported with NP200. The NP30 uptake in the co-culture was tremendously reduced compared to the Caco-2 monolayer with only 27% of detected particles ( $p \leq 0.05$ ).



**Figure 4.** Uptake of fluorescent silica NPs in Caco-2 cells or co-culture at 37°C or 4°C after 2h exposure. Data are means  $\pm$  SEM from triplicate of 3 independent cultures.

# $p \leq 0.05$  : Caco-2 30 nm at 37°C compared to co-culture 30 nm at 37°C.

\$\$ $p \leq 0.01$  : Caco-2 200 nm at 37°C compared to Caco-2 30 nm at 37°C.

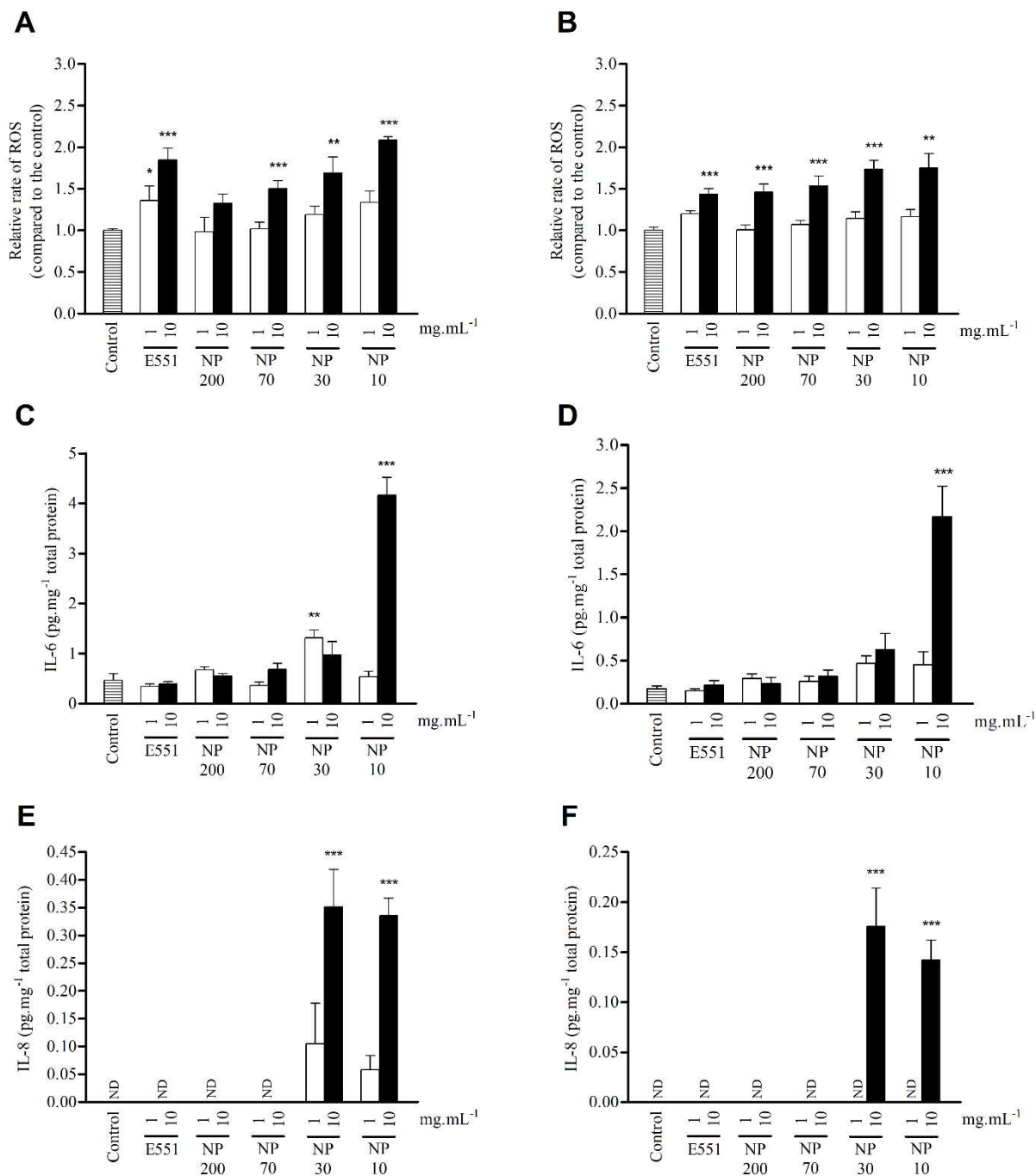
\*\*\* $p \leq 0.001$  : Caco-2 30 nm at 37°C compared to Caco-2 30 nm at 4°C.



### **Cellular oxidative stress and inflammatory response induced by silica NPs**

The cellular oxidative stress was determined by the quantification of reactive oxygen species (ROS) in Caco-2 and co-culture after incubation with silica NPs for 2h in TB (**Figures 5A and 5B**). Except for NP200, silica nanoparticles induced a ROS production in both *in vitro* models at 10 mg.mL<sup>-1</sup>. The increase of relative rate of ROS was comprised between 1.5 and 2.1 in the Caco-2 monolayer. A similar effect was detected with the additive E551.

The secretion of IL-6 and IL-8 was also evaluated by ELISA assay (**Figures 5C to 5F**). Only NP10 at 10 mg.mL<sup>-1</sup> significantly increased the IL-6 secretion in the Caco-2 monolayer and the co-culture. No secretion was measured for the other silica NPs except for NP30 at 1 mg.mL<sup>-1</sup> in Caco-2 model. Moreover, NP30 and NP10 induced a significant secretion of IL-8 at highest concentration in both models. The concentrations of pro-inflammatory cytokines including IL-6 and IL-8 were approximately two times higher with the Caco-2 monolayer compared with the co-culture. Release of IL-1 $\alpha$  and IL-10 were also studied but not detected whatever the treatment (data not shown).



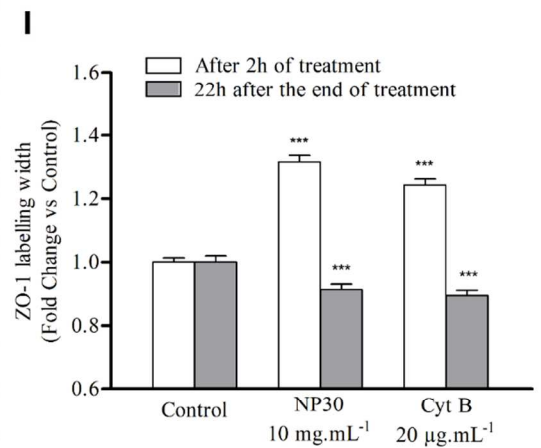
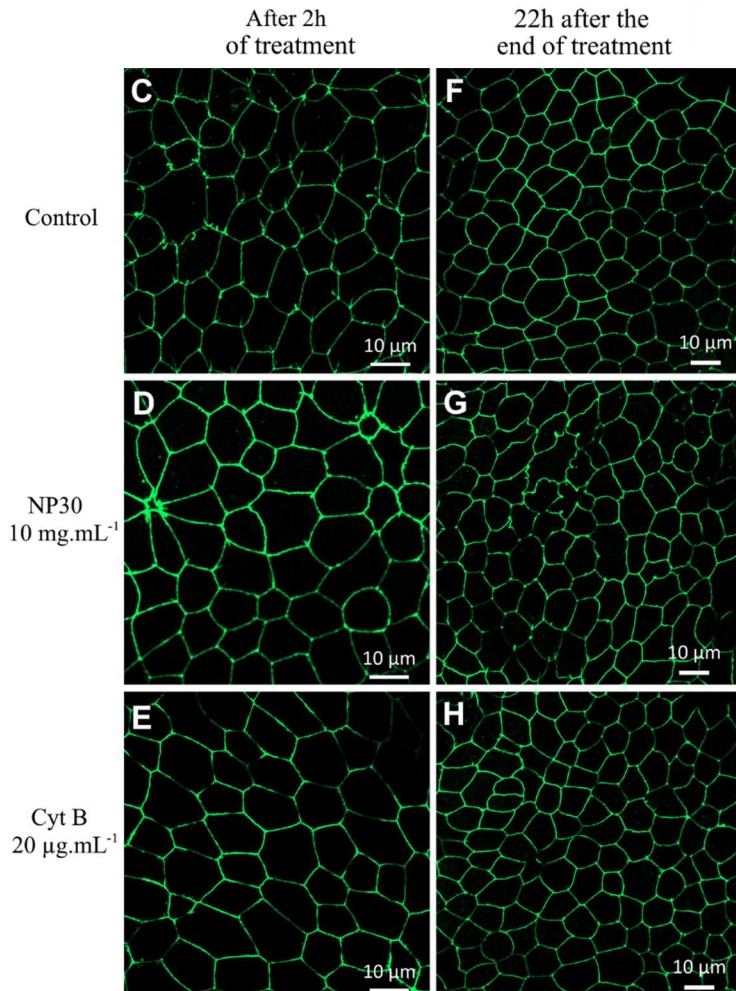
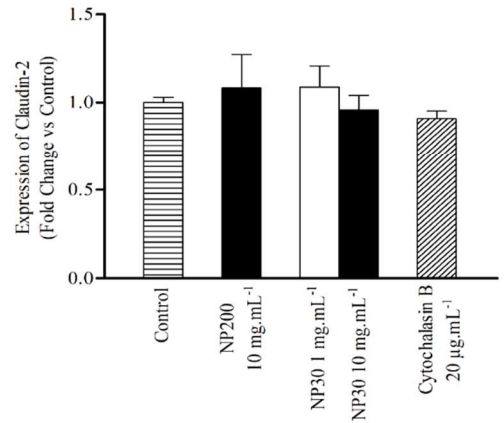
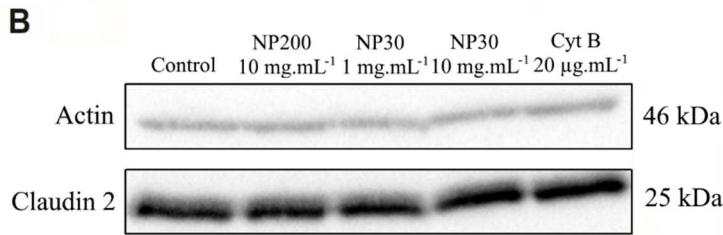
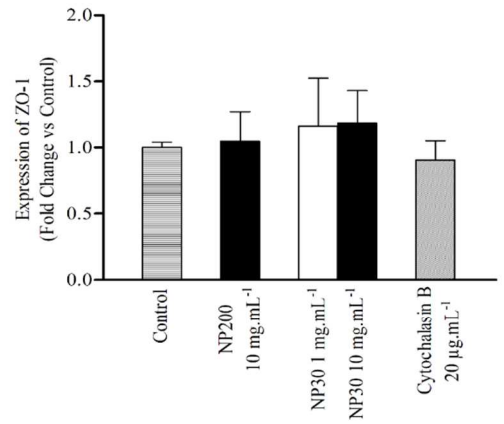
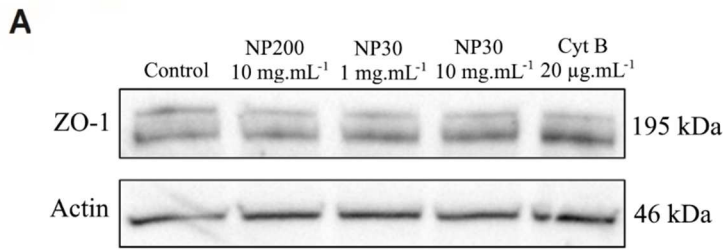
**Figure 5.** Effect of the silica NPs (1 and 10 mg.mL<sup>-1</sup>) on ROS production in Caco-2 (A) and Caco-2/HT29-MTX co-culture (B) after 2h exposure. Rate of ROS were expressed as versus control. IL-6 (C and D) and IL-8 (E and F) secretion were determined by ELISA assay after 2h exposure of the silica NPs (1 and 10 mg.mL<sup>-1</sup>) in Caco-2 model (C and E) or in co-culture (D and F). IL secretions were reported to the amount of total proteins. Data are means ± SEM

from duplicate of 3 independent cultures. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  and \*\*\* $p \leq 0.001$  with respect to control. ND: non detectable.

### **Effect of silica NPs on tight junctions**

Tight junction proteins in Caco-2 cells previously exposed to silica NPs and Cyt B were quantified by western blotting (**Figures 6A and 6B**). Actin was used as the reference protein and the control without any treatment was set at 1. The ZO-1 expression was similar to the control for all the treatments. Claudin 2 expression was unchanged with NP30 and NP200, as compared to the control medium.

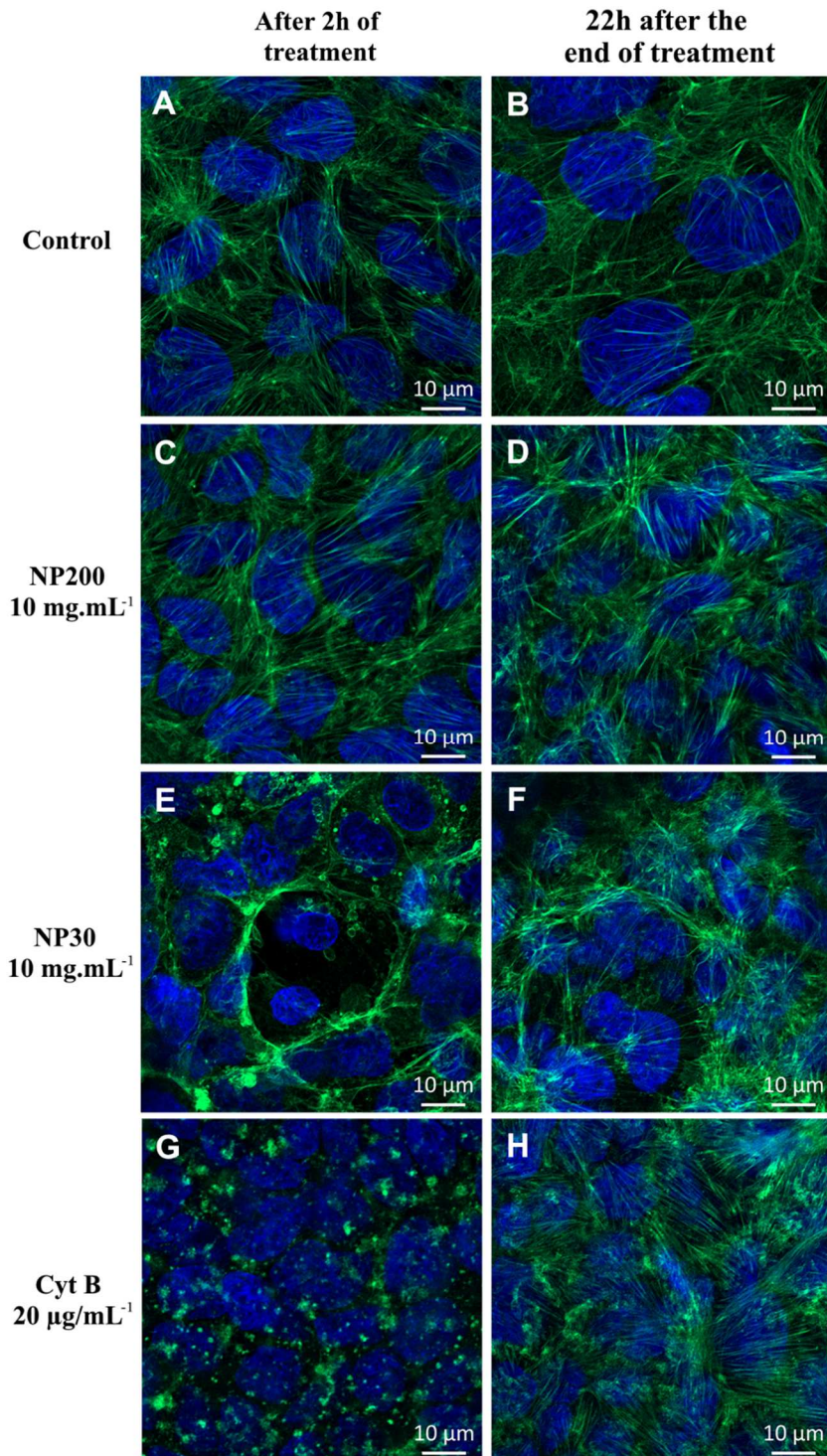
The ZO-1 protein in the Caco-2 monolayer was also observed by confocal microscopy after 2h incubation with silica NPs and Cyt B (**Figures 6C to 6E**). A continuous staining of ZO-1 was observed after all the treatments. For each image, the width of fluorescent staining was measured at different points (**Figure 6I**). Untreated cells were used as the control and set at 1. Fluorescent labelling width was increased by 1.3-fold after treatment with NP30 at 10 mg.mL<sup>-1</sup>. A 1.2-fold increase was reported with Cyt B. No significant effect of NP200 at 10 mg.mL<sup>-1</sup> on the labelling width was observed (data not shown). Twenty-two hours after the end of the treatments (**Figures 6F to 6H**) corresponding to the time necessary to the full TEER recovery, the enlarging of ZO-1 staining bands was not observed anymore for NP30 and Cyt B with widths equal to 90% of control values. Expression of Claudin 2 was also studied by confocal microscopy (data not shown). No difference between control and silica NP treatment in the expression and the localization of this protein was noticed.



**Figure 6.** Changes in relative expression of ZO-1 (A) and Claudin 2 (B) after 2h exposure to silica NPs (10 mg.mL<sup>-1</sup>) or Cyt B (20 µg.mL<sup>-1</sup>) in Caco-2 cells. Data are means ± SEM from 3 independent cultures. ZO-1 immunostaining in Caco-2 cells after 2h incubation with TB (C), NP30 (10 mg.mL<sup>-1</sup>) (D) and Cyt B (20 µg.mL<sup>-1</sup>) (E) or 22h after the end of the treatment (F, G and H). Representative image of 3 independent cultures. ZO-1 labelling width (I) was expressed as versus control. Data are means ± SEM from at least 20 points per image of 3 independent cultures. \**p*≤0.05 and \*\*\**p*≤0.001 with respect to control.

### **Effect of silica NPs on actin cytoskeleton**

Actin cytoskeleton of Caco-2 cells was labelled and observed by confocal microscopy after treatments with silica NPs and Cyt B (Figure 7). In contrast to NP200, NP30 at 10 mg.mL<sup>-1</sup> and Cyt B led to a total disruption of actin filaments after 2h incubation. *De novo* actin filaments were identified 22 h after the end of the treatments.



**Figure 7.** Actin staining in Caco-2 cells after 2h incubation with TB (A), NP200 (10 mg.mL<sup>-1</sup>) (C), NP30 (10 mg.mL<sup>-1</sup>) (E) and Cyt B (20 μg.mL<sup>-1</sup>) (G) and 22h after the end of the treatment (B, D, F and H) . Representative image of 3 independent cultures.



## DISCUSSION

Silica NPs were physically stable in TB after 2h incubation. This stability conferred by the negative surface charge of silica nanoparticles in TB allowed considering the size effect of NPs during the *in vitro* experiments. The high polydispersity index of the additive E551 suggests a wide size distribution of silica particles. The 2h duration corresponds to the mean residence time of components administered by the oral route in the major absorbing segments of the small intestine including jejunum and ileum (Billat *et al.*, 2017). NP30 and NP10 at 10 mg.mL<sup>-1</sup> increased the LY paracellular transport across the Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX cultures after 2h treatment. Silica NPs with sizes comprised between 10 nm and 70 nm induced a TEER drop in both *in vitro* models in a concentration- and size-dependent manner, whereas no effect was observed with NP200. The TEER values in the Caco-2 monolayer were around 2-fold lower with NP30 compared with NP10 and NP70, suggesting a target size in the modulation of the intestinal permeability. Additive E551 induced also a TEER decrease in the Caco-2 monolayer, while no effect was detected with the Caco-2/HT29-MTX model. In addition, the effects of NP30 on the TEER were significantly reduced with the co-culture, presumably due to the mucus layer as compared to the Caco-2 monolayer. This result was in accordance with the cell uptake studies which revealed a tremendous difference in the NP30 internalization between the two *in vitro* models. After 2h exposure at 37°C, 71% and 27% of NP30 added in the donor compartment were detected in the Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX cultures, respectively. When incubation was performed at 4°C, only 4% of NP30 were in contact with the Caco-2 monolayer, demonstrating the intracellular location of the majority of NP30 at 37°C. These results emphasize the protective effect of mucus which reduces the accessibility of epithelial cells for the NP30, thus limiting the TEER drop. This was consistent with the permeability results observed with the additive E551. The large size distribution of the E551 suggests the presence of a few small particles which could affect in the same way the Caco-2 monolayer permeability.

The effect was fully inhibited by the presence of the mucus in the co-culture. No mucus effect was detected with NP200 due to the lack of internalization in epithelial cells. This was consistent with previous findings that showed a low uptake of 150 nm silica NPs in Caco-2 cell-lines and could explain the lack of intestinal modulation with NP200 (Ye *et al.*, 2017).

NPs were incubated with epithelial cells at non-cytotoxic concentrations as demonstrated using two complementary studies. MTT assays revealed that at least 80% of cells were still viable after 2h exposure. Additionally, the low LDH release observed with the Caco-2 monolayer after the NP30-incubation was not concentration-dependent in contrast to the permeability modulation. No LDH release was observed with NP10 whereas a TEER decrease was measured. In the lack of cytotoxic effects, modulation of paracellular permeability is often caused by a dysfunction of tight junctions (TJ) (Lemmer and Hamman, 2013). TJ are composed of transmembrane proteins such as claudins, and occludins and cytoplasmic proteins (ZO-1, ZO-2 and ZO-3). The ZO protein relies the transmembrane proteins to actin cytoskeleton. This multiprotein network limits the intracellular space dimensions which do not exceed 50 Angstroms, preventing the passage of large compounds (Kirby and Linklater, 2016). NPs can affect directly the TJ by modulating the intracellular signal transduction or indirectly by inducing oxidative stress and/or inflammation (Lee, 2015; Rao, 2008).

Li *et al.* showed that gold NPs characterized by a mean diameter of 150 nm modulated the Blood Brain Barrier permeability in mice (C.-H. Li *et al.*, 2015). By inhibiting the PKC $\zeta$  protein kinase isoform, gold NPs reduced the threonine phosphorylation of occludin and ZO-1. Disassembly and degradation of TJ in endothelial cells were then observed. However, TJ protein downregulation was not observed with the same gold NPs in Caco-2 and HCT116 epithelial cells, suggesting a cell-dependent mechanism. This was consistent with our findings which revealed that ZO-1 and Claudin 2 expressions were not significantly affected after treatment with NP30 despite the paracellular permeability increase.



Oxidative stress was detected in both Caco-2 monolayer and co-culture in a concentration-dependent manner after 2h incubation with the additive and all the nanoparticles. These findings were consistent with the work of Christen *et al.* which showed a ROS activity after incubation of silica NPs in human hepatoma cells (Christen *et al.*, 2014). A relationship between the oxidative stress induced by NPs and the TJ dysfunction in the blood-brain barrier was reported (Liu *et al.*, 2017). ROS including superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals may disrupt either directly the ZO-1/occludin complex or indirectly after rearrangement of actin cytoskeleton due to protein modifications by thiol oxidation and tyrosine phosphorylation (Rao, 2008). However, our results showed that the oxidative stress was not correlated with the permeability modulation. ROS activity levels were in the same range for all the tested NPs while, only NP30 followed by NP10 and NP70 induced a significant TEER drop.

Inflammatory response was observed in mono-and co-cultures after some NP treatments. Only NP10 induced the IL-6 release in the two *in vitro* models. Suzuki *et al.* showed that IL 6 increases the paracellular permeability of the intestinal epithelium by regulating the Claudin 2 expression involved in the well-known “pore” pathway of paracellular flux (Suzuki *et al.*, 2011b; Weber, 2012). However, this mechanism does not explain the strong TEER drop induced by the NP30. By contrast, both NP10 and NP30 involved in the intestinal permeability modulations triggered the IL-8 release by epithelial cells in a concentration-dependent manner. No IL-8 was detected with the other sizes of NPs. The interleukin concentrations were two times higher in the Caco-2 monolayer compared with the co-culture, confirming the protective effect of mucus as previously discussed. IL-8 secretion by Caco-2 cell lines was also reported by Tarantini *et al.* after incubation of silica nanoparticle when their size was 20 nm by transmission electron microscopy (TEM) and 53 nm by dynamic light scattering (DLS) (Tarantini *et al.*, 2015). In the same study, no cytokine secretion was observed with silica NPs with a hydrodynamic diameter of 123 nm. IL-8 released from infected human dermal

microvascular endothelial cell lines increased the paracellular transport across the monolayer. IL-8 was responsible for the disorganization of actin structures and the displacement of occludins in the cytoplasm (Talavera *et al.*, 2004). However, in the present study, no modulation of the permeability of the Caco-2 monolayer was observed after addition of recombinant IL-8 (data not shown). This result discards the hypothesis of a direct correlation between the inflammatory response and the intestinal permeability.

Considering that the oxidative stress and the inflammatory response were not directly corroborated with the enhanced permeability of the intestinal barrier, the direct interaction of NP30 on the actin cytoskeleton was investigated using only the Caco-2 cell lines, exhibiting a high TJ expression compared with the HT29-MTX (Kleiveland, 2015). Many findings demonstrated the role of the actin cytoskeleton in the epithelial permeability (Rodgers and Fanning, 2011) as well as the cytoskeleton disruption induced by NP cell uptake (Ispanixtlahuatl-Meráz *et al.*, 2018). The NP30 effects were compared to Cyt B, a fungal toxin well-known to disrupt the actin microfilaments and to increase the epithelial permeability<sup>15</sup>. Interestingly, a permeability drop and a TEER recovery were observed after treatment with Cyt B at 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and NP30 at 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The reversible effect of the cytochalasin D (Cyt D) on the permeability modulation of MDCK monolayers was previously reported by Stevenson *et al.* (Stevenson and Begg, 1994). Disruption of actin microfilaments in Caco-2 cells was observed by confocal microscopy after NP30 and Cyt B treatments while, no effect was observed with NP200. Surprisingly, the expression of ZO-1 assessed by western blotting was not affected by both NP30 and Cyt B despite the paracellular permeability modulation. This finding was confirmed by immunofluorescence studies which showed a continuous labelling of ZO-1 at the cell surface. However, both NP30 in a concentration-dependent manner and Cyt B increased the width of the ZO-1 band compared with the “no treatment” control and the NP200. The band enlarging was not visible anymore 22h after the treatments, corresponding to the time

necessary to the complete TEER recovery. This observation suggests a relaxation of TJ network due to the anchorage loss with the actin cytoskeleton and may explain the intestinal permeability increase. The hypothesis was supported by Van Itallie *et al.* who stated ZO-1 stabilizes the tight junction barrier by coupling to the perijunctional actin (Van Itallie *et al.*, 2009). In addition, Madara *et al.* demonstrated that the filamentous structure condensation in presence of Cyt D induced the widening of spaces between enterocytes and increased the intestinal permeability (Madara *et al.*, 1987, 1986).

## CONCLUSION

In conclusion, silica NPs exposed to *in vitro* models of intestinal barrier induced oxidative stress as well as an inflammatory response for the smallest NPs. A size- and concentration-dependent modulation of the intestinal permeability was observed in presence of NPs in both *in vitro* models. The highest modulation was observed with small NPs, especially NP30. E551 additive also decreased the TEER values in the Caco-2 monolayer. The large size distribution of the food additive suggests the presence of a small NP ratio which could affect the intestinal permeability. By limiting the cell internalization of small silica NPs, mucus reduced even prevented in the case of the E551, the TEER drop in the co-culture. In addition, pro-inflammatory cytokine secretion and oxidative stress were also lower in the co-culture. Thus, the protective role of mucus has to take into account for a relevant estimation of the oral nanotoxicity. TEER recovery was obtained within 22h following the treatment, suggesting a reversible effect of NPs. The increase of the intestinal permeability by the NPs was explained by the disruption of the actin cytoskeleton, altering the ZO-actin binding involved in the stability of TJ network. This hypothesis was supported by the enlarging of ZO-1 bands, suggesting the dilatation of spaces between epithelial cells as well as by the concomitant recovery of actin filaments and TEER values. In addition, no modification of Claudin 2 and

ZO-1 expressions was observed, discarding the hypothesis of a TJ dysregulation. This work emphasizes the potential risk of small silica NPs administered by the oral route. It demonstrates that the toxicity of the E551 is clearly dependent of the nanoparticle/microparticle ratio that can vary according to the batch and the manufacturer.

## **EXPERIMENTAL SECTION**

### **Chemicals and reagents**

Silica NPs (plain sicastar®) were purchased from Micromod Partikeltechnologie GmbH (Rostock, Germany). Caco-2 cells were provided from the American Type Culture Collection (ATCC) at passage 47 and HT29-MTX cell line were kindly provided by Dr. Thécla Lesuffleur from INSERM UMR S 938 in Paris, France, at passage 13. All the cell culture reagents were purchased from Fisher Scientific (Illkirch, France). Other chemicals used in our experiments were from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany), unless stated otherwise. A transport buffer (TB) consisting in 25 mM D-(+)-glucose, 10 mM HEPES in Hank's Balanced Salt Solution with Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> pH 7.4 was used for all experiments.

### **Physicochemical characterization of silica nanoparticles**

Size and zeta potential of silica nanoparticles were characterized using a ZetaSizer Nano-ZS90 (Malvern). Average hydrodynamic diameters and PDI were determined by dynamic light scattering at 25°C after dilutions in TB. Zeta potential measurements were performed by laser Doppler electrophoresis at 25°C at a final concentration of 1 mg.mL<sup>-1</sup>.

### **Physical stability of silica NPs in culture medium**

The physical stability of NPs was assessed at 37°C in TB. NP suspensions at a concentration of 1 mg.mL<sup>-1</sup> were prepared. Hydrodynamic diameters, PDI and zeta potential were measured before and after 2h incubation.

### **Caco-2/HT29-MTX co-culture in Transwell®**

Caco-2 and HT29-MTX cells were cultivated in 25 cm<sup>2</sup> flasks during 2 passages after thawing in Dulbecco's Modified Eagle Medium Gluta-Max containing 15% fetal bovine serum, 1% non-essential amino-acids and 100 µg.mL<sup>-1</sup> streptomycin/100 UI.mL<sup>-1</sup> penicillin. Cells were then cultured in Transwell®-24 well 0.33 cm<sup>2</sup> permeable support with a polycarbonate membrane. Caco-2 were seeded at day 0 at 5 000 cells per insert and HT29-MTX were seeded at day 5 at 10 000 cells per insert. The Transwell® supports were used at day 21.

### **Cytotoxic assay**

#### *MTT assay*

The evaluation of the cell viability was assessed using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method. Cell cultures in Transwell® support were incubated with NPs at 1 and 10 mg.mL<sup>-1</sup> for 2h. Cells were washed twice with PBS and incubated with MTT (0.5 mg.mL<sup>-1</sup>) for 2h at 37 °C. The formazan crystals were then dissolved in DMSO. The supernatants were transferred in a 96-well plate and the absorbance was measured at 570 nm with a microplate reader (Synergy HT BioTek).

#### *LDH assay*

The cytotoxicity of silica NPs was also determined using the Pierce LDH cytotoxicity assay kit (ThermoScientific). Briefly, cells in Transwell® support were incubated 2h with silica NPs and the apical and basolateral media were collected. Fifty microliters of substrate LDH mixture

were added to 50  $\mu\text{L}$  medium and incubated 30 min at room temperature. The absorbance was measured at 490 nm and 680 nm with a microplate reader (Synergy HT BioTek). The percentage of cytotoxicity was calculated by relating the LDH activity generated by cells treated with NPs and the maximum LDH activity. To determine the maximum of LDH activity, lysis buffer was previously added in wells without any treatment during 45 min.

## Permeability studies

### *Transepithelial electrical resistance (TEER)*

TEER measurement was carried out before and after 2h incubation with NPs using the Millicell Electrical Resistance System (Millipore). For TEER recovery monitoring, cells were washed twice with PBS after 2h incubation and TB containing NPs or Cyt B ( $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) were replaced by fresh complete medium culture. The TEER was then monitored for 22h at different time points.

### *Paracellular permeability*

After incubation of the Caco-2 monolayer and the co-culture with NPs, LY was added at a concentration of  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  in the apical compartment. After 2h incubation, the LY concentration in the acceptor compartment was then assessed by fluorescence.  $\lambda_{\text{excitation}}$  and  $\lambda_{\text{emission}}$  were 405 nm and 535 nm, respectively. The apparent permeability of LY was then

calculated according to the following Equation (1):  $P_{app} = \frac{dQ}{A \times C_0 \times dt}$  (1)

$dQ/dt$  is the flux with  $Q$ , the amount of molecules transported over time  $t$  of the incubation,  $A$  is the surface area of the polycarbonate membrane ( $0.33 \text{ cm}^2$ ), and  $C_0$  is the initial concentration in the donor compartment.

### **Uptake of silica NPs**

Cells in Transwell® insert were incubated 2h at 37 °C or 4 °C with fluorescent silica NPs at 1 mg.mL<sup>-1</sup>. Caco-2 cells were washed three times with PBS and then lysed with NaOH 0.1N. Samples were transferred in black 96-well plate. Fluorescence was immediately measured using a microplate reader.  $\lambda_{excitation}$  and  $\lambda_{emission}$  were 569 nm and 585 nm, respectively. The percentage of NPs uptake was determined in relation to a standard curve prepared by successive dilutions of fluorescent NPs.

### **ROS production**

The ROS production was assessed using the ROS-Glo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> assay kit (Promega). In brief, cells were incubated 2h with NPs or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Reagent in the apical compartment. The supernatant was collected and incubated for 20 min at room temperature with ROS-Glo detection solution. The relative luminescence was then recorded.

### **Cytokine production**

The levels of interleukin IL-6 and IL-8 were assessed in pooled apical and basolateral supernatants. IL-6 human ELISA high sensitivity kit and IL-8 human ELISA kit (Life Technologies-ThermoFisher) were used according to the manufacturer's instruction. Protein concentrations were determined by Micro BCA Protein Assay (ThermoScientific).

### **Western blotting**

For western blotting analysis, Caco-2 were incubated with NPs during 2h, washed three times with PBS, and then lysed on ice in RIPA lysis buffer. Lysed samples were centrifuged at 20 000g at 4°C for 15 min. Proteins were quantified by Micro BCA assay, separated on a 12.5% polyacrylamide gel and transferred on a PVDF membrane. Membranes were blocked in 5%

nonfat milk in TBS-Tween 0.1% during 1h, and then incubated with primary antibodies (1:1000 for ZO-1 (Abcam ab216880) and 1:1000 Claudin 2 (Abcam ab53032)) overnight at 4°C. This was followed by a 1h-incubation with secondary antibodies HRP goat anti Rabbit (1:1000) (BD Biosciences 554021). Blots were washed three times in PBS-Tween 0.1% after the incubations with primary and secondary antibodies. Bands were detected using Clarity™ Western ECL and quantified with Image Lab software (BioRad).

## **Fluorescent staining**

### *Immunostaining of ZO-1*

After 2h incubation with NPs, Caco-2 cells in Transwell® support were washed twice with PBS and then fixed with cold methanol during 5 min. Blocking buffer containing 1% BSA and 22.5 mg.mL<sup>-1</sup> glycine in PBS-Tween 0.1% was added to Caco-2 cells during 30 minutes. ZO-1 protein was labelled with Rabbit anti-ZO1 tight junction protein antibody (Abcam ab216880) at 5 µg.mL<sup>-1</sup> during 1 h at room temperature in humid chamber. Cells were washed three times with PBS-Tween 0.1%. This was followed by a 1h incubation with the secondary antibody goat anti-rabbit IgG H&L (Alexafluor 488) (Abcam ab150077). Caco-2 cells were washed three times with PBS-Tween 0.1%. The membrane of Transwell® inserts was removed and sealed using DAKO fluorescent mounting medium. Slides were analyzed with a confocal microscope Zeiss LSM 800 AiryScan (DImaCell platform, Besançon).

### *Staining of actin*

Caco-2 cells were seeded in chamber-slide at 12 000 cells per well. After 2h incubation with TB, NP200, NP30 at 10 mg.mL<sup>-1</sup>, Cyt B at 20 µg.mL<sup>-1</sup> or 22h after recovery, Caco-2 cells were washed twice with PBS and then fixed with 3.7% PFA during 15 min at room temperature. Cells were first permeabilized with 1% Triton X-100 during 10 min under gentle agitation. Actin was labelled with 150 nM Acti-stain 488 phalloidin (Cytoskeleton, Inc. PHDG1-A) for



45 min at room temperature in humid chamber. Cells were washed twice with PBS. This was followed by a 1 min-incubation with DAPI. Caco-2 cells were washed twice with PBS. The chamber-slide were sealed using DAKO fluorescent mounting medium. Slides were analyzed with a confocal microscope Zeiss LSM 800 AiryScan (DImaCell platform, Besançon).

### **Statistics**

All data are means  $\pm$  SEM. Comparisons between the experimental groups and control were performed by one-way ANOVA analysis and the Holm Sidak test (Sigmastat software). A difference was considered significant at  $p \leq 0.05$ .

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

Raphaël Cornu is supported by a fellowship from the “Communauté d’Agglomération du Grand Besançon (CAGB)”. We thank DImaCell microscopy facilities, especially M. Tissot for her technical assistance (Plateforme DImaCell, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France). The authors thank FHU InCREASE for the Oral Communication Award and the financial support.

### **Disclosure of interest**

The authors report no conflict of interest.

### **REFERENCES**

Athinarayanan, J., V. S. Periasamy, M. A. Alsaif, A. A. Al-Warthan, and A. A. Alshatwi. 2014. “Presence of nanosilica (E551) in commercial food products: TNF-mediated oxidative stress and altered cell cycle progression in human lung fibroblast cells.” *Cell Biology and Toxicology*, 30(2), 89–100. doi: 10.1007/s10565-014-9271-8

- Barahona, F., I. Ojea-Jimenez, O. Geiss, D. Gilliland, and J. Barrero-Moreno. 2016. "Multimethod approach for the detection and characterisation of food-grade synthetic amorphous silica nanoparticles." *Journal of Chromatography A*, 1432, 92–100. doi: 10.1016/j.chroma.2015.12.058
- Béduneau, A., C. Tempesta, S. Fimbel, Y. Pellequer, V. Jannin, F. Demarne, A. Lamprecht. 2014. « A tunable Caco-2/HT29-MTX co-culture model mimicking variable permeabilities of the human intestine obtained by an original seeding procedure." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 87(2), 290-298. 10.1016/j.ejpb.2014.03.017
- Billat, P.-A., E. Roger, S. Faure, and F. Lagarce. 2017. "Models for drug absorption from the small intestine: where are we and where are we going?" *Drug Discovery Today*, 22(5), 761–775. doi: 10.1016/j.drudis.2017.01.007
- Brown, S. S., and J.A. Spudich. 1981. "Mechanism of action of cytochalasin: evidence that it binds to actin filament ends." *The Journal of Cell Biology*, 88(3), 487–491. doi: 10.1083/jcb.88.3.487
- Brun, E., F. Barreau, G. Veronesi, B. Fayard, S. Sorieul, C. Chanéac, C. Carapito, T. Rabilloud, A. Mabondzo, N. Herlin-Boime, and M. Carrière. 2014. "Titanium dioxide nanoparticle impact and translocation through ex vivo, in vivo and in vitro gut epithelia." *Particle and Fibre Toxicology*, 11(1), 13. doi: 10.1186/1743-8977-11-13
- Christen, V., M. Camenzind, and K. Fent. 2014. "Silica nanoparticles induce endoplasmic reticulum stress response, oxidative stress and activate the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway." *Toxicology Reports*, 1, 1143–1151. doi: 10.1016/j.toxrep.2014.10.023
- EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), M. Younes, P. Aggett, F. Aguilar, R. Crebelli, B. Dusemund, M. Filipic, M. J. Frutos, P. Galtier, D. Gott, U. Gundert-Remy, G. G. Kuhnle, J.-C. Leblanc, I. T. Lillegaard, P. Moldeus, A. Mortensen, A. Oskarsson, I. Stankovic, I. Waalkens-Berendsen, R. A. Woutersen, M. Wright, P. Boon, D. Chrysafidis, R. Gürtler, P. Mosesso, D. Parent-Massin, P. Tobback, N. Kovalkovicova, A. M. Rincon, A. Tard, and C. Lambré. 2018. "Re-evaluation of silicon dioxide (E 551) as a food additive." *EFSA Journal*, 16(1). doi: 10.2903/j.efsa.2018.5088
- He, X., H. Deng, and H. Hwang. 2019. "The current application of nanotechnology in food and agriculture." *Journal of Food and Drug Analysis*, 27(1), 1–21. doi: 10.1016/j.jfda.2018.12.002
- Ispanixtlahuatl-Meráz, O., R. P. F. Schins, and Y. I. Chirino. 2018. "Cell type specific cytoskeleton disruption induced by engineered nanoparticles." *Environmental Science: Nano*, 5(2), 228–245. doi: 10.1039/C7EN00704C
- Jackson, T. C., B. O. Patani, and M. B. Israel. 2017. « Nanomaterials and Cell Interactions: A Review." *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 08(04), 220–228. doi: 10.4236/jbmb.2017.84015
- Kirby, R., and A. K. J. Linklater. 2016. *Monitoring and intervention for the critically ill small animal: the rule of 20*. Ames, Iowa: Wiley Blackwell.
- Kleiveland, C. R. 2015. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Cham: Springer International Publishing

- Lee, S. H. 2015. "Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases." *Intestinal Research*, 13(1), 11–18. doi: 10.5217/ir.2015.13.1.11
- Lemmer, H. J. R., and J. H. Hamman. 2013. "Paracellular drug absorption enhancement through tight junction modulation." *Expert Opinion on Drug Delivery*, 10(1), 103–114. doi: 10.1517/17425247.2013.745509
- Li, C.-H., M.-K. Shyu, C. Jhan, Y.-W. Cheng, C.-H. Tsai, C.-W. Liu, C.-C. Lee, R.-M. Chen, and J.-J. Kang. 2015. "Gold Nanoparticles Increase Endothelial Paracellular Permeability by Altering Components of Endothelial Tight Junctions, and Increase Blood-Brain Barrier Permeability in Mice." *Toxicological Sciences*, 148(1), 192–203. doi: 10.1093/toxsci/kfv176
- Liu, X., B. Sui, and J. Sun. 2017. "Blood-brain barrier dysfunction induced by silica NPs in vitro and in vivo: Involvement of oxidative stress and Rho-kinase/JNK signaling pathways." *Biomaterials*, 121, 64–82. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.01.006
- Ma, T. Y., N.-T. Hoa, D. D. Tran, V. Bui, A. Pedram, S. Mills, and M. Merryfield. 2000. "Cytochalasin B modulation of Caco-2 tight junction barrier: role of myosin light chain kinase." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 279(5), G875–G885. doi: 10.1152/ajpgi.2000.279.5.G875
- Madara, J. L., D. Barenberg, and S. Carlson. 1986. "Effects of cytochalasin D on occluding junctions of intestinal absorptive cells: further evidence that the cytoskeleton may influence paracellular permeability and junctional charge selectivity." *The Journal of Cell Biology*, 102(6), 2125–2136. doi: 10.1083/jcb.102.6.2125
- Madara, J. L., R. Moore and S. Carlson. 1987. "Alteration of intestinal tight junction structure and permeability by cytoskeletal contraction." *The American Journal of Physiology*, 253(6 Pt 1), C854-861. doi: 10.1152/ajpcell.1987.253.6.C854
- Pedata, P., G. Ricci, L. Malorni, A. Venezia, M. Cammarota, M. G. Volpe, N. Iannaccone, V. Guida, C. Schiraldi, M. Romano and G. Iacomino. 2019. "In vitro intestinal epithelium responses to titanium dioxide nanoparticles." *Food Research International*, 119, 634–642. doi: 10.1016/j.foodres.2018.10.041
- Pradhan, N., S. Singh, N. Ojha, A. Shrivastava, A. Barla, V. Rai, and S. Bose. 2015. "Facets of Nanotechnology as Seen in Food Processing, Packaging, and Preservation Industry." *BioMed Research International*, 2015, 1–17. doi: 10.1155/2015/365672
- Rao, R. 2008. "Oxidative Stress-Induced Disruption of Epithelial and Endothelial Tight Junctions." *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 13, 7210–7226.
- Rodgers, L. S., and A. S. Fanning. 2011. "Regulation of epithelial permeability by the actin cytoskeleton." *Cytoskeleton*, 68(12), 653–660. doi: 10.1002/cm.20547
- Sahu, S. C., and A. W. Hayes. 2017. "Toxicity of nanomaterials found in human environment: A literature review." *Toxicology Research and Application*, 1, 239784731772635. doi: 10.1177/2397847317726352
- Stevenson, B. R., and D. A. Begg. 1994. "Concentration-dependent effects of cytochalasin D on tight junctions and actin filaments in MDCK epithelial cells." *Journal of Cell Science*, 107 (Pt 3), 367–375.

Suzuki, T., N. Yoshinaga, and S. Tanabe. 2011. “Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium.” *The Journal of Biological Chemistry*, 286(36), 31263–31271. doi: 10.1074/jbc.M111.238147

Talavera, D., A. M. Castillo, M. C. Dominguez, A. E. Gutierrez, and I. Meza. 2004. « IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers.” *The Journal of General Virology*, 85(Pt 7), 1801–1813. doi: 10.1099/vir.0.19652-0

Tarantini, A., R. Lancelur, A. Mourot, M.-T. Lavault, G. Casterou, G. Jarry, K. Hogeveen and V. Fessard. 2015. “Toxicity, genotoxicity and proinflammatory effects of amorphous nanosilica in the human intestinal Caco-2 cell line.” *Toxicology in Vitro*, 29(2), 398–407. doi: 10.1016/j.tiv.2014.10.023

Van Itallie, C. M., A. S. Fanning, A. Bridges, and J. M. Anderson. 2009. “ZO-1 stabilizes the tight junction solute barrier through coupling to the perijunctional cytoskeleton.” *Molecular Biology of the Cell*, 20(17), 3930–3940. doi: 10.1091/mbc.e09-04-0320

Vancamelbeke, M., and S. Vermeire. 2017. “The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease.” *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 11(9), 821–834. doi: 10.1080/17474124.2017.1343143

Weber, C. R. 2012. “Dynamic properties of the tight junction barrier: Dynamic properties of the tight junction barrier.” *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1257(1), 77–84. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06528.x

Ye, D., M. Bramini, D. R. Hristov, S. Wan, A. Salvati, C. Åberg, and K. A. Dawson. 2017. “Low uptake of silica nanoparticles in Caco-2 intestinal epithelial barriers.” *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 8, 1396–1406. doi: 10.3762/bjnano.8.141

Zhou, Y., G. Quan, Q. Wu, X. Zhang, B. Niu, B. Wu, Y. Huang, X. Pan, and C. Wu. 2018. “Mesoporous silica nanoparticles for drug and gene delivery.” *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8(2), 165–177. doi: 10.1016/j.apsb.2018.01.007



# **DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES**

---



L'utilisation des NPs est en progression exponentielle et tous les secteurs industriels ou presque sont concernés. En raison de leur taille nanométrique, les NPs possèdent des propriétés physico-chimiques uniques qui diffèrent totalement des matériaux conventionnels et qui font tout leur attrait. Cependant, ces caractéristiques particulières soulèvent de nombreuses questions car les nanomatériaux pourraient davantage interagir avec l'environnement biologique, être plus toxiques ou passer plus facilement les barrières physiologiques. Ainsi, les risques posés par ces nouveaux systèmes doivent être identifiés. Ce travail de thèse combine des approches classiques de biologie cellulaire (test de viabilité cellulaire, activité enzymatique et dosages ELISA) et des modèles cellulaires adaptés afin d'étudier la toxicité des NPs, isoler certains facteurs pouvant être associés à la nanotoxicité et comprendre les mécanismes impliqués. Le travail est divisé en deux parties, la première s'intéressant aux effets sur la fonction hépatique des NPs de PLGA et de silice et la seconde, se focalisant sur les effets sur la barrière intestinale des NPs de silice. Les NPs de PLGA sont principalement employées comme vecteurs pharmaceutiques et les NPs de silice ont une utilisation majoritairement orientée vers l'industrie pharmaceutique et agroalimentaire.

## **I. TOXICITE HEPATIQUE**

### **1. Méthodologie**

Les caractéristiques physico-chimiques (taille, charge de surface, composition) des NPs sont des facteurs de toxicité extrêmement importants. Les NPs de PLGA et la silice ont été choisies dans cette étude pour plusieurs raisons. Du fait des propriétés biocompatibles du polymère PLGA, l'évaluation de la toxicité des NPs de PLGA permettra de mieux appréhender l'effet de la forme nanoparticulaire et des caractéristiques physico-chimiques. Au regard de la littérature, les NPs inorganiques sont généralement plus toxiques que les organiques. La comparaison des deux types de NPs mettra en avant l'influence de la composition sur la nanotoxicité.

Dans le cadre des études de nanotoxicité, le choix des concentrations ou doses ainsi que les durées d'incubation ou de traitement sont également deux facteurs à ne pas négliger.

Pour notre première étude concernant l'hépatotoxicité des NPs, nous avons choisi d'exposer les cellules à des concentrations croissantes de NPs comprises entre 0,1 et 1 mg/mL.



Ces valeurs correspondent à celles fréquemment utilisées dans les études *in vitro* décrites dans la littérature (Almutary *et al.*, 2017 ; Haji Mansor *et al.*, 2018 ; Xiong *et al.*, 2013). La dose de 5 mg administrée aux animaux dans cette même étude correspond également aux valeurs indiquées dans de nombreuses études *in vivo* (Householder *et al.*, 2015 ; Tiwari *et al.*, 2011 ; Xu *et al.*, 2019). Les concentrations utilisées pour les NPs de PEI ont été divisées par un facteur 10 en raison de la toxicité parfaitement connue du PEI et qui a été confirmée dans les études préliminaires que nous avons réalisées (Andronescu and Grumezescu, 2017 ; Florea *et al.*, 2002). Le potentiel Zeta positif des NPs recouvertes de PEI promeut les interactions avec les charges négatives de la membrane cellulaire et facilite par conséquent leur internalisation (Pillai *et al.*, 2015).

Selon les recommandations de l'Agence européenne des médicaments (EMA), pour mener des études d'interactions médicamenteuses et de mesure d'activité enzymatique des CYP-dépendante, les hépatocytes humains en culture, frais ou après cryopréservation sont considérés comme le modèle de référence dans les études *in vitro*. Ils possèdent des fonctions et un phénotype très similaires à ceux de leurs homologues *in vivo*. Par ailleurs, les incubations doivent être effectuées avec l'addition quotidienne du xénobiotique à tester et ce, pendant trois jours (European Medicines Agency, 2012). Nous avons donc choisi de travailler avec des cultures primaires d'hépatocytes, en particulier humains, en renouvelant le traitement toutes les 24h pendant 72h.

## 2. Résultats

L'EMA recommande d'étudier en particulier trois isoformes de CYP, les CYP1A2, 2B6 et 3A4, dans les études de toxicologie (European Medicines Agency, 2012). Ils représentent à eux seuls plus de 50% des cytochromes P450 exprimés au niveau du foie humain et sont impliqués dans le métabolisme de plus de la moitié des médicaments. Le CYP3A4 est l'isoforme la plus exprimée et la plus impliquée dans le métabolisme des xénobiotiques. Le CYP2B6, plus minoritaire, présente néanmoins un intérêt tout particulier en toxicologie car il métabolise en plus de certaines molécules pharmaceutiques, des composés présents dans notre environnement. Le CYP1A2 est particulièrement intéressant car il catalyse un très grand nombre de substrats ; il est d'ailleurs impliqué dans le métabolisme de plusieurs grandes classes de molécules à visée thérapeutique. L'induction du CYP1A2 passe par le récepteur Ah, contrairement aux CYP2B6 et 3A4 qui passent par les récepteurs PXR et CAR (Zanger and Schwab, 2013).

D'après nos résultats, la toxicité des NPs de PLGA au niveau hépatique se traduit principalement par une modification de l'activité de ces CYPs. Cette modulation est due aux propriétés physico-chimiques des NPs et notamment leur composition (organique vs inorganique). Au regard des résultats obtenus sur l'activité du CYP3A chez l'Homme, la taille des NPs semble également être un facteur influençant la toxicité, les NPs les plus larges modulant davantage l'activité du CYP. Nos résultats soulèvent également l'importance du phénomène d'opsonisation car les NPs de PLGA recouvertes de protéines modulent l'activité de tous les CYP étudiés. Par ailleurs, nous avons également mis en avant des différences significatives dans la modulation de l'activité des CYP en fonction de l'isoforme et de l'espèce considérées. Les NPs de PLGA sont principalement destinées à transporter des substances actives. Il est donc important de prendre en considération, l'impact de la NP vide car, si à elle seule, elle induit une modification de l'activité des enzymes de détoxification, elle pourrait aussi modifier le métabolisme de la substance qu'elle transporte avec les effets potentiellement dangereux pour la santé de l'individu traité que cela implique.

De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont par ailleurs montré que ces isoformes de CYPs peuvent être modulées par des NPs. Cependant, les mécanismes impliqués dans la modulation de l'activité des CYP sont relativement peu connus et décrits. Quelques hypothèses ont été apportées parmi lesquelles la perturbation du transfert des électrons impliqués dans les réactions d'oxydation du CYP (Lamb *et al.*, 2010), la modification de la structure des CYP par fixation des NPs sur des sites autres que le site catalytique de l'enzyme entraînant une modification de son activité (Fröhlich *et al.*, 2010), un mécanisme d'inhibition compétitive dans lequel une NP se fixerait sur le site catalytique de l'enzyme (Fröhlich *et al.*, 2010 ; Lamb *et al.*, 2010), ou la modulation de l'activité du CYP *via* l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Tang *et al.*, 2018).

### 3. Perspectives

Le foie est un tissu complexe au sein duquel les hépatocytes interagissent avec de nombreux types cellulaires. En fonction de leur taille, les NPs éliminées par la voie hépatobiliaire peuvent être prises en charge par les hépatocytes ou les cellules Kupffer. Les hépatocytes prennent notamment en charge les petites NPs capables de pénétrer dans l'espace de Disse ou les NPs furtives qui ont échappé à la reconnaissance du système réticulo-endothélial. Les cellules de Kupffer possèdent un taux d'internalisation des NPs bien supérieur à celui des hépatocytes et sont fortement impliquées dans le mécanisme d'élimination des NPs

administrées par voie systémique (Park *et al.*, 2016). Cependant, elles ne sont pas impliquées directement dans la fonction de détoxification du foie mais pourraient l'altérer de façon indirecte en induisant une réponse immunitaire locale. Il serait donc intéressant de déterminer si la réponse métabolique des hépatocytes est identique en présence de cellules de Kupffer. Une coculture hépatocytes/cellules de Kupffer pourrait ainsi apporter des réponses quant à l'impact des cytokines et des médiateurs pro- et anti-inflammatoires sécrétés par les macrophages hépatiques sur l'activité des hépatocytes.

Le devenir des NPs au sein de la cellule à travers l'étude des mécanismes cellulaires d'élimination est mal connu : étudier les mécanismes d'efflux impliqués dans l'excrétion des NPs au niveau de l'hépatocyte pourrait s'avérer intéressant. En utilisant des marqueurs fluorescents et des inhibiteurs spécifiques des protéines de transport, nous serions en capacité de déterminer les transporteurs nécessaires à l'efflux des NPs et si ceux-ci diffèrent en fonction des propriétés physico-chimiques des NPs. Répondre à ces questions nous permettrait de déterminer en partie le potentiel de bioaccumulation des NPs.

Malgré les inconvénients et les questions éthiques que soulève l'expérimentation animale, une approche *in vivo* permet notamment d'être davantage en adéquation avec les durées et les voies réelles d'exposition de la population aux NPs, d'intégrer l'ensemble du métabolisme, peut faciliter l'évaluation des effets des xénobiotiques sur plusieurs organes à la fois mais aussi les interactions entre organes, et est plus proche de la clinique.

Les rongeurs de laboratoire sont largement utilisés dans les études de toxicité. Cependant, les études *in vivo* posent de nombreux problèmes relatifs à l'éthique, sont plus coûteuses que les études *in vitro* et les résultats obtenus doivent être extrapolés à l'Homme. Or, sur une vaste base de données de plus de 3 000 médicaments contenant des données à la fois sur l'animal et sur l'Homme, il a été montré que l'absence de toxicité chez les animaux ne prouve pas de façon irréfutable une innocuité chez l'Homme. Ces différences inter-espèces sont d'autant plus importantes sur certaines classes de médicaments (Bailey *et al.*, 2015).

Ces différents problèmes conduisent les toxicologues à développer des modèles *in vitro* complémentaires à l'expérimentation animale. Khetani *et al.* ont montré qu'un modèle dans lequel des hépatocytes sont mis en culture avec des cellules stromales fournit une meilleure modélisation de l'expression des gènes du métabolisme et de l'action des médicaments que dans les cultures cellulaires conventionnelles (Khetani and Bhatia, 2008). Un autre modèle de

coculture prometteur est celui combinant des hépatocytes et des cellules de Kupffer cultivées sous forme de sphéroïdes (Messner *et al.*, 2013). Malgré des coûts et des contraintes techniques plus importants imposés par ces modèles plus complexes, leur utilisation devrait permettre d'apporter davantage de données relatives aux mécanismes de toxicité et aider à prédire avec plus de précision et de certitude, la toxicité des NPs et des autres xénobiotiques chez l'Homme. Khetani *et al.* ont par exemple montré que l'utilisation de modèles de co-culture hépatocytes/cellules stromales dont le phénotype est stable pendant plusieurs semaines permettait de mieux prédire l'atteinte hépatique de 35 molécules comparés aux cultures à court-terme d'hépatocytes (Khetani *et al.*, 2013).

## II. TOXICITE INTESTINALE

### 1. Méthodologie

Concernant la seconde étude, les concentrations en NPs de silice choisies sont en accord avec les données de la littérature. Nous avons choisi d'exposer pendant 2h les entérocytes aux NPs, durée qui correspond approximativement au temps de transit chez l'Homme (Billat *et al.*, 2017)

Le premier modèle cellulaire de barrière intestinale que nous avons utilisé est le modèle Caco-2. Ce modèle est défini comme le *gold standard* pour les études prédictives de perméabilité et de transport de molécules à travers l'épithélium intestinal. Initialement utilisé en pharmacologie pour étudier le transport de molécules à travers l'épithélium intestinal, cette lignée cellulaire est également utilisée en toxicologie pour étudier l'impact des NPs sur la paroi intestinale (Koeneman *et al.*, 2010 ; Tarantini *et al.*, 2015 ; van Breemen and Li, 2005 ; Wang *et al.*, 2000).

Après environ trois semaines de culture, les cellules sont complètement différenciées, polarisées, les jonctions cellulaires assurant l'intégrité de l'épithélium sont parfaitement établies. Ainsi ce modèle monocellulaire représentatif d'un épithélium composé d'entérocytes est le plus simple. Cependant, il présente certaines limites telles que l'absence de sécrétion de mucus, une trop forte densité de jonctions serrées et une expression trop importante de la P-gp (Béduneau *et al.*, 2014). Ces facteurs peuvent induire une sous-estimation de la perméabilité. Afin de pallier les lacunes de ce premier modèle, nous avons également choisi d'utiliser un second modèle associant des cellules HT29-MTX sécrétrices de mucus aux cellules Caco-2. Les cellules HT29-MTX sont capables de sécréter du mucus, sont dépourvues de P-gp et expriment faiblement les jonctions serrées (Hilgendorf *et al.*, 2000). Ainsi, ce modèle de coculture présente après différenciation des cellules des caractéristiques plus proches de celles identifiées *in vivo* et notamment la présence d'une couche de mucus à la surface des cellules ainsi qu'une densité de jonctions serrées et une expression de la P-gp plus modérée. Les cellules expriment plus faiblement les jonctions cellulaires, ceci explique pourquoi l'épithélium de la coculture est moins jointif et présente donc un TEER plus faible que celui de la monocouche de cellules Caco-2. Par ailleurs, le ratio entre le nombre de cellules Caco-2 et HT29-MTX lors de l'ensemencement ainsi que le délai entre l'ensemencement du premier type cellulaire par rapport au second sont deux facteurs déterminant les propriétés de la barrière intestinale *in vitro*.

## 2. Résultats

Après exposition aux NPs, la perméabilité de la coculture est augmentée mais de façon moins conséquente que dans le modèle Caco-2. L'hypothèse la plus probable expliquant cette différence est la présence de mucus dans le modèle de coculture. En fonction des caractéristiques des NPs et plus particulièrement de leur charge et de leur taille, celles-ci peuvent interagir avec la couche de mucus et s'y adsorber limitant drastiquement les interactions avec l'épithélium (Mercier-Bonin *et al.*, 2016 ; Ponchel and Irache, 1998). L'effet des NPs dans le modèle de coculture n'est cependant pas totalement inhibé par le mucus. En effet, les plus petites NPs impactent significativement la perméabilité. Ceci peut s'expliquer par le fait que la rhéologie et la composition du mucus favorisent la rétention des agrégats et des plus grosses particules notamment laissant seulement les plus petites particules interagir avec l'épithélium.

En plus de modifier la perméabilité de la barrière intestinale, la consommation prolongée de particules minérales pourrait altérer les fonctions d'absorption de l'intestin. Les données obtenues après exposition d'entérocytes à des NPs de SiO<sub>2</sub> de 30 nm attestent d'une modification significative de l'absorption de différents minéraux tels que le zinc et le fer (Guo *et al.*, 2018). Les NPs modulent l'expression de différents gènes impliqués dans le transport de ces minéraux. L'absorption de glucose et de lipides est également impactée par les NPs de SiO<sub>2</sub>. L'expression du gène GLUT2 est augmentée significativement après une exposition aiguë (Guo *et al.*, 2018). Mahler *et al.* ont également montré dans un modèle *in vitro* d'épithélium intestinal qu'après exposition à des NPs de polystyrène, l'absorption de fer est réduite (Mahler *et al.*, 2012). L'absorption des lipides ou des sucres pourrait être aussi en partie altérée par la fixation de ces molécules sur les NPs (Monopoli *et al.*, 2012).

Selon les données de l'EFSA, l'exposition journalière au SiO<sub>2</sub> serait estimée entre 0,3 et 0,8 mg par kg et par jour ce qui correspond à une dose d'environ 20 à 50 mg chez un adulte de 60 kg (Becker *et al.*, 2004). En choisissant la dose d'exposition journalière la plus élevée, en considérant que celle-ci se répartit uniformément sur l'ensemble de l'intestin et que la surface des intestins est équivalente à environ 250 m<sup>2</sup> (Helander and Fändriks, 2014), nous pouvons calculer une dose très théorique de 0,2 µg/cm<sup>2</sup> de NPs de silice. En parallèle, les doses que nous avons choisi d'utiliser sont des centaines de fois plus élevées comparées à la dose estimée par l'EFSA. Cependant, en toxicologie, l'utilisation de très fortes doses est une stratégie nécessaire afin d'identifier les doses toxiques et ainsi comparer la toxicité des matériaux sous forme

nanoparticulaire les uns par rapport aux autres. En raison des phénomènes d'agrégation, de sédimentation et d'instabilité physique, les NPs pourraient présenter des effets et des cinétiques de toxicité différents comparés aux toxiques chimiques conventionnels dont la toxicité est intimement liée à la concentration ou la dose d'exposition.

La dose d'exposition choisie pour les NPs de silice pourrait correspondre à une exposition aiguë après consommation d'un produit contenant une forte proportion d'additif. Elle pourrait aussi correspondre à celle constatée après une phase d'accumulation dans le tissu. En effet, l'exposition aux additifs alimentaires sous forme nanoparticulaire se fait quotidiennement tout au long de notre vie et il a été montré qu'ils peuvent localement s'accumuler. La quantité de TiO<sub>2</sub> et de silicate d'aluminium mesurée dans les plaques de Peyer augmente avec l'âge des individus (Hummel *et al.*, 2014).

Les NPs de silice ont été incubées avec les cellules Caco-2 dans un tampon ne contenant pas de sérum afin de ne pas déstabiliser les NPs et de pouvoir déterminer de façon plus précise, l'influence du facteur taille sur la barrière intestinale. Lors du passage au travers de la barrière, il est probable que les NPs de silice soient recouvertes de macromolécules biologiques (Monopoli *et al.*, 2012). De plus, afin de mimer au mieux les conditions *in vivo*, il pourrait être envisagé d'exposer les entérocytes à des NPs, en suspension dans des fluides intestinaux simulés (FaSSIF/FeSSIF). Ces étapes pourraient sensiblement modifier les propriétés physico-chimiques des NPs et les interactions avec l'épithélium intestinal (Peters *et al.*, 2012 ; Sakai-Kato *et al.*, 2014).

La structure et le fonctionnement de la barrière intestinale semblent suffisamment complexes pour affirmer que l'Homme est plutôt bien armé face aux xénobiotiques. Le mucus et les entérocytes forment deux lignes de défense physiques, le mucus qui assure également une protection bactériologique, et le tissu lymphoïde sous-jacent, qui assure une protection immunitaire complète grâce aux cytokines et à la présence de cellules immunitaires. Cependant, un certain nombre d'études ainsi que nos résultats ont montré que les NPs peuvent impacter de façon significative la barrière intestinale. Aux doses testées, les NPs de silice n'altèrent pas de façon importante la viabilité cellulaire dans les deux modèles *in vitro* Caco-2 et Caco-2/HT29-MTX. Toutefois, elles modulent les marqueurs de stress oxydant et la réponse inflammatoire. La toxicité des NPs pourrait ainsi être qualifiée de modérée. Néanmoins, elles induisent également une augmentation très significative de la perméabilité intestinale. En facilitant l'absorption de molécules potentiellement toxiques ou en modifiant la biodisponibilité des

xénobiotiques, les NPs de silice pourraient induire des risques plus conséquents pour la santé humaine ne permettant plus de qualifier leur toxicité de modérée. Nous avons par ailleurs pu approcher le mécanisme cellulaire responsable de cette modulation de la perméabilité. Il s'agit d'une destruction des filaments d'actine du cytosquelette qui impacte directement la stabilité des jonctions serrées et par conséquent la perméabilité intestinale.

### 3. Perspectives

Afin de compléter ces données, plusieurs points pourraient être étudiés. D'une part, il serait intéressant de déterminer le mécanisme impliqué dans la rupture du cytosquelette des entérocytes suite à l'exposition aux NPs de silice. Est-ce une interaction physique directe entre les NPs et les filaments d'actine ou d'autres acteurs protéiques qui déstabilise le cytosquelette, ou cette rupture a-t-elle un lien avec l'environnement cytokinique ou le stress oxydant ? Certaines études ont mis en évidence des interactions directes entre le système cytosquelettique et les nanomatériaux et ces interactions sont probablement la raison principale du dysfonctionnement cytosquelettique qui en résulte (Dadras *et al.*, 2013 ; Kang *et al.*, 2016). Par exemple, Gheshlaghi *et al.* ont montré que les NP de TiO<sub>2</sub> entraînent des modifications conformationnelles de la tubuline (Gheshlaghi *et al.*, 2008). Cette hypothèse d'interaction physique n'est pas la seule pouvant être évoquée car l'implication du stress oxydant ou des cytokines dans la déstabilisation du cytosquelette a déjà été suggérée dans certaines études (Chelakkot *et al.*, 2018 ; Rao, 2008). Apopa *et al.* a mis en évidence une réorganisation des microtubules induite par les ROS après traitement avec des NPs métalliques (Apopa *et al.*, 2009). Par ailleurs, le TNF active la MLCK dans les cellules épithéliales intestinales pour phosphoryler la MLC et provoquer la contraction des filaments du cytosquelette. Ces événements conduisent à une réorganisation des jonctions serrées, entraînant l'internalisation de l'occludine dans des vésicules de cavéoline (Shen, 2012).

De plus, nous pourrions envisager de nous placer dans un contexte pathologique afin d'évaluer les effets des NPs sur des terrains fragiles, notamment des patients souffrant de MICI. Dans ce cadre, les fonctions du microbiote, du mucus et de l'épithélium sont totalement modifiées par le contexte inflammatoire très important induit par la maladie (Vindigni *et al.*, 2016; Yu, 2018). Des effets cytotoxiques mineurs pourraient être exacerbés chez ces personnes. Il serait ainsi intéressant d'étudier l'impact des NPs dans un modèle de barrière intestinale inflammée ou présentant une perméabilité accrue. Nous pourrions ainsi être en mesure de fournir davantage d'éléments relatifs aux facteurs environnementaux suspectés d'intervenir



dans la physiopathologie des MICI. Beaucoup plus complexes à mettre en œuvre, les études épidémiologiques pourraient néanmoins s'avérer très utiles pour récolter des informations relatives à l'impact des micros et NPs présentes dans l'alimentation.

Enfin, les outils et méthodes développés dans le cadre de ce travail de thèse seront mis à profit pour évaluer la toxicité d'un plus large spectre de NPs organiques ou inorganiques. Les études pourront être étendues à d'autres épithéliums comme la barrière cutanée. Elles pourraient avoir comme objectifs de déterminer la voie de franchissement de la barrière (transcellulaire, paracellulaire ou pilosébacée) des NPs, d'évaluer la profondeur d'atteinte dans les différentes couches de la peau et d'étudier les éventuels effets cytotoxiques, inflammatoires et génotoxiques. Ces études pourraient ainsi contribuer à déterminer des facteurs de toxicité à prendre en considération pour l'élaboration de nouveaux produits cosmétiques par exemple.

L'ensemble des données fournies par ces différents travaux contribuera à une meilleure évaluation de l'impact des nanomatériaux sur notre santé et la compréhension des mécanismes de toxicité des NPs en identifiant les facteurs de toxicité. Cela permettrait également d'aider à définir un cadre réglementaire et sanitaire approprié et de limiter ainsi le principe de précaution en vigueur sur l'usage des systèmes nanoparticulaires, qui constitue un véritable frein à leur développement.

# **BIBLIOGRAPHIE**

---



- A. Nkabinde, L., N.N. Shoba-Zikhali, L., Semete-Makokotlela, B., Kalombo, L., S. Swai, H., Hayeshi, R., Naicker, B., K. Hillie, T., H. Hamman, J., 2012. Permeation of PLGA Nanoparticles Across Different in vitro Models. *CDD* 9, 617–627. <https://doi.org/10.2174/156720112803529819>
- Abbott Chalew, T.E., Schwab, K.J., 2013. Toxicity of commercially available engineered nanoparticles to Caco-2 and SW480 human intestinal epithelial cells. *Cell Biol. Toxicol.* 29, 101–116. <https://doi.org/10.1007/s10565-013-9241-6>
- Abdelhalim, M.A.K., Abdelmottaleb Moussa, S.A., 2013. The gold nanoparticle size and exposure duration effect on the liver and kidney function of rats: In vivo. *Saudi Journal of Biological Sciences* 20, 177–181. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.01.007>
- Abdel-Misih, S.R.Z., Bloomston, M., 2010. Liver Anatomy. *Surgical Clinics of North America* 90, 643–653. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2010.04.017>
- Adeva-Andany, M.M., Pérez-Felpete, N., Fernández-Fernández, C., Donapetry-García, C., Pazos-García, C., 2016. Liver glucose metabolism in humans. *Biosci. Rep.* 36. <https://doi.org/10.1042/BSR20160385>
- AFSSAPS, 2008. Mise au point sur l'interaction médicaments et jus de pamplemousse 2.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. Cell Junctions, Cell Adhesion, and the Extracellular Matrix. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition.
- Allen, T.M., Cullis, P.R., 2013. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65, 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.037>
- Almutary, A., Sanderson, B.J.S., Alhalili, Z., Ellis, A.V., 2017. Toxicity of thiolated silica nanoparticles modified with sulfobetaine methacrylate for potential use in chemotherapy drug conjugation. *J App Pharm Sci*. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.70701>
- Alonso, C., Vicario, M., Pigrau, M., Lobo, B., Santos, J., 2014. Intestinal Barrier Function and the Brain-Gut Axis, in: Lyte, M., Cryan, J.F. (Eds.), *Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease*. Springer New York, New York, NY, pp. 73–113. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_4)
- Al-Sadi, R., Ye, D., Dokladny, K., Ma, T.Y., 2008. Mechanism of IL-1beta-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J. Immunol.* 180, 5653–5661. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5653>
- Alvarez-Román, R., Naik, A., Kalia, Y.N., Guy, R.H., Fessi, H., 2004. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 99, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.06.015>
- Amidi, M., Mastrobattista, E., Jiskoot, W., Hennink, W.E., 2010. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62, 59–82. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.009>
- Andrews, D.L., Scholes, G.D., Wiederrecht, G.P., 2011. *Comprehensive nanoscience and technology*. Elsevier, Amsterdam.
- Andronescu, E., Grumezescu, A.M., 2017. Nanostructures for drug delivery, Nanostructures in therapeutic medicine series. Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- ANSES, 2019. Avis révisé de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la sécurité des couches pour bébé.
- Antoni, L., Nuding, S., Wehkamp, J., Stange, E.F., 2014. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 20, 1165–1179. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i5.1165>
- Anu Mary Ealia, S., Saravanakumar, M.P., 2017. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* 263, 032019. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/263/3/032019>

- Apopa, P.L., Qian, Y., Shao, R., Guo, N.L., Schwegler-Berry, D., Pacurari, M., Porter, D., Shi, X., Vallyathan, V., Castranova, V., Flynn, D.C., 2009. Iron oxide nanoparticles induce human microvascular endothelial cell permeability through reactive oxygen species production and microtubule remodeling. *Part Fibre Toxicol* 6, 1. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-6-1>
- Aqel, A., El-Nour, K.M.M.A., Ammar, R.A.A., Al-Warthan, A., 2012. Carbon nanotubes, science and technology part (I) structure, synthesis and characterisation. *Arabian Journal of Chemistry* 5, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.08.022>
- Aritomi, K., Ishitsuka, Y., Tomishima, Y., Shimizu, D., Abe, N., Shuto, T., Irikura, M., Kai, H., Irie, T., 2014. Evaluation of Three-Dimensional Cultured HepG2 Cells in a Nano Culture Plate System: an In Vitro Human Model of Acetaminophen Hepatotoxicity. *J Pharmacol Sci* 124, 218–229. <https://doi.org/10.1254/jphs.13135FP>
- Athinarayanan, J., Periasamy, V.S., Alsaif, M.A., Al-Warthan, A.A., Alshatwi, A.A., 2014. Presence of nanosilica (E551) in commercial food products: TNF-mediated oxidative stress and altered cell cycle progression in human lung fibroblast cells. *Cell Biol Toxicol* 30, 89–100. <https://doi.org/10.1007/s10565-014-9271-8>
- Augustin, E., Czubek, B., Nowicka, A.M., Kowalczyk, A., Stojek, Z., Mazerska, Z., 2016. Improved cytotoxicity and preserved level of cell death induced in colon cancer cells by doxorubicin after its conjugation with iron-oxide magnetic nanoparticles. *Toxicol In Vitro* 33, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.02.009>
- Aulenta, F., Hayes, W., Rannard, S., 2003. Dendrimers: a new class of nanoscopic containers and delivery devices. *European Polymer Journal* 39, 1741–1771. [https://doi.org/10.1016/S0014-3057\(03\)00100-9](https://doi.org/10.1016/S0014-3057(03)00100-9)
- Axson, J.L., Stark, D.I., Bondy, A.L., Capracotta, S.S., Maynard, A.D., Philbert, M.A., Bergin, I.L., Ault, A.P., 2015. Rapid Kinetics of Size and pH-Dependent Dissolution and Aggregation of Silver Nanoparticles in Simulated Gastric Fluid. *J. Phys. Chem. C* 119, 20632–20641. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b03634>
- Bachhav, S.S., Dighe, V.D., Devarajan, P.V., 2018. Exploring Peyer's Patch Uptake as a Strategy for Targeted Lung Delivery of Polymeric Rifampicin Nanoparticles. *Mol. Pharmaceutics* 15, 4434–4445. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00382>
- Bachler, G., von Goetz, N., Hungerbuhler, K., 2015. Using physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling for dietary risk assessment of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles. *Nanotoxicology* 9, 373–380. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.940404>
- Bailey, J., Thew, M., Balls, M., 2015. Predicting human drug toxicity and safety via animal tests: can any one species predict drug toxicity in any other, and do monkeys help? *Altern Lab Anim* 43, 393–403. <https://doi.org/10.1177/026119291504300607>
- Bangham, A.D., Horne, R.W., 1964. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of Molecular Biology* 8, 660–IN10. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(64\)80115-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(64)80115-7)
- Banik, B.L., Fattahi, P., Brown, J.L., 2016. Polymeric nanoparticles: the future of nanomedicine: Polymeric nanoparticles. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol* 8, 271–299. <https://doi.org/10.1002/wnan.1364>
- Bannunah, A.M., Vllasaliu, D., Lord, J., Stolnik, S., 2014. Mechanisms of Nanoparticle Internalization and Transport Across an Intestinal Epithelial Cell Model: Effect of Size and Surface Charge. *Mol. Pharmaceutics* 11, 4363–4373. <https://doi.org/10.1021/mp500439c>

- Barahona, F., Ojea-Jimenez, I., Geiss, O., Gilliland, D., Barrero-Moreno, J., 2016. Multimethod approach for the detection and characterisation of food-grade synthetic amorphous silica nanoparticles. *Journal of Chromatography A* 1432, 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.12.058>
- Barone, F., De Berardis, B., Bizzarri, L., Degan, P., Andreoli, C., Zijno, A., De Angelis, I., 2011. Physico-chemical characteristics and cyto-genotoxic potential of ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles on human colon carcinoma cells. *J. Phys.: Conf. Ser.* 304, 012047. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/304/1/012047>
- Bazzoni, G., 2003. The JAM family of junctional adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 525–530. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(03\)00104-2](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(03)00104-2)
- Becker, W., Brasseur, D., Bresson, J.-L., Flynn, A., Jackson, A.A., Lagiou, P., Mingrone, G., Moseley, B., Palou, A., Przyrembel, H., Salminen, S., Strobel, S., van Loveren, H., 2004. Opinion of the Scientific Panel on Dietetic products, nutrition and allergies [NDA] related to the Tolerable Upper Intake Level of Silicon. *EFSA Journal* 2. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2004.60>
- Beddoes, C.M., Case, C.P., Briscoe, W.H., 2015. Understanding nanoparticle cellular entry: A physicochemical perspective. *Advances in Colloid and Interface Science* 218, 48–68. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.01.007>
- Bednarski, M., Dudek, M., Knutelska, J., Nowiński, L., Sapa, J., Zygmunt, M., Nowak, G., Luty-Błoch, M., Wojnicki, M., Fitzner, K., Teşiorowski, M., 2015. The influence of the route of administration of gold nanoparticles on their tissue distribution and basic biochemical parameters: In vivo studies. *Pharmacological Reports* 67, 405–409. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.10.019>
- Béduneau, A., Tempesta, C., Fimbel, S., Pellequer, Y., Jannin, V., Demarne, F., Lamprecht, A., 2014. A tunable Caco-2/HT29-MTX co-culture model mimicking variable permeabilities of the human intestine obtained by an original seeding procedure. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 87, 290–298. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.03.017>
- Behrens, I., Pena, A.I.V., Alonso, M.J., Kissel, T., 2002. Comparative uptake studies of bioadhesive and non-bioadhesive nanoparticles in human intestinal cell lines and rats: the effect of mucus on particle adsorption and transport. *Pharm. Res.* 19, 1185–1193.
- Beigmoradi, R., Samimi, A., Mohebbi-Kalhari, D., 2018. Engineering of oriented carbon nanotubes in composite materials. *Beilstein J. Nanotechnol.* 9, 415–435. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.41>
- Bellmann, S., Carlander, D., Fasano, A., Momcilovic, D., Scimeca, J.A., Waldman, W.J., Gombau, L., Tsytsikova, L., Canady, R., Pereira, D.I.A., Lefebvre, D.E., 2015. Mammalian gastrointestinal tract parameters modulating the integrity, surface properties, and absorption of food-relevant nanomaterials. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 7, 609–622. <https://doi.org/10.1002/wnan.1333>
- Belpaire, F.M., Bogaert, M.G., 1996. Cytochrome P450: Genetic Polymorphism and Drug Interactions. *Acta Clinica Belgica* 51, 254–260. <https://doi.org/10.1080/22953337.1996.11718518>
- Berry, J.P., Arnoux, B., Stanislas, G., Galle, P., Chretien, J., 1977. A microanalytic study of particles transport across the alveoli: role of blood platelets. *Biomedicine* 27, 354–357.
- Bettini, S., Boutet-Robinet, E., Cartier, C., Coméra, C., Gaultier, E., Dupuy, J., Naud, N., Taché, S., Grysan, P., Reguer, S., Thieriet, N., Réfrégiers, M., Thiaudière, D., Cravedi, J.-P., Carrière, M., Audinot, J.-N., Pierre, F.H., Guzylack-Piriou, L., Houdeau, E., 2017. Food-grade TiO<sub>2</sub> impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon. *Sci Rep* 7, 40373. <https://doi.org/10.1038/srep40373>

- Bhattacharjee, S., de Haan, L.H.J., Evers, N.M., Jiang, X., Marcelis, A.T.M., Zuilhof, H., Rietjens, I.M.C.M., Alink, G.M., 2010. Role of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity of organic monolayer-coated silicon nanoparticles towards macrophage NR8383 cells. *Part Fibre Toxicol* 7, 25. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-25>
- Bhol, K.C., Schechter, P.J., 2007. Effects of nanocrystalline silver (NPI 32101) in a rat model of ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.* 52, 2732–2742. <https://doi.org/10.1007/s10620-006-9738-4>
- Billat, P.-A., Roger, E., Faure, S., Lagarce, F., 2017. Models for drug absorption from the small intestine: where are we and where are we going? *Drug Discov. Today* 22, 761–775. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.01.007>
- Bioulac-Sage, P., Dubuisson, L., Bonjean, P., Balabaud, C., 1984. Morphometric analysis of normal human liver by electron microscopy. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 8, 856–860.
- Blair, S.A., Kane, S.V., Clayburgh, D.R., Turner, J.R., 2006. Epithelial myosin light chain kinase expression and activity are upregulated in inflammatory bowel disease. *Lab. Invest.* 86, 191–201. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700373>
- Bobo, D., Robinson, K.J., Islam, J., Thurecht, K.J., Corrie, S.R., 2016. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm Res* 33, 2373–2387. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-1958-5>
- Böckmann, J., Lahl, H., Eckert, T., Unterhalt, B., 2000. [Blood titanium levels before and after oral administration titanium dioxide]. *Pharmazie* 55, 140–143.
- Bogdanos, D.P., Gao, B., Gershwin, M.E., 2013. Liver Immunology, in: Terjung, R. (Ed.), *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, p. c120011. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120011>
- Bomo, J., Ezan, F., Tiaho, F., Bellamri, M., Langouët, S., Theret, N., Baffet, G., 2016. Increasing 3D Matrix Rigidity Strengthens Proliferation and Spheroid Development of Human Liver Cells in a Constant Growth Factor Environment. *Journal of Cellular Biochemistry* 117, 708–720. <https://doi.org/10.1002/jcb.25356>
- Borges, O., Cordeiro-da-Silva, A., Romeijn, S.G., Amidi, M., de Sousa, A., Borchard, G., Junginger, H.E., 2006. Uptake studies in rat Peyer's patches, cytotoxicity and release studies of alginate coated chitosan nanoparticles for mucosal vaccination. *Journal of Controlled Release* 114, 348–358. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.06.011>
- Bose, T., Latawiec, D., Mondal, P.P., Mandal, S., 2014. Overview of nano-drugs characteristics for clinical application: the journey from the entry to the exit point. *J Nanopart Res* 16, 2527. <https://doi.org/10.1007/s11051-014-2527-7>
- Bosi, S., Da Ros, T., Spalluto, G., Prato, M., 2003. Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications. *European Journal of Medicinal Chemistry* 38, 913–923. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2003.09.005>
- Bouwmeester, H., van der Zande, M., Jepson, M.A., 2018. Effects of food-borne nanomaterials on gastrointestinal tissues and microbiota: Effects of food-borne nanomaterials on gastrointestinal tissues. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol* 10, e1481. <https://doi.org/10.1002/wnan.1481>
- Boyer, J.L., 2013. Bile Formation and Secretion, in: Terjung, R. (Ed.), *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, p. c120027. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120027>
- Braakhuis, H.M., Gosens, I., Krystek, P., Boere, J.A., Cassee, F.R., Fokkens, P.H., Post, J.A., van Loveren, H., Park, M.V., 2014. Particle size dependent deposition and pulmonary inflammation after short-term inhalation of silver nanoparticles. *Part Fibre Toxicol* 11, 49. <https://doi.org/10.1186/s12989-014-0049-1>

- Brodie, B.B., Gillette, J.R., La Du, B.N., 1958. Enzymatic Metabolism of Drugs and other Foreign Compounds. *Annu. Rev. Biochem.* 27, 427–454. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.27.070158.002235>
- Brown, S.S., Spudich, J.A., 1981. Mechanism of action of cytochalasin: evidence that it binds to actin filament ends. *J. Cell Biol.* 88, 487–491. <https://doi.org/10.1083/jcb.88.3.487>
- Bruewer, M., Utech, M., Ivanov, A.I., Hopkins, A.M., Parkos, C.A., Nusrat, A., 2005. Interferon-gamma induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process. *FASEB J.* 19, 923–933. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3260com>
- Brun, E., Barreau, F., Veronesi, G., Fayard, B., Sorieul, S., Chanéac, C., Carapito, C., Rabilloud, T., Mabondzo, A., Herlin-Boime, N., Carrière, M., 2014. Titanium dioxide nanoparticle impact and translocation through ex vivo, in vivo and in vitro gut epithelia. *Part Fibre Toxicol* 11, 13. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-11-13>
- Buatois, S., Le Merdy, M., Labat, L., Scherrmann, J.-M., Decleves, X., 2014. Principales modifications pharmacocinétiques chez l'enfant. *Toxicologie Analytique et Clinique* 26, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.toxac.2014.06.003>
- Buckley, A., Hodgson, A., Warren, J., Guo, C., Smith, R., 2016. Size-dependent deposition of inhaled nanoparticles in the rat respiratory tract using a new nose-only exposure system. *Aerosol Science and Technology* 50, 1–10. <https://doi.org/10.1080/02786826.2015.1124987>
- Busquets, M.A., Estelrich, J., Sánchez-Martín, M.J., 2015. Nanoparticles in magnetic resonance imaging: from simple to dual contrast agents. *IJN* 1727. <https://doi.org/10.2147/IJN.S76501>
- Cani, P.D., 2018. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut* 67, 1716–1725. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316723>
- Cao, Y., Roursgaard, M., Kermanizadeh, A., Loft, S., Møller, P., 2015. Synergistic effects of zinc oxide nanoparticles and Fatty acids on toxicity to caco-2 cells. *Int. J. Toxicol.* 34, 67–76. <https://doi.org/10.1177/1091581814560032>
- Caputo, F., 2016. Zeta potential determination of nanoparticles in aqueous dispersions by PALS 19.
- Cardinal, J., Klune, J.R., Chory, E., Jeyabalan, G., Kanzius, J.S., Nalesnik, M., Geller, D.A., 2008. Noninvasive radiofrequency ablation of cancer targeted by gold nanoparticles. *Surgery* 144, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2008.03.036>
- Cha, C., Shin, S.R., Annabi, N., Dokmeci, M.R., Khademhosseini, A., 2013. Carbon-Based Nanomaterials: Multifunctional Materials for Biomedical Engineering. *ACS Nano* 7, 2891–2897. <https://doi.org/10.1021/nn401196a>
- Chandra, P., Brouwer, K.L.R., 2004. The Complexities of Hepatic Drug Transport: Current Knowledge and Emerging Concepts. *Pharm Res* 21, 719–735. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000026420.79421.8f>
- Chatterjee, D.K., Diagaradjane, P., Krishnan, S., 2011. Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy. *Ther Deliv* 2, 1001–1014.
- Chelakkot, C., Ghim, J., Ryu, S.H., 2018. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp Mol Med* 50, 103. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0126-x>
- Chen, J., Shi, M., Liu, P., Ko, A., Zhong, W., Liao, W., Xing, M.M.Q., 2014. Reducible polyamidoamine-magnetic iron oxide self-assembled nanoparticles for doxorubicin delivery. *Biomaterials* 35, 1240–1248. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.10.057>



- Chithrani, B.D., Ghazani, A.A., Chan, W.C.W., 2006. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett.* 6, 662–668. <https://doi.org/10.1021/nl052396o>
- Cho, W.-S., Kang, B.-C., Lee, J.K., Jeong, J., Che, J.-H., Seok, S.H., 2013. Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration. *Particle and Fibre Toxicology* 10, 9. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-9>
- Christen, V., Camenzind, M., Fent, K., 2014. Silica nanoparticles induce endoplasmic reticulum stress response, oxidative stress and activate the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. *Toxicol Rep* 1, 1143–1151. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.10.023>
- Chusuei, C.C., Wu, C.-H., Mallavarapu, S., Hou, F.Y.S., Hsu, C.-M., Winiarz, J.G., Aronstam, R.S., Huang, Y.-W., 2013. Cytotoxicity in the age of nano: The role of fourth period transition metal oxide nanoparticle physicochemical properties. *Chemico-Biological Interactions* 206, 319–326. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.09.020>
- Clark, M.A., Jepson, M.A., Hirst, B.H., 2001. Exploiting M cells for drug and vaccine delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 50, 81–106.
- Collège des universitaires en hépato-gastro-entérologie, Beaugerie, L., Sokol, H., 2014. Les fondamentaux de la pathologie digestive: enseignement intégré, appareil digestif. Elsevier Masson, Issy-les-Moulineaux.
- Corfield, A.P., Carroll, D., Myerscough, N., Probert, C.S., 2001. Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. *Front. Biosci.* 6, D1321-1357. <https://doi.org/10.2741/corfield>
- Correia, M.A., Ortiz de Montellano, P.R., 2005. Inhibition of Cytochrome P450 Enzymes, in: Ortiz de Montellano, P.R. (Ed.), *Cytochrome P450*. Springer US, Boston, MA, pp. 247–322. [https://doi.org/10.1007/0-387-27447-2\\_7](https://doi.org/10.1007/0-387-27447-2_7)
- Crater, J.S., Carrier, R.L., 2010. Barrier properties of gastrointestinal mucus to nanoparticle transport. *Macromol Biosci* 10, 1473–1483. <https://doi.org/10.1002/mabi.201000137>
- Crosnier, C., Stamatakis, D., Lewis, J., 2006. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet* 7, 349–359. <https://doi.org/10.1038/nrg1840>
- Da Silva, C., Wagner, C., Bonnardel, J., Gorvel, J.-P., Lelouard, H., 2017. The Peyer's Patch Mononuclear Phagocyte System at Steady State and during Infection. *Front. Immunol.* 8, 1254. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01254>
- Da Silva, C.G., Camps, M.G.M., Li, T.M.W.Y., Chan, A.B., Ossendorp, F., Cruz, L.J., 2019. Co-delivery of immunomodulators in biodegradable nanoparticles improves therapeutic efficacy of cancer vaccines. *Biomaterials* 220, 119417. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119417>
- Dadras, A., Riazi, G.H., Afrasiabi, A., Naghshineh, A., Ghalandari, B., Mokhtari, F., 2013. In vitro study on the alterations of brain tubulin structure and assembly affected by magnetite nanoparticles. *J. Biol. Inorg. Chem.* 18, 357–369. <https://doi.org/10.1007/s00775-013-0980-x>
- Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J.M., Coco, R., Le Breton, A., Pr at, V., 2012. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release* 161, 505–522. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.043>
- De Berardis, B., Civitelli, G., Condello, M., Lista, P., Pozzi, R., Arancia, G., Meschini, S., 2010. Exposure to ZnO nanoparticles induces oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 246, 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.04.012>

- De Jesus, M., Ostroff, G.R., Levitz, S.M., Bartling, T.R., Mantis, N.J., 2014. A population of Langerin-positive dendritic cells in murine Peyer's patches involved in sampling  $\beta$ -glucan microparticles. *PLoS ONE* 9, e91002. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091002>
- Debattista, C., Schatzberg, A., 2006. Psychotropic Dosing and Monitoring Guidelines. *Primary Psychiatry* 13.
- Dekkers, S., Krystek, P., Peters, R.J.B., Lankveld, D.P.K., Bokkers, B.G.H., van Hoeven-Arentzen, P.H., Bouwmeester, H., Oomen, A.G., 2011. Presence and risks of nanosilica in food products. *Nanotoxicology* 5, 393–405. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.519836>
- Desai, M.P., Labhasetwar, V., Walter, E., Levy, R.J., Amidon, G.L., 1997. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm. Res.* 14, 1568–1573. <https://doi.org/10.1023/a:1012126301290>
- Dhillon, K.K., Gupta, S., 2019. Biochemistry, Ketogenesis, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Diamond, L., Kruszewski, F., Aden, D.P., Knowles, B.B., Baird, W.M., 1980. Metabolic activation of benzo[a]pyrene by a human hepatoma cell line. *Carcinogenesis* 1, 871–875. <https://doi.org/10.1093/carcin/1.10.871>
- Docter, D., Bantz, C., Westmeier, D., Galla, H.J., Wang, Q., Kirkpatrick, J.C., Nielsen, P., Maskos, M., Stauber, R.H., 2014. The protein corona protects against size- and dose-dependent toxicity of amorphous silica nanoparticles. *Beilstein J Nanotechnol* 5, 1380–1392. <https://doi.org/10.3762/bjnano.5.151>
- Donaldson, G.P., Lee, S.M., Mazmanian, S.K., 2016. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol* 14, 20–32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3552>
- Dorier, M., 2016. Impact du colorant alimentaire E171 et de nanoparticules de dioxyde de titane sur des modèles cellulaires, in vitro, d'épithélium intestinal.
- Döring, B., Petzinger, E., 2014. Phase 0 and phase III transport in various organs: Combined concept of phases in xenobiotic transport and metabolism. *Drug Metabolism Reviews* 46, 261–282. <https://doi.org/10.3109/03602532.2014.882353>
- Dufes, C., Uchegbu, I., Schatzlein, A., 2005. Dendrimers in gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57, 2177–2202. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.09.017>
- Dunlap, B.I., Zope, R.R., 2006. Efficient quantum-chemical geometry optimization and the structure of large icosahedral fullerenes. *Chemical Physics Letters* 422, 451–454. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2006.02.100>
- Dunn, J.C., Yarmush, M.L., Koebe, H.G., Tompkins, R.G., 1989. Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration. *The FASEB Journal* 3, 174–177. <https://doi.org/10.1096/fasebj.3.2.2914628>
- Echegoyen, Y., Nerín, C., 2013. Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers. *Food Chem. Toxicol.* 62, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.08.014>
- Edwards, P.P., Thomas, J.M., 2007. Gold in a Metallic Divided State—From Faraday to Present-Day Nanoscience. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46, 5480–5486. <https://doi.org/10.1002/anie.200700428>
- EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), Younes, M., Aggett, P., Aguilar, F., Crebelli, R., Dusemund, B., Filipic, M., Frutos, M.J., Galtier, P., Gott, D., Gundert-Remy, U., Kuhnle, G.G., Leblanc, J.-C., Lillegaard, I.T., Moldeus, P., Mortensen, A., Oskarsson, A., Stankovic, I., Waalkens-Berendsen, I., Woutersen, R.A., Wright, M., Boon, P., Chrysafidis, D., Gürtler, R., Mosesso, P., Parent-Massin, D., Tobbäck, P., Kovalkovicova, N., Rincon, A.M., Tard, A., Lambré, C., 2018. Re-evaluation of silicon dioxide (E 551) as a food additive. *EFSA Journal* 16. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5088>

- Encyclopædia Universalis FULLERENES, FULLERÈNES [WWW Document]. Encyclopædia Universalis. URL <http://www.universalis.fr/encyclopedie/fullerenes/> (accessed 7.17.19)
- Encyclopædia Universalis SILICE, SILICE [WWW Document]. Encyclopædia Universalis. URL <http://www.universalis.fr/encyclopedie/silice/> (accessed 7.13.19).
- Enjoji, M., Kohjima, M., Nakamuta, M., 2016. Lipid Metabolism and the Liver, in: Ohira, H. (Ed.), *The Liver in Systemic Diseases*. Springer Japan, Tokyo, pp. 105–122. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-55790-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-4-431-55790-6_6)
- Espinosa, A., Kolosnjaj-Tabi, J., Abou-Hassan, A., Plan Sangnier, A., Curcio, A., Silva, A.K.A., Di Corato, R., Neveu, S., Pellegrino, T., Liz-Marzán, L.M., Wilhelm, C., 2018. Magnetic (Hyper)Thermia or Photothermia? Progressive Comparison of Iron Oxide and Gold Nanoparticles Heating in Water, in Cells, and In Vivo. *Adv. Funct. Mater.* 28, 1803660. <https://doi.org/10.1002/adfm.201803660>
- European Commission, 2003. Scientific Committee on toxicity, ecotoxicity and the environment (CSTEE) Opinion on the results of the Risk Assessment of: Zinc Metal (CAS NO. 7440-66-6) Zinc Chloride (CAS NO. 7646-85-7) Zinc sulphate (CAS NO. 7733-02-0) Zinc Diesterate (CAS NO. 557-05-1, 9105-01-3) Zinc Phosphate (CAS NO. 7779-90-0) Zinc Oxide (CAS NO. 1314-13-2) Human Health Part.
- European Medicines Agency, 2012. Guideline on the investigation of drug interactions 59.
- Evans, W.E., Relling, M.V., 1999. Pharmacogenomics: Translating Functional Genomics into Rational Therapeutics. *Science* 286, 487–491. <https://doi.org/10.1126/science.286.5439.487>
- Fang, S., Shen, L., Zhang, X., 2017. Application of Carbon Nanotubes in Lithium-Ion Batteries, in: *Industrial Applications of Carbon Nanotubes*. Elsevier, pp. 251–276. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-41481-4.00009-5>
- Faust, J.J., Doudrick, K., Yang, Y., Westerhoff, P., Capco, D.G., 2014. Food grade titanium dioxide disrupts intestinal brush border microvilli in vitro independent of sedimentation. *Cell Biol. Toxicol.* 30, 169–188. <https://doi.org/10.1007/s10565-014-9278-1>
- Filon, F.L., Crosera, M., Adami, G., Bovenzi, M., Rossi, F., Maina, G., 2011. Human skin penetration of gold nanoparticles through intact and damaged skin. *Nanotoxicology* 5, 493–501. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.551428>
- Finnie, K.S., Bartlett, J.R., Barbé, C.J.A., Kong, L., 2007. Formation of Silica Nanoparticles in Microemulsions. *Langmuir* 23, 3017–3024. <https://doi.org/10.1021/la0624283>
- Fish, R.J., Neerman-Arbez, M., 2012. Fibrinogen gene regulation. *Thromb Haemost* 108, 419–426. <https://doi.org/10.1160/TH12-04-0273>
- Flint, H.J., Scott, K.P., Louis, P., Duncan, S.H., 2012. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9, 577–589. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.156>
- Floch, M.H., Pitchumoni, C.S., Floch, N.R., Rosenthal, R.R., Scolapio, J.S., Lim, J.K., Netter, F.H., Machado, C.A.G., Craig, J.A., Carter, K., Mascaro, D.J., Moon, S., Marzejon, K.W., Flor, M. de la, Elsevier (Amsterdam), 2019. *Netter's gastroenterology*. Elsevier, Philadelphia.
- Florea, B.I., Meaney, C., Junginger, H.E., Borchard, G., 2002. Transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine in differentiated Calu-3 and nondifferentiated COS-1 cell cultures. *AAPS PharmSci* 4, E12. <https://doi.org/10.1208/ps040312>
- Florence, A.T., Hillery, A.M., Hussain, N., Jani, P.U., 1994. Oral Uptake and Translocation of Nanoparticles: A Real but Useful Phenomenon?, in: Gregoriadis, G., McCormack, B., Poste, G. (Eds.), *Targeting of Drugs 4*. Springer US, Boston, MA, pp. 173–181. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1207-7\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1207-7_16)

- Foroozandeh, P., Aziz, A.A., 2018. Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles. *Nanoscale Res Lett* 13, 339. <https://doi.org/10.1186/s11671-018-2728-6>
- Fröhlich, E., Kueznik, T., Samberger, C., Roblegg, E., Wrighton, C., Pieber, T.R., 2010. Size-dependent effects of nanoparticles on the activity of cytochrome P450 isoenzymes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 242, 326–332. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.11.002>
- Fröhlich, E., Roblegg, E., 2012. Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products. *Toxicology* 291, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.11.004>
- Fröhlich, Esther, Fröhlich, Eleonore, 2016. Cytotoxicity of Nanoparticles Contained in Food on Intestinal Cells and the Gut Microbiota. *IJMS* 17, 509. <https://doi.org/10.3390/ijms17040509>
- Gaiser, B.K., Fernandes, T.F., Jepson, M., Lead, J.R., Tyler, C.R., Stone, V., 2009. Assessing exposure, uptake and toxicity of silver and cerium dioxide nanoparticles from contaminated environments. *Environ Health* 8, S2. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-8-S1-S2>
- Gao, B., Jeong, W.-I., Tian, Z., 2007. Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology* 47, 729–736. <https://doi.org/10.1002/hep.22034>
- Gao, Y., Li, S., Wang, J., Luo, C., Zhao, S., Zheng, N., 2017. Modulation of Intestinal Epithelial Permeability in Differentiated Caco-2 Cells Exposed to Aflatoxin M1 and Ochratoxin A Individually or Collectively. *Toxins* 10, 13. <https://doi.org/10.3390/toxins10010013>
- Garcia, M.A., 2011. Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 44, 283001. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/44/28/283001>
- Garcia, M.A., Nelson, W.J., Chavez, N., 2018. Cell-Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029181>
- Garuglieri, E., Meroni, E., Cattò, C., Villa, F., Cappitelli, F., Erba, D., 2017. Effects of Sub-lethal Concentrations of Silver Nanoparticles on a Simulated Intestinal Prokaryotic-Eukaryotic Interface. *Front Microbiol* 8, 2698. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02698>
- Geckeler, K.E., Premkumar, T., 2011. Carbon nanotubes: are they dispersed or dissolved in liquids? *Nanoscale Res Lett* 6, 136. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-6-136>
- Gentile, P., Chiono, V., Carmagnola, I., Hatton, P., 2014. An Overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *IJMS* 15, 3640–3659. <https://doi.org/10.3390/ijms15033640>
- Geraets, L., Oomen, A.G., Krystek, P., Jacobsen, N.R., Wallin, H., Laurentie, M., Verharen, H.W., Brandon, E.F., de Jong, W.H., 2014. Tissue distribution and elimination after oral and intravenous administration of different titanium dioxide nanoparticles in rats. *Part Fibre Toxicol* 11, 30. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-11-30>
- Gerloff, K., Albrecht, C., Boots, A.W., Förster, I., Schins, R.P.F., 2009. Cytotoxicity and oxidative DNA damage by nanoparticles in human intestinal Caco-2 cells. *Nanotoxicology* 3, 355–364. <https://doi.org/10.3109/17435390903276933>
- Gerloff, K., Fenoglio, I., Carella, E., Kolling, J., Albrecht, C., Boots, A.W., Förster, I., Schins, R.P.F., 2012. Distinctive Toxicity of TiO<sub>2</sub> Rutile/Anatase Mixed Phase Nanoparticles on Caco-2 Cells. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 646–655. <https://doi.org/10.1021/tx200334k>
- Gheshlaghi, Z.N., Riazi, G.H., Ahmadian, S., Ghafari, M., Mahinpour, R., 2008. Toxicity and interaction of titanium dioxide nanoparticles with microtubule protein. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 40, 777–782.
- Golombek, S.K., May, J.-N., Theek, B., Appold, L., Drude, N., Kiessling, F., Lammers, T., 2018. Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses. *Advanced Drug Delivery Reviews* 130, 17–38. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.007>

- Goodman, C.M., McCusker, C.D., Yilmaz, T., Rotello, V.M., 2004. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjug. Chem.* 15, 897–900. <https://doi.org/10.1021/bc049951i>
- Gouadec, G., Colombari, P., 2007. Raman Spectroscopy of nanomaterials: How spectra relate to disorder, particle size and mechanical properties. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials* 53, 1–56. <https://doi.org/10.1016/j.pcrysgrow.2007.01.001>
- Graf, C., Gao, Q., Schütz, I., Noufele, C.N., Ruan, W., Posselt, U., Korotianskiy, E., Nordmeyer, D., Rancan, F., Hadam, S., Vogt, A., Lademann, J., Haucke, V., Rühl, E., 2012. Surface Functionalization of Silica Nanoparticles Supports Colloidal Stability in Physiological Media and Facilitates Internalization in Cells. *Langmuir* 28, 7598–7613. <https://doi.org/10.1021/la204913t>
- Greish, K., 2010. Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect for Anticancer Nanomedicine Drug Targeting, in: Grobmyer, S.R., Moudgil, B.M. (Eds.), *Cancer Nanotechnology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 25–37. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-609-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-609-2_3)
- Guerrera, D., 2016. PDZD11: a novel PLEKHA7 interactor at adherens junctions. <https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:87754>
- Guguen-Guillouzo, C., Corlu, A., Guillouzo, A., 2010. Stem cell-derived hepatocytes and their use in toxicology. *Toxicology* 270, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.09.019>
- Guguen-Guillouzo, C., Guillouzo, A., 2010. General Review on In Vitro Hepatocyte Models and Their Applications, in: Maurel, P. (Ed.), *Hepatocytes*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 1–40. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-688-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-688-7_1)
- Guo, Z., Martucci, N.J., Liu, Y., Yoo, E., Tako, E., Mahler, G.J., 2018. Silicon dioxide nanoparticle exposure affects small intestine function in an *in vitro* model. *Nanotoxicology* 12, 485–508. <https://doi.org/10.1080/17435390.2018.1463407>
- Gurr, J.-R., Wang, A.S.S., Chen, C.-H., Jan, K.-Y., 2005. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 213, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.05.007>
- Guterres, S.S., Alves, M.P., Pohlmann, A.R., 2007. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. *Drug Target Insights* 2, 147–157.
- Hadrup, N., Loeschner, K., Bergström, A., Wilcks, A., Gao, X., Vogel, U., Frandsen, H.L., Larsen, E.H., Lam, H.R., Mortensen, A., 2012. Subacute oral toxicity investigation of nanoparticulate and ionic silver in rats. *Arch. Toxicol.* 86, 543–551. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0759-1>
- Haji Mansor, M., Najberg, M., Contini, A., Alvarez-Lorenzo, C., Garcion, E., Jérôme, C., Boury, F., 2018. Development of a non-toxic and non-denaturing formulation process for encapsulation of SDF-1 $\alpha$  into PLGA/PEG-PLGA nanoparticles to achieve sustained release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 125, 38–50. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.12.020>
- Haskins, J., Gu, L., Wittchen, E.S., Hibbard, J., Stevenson, B.R., 1998. ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J. Cell Biol.* 141, 199–208. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.1.199>
- He, B., Lin, P., Jia, Z., Du, W., Qu, W., Yuan, L., Dai, W., Zhang, H., Wang, X., Wang, J., Zhang, X., Zhang, Q., 2013. The transport mechanisms of polymer nanoparticles in Caco-2 epithelial cells. *Biomaterials* 34, 6082–6098. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.04.053>
- He, X., Deng, H., Hwang, H., 2019. The current application of nanotechnology in food and agriculture. *Journal of Food and Drug Analysis* 27, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.12.002>

- He, X., Zhang, H., Ma, Y., Bai, W., Zhang, Z., Lu, K., Ding, Y., Zhao, Y., Chai, Z., 2010. Lung deposition and extrapulmonary translocation of nano-ceria after intratracheal instillation. *Nanotechnology* 21, 285103. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/21/28/285103>
- Heel, K.A., McCauley, R.D., Papadimitriou, J.M., Hall, J.C., 1997. Review: Peyer's patches. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 122–136. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.1997.tb00395.x>
- Heiligt, F.J., Niederberger, M., 2013. The fascinating world of nanoparticle research. *Materials Today* 16, 262–271. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2013.07.004>
- Helander, H.F., Fändriks, L., 2014. Surface area of the digestive tract – revisited. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 49, 681–689. <https://doi.org/10.3109/00365521.2014.898326>
- Hidalgo, I.J., Raub, T.J., Borchardt, R.T., 1989. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96, 736–749.
- Higashisaka, K., Yoshioka, Y., Tsutsumi, Y., 2015. Applications and Safety of Nanomaterials Used in the Food Industry. *Food Safety* 3, 39–47. <https://doi.org/10.14252/foodsafetyfscj.2015005>
- Hilgendorf, C., Spahn-Langguth, H., Regårdh, C.G., Lipka, E., Amidon, G.L., Langguth, P., 2000. Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport. *J Pharm Sci* 89, 63–75. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6017\(200001\)89:1<63::AID-JPS7>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6017(200001)89:1<63::AID-JPS7>3.0.CO;2-6)
- Hilgers, A.R., Conradi, R.A., Burton, P.S., 1990. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharmaceutical Research* 07, 902–910. <https://doi.org/10.1023/A:1015937605100>
- Householder, K.T., DiPerna, D.M., Chung, E.P., Wohlleb, G.M., Dhruv, H.D., Berens, M.E., Sirianni, R.W., 2015. Intravenous delivery of camptothecin-loaded PLGA nanoparticles for the treatment of intracranial glioma. *International Journal of Pharmaceutics* 479, 374–380. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.01.002>
- Hsu, L.-W., Ho, Y.-C., Chuang, E.-Y., Chen, C.-T., Juang, J.-H., Su, F.-Y., Hwang, S.-M., Sung, H.-W., 2013. Effects of pH on molecular mechanisms of chitosan–integrin interactions and resulting tight-junction disruptions. *Biomaterials* 34, 784–793. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.09.082>
- Hu, X., Fan, W., Yu, Z., Lu, Y., Qi, J., Zhang, J., Dong, X., Zhao, W., Wu, W., 2016. Evidence does not support absorption of intact solid lipid nanoparticles via oral delivery. *Nanoscale* 8, 7024–7035. <https://doi.org/10.1039/C5NR07474F>
- Huang, W., Taylor, S., Fu, K., Lin, Y., Zhang, D., Hanks, T.W., Rao, A.M., Sun, Y.-P., 2002. Attaching Proteins to Carbon Nanotubes via Diimide-Activated Amidation. *Nano Lett.* 2, 311–314. <https://doi.org/10.1021/nl010095i>
- Hummel, T.Z., Kindermann, A., Stokkers, P.C.F., Benninga, M.A., ten Kate, F.J.W., 2014. Exogenous pigment in Peyer patches of children suspected of having IBD. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 58, 477–480. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000221>
- Huo, S., Jin, S., Ma, X., Xue, X., Yang, K., Kumar, A., Wang, P.C., Zhang, J., Hu, Z., Liang, X.-J., 2014. Ultrasmall gold nanoparticles as carriers for nucleus-based gene therapy due to size-dependent nuclear entry. *ACS Nano* 8, 5852–5862. <https://doi.org/10.1021/nn5008572>
- Hwang, J.Y., Li, Z., Loh, X.J., 2016. Small molecule therapeutic-loaded liposomes as therapeutic carriers: from development to clinical applications. *RSC Adv.* 6, 70592–70615. <https://doi.org/10.1039/C6RA09854A>

- Immordino, M.L., Dosio, F., Cattel, L., 2006. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int J Nanomedicine* 1, 297–315.
- Inshakova, E., Inshakov, O., 2017. World market for nanomaterials: structure and trends. *MATEC Web Conf.* 129, 02013. <https://doi.org/10.1051/mateconf/201712902013>
- Institut national de la santé et de la recherche médicale (France), 2001. Susceptibilités génétiques et expositions professionnelles. Editions INSERM, Paris.
- Ise, H., Takashima, S., Nagaoka, M., Ferdous, A., Akaïke, T., 1999. Analysis of cell viability and differential activity of mouse hepatocytes under 3D and 2D culture in agarose gel. *Biotechnology Letters* 21, 209–213. <https://doi.org/10.1023/A:1005412129500>
- ISO/TC 229, Nanotechnologies, 2017. ISO/TR 18401:2017 Nanotechnologies — Language explanation of selected terms from the ISO/IEC 80004 series.
- Ispanixtlahuatl-Meráz, O., Schins, R.P.F., Chirino, Y.I., 2018. Cell type specific cytoskeleton disruption induced by engineered nanoparticles. *Environ. Sci.: Nano* 5, 228–245. <https://doi.org/10.1039/C7EN00704C>
- Jackson, T.C., Patani, B.O., Israel, M.B., 2017. Nanomaterials and Cell Interactions: A Review. *JBNB* 08, 220–228. <https://doi.org/10.4236/jbnb.2017.84015>
- Jacob, C., Yang, P.-C., Darmoul, D., Amadesi, S., Saito, T., Cottrell, G.S., Coelho, A.-M., Singh, P., Grady, E.F., Perdue, M., Bunnett, N.W., 2005. Mast cell tryptase controls paracellular permeability of the intestine. Role of protease-activated receptor 2 and beta-arrestins. *J. Biol. Chem.* 280, 31936–31948. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506338200>
- Jaeg, J.-P., 2013. Le passage membranaire - Les différents transporteurs et caractéristiques de ce mécanisme [WWW Document]. URL [http://pedagogotech.inp-toulouse.fr/130919/co/module\\_passage-membranaire\\_3.html](http://pedagogotech.inp-toulouse.fr/130919/co/module_passage-membranaire_3.html)
- Jain, S., 2011. Role of Protein Kinase C Zeta (PKC $\zeta$ ) in Regulation of Epithelial Tight Junctions (Doctor of Philosophy). University of Tennessee Health Science Center, Memphis, TN. <https://doi.org/10.21007/etd.cghs.2011.0149>
- Jani, P., Halbert, G.W., Langridge, J., Florence, A.T., 1990. Nanoparticle Uptake by the Rat Gastrointestinal Mucosa: Quantitation and Particle Size Dependency. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 42, 821–826. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1990.tb07033.x>
- Jani, P., Halbert, G.W., Langridge, J., Florence, A.T., 1989. The Uptake and Translocation of Latex Nanospheres and Microspheres after Oral Administration to Rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 41, 809–812. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1989.tb06377.x>
- Jani, P.U., McCarthy, D.E., Florence, A.T., 1994. Titanium dioxide (rutile) particle uptake from the rat GI tract and translocation to systemic organs after oral administration. *International Journal of Pharmaceutics* 105, 157–168. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(94\)90461-8](https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)90461-8)
- Javurek, A.B., Suresh, D., Spollen, W.G., Hart, M.L., Hansen, S.A., Ellersieck, M.R., Bivens, N.J., Givan, S.A., Upendran, A., Kannan, R., Rosenfeld, C.S., 2017. Gut Dysbiosis and Neurobehavioral Alterations in Rats Exposed to Silver Nanoparticles. *Sci Rep* 7, 2822. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02880-0>
- Jensen-Jarolim, E., Gajdzik, L., Haberl, I., Kraft, D., Scheiner, O., Graf, J., 1998. Hot Spices Influence Permeability of Human Intestinal Epithelial Monolayers. *The Journal of Nutrition* 128, 577–581. <https://doi.org/10.1093/jn/128.3.577>
- Jepson, M., Simmons, N., O'hagan, D., Hirst, B., 1993. Comparison of Poly(DL-Lactide-co-Glycolide) and Polystyrene Microsphere Targeting to Intestinal M Cells. *Journal of Drug Targeting* 1, 245–249. <https://doi.org/10.3109/10611869308996082>
- Jesorka, A., Orwar, O., 2008. Liposomes: Technologies and Analytical Applications. *Annual Rev. Anal. Chem.* 1, 801–832. <https://doi.org/10.1146/annurev.anchem.1.031207.112747>

- Johansson, I., Ingelman-Sundberg, M., 2011. Genetic Polymorphism and Toxicology—With Emphasis on Cytochrome P450. *Toxicological Sciences* 120, 1–13. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq374>
- Johansson, M.E.V., Ambort, D., Pelaseyed, T., Schütte, A., Gustafsson, J.K., Ermund, A., Subramani, D.B., Holmén-Larsson, J.M., Thomsson, K.A., Bergström, J.H., van der Post, S., Rodriguez-Piñeiro, A.M., Sjövall, H., Bäckström, M., Hansson, G.C., 2011. Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 3635–3641. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0822-3>
- Johnson-McDaniel, D., Barrett, C.A., Sharafi, A., Salguero, T.T., 2013. Nanoscience of an Ancient Pigment. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 1677–1679. <https://doi.org/10.1021/ja310587c>
- Jokerst, J.V., Lobovkina, T., Zare, R.N., Gambhir, S.S., 2011. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine (Lond)* 6, 715–728. <https://doi.org/10.2217/nmm.11.19>
- Jones, C.F., Grainger, D.W., 2009. In vitro assessments of nanomaterial toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61, 438–456. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.005>
- Jones, K., Morton, J., Smith, I., Jurkschat, K., Harding, A.-H., Evans, G., 2015. Human in vivo and in vitro studies on gastrointestinal absorption of titanium dioxide nanoparticles. *Toxicology Letters* 233, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.12.005>
- Jones, M.-C., Leroux, J.-C., 1999. Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 48, 101–111. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(99\)00039-9](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(99)00039-9)
- Kahru, A., Ivask, A., 2013. Mapping the dawn of nanoecotoxicological research. *Acc. Chem. Res.* 46, 823–833. <https://doi.org/10.1021/ar3000212>
- Kai, W., Xiaojun, X., Ximing, P., Zhenqing, H., Qiqing, Z., 2011. Cytotoxic effects and the mechanism of three types of magnetic nanoparticles on human hepatoma BEL-7402 cells. *Nanoscale Res Lett* 6, 480. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-6-480>
- Kamel, A., Harriman, S., 2013. Inhibition of cytochrome P450 enzymes and biochemical aspects of mechanism-based inactivation (MBI). *Drug Discovery Today: Technologies* 10, e177–e189. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2012.09.011>
- Kan, Z., Madoff, D., 2008. Liver Anatomy: Microcirculation of the Liver. *Semin Intervent Radiol* 25, 077–085. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1076685>
- Kang, Y., Liu, J., Song, B., Feng, X., Ou, L., Wei, L., Lai, X., Shao, L., 2016. Potential Links between Cytoskeletal Disturbances and Electroneurophysiological Dysfunctions Induced in the Central Nervous System by Inorganic Nanoparticles. *Cell Physiol Biochem* 40, 1487–1505. <https://doi.org/10.1159/000453200>
- Kapur, B.M., Lala, P.K., Shaw, J.L.V., 2014. Pharmacogenetics of chronic pain management. *Clinical Biochemistry* 47, 1169–1187. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.05.065>
- Khetani, S.R., Bhatia, S.N., 2008. Microscale culture of human liver cells for drug development. *Nat Biotechnol* 26, 120–126. <https://doi.org/10.1038/nbt1361>
- Khetani, S.R., Kanchagar, C., Ukairo, O., Krzyzewski, S., Moore, A., Shi, J., Aoyama, S., Aleo, M., Will, Y., 2013. Use of Micropatterned Cocultures to Detect Compounds That Cause Drug-Induced Liver Injury in Humans. *Toxicological Sciences* 132, 107–117. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs326>
- Kim, Y.S., Song, M.Y., Park, J.D., Song, K.S., Ryu, H.R., Chung, Y.H., Chang, H.K., Lee, J.H., Oh, K.H., Kelman, B.J., Hwang, I.K., Yu, I.J., 2010. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Part Fibre Toxicol* 7, 20. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-20>
- Kirby, R., Linklater, A.K.J. (Eds.), 2016. *Monitoring and intervention for the critically ill small animal: the rule of 20*. Wiley Blackwell, Ames, Iowa.



- Klapetek, P., Valtr, M., Nečas, D., Salyk, O., Dzik, P., 2011. Atomic force microscopy analysis of nanoparticles in non-ideal conditions. *Nanoscale Res Lett* 6, 514. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-6-514>
- Kleiveland, C.R., 2015. Co-cultivation of Caco-2 and HT-29MTX, in: Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H. (Eds.), *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*. Springer International Publishing, Cham, pp. 135–140. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_13)
- Klingenberg, M., 1958. Pigments of rat liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 75, 376–386. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(58\)90436-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(58)90436-3)
- Knowles, B.B., Aden, D.P., 1983. Human hepatoma derived cell line, process for preparation thereof, and uses therefor. US4393133A.
- Koeneman, B.A., Zhang, Y., Westerhoff, P., Chen, Y., Crittenden, J.C., Capco, D.G., 2010. Toxicity and cellular responses of intestinal cells exposed to titanium dioxide. *Cell Biol Toxicol* 26, 225–238. <https://doi.org/10.1007/s10565-009-9132-z>
- Kojima, C., Turkbey, B., Ogawa, M., Bernardo, M., Regino, C.A.S., Bryant, L.H., Choyke, P.L., Kono, K., Kobayashi, H., 2011. Dendrimer-based MRI contrast agents: the effects of PEGylation on relaxivity and pharmacokinetics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 7, 1001–1008. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.03.007>
- Konishi, Y., 2003. Modulations of Food-derived Substances on Intestinal Permeability in Caco-2 Cell Monolayers. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 67, 2297–2299. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.2297>
- Krishnan, V., Xu, X., Barwe, S.P., Yang, X., Czymmek, K., Waldman, S.A., Mason, R.W., Jia, X., Rajasekaran, A.K., 2013. Dexamethasone-loaded block copolymer nanoparticles induce leukemia cell death and enhance therapeutic efficacy: a novel application in pediatric nanomedicine. *Mol. Pharm.* 10, 2199–2210. <https://doi.org/10.1021/mp300350e>
- Krüger, K., Schrader, K., Klempt, M., 2017. Cellular Response to Titanium Dioxide Nanoparticles in Intestinal Epithelial Caco-2 Cells is Dependent on Endocytosis-Associated Structures and Mediated by EGFR. *Nanomaterials* 7, 79. <https://doi.org/10.3390/nano7040079>
- Kumar, A., Chen, F., Mozhi, A., Zhang, Xu, Zhao, Y., Xue, X., Hao, Y., Zhang, Xiaoning, Wang, P.C., Liang, X.-J., 2013. Innovative pharmaceutical development based on unique properties of nanoscale delivery formulation. *Nanoscale* 5, 8307. <https://doi.org/10.1039/c3nr01525d>
- Kumar K, H., Venkatesh, N., Bhowmik, H., Kuila, A., 2018. Metallic Nanoparticle: A Review. *Biomed J Sci & Tech Res* 4. <https://doi.org/10.26717/BJSTR.2018.04.001011>
- Kumar, S., Dilbaghi, N., Saharan, R., Bhanjana, G., 2012. Nanotechnology as Emerging Tool for Enhancing Solubility of Poorly Water-Soluble Drugs. *BioNanoSci.* 2, 227–250. <https://doi.org/10.1007/s12668-012-0060-7>
- Kumawat, M.K., Thakur, M., Gurung, R.B., Srivastava, R., 2017. Graphene Quantum Dots for Cell Proliferation, Nucleus Imaging, and Photoluminescent Sensing Applications. *Sci Rep* 7, 15858. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16025-w>
- Lahar, N., Lei, N.Y., Wang, J., Jabaji, Z., Tung, S.C., Joshi, V., Lewis, M., Stelzner, M., Martín, M.G., Dunn, J.C.Y., 2011. Intestinal subepithelial myofibroblasts support in vitro and in vivo growth of human small intestinal epithelium. *PLoS ONE* 6, e26898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026898>
- Lamb, J.G., Hathaway, L.B., Munger, M.A., Raucy, J.L., Franklin, M.R., 2010. Nanosilver Particle Effects on Drug Metabolism In Vitro. *Drug Metabolism and Disposition* 38, 2246–2251. <https://doi.org/10.1124/dmd.110.035238>

- Lea, T., 2015. Caco-2 Cell Line, in: Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H. (Eds.), *The Impact of Food Bioactives on Health*. Springer International Publishing, Cham, pp. 103–111. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_10)
- LeCluyse, E.L., 2001. Human hepatocyte culture systems for the in vitro evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. *Eur J Pharm Sci* 13, 343–368. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00135-X](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00135-X)
- LeCluyse, E.L., Witek, R.P., Andersen, M.E., Powers, M.J., 2012. Organotypic liver culture models: Meeting current challenges in toxicity testing. *Critical Reviews in Toxicology* 42, 501–548. <https://doi.org/10.3109/10408444.2012.682115>
- Lee, B., Moon, K.M., Kim, C.Y., 2018. Tight Junction in the Intestinal Epithelium: Its Association with Diseases and Regulation by Phytochemicals. *Journal of Immunology Research* 2018, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/2645465>
- Lee, J.H., Ju, J.E., Kim, B.I., Pak, P.J., Choi, E.-K., Lee, H.-S., Chung, N., 2014. Rod-shaped iron oxide nanoparticles are more toxic than sphere-shaped nanoparticles to murine macrophage cells: Toxicity of rod and sphere iron oxide nanoparticles. *Environ Toxicol Chem* 33, 2759–2766. <https://doi.org/10.1002/etc.2735>
- Lee, K.J., Nallathamby, P.D., Browning, L.M., Osgood, C.J., Xu, X.-H.N., 2007. *In Vivo* Imaging of Transport and Biocompatibility of Single Silver Nanoparticles in Early Development of Zebrafish Embryos. *ACS Nano* 1, 133–143. <https://doi.org/10.1021/nn700048y>
- Lee, S.H., 2015. Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intest Res* 13, 11–18. <https://doi.org/10.5217/ir.2015.13.1.11>
- Lemmer, H.J.R., Hamman, J.H., 2013. Paracellular drug absorption enhancement through tight junction modulation. *Expert Opin Drug Deliv* 10, 103–114. <https://doi.org/10.1517/17425247.2013.745509>
- Leung, K., 2004. Ferumoxsil, in: *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD).
- Li, C.-H., Shyu, M.-K., Jhan, C., Cheng, Y.-W., Tsai, C.-H., Liu, C.-W., Lee, C.-C., Chen, R.-M., Kang, J.-J., 2015. Gold Nanoparticles Increase Endothelial Paracellular Permeability by Altering Components of Endothelial Tight Junctions, and Increase Blood-Brain Barrier Permeability in Mice. *Toxicol. Sci.* 148, 192–203. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv176>
- Li, M., Al-Jamal, K.T., Kostarelos, K., Reineke, J., 2010. Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Nanoparticles. *ACS Nano* 4, 6303–6317. <https://doi.org/10.1021/nn1018818>
- Li, Y., Pei, Y., Zhang, X., Gu, Z., Zhou, Z., Yuan, W., Zhou, J., Zhu, J., Gao, X., 2001. PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. *J Control Release* 71, 203–211. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(01\)00218-8](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(01)00218-8)
- Li, Y., Yan, J., Ding, W., Chen, Y., Pack, L.M., Chen, T., 2017. Genotoxicity and gene expression analyses of liver and lung tissues of mice treated with titanium dioxide nanoparticles. *MUTAGE* 32, 33–46. <https://doi.org/10.1093/mutage/gew065>
- Li, Z., Hsu, C.-H., Dimitrov, N., Hwang, D.W., Chang, H.-W., Hwang, L.-P., Lin, Y.-Y., 2015. Sensitive imaging of magnetic nanoparticles for cancer detection by active feedback MR: Sensitive Imaging of Magnetic Nanoparticles by Active Feedback MR. *Magn. Reson. Med.* 74, 33–41. <https://doi.org/10.1002/mrm.25632>

- Lichtenstein, D., Ebmeyer, J., Knappe, P., Juling, S., Böhmert, L., Selve, S., Niemann, B., Braeuning, A., Thünemann, A.F., Lampen, A., 2015. Impact of food components during in vitro digestion of silver nanoparticles on cellular uptake and cytotoxicity in intestinal cells. *Biological Chemistry* 396, 1255–1264. <https://doi.org/10.1515/hsz-2015-0145>
- Lin, J.H., Lu, A.Y.H., 1998. Inhibition and Induction of Cytochrome P450 and the Clinical Implications: *Clinical Pharmacokinetics* 35, 361–390. <https://doi.org/10.2165/00003088-199835050-00003>
- Liu, F., Huang, J., Ning, B., Liu, Z., Chen, S., Zhao, W., 2016. Drug Discovery via Human-Derived Stem Cell Organoids. *Front Pharmacol* 7, 334. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00334>
- Liu, X., Sui, B., Sun, J., 2017. Blood-brain barrier dysfunction induced by silica NPs in vitro and in vivo: Involvement of oxidative stress and Rho-kinase/JNK signaling pathways. *Biomaterials* 121, 64–82. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.01.006>
- Liu, Yuexian, Li, W., Lao, F., Liu, Ying, Wang, L., Bai, R., Zhao, Y., Chen, C., 2011. Intracellular dynamics of cationic and anionic polystyrene nanoparticles without direct interaction with mitotic spindle and chromosomes. *Biomaterials* 32, 8291–8303. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.07.037>
- Lomer, M.C., Thompson, R.P., Commisso, J., Keen, C.L., Powell, J.J., 2000. Determination of titanium dioxide in foods using inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Analyst* 125, 2339–2343. <https://doi.org/10.1039/b006285p>
- Lomer, M.C.E., Hutchinson, C., Volkert, S., Greenfield, S.M., Catterall, A., Thompson, R.P.H., Powell, J.J., 2004. Dietary sources of inorganic microparticles and their intake in healthy subjects and patients with Crohn's disease. *Br. J. Nutr.* 92, 947–955. <https://doi.org/10.1079/bjn20041276>
- Longmire, M., Choyke, P.L., Kobayashi, H., 2008. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. *Nanomedicine* 3, 703–717. <https://doi.org/10.2217/17435889.3.5.703>
- Loo, Y., Grigsby, C.L., Yamanaka, Y.J., Chellappan, M.K., Jiang, X., Mao, H.-Q., Leong, K.W., 2012. Comparative study of nanoparticle-mediated transfection in different GI epithelium co-culture models. *J Control Release* 160, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.041>
- Lozoya-Agullo, I., Araújo, F., González-Álvarez, I., Merino-Sanjuán, M., González-Álvarez, M., Bermejo, M., Sarmiento, B., 2017. Usefulness of Caco-2/HT29-MTX and Caco-2/HT29-MTX/Raji B Coculture Models To Predict Intestinal and Colonic Permeability Compared to Caco-2 Monoculture. *Mol. Pharmaceutics* 14, 1264–1270. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b01165>
- Lu, C.-W., Hung, Y., Hsiao, J.-K., Yao, M., Chung, T.-H., Lin, Y.-S., Wu, S.-H., Hsu, S.-C., Liu, H.-M., Mou, C.-Y., Yang, C.-S., Huang, D.-M., Chen, Y.-C., 2007. Bifunctional Magnetic Silica Nanoparticles for Highly Efficient Human Stem Cell Labeling. *Nano Lett.* 7, 149–154. <https://doi.org/10.1021/nl0624263>
- Lu, Z., Ding, L., Lu, Q., Chen, Y.-H., 2013. Claudins in intestines: Distribution and functional significance in health and diseases. *Tissue Barriers* 1, e24978. <https://doi.org/10.4161/tisb.24978>
- Luyendyk, J.P., Roth, R.A., Ganey, P.E., 2010. Inflammation and Hepatotoxicity, in: *Comprehensive Toxicology*. Elsevier, pp. 295–317. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01031-9>
- Ma, T.Y., Boivin, M.A., Ye, D., Pedram, A., Said, H.M., 2005. Mechanism of TNF- $\alpha$  modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288, G422–430. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00412.2004>

- Ma, T.Y., Hoa, N.T., Tran, D.D., Bui, V., Pedram, A., Mills, S., Merryfield, M., 2000. Cytochalasin B modulation of Caco-2 tight junction barrier: role of myosin light chain kinase. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 279, G875–G885. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2000.279.5.G875>
- Ma, Y., Li, Y., Zhong, X., 2014. Silica coating of luminescent quantum dots prepared in aqueous media for cellular labeling. *Materials Research Bulletin* 60, 543–551. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2014.08.033>
- Ma, Z., Lim, L.-Y., 2003. Uptake of Chitosan and Associated Insulin in Caco-2 Cell Monolayers: A Comparison Between Chitosan Molecules and Chitosan Nanoparticles. *Pharm Res* 20, 1812–1819. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.00000003379.76417.3e>
- MacAdam, A., 1993. The effect of gastro-intestinal mucus on drug absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews* 11, 201–220. [https://doi.org/10.1016/0169-409X\(93\)90010-2](https://doi.org/10.1016/0169-409X(93)90010-2)
- Madani, S.Y., Naderi, N., Dissanayake, O., Tan, A., Seifalian, A.M., 2011. A new era of cancer treatment: carbon nanotubes as drug delivery tools. *Int J Nanomedicine* 6, 2963–2979. <https://doi.org/10.2147/IJN.S16923>
- Madara, J.L., Barenberg, D., Carlson, S., 1986. Effects of cytochalasin D on occluding junctions of intestinal absorptive cells: further evidence that the cytoskeleton may influence paracellular permeability and junctional charge selectivity. *J. Cell Biol.* 102, 2125–2136. <https://doi.org/10.1083/jcb.102.6.2125>
- Madara, J.L., Moore, R., Carlson, S., 1987. Alteration of intestinal tight junction structure and permeability by cytoskeletal contraction. *Am. J. Physiol.* 253, C854–861. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1987.253.6.C854>
- Mahler, G.J., Esch, M.B., Tako, E., Southard, T.L., Archer, S.D., Glahn, R.P., Shuler, M.L., 2012. Oral exposure to polystyrene nanoparticles affects iron absorption. *Nat Nanotechnol* 7, 264–271. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.3>
- Manikandan, P., Nagini, S., 2018. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *CDT* 19. <https://doi.org/10.2174/1389450118666170125144557>
- Mao, Z., Zhou, X., Gao, C., 2013. Influence of structure and properties of colloidal biomaterials on cellular uptake and cell functions. *Biomaterials Science* 1, 896. <https://doi.org/10.1039/c3bm00137g>
- Marano, F., Rodrigues-Lima, F., Dupret, J.-M., Baeza-Squiban, A., Boland, S., 2016. Cellular Mechanisms of Nanoparticle Toxicity, in: Bhushan, B. (Ed.), *Encyclopedia of Nanotechnology*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 498–505. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-9780-1\\_175](https://doi.org/10.1007/978-94-017-9780-1_175)
- Marchetto, M.C.N., Yeo, G.W., Kainohana, O., Marsala, M., Gage, F.H., Muotri, A.R., 2009. Transcriptional Signature and Memory Retention of Human-Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS ONE* 4, e7076. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007076>
- Marra, F., 1999. Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation. *Journal of Hepatology* 31, 1106–1119. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(99\)80327-4](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(99)80327-4)
- Martirosyan, A., Bazes, A., Schneider, Y.-J., 2014. *In vitro* toxicity assessment of silver nanoparticles in the presence of phenolic compounds – preventive agents against the harmful effect? *Nanotoxicology* 8, 573–582. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.812258>
- Martirosyan, A., Polet, M., Bazes, A., Sergent, T., Schneider, Y.-J., 2012. Food Nanoparticles and Intestinal Inflammation: A Real Risk?, in: Szabo, I. (Ed.), *Inflammatory Bowel Disease*. InTech. <https://doi.org/10.5772/52887>
- McCracken, C., Zane, A., Knight, D.A., Dutta, P.K., Waldman, W.J., 2013. Minimal Intestinal Epithelial Cell Toxicity in Response to Short- and Long-Term Food-Relevant Inorganic Nanoparticle Exposure. *Chem. Res. Toxicol.* 26, 1514–1525. <https://doi.org/10.1021/tx400231u>

- McGuckin, M.A., Lindén, S.K., Sutton, P., Florin, T.H., 2011. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat Rev Microbiol* 9, 265–278. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2538>
- Medina, S.H., El-Sayed, M.E.H., 2009. Dendrimers as Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Agents. *Chem. Rev.* 109, 3141–3157. <https://doi.org/10.1021/cr900174j>
- Messner, S., Agarkova, I., Moritz, W., Kelm, J.M., 2013. Multi-cell type human liver microtissues for hepatotoxicity testing. *Arch Toxicol* 87, 209–213. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0968-2>
- Michaud, V., Turgeon, J., 2002. Les cytochromes P450 et leur rôle clinique. *Le Médecin du Québec* 37.
- Mičić, O.I., Nozik, A.J., 2002. Colloidal quantum dots of III–V semiconductors, in: *Nanostructured Materials and Nanotechnology*. Elsevier, pp. 183–205. <https://doi.org/10.1016/B978-012513920-5/50007-X>
- Ministère de l'Environnement, de l'Energie et de la Mer, 2016. Rapport R-nano 2016 - Elements issus des déclarations des substances à l'état nanoparticulaire - Rapport d'étude 2016.
- Mishra, V., Kesharwani, P., Jain, N., 2014. Functionalized Polymeric Nanoparticles for Delivery of Bioactives. p. pg 91-123.
- Mittal, B., Tulsyan, S., Kumar, S., Mittal, R.D., Agarwal, G., 2015. Cytochrome P450 in Cancer Susceptibility and Treatment, in: *Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier, pp. 77–139. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2015.06.003>
- Mohanta, D., Patnaik, S., Sood, S., Das, N., 2019. Carbon nanotubes: Evaluation of toxicity at biointerfaces. *Journal of Pharmaceutical Analysis* S2095177918305458. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.04.003>
- Monopoli, M.P., Åberg, C., Salvati, A., Dawson, K.A., 2012. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature Nanotech* 7, 779–786. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.207>
- Monteiro-Riviere, N.A., Inman, A.O., Zhang, L.W., 2009. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology* 234, 222–235. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.09.030>
- Mowat, A.McI., 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 3, 331–341. <https://doi.org/10.1038/nri1057>
- Mudshinge, S.R., Deore, A.B., Patil, S., Bhalgat, C.M., 2011. Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery. *Saudi Pharm J* 19, 129–141. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2011.04.001>
- Mukherjee, B., Chakraborty, S., Mondal, L., Satapathy, B.S., Sengupta, S., Dutta, L., Choudhury, A., Mandal, D., 2016. Multifunctional drug nanocarriers facilitate more specific entry of therapeutic payload into tumors and control multiple drug resistance in cancer, in: *Nanobiomaterials in Cancer Therapy*. Elsevier, pp. 203–251. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42863-7.00007-4>
- Naito, M., Hasegawa, G., Ebe, Y., Yamamoto, T., 2004. Differentiation and function of Kupffer cells. *Medical Electron Microscopy* 37, 16–28. <https://doi.org/10.1007/s00795-003-0228-x>
- Nan, A., Bai, X., Son, S.J., Lee, S.B., Ghandehari, H., 2008. Cellular Uptake and Cytotoxicity of Silica Nanotubes. *Nano Lett.* 8, 2150–2154. <https://doi.org/10.1021/nl0802741>
- Nebert, D.W., Karp, C.L., 2008. Endogenous functions of the aryl hydrocarbon receptor (AHR): intersection of cytochrome P450 1 (CYP1)-metabolized eicosanoids and AHR biology. *J. Biol. Chem.* 283, 36061–36065. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800053200>
- Nebert, D.W., Russell, D.W., 2002. Clinical importance of the cytochromes P450. *The Lancet* 360, 1155–1162. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11203-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11203-7)

- Nelson, K.F., Acosta, D., Bruckner, J.V., 1982. Long-term maintenance and induction of cytochrome P-450 in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology* 31, 2211–2214. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(82\)90521-4](https://doi.org/10.1016/0006-2952(82)90521-4)
- Nemoto, N., Sakurai, J., Funae, Y., 1995. Maintenance of Phenobarbital-Inducible Cyp2b Gene Expression in C57BL/6 Mouse Hepatocytes in Primary Culture as Spheroids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 316, 362–369. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1048>
- Ng, C.T., Tang, F.M.A., Li, J.J., Ong, C., Yung, L.L.Y., Bay, B.H., 2015. Clathrin-Mediated Endocytosis of Gold Nanoparticles *In Vitro*: Clathrin-Mediated Endocytosis Of AuNPs. *Anat. Rec.* 298, 418–427. <https://doi.org/10.1002/ar.23051>
- Nguyen, P., Leray, V., Diez, M., Serisier, S., Bloc'h, J.L., Siliart, B., Dumon, H., 2008. Liver lipid metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr* 92, 272–283. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2007.00752.x>
- Nguyen, T.-A., 2007. Relations structure - Fonction dans la superfamille des Cytochromes P450.
- Nguyen-Lefebvre, A.T., Horuzsko, A., 2015. Kupffer Cell Metabolism and Function. *J Enzymol Metab* 1.
- Nichols, G., Byard, S., Bloxham, M.J., Botterill, J., Dawson, N.J., Dennis, A., Diart, V., North, N.C., Sherwood, J.D., 2002. A Review of the Terms Agglomerate and Aggregate with a Recommendation for Nomenclature Used in Powder and Particle Characterization. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 91, 2103–2109. <https://doi.org/10.1002/jps.10191>
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113, 823–839. <https://doi.org/10.1289/ehp.7339>
- Oh, W.-K., Kim, S., Choi, M., Kim, C., Jeong, Y.S., Cho, B.-R., Hahn, J.-S., Jang, J., 2010. Cellular uptake, cytotoxicity, and innate immune response of silica-titania hollow nanoparticles based on size and surface functionality. *ACS Nano* 4, 5301–5313. <https://doi.org/10.1021/nm100561e>
- Olinga, P., Schuppan, D., 2013. Precision-cut liver slices: A tool to model the liver ex vivo. *Journal of Hepatology* 58, 1252–1253. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.01.009>
- Omura, T., Sato, R., 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification, and properties. *J. Biol. Chem.* 239, 2379–2385.
- Orbach, S.M., Less, R.R., Kothari, A., Rajagopalan, P., 2017. In Vitro Intestinal and Liver Models for Toxicity Testing. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 3, 1898–1910. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00699>
- Palocci, C., Valletta, A., Chronopoulou, L., Donati, L., Bramosanti, M., Brasili, E., Baldan, B., Pasqua, G., 2017. Endocytic pathways involved in PLGA nanoparticle uptake by grapevine cells and role of cell wall and membrane in size selection. *Plant Cell Rep* 36, 1917–1928. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2206-0>
- Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U., Schmid, G., Brandau, W., Jähnen-Dechent, W., 2007. Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. *Small* 3, 1941–1949. <https://doi.org/10.1002/smll.200700378>
- Panagi, Z., Beletsi, A., Evangelatos, G., Livaniou, E., Ithakissios, D.S., Avgoustakis, K., 2001. Effect of dose on the biodistribution and pharmacokinetics of PLGA and PLGA-mPEG nanoparticles. *Int J Pharm* 221, 143–152.
- Pandita, D., Poonia, N., Kumar, S., Lather, V., Madaan, K., 2014. Dendrimers in drug delivery and targeting: Drug-dendrimer interactions and toxicity issues. *J Pharm Bioall Sci* 6, 139. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.130965>

- Park, E.-J., Bae, E., Yi, J., Kim, Y., Choi, K., Lee, S.H., Yoon, J., Lee, B.C., Park, K., 2010. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 30, 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2010.05.004>
- Park, J.-K., Utsumi, T., Seo, Y.-E., Deng, Y., Satoh, A., Saltzman, W.M., Iwakiri, Y., 2016. Cellular distribution of injected PLGA-nanoparticles in the liver. *Nanomedicine* 12, 1365–1374. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.01.013>
- Park, Y., Jeong, S., Kim, S., 2017. Medically translatable quantum dots for biosensing and imaging. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 30, 51–70. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2017.01.002>
- Passagne, I., 2010. Évaluation de la toxicité des nanomatériaux : fiabilité/pertinence des techniques in vitro couramment utilisées et nouvelles pistes méthodologiques 5.
- Patel, A., Patel, M., Yang, X., Mitra, A.K., 2014. Recent advances in protein and Peptide drug delivery: a special emphasis on polymeric nanoparticles. *Protein Pept. Lett.* 21, 1102–1120. <https://doi.org/10.2174/0929866521666140807114240>
- Pedata, P., Ricci, G., Malorni, L., Venezia, A., Cammarota, M., Volpe, M.G., Iannaccone, N., Guida, V., Schiraldi, C., Romano, M., Iacomino, G., 2019. In vitro intestinal epithelium responses to titanium dioxide nanoparticles. *Food Research International* 119, 634–642. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.041>
- Pele, L.C., Thoree, V., Bruggraber, S.F.A., Koller, D., Thompson, R.P.H., Lomer, M.C., Powell, J.J., 2015. Pharmaceutical/food grade titanium dioxide particles are absorbed into the bloodstream of human volunteers. *Part Fibre Toxicol* 12, 26. <https://doi.org/10.1186/s12989-015-0101-9>
- Pelkonen, O., Turpeinen, M., Hakkola, J., Honkakoski, P., Hukkanen, J., Raunio, H., 2008. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch Toxicol* 82, 667–715. <https://doi.org/10.1007/s00204-008-0332-8>
- Pereira, C., Araújo, F., Barrias, C.C., Granja, P.L., Sarmiento, B., 2015. Dissecting stromal-epithelial interactions in a 3D in vitro cellularized intestinal model for permeability studies. *Biomaterials* 56, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.03.054>
- Peters, R., Kramer, E., Oomen, A.G., Herrera Rivera, Z.E., Oegema, G., Tromp, P.C., Fokkink, R., Rietveld, A., Marvin, H.J.P., Weigel, S., Peijnenburg, A.A.C.M., Bouwmeester, H., 2012. Presence of Nano-Sized Silica during *In Vitro* Digestion of Foods Containing Silica as a Food Additive. *ACS Nano* 6, 2441–2451. <https://doi.org/10.1021/nn204728k>
- Peterson, D.A., Frank, D.N., Pace, N.R., Gordon, J.I., 2008. Metagenomic Approaches for Defining the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Host & Microbe* 3, 417–427. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.05.001>
- Petros, R.A., DeSimone, J.M., 2010. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov* 9, 615–627. <https://doi.org/10.1038/nrd2591>
- Petzinger, E., Geyer, J., 2006. Drug transporters in pharmacokinetics. *Naunyn Schmied Arch Pharmacol* 372, 465–475. <https://doi.org/10.1007/s00210-006-0042-9>
- Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., Nowack, B., 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *J Nanopart Res* 14, 1109. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1109-9>
- Pillai, G.J., Greeshma, M.M., Menon, D., 2015. Impact of poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticle surface charge on protein, cellular and haematological interactions. *Colloids Surf B Biointerfaces* 136, 1058–1066. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.10.047>
- Poisson, J., Lemoine, S., Boulanger, C., Durand, F., Moreau, R., Valla, D., Rautou, P.-E., 2017. Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *Journal of Hepatology* 66, 212–227. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.07.009>

- Poland, C.A., Read, S.A.K., Varet, J., Carse, G., Christensen, F.M., Hankin, S.M., 2013. Dermal Absorption of Nanomaterials. Part of the “Better control of nano” initiative 2012-2015. The Danish Environmental Protection Agency.
- Pontier, C., Pachot, J., Botham, R., Lenfant, B., Arnaud, P., 2001. HT29-MTX and Caco-2/TC7 Monolayers as Predictive Models for Human Intestinal Absorption: Role of the Mucus Layer. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 90, 1608–1619. <https://doi.org/10.1002/jps.1111>
- Pradhan, N., Singh, S., Ojha, N., Shrivastava, A., Barla, A., Rai, V., Bose, S., 2015. Facets of Nanotechnology as Seen in Food Processing, Packaging, and Preservation Industry. *BioMed Research International* 2015, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2015/365672>
- Prylutska, S.V., Burlaka, A.P., Klymenko, P.P., Grynyuk, I.I., Prylutsky, Yu.I., Schütze, Ch., Ritter, U., 2011. Using water-soluble C60 fullerenes in anticancer therapy. *Cancer Nano* 2, 105–110. <https://doi.org/10.1007/s12645-011-0020-x>
- Qiu, Y., Chen, Y., Zhang, G.G.Z., Yu, L.X., Mantri, R.V. (Eds.), 2017. *Developing solid oral dosage forms: pharmaceutical theory & practice*, Second edition. ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston.
- Rahman, I.A., Padavettan, V., 2012. Synthesis of Silica Nanoparticles by Sol-Gel: Size-Dependent Properties, Surface Modification, and Applications in Silica-Polymer Nanocomposites—A Review. *Journal of Nanomaterials* 2012, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2012/132424>
- Rao, R., 2008. Oxidative Stress-Induced Disruption of Epithelial and Endothelial Tight Junctions. *Front Biosci* 13, 7210–7226.
- Reboldi, A., Cyster, J.G., 2016. Peyer’s patches: organizing B-cell responses at the intestinal frontier. *Immunol. Rev.* 271, 230–245. <https://doi.org/10.1111/imr.12400>
- Recommandation de la Commission du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux, 2011. *Journal officiel de l’Union européenne* 2011/696/UE, 3.
- RÈGLEMENT (UE) 2018/1881 DE LA COMMISSION - du 3 décembre 2018 - modifiant les annexes I, III, VI, VII, VIII, IX, X, XI, et XII du règlement (CE) no 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil concernant l’enregistrement, l’évaluation et l’autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), aux fins de couvrir les nanofformes des substances, 2018. *Journal officiel de l’Union européenne* L308/1, 20.
- Rezvantalab, S., Drude, N.I., Moraveji, M.K., Güvener, N., Koons, E.K., Shi, Y., Lammers, T., Kiessling, F., 2018. PLGA-Based Nanoparticles in Cancer Treatment. *Front Pharmacol* 9, 1260. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01260>
- Riccalton-Banks, L., Liew, C., Bhandari, R., Fry, J., Shakesheff, K., 2003. Long-term culture of functional liver tissue: three-dimensional coculture of primary hepatocytes and stellate cells. *Tissue Eng.* 9, 401–410. <https://doi.org/10.1089/107632703322066589>
- Richards, D.A., Maruani, A., Chudasama, V., 2017. Antibody fragments as nanoparticle targeting ligands: a step in the right direction. *Chem. Sci.* 8, 63–77. <https://doi.org/10.1039/C6SC02403C>
- Riento, K., Ridley, A.J., 2003. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 446–456. <https://doi.org/10.1038/nrm1128>
- Rigor, R.R., Shen, Q., Pivetti, C.D., Wu, M.H., Yuan, S.Y., 2013. Myosin light chain kinase signaling in endothelial barrier dysfunction. *Med Res Rev* 33, 911–933. <https://doi.org/10.1002/med.21270>
- Rodgers, L.S., Fanning, A.S., 2011. Regulation of epithelial permeability by the actin cytoskeleton. *Cytoskeleton* 68, 653–660. <https://doi.org/10.1002/cm.20547>



- Rodríguez, J.M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R.P., Kober, O.I., Juge, N., Avershina, E., Rudi, K., Narbad, A., Jenmalm, M.C., Marchesi, J.R., Collado, M.C., 2015. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial Ecology in Health & Disease* 26. <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.26050>
- Rogers, K.R., Bradham, K., Tolaymat, T., Thomas, D.J., Hartmann, T., Ma, L., Williams, A., 2012. Alterations in physical state of silver nanoparticles exposed to synthetic human stomach fluid. *Sci. Total Environ.* 420, 334–339. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.01.044>
- Rosenbaum, J., Mavrier, P., Dhumeaux, D., 1991. Interactions cellulaires dans le foie. *Med Sci (Paris)* 7, 110. <https://doi.org/10.4267/10608/4319>
- Ruenraroengsak, P., Cook, J.M., Florence, A.T., 2010. Nanosystem drug targeting: Facing up to complex realities. *Journal of Controlled Release* 141, 265–276. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.10.032>
- Ryman-Rasmussen, J.P., Riviere, J.E., Monteiro-Riviere, N.A., 2007. Surface coatings determine cytotoxicity and irritation potential of quantum dot nanoparticles in epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 127, 143–153. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700508>
- Ryter, S.W., Kim, H.P., Hoetzel, A., Park, J.W., Nakahira, K., Wang, X., Choi, A.M.K., 2007. Mechanisms of Cell Death in Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling* 9, 49–89. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.9.49>
- Sadauskas, E., Danscher, G., Stoltenberg, M., Vogel, U., Larsen, A., Wallin, H., 2009. Protracted elimination of gold nanoparticles from mouse liver. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 5, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2008.11.002>
- Sahay, G., Alakhova, D.Y., Kabanov, A.V., 2010a. Endocytosis of nanomedicines. *Journal of Controlled Release* 145, 182–195. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.01.036>
- Sahay, G., Kim, J.O., Kabanov, A.V., Bronich, T.K., 2010b. The exploitation of differential endocytic pathways in normal and tumor cells in the selective targeting of nanoparticulate chemotherapeutic agents. *Biomaterials* 31, 923–933. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.101>
- Sahin, A., Esendagli, G., Yerlikaya, F., Caban-Toktas, S., Yoyen-Ermis, D., Horzum, U., Aktas, Y., Khan, M., Couvreur, P., Capan, Y., 2017. A small variation in average particle size of PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation leads to considerable change in nanoparticles' characteristics and efficacy of intracellular delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 45, 1657–1664. <https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1276924>
- Sahu, S.C., Hayes, A.W., 2017. Toxicity of nanomaterials found in human environment: A literature review. *Toxicology Research and Application* 1, 239784731772635. <https://doi.org/10.1177/2397847317726352>
- Sakai-Kato, K., Hidaka, M., Un, K., Kawanishi, T., Okuda, H., 2014. Physicochemical properties and in vitro intestinal permeability properties and intestinal cell toxicity of silica particles, performed in simulated gastrointestinal fluids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1840, 1171–1180. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.12.014>
- Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M.L., Stammati, A., Zucco, F., 2005. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* 21, 1–26. <https://doi.org/10.1007/s10565-005-0085-6>
- Samer, C.F., Desmeules, J.A., Rossier, M.F., Hochstrasser, D., Dayer, P., 2004. Le polymorphisme génétique du cytochrome P450 2D6: le Bon, l'Ultraparapide, l'Intermédiaire et le Lent. *Rev Med Suisse.*

- Sarmiento, B., Andrade, F., Silva, S.B. da, Rodrigues, F., das Neves, J., Ferreira, D., 2012. Cell-based *in vitro* models for predicting drug permeability. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 8, 607–621. <https://doi.org/10.1517/17425255.2012.673586>
- Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., Clevers, H., 2009. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262–265. <https://doi.org/10.1038/nature07935>
- Sauer, U.G., Kneuer, C., Tentschert, J., Wächter, T., Schroeder, M., Butzke, D., Luch, A., Liebsch, M., Grune, B., Götz, M.E., 2011. A knowledge-based search engine to navigate the information thicket of nanotoxicology. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 59, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2010.09.005>
- Schaeublin, N.M., Braydich-Stolle, L.K., Schrand, A.M., Miller, J.M., Hutchison, J., Schlager, J.J., Hussain, S.M., 2011. Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity. *Nanoscale* 3, 410–420. <https://doi.org/10.1039/c0nr00478b>
- Schinazi, R.F., Sijbesma, R., Srdanov, G., Hill, C.L., Wudl, F., 1993. Synthesis and virucidal activity of a water-soluble, configurationally stable, derivatized C60 fullerene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37, 1707–1710. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.8.1707>
- Schleh, C., Semmler-Behnke, M., Lipka, J., Wenk, A., Hirn, S., Schäffler, M., Schmid, G., Simon, U., Kreyling, W.G., 2012. Size and surface charge of gold nanoparticles determine absorption across intestinal barriers and accumulation in secondary target organs after oral administration. *Nanotoxicology* 6, 36–46. <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.552811>
- Schübbe, S., Schumann, C., Cavelius, C., Koch, M., Müller, T., Kraegeloh, A., 2012. Size-Dependent Localization and Quantitative Evaluation of the Intracellular Migration of Silica Nanoparticles in Caco-2 Cells. *Chemistry of Materials* 24, 914–923. <https://doi.org/10.1021/cm2018532>
- Sender, R., Fuchs, S., Milo, R., 2016. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol* 14, e1002533. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>
- Shaker, A., Rubin, D.C., 2012. Stem cells: One step closer to gut repair. *Nature* 485, 181–182. <https://doi.org/10.1038/485181a>
- Shakweh, M., Ponchel, G., Fattal, E., 2004. Particle uptake by Peyer's patches: a pathway for drug and vaccine delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* 1, 141–163. <https://doi.org/10.1517/17425247.1.1.141>
- Shatrohan Lal, R.K., 2014. Synthesis of Organic Nanoparticles and their Applications in Drug Delivery and Food Nanotechnology: A Review. *J Nanomater Mol Nanotechnol* 03. <https://doi.org/10.4172/2324-8777.1000150>
- Shen, C., Zhang, G., Qiu, H., Meng, Q., 2006. Acetaminophen-induced hepatotoxicity of gel entrapped rat hepatocytes in hollow fibers. *Chemico-Biological Interactions* 162, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.05.005>
- Shen, L., 2012. Tight junctions on the move: molecular mechanisms for epithelial barrier regulation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1258, 9–18. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06613.x>
- Sheth, P., Delos Santos, N., Seth, A., LaRusso, N.F., Rao, R.K., 2007. Lipopolysaccharide disrupts tight junctions in cholangiocyte monolayers by a c-Src-, TLR4-, and LBP-dependent mechanism. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 293, G308–G318. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00582.2006>
- Shi, H., Magaye, R., Castranova, V., Zhao, J., 2013. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and Fibre Toxicology* 10, 15. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-15>

- Sinnecker, H., Ramaker, K., Frey, A., 2014. Coating with luminal gut-constituents alters adherence of nanoparticles to intestinal epithelial cells. *Beilstein J Nanotechnol* 5, 2308–2315. <https://doi.org/10.3762/bjnano.5.239>
- Soldatow, V.Y., LeCluyse, E.L., Griffith, L.G., Rusyn, I., 2013. In vitro models for liver toxicity testing. *Toxicol. Res.* 2, 23–39. <https://doi.org/10.1039/C2TX20051A>
- Son, K.H., Hong, J.H., Lee, J.W., 2016. Carbon nanotubes as cancer therapeutic carriers and mediators. *IJN Volume* 11, 5163–5185. <https://doi.org/10.2147/IJN.S112660>
- Specian, R.D., Oliver, M.G., 1991. Functional biology of intestinal goblet cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 260, C183–C193. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1991.260.2.C183>
- Starokozhko, V., Abza, G.B., Maessen, H.C., Merema, M.T., Kuper, F., Groothuis, G.M.M., 2015. Viability, function and morphological integrity of precision-cut liver slices during prolonged incubation: Effects of culture medium. *Toxicol In Vitro* 30, 288–299. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.10.008>
- Stetefeld, J., McKenna, S.A., Patel, T.R., 2016. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev* 8, 409–427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>
- Stevenson, B.R., Begg, D.A., 1994. Concentration-dependent effects of cytochalasin D on tight junctions and actin filaments in MDCK epithelial cells. *J. Cell. Sci.* 107 ( Pt 3), 367–375.
- Stöber, W., Fink, A., Bohn, E., 1968. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science* 26, 62–69. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(68\)90272-5](https://doi.org/10.1016/0021-9797(68)90272-5)
- Suffredini, G., East, J.E., Levy, L.M., 2014. New Applications of Nanotechnology for Neuroimaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 35, 1246–1253. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A3543>
- Sung, J.H., Yu, J., Luo, D., Shuler, M.L., March, J.C., 2011. Microscale 3-D hydrogel scaffold for biomimetic gastrointestinal (GI) tract model. *Lab Chip* 11, 389–392. <https://doi.org/10.1039/c0lc00273a>
- Suzuki, T., Hara, H., 2011. Role of flavonoids in intestinal tight junction regulation. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 22, 401–408. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.08.001>
- Suzuki, T., Yoshinaga, N., Tanabe, S., 2011. Interleukin-6 (IL-6) Regulates Claudin-2 Expression and Tight Junction Permeability in Intestinal Epithelium. *Journal of Biological Chemistry* 286, 31263–31271. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.238147>
- Taburet, A.M., Furlan, V., 2000. Le système des cytochromes P450 : définition, rôle et implication dans la pharmacocinétique des anti-infectieux. *M iSE AU POINT* 6.
- Talavera, D., Castillo, A.M., Dominguez, M.C., Gutierrez, A.E., Meza, I., 2004. IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *J. Gen. Virol.* 85, 1801–1813. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19652-0>
- Tan, J.S., Butterfield, D.E., Voycheck, C.L., Caldwell, K.D., Li, J.T., 1993. Surface modification of nanoparticles by PEO/PPO block copolymers to minimize interactions with blood components and prolong blood circulation in rats. *Biomaterials* 14, 823–833. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(93\)90004-1](https://doi.org/10.1016/0142-9612(93)90004-1)
- Tang, H., Xu, M., Shi, F., Ye, G., Lv, C., Luo, J., Zhao, L., Li, Y., 2018. Effects and Mechanism of Nano-Copper Exposure on Hepatic Cytochrome P450 Enzymes in Rats. *IJMS* 19, 2140. <https://doi.org/10.3390/ijms19072140>
- Tarabova, L., Makova, Z., Piesova, E., Szaboova, R., Faixova, Z., 2016. Intestinal Mucus Layer and Mucins (A Review). *Folia Veterinaria* 60, 21–25. <https://doi.org/10.1515/fv-2016-0003>

- Tarantini, A., Lancelleur, R., Mourot, A., Lavault, M.-T., Casterou, G., Jarry, G., Hogeveen, K., Fessard, V., 2015. Toxicity, genotoxicity and proinflammatory effects of amorphous nanosilica in the human intestinal Caco-2 cell line. *Toxicology in Vitro* 29, 398–407. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.10.023>
- Taylor, A.A., Marcus, I.M., Guysi, R.L., Walker, S.L., 2015. Metal Oxide Nanoparticles Induce Minimal Phenotypic Changes in a Model Colon Gut Microbiota. *Environmental Engineering Science* 32, 602–612. <https://doi.org/10.1089/ees.2014.0518>
- The Lycurgus Cup [WWW Document]. British Museum. URL [https://www.britishmuseum.org/research/collection\\_online/collection\\_object\\_details.aspx?objectId=61219&partId=1&searchText=Lycurgus+Cup&page=1](https://www.britishmuseum.org/research/collection_online/collection_object_details.aspx?objectId=61219&partId=1&searchText=Lycurgus+Cup&page=1) (accessed 7.6.19).
- Thursby, E., Juge, N., 2017. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem. J.* 474, 1823–1836. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>
- Tiwari, D.K., Jin, T., Behari, J., 2011. Dose-dependent in-vivo toxicity assessment of silver nanoparticle in Wistar rats. *Toxicology Mechanisms and Methods* 21, 13–24. <https://doi.org/10.3109/15376516.2010.529184>
- Tobin, D.J., 2006. Biochemistry of human skin—our brain on the outside. *Chem. Soc. Rev.* 35, 52–67. <https://doi.org/10.1039/B505793K>
- Tolson, A.H., Wang, H., 2010. Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62, 1238–1249. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.08.006>
- Tompkins, L.M., Wallace, A.D., 2007. Mechanisms of cytochrome P450 induction. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 21, 176–181.
- Trouiller, B., Reliene, R., Westbrook, A., Solaimani, P., Schiestl, R.H., 2009. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer Res.* 69, 8784–8789. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2496>
- Tsukamoto, H., 1999. Cytokine Regulation of Hepatic Stellate Cells in Liver Fibrosis. *Alcoholism Clin Exp Res* 23, 911–916. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1999.tb04202.x>
- Tsuzuki, T., 2009. Commercial scale production of inorganic nanoparticles. *IJNT* 6, 567. <https://doi.org/10.1504/IJNT.2009.024647>
- Ulluwishewa, D., Anderson, R.C., McNabb, W.C., Moughan, P.J., Wells, J.M., Roy, N.C., 2011. Regulation of Tight Junction Permeability by Intestinal Bacteria and Dietary Components. *The Journal of Nutrition* 141, 769–776. <https://doi.org/10.3945/jn.110.135657>
- Valenzuela, P., Simon, J.A., 2012. Nanoparticle delivery for transdermal HRT. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 8, S83–S89. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.05.008>
- van Breemen, R.B., Li, Y., 2005. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 1, 175–185. <https://doi.org/10.1517/17425255.1.2.175>
- van den Brule, S., Ambroise, J., Lecloux, H., Levard, C., Soulas, R., De Temmerman, P.-J., Palmari-Pallag, M., Marbaix, E., Lison, D., 2015. Dietary silver nanoparticles can disturb the gut microbiota in mice. *Part Fibre Toxicol* 13, 38. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0149-1>
- Van Itallie, C.M., Anderson, J.M., 2014. Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Semin. Cell Dev. Biol.* 36, 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.08.011>
- Van Itallie, C.M., Fanning, A.S., Bridges, A., Anderson, J.M., 2009. ZO-1 stabilizes the tight junction solute barrier through coupling to the perijunctional cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* 20, 3930–3940. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-04-0320>

- Van Spaendonk, H., Ceuleers, H., Witters, L., Patteet, E., Joossens, J., Augustyns, K., Lambeir, A.-M., De Meester, I., De Man, J.G., De Winter, B.Y., 2017. Regulation of intestinal permeability: The role of proteases. *World J. Gastroenterol.* 23, 2106–2123. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i12.2106>
- Vancamelbeke, M., Vermeire, S., 2017. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 11, 821–834. <https://doi.org/10.1080/17474124.2017.1343143>
- Vance, M.E., Kuiken, T., Vejerano, E.P., McGinnis, S.P., Hochella, M.F., Rejeski, D., Hull, M.S., 2015. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J Nanotechnol* 6, 1769–1780. <https://doi.org/10.3762/bjnano.6.181>
- Vandebriel, R.J., De Jong, W.H., 2012. A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles. *Nanotechnol Sci Appl* 5, 61–71. <https://doi.org/10.2147/NSA.S23932>
- Vasir, J.K., Labhasetwar, V., 2006. Polymeric nanoparticles for gene delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* 3, 325–344. <https://doi.org/10.1517/17425247.3.3.325>
- Vauthier, C., 2016. Methods for the Preparation of Nanoparticles by Polymerization, in: Vauthier, C., Ponchel, G. (Eds.), *Polymer Nanoparticles for Nanomedicines*. Springer International Publishing, Cham, pp. 123–157. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-41421-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-41421-8_5)
- Venkatraman, G., Ramya, Shruthilaya, Akila, Ganga, Suresh Kumar, Yoganathan, Santosham, R., Ponraju, 2012. Nanomedicine: towards development of patient-friendly drug-delivery systems for oncological applications. *IJN* 1043. <https://doi.org/10.2147/IJN.S25182>
- Verma, G., Rajagopalan, M.D., Valluru, R., Sridhar, K.A., 2017. Nanoparticles: A Novel Approach to Target Tumors, in: *Nano- and Microscale Drug Delivery Systems*. Elsevier, pp. 113–129. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52727-9.00007-8>
- Vernon, H., Kasi, A., 2019. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Liver, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Vetrano, S., Rescigno, M., Cera, M.R., Correale, C., Rumio, C., Doni, A., Fantini, M., Sturm, A., Borroni, E., Repici, A., Locati, M., Malesci, A., Dejana, E., Danese, S., 2008. Unique role of junctional adhesion molecule-a in maintaining mucosal homeostasis in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 135, 173–184. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.04.002>
- Vindigni, S.M., Zisman, T.L., Suskind, D.L., Damman, C.J., 2016. The intestinal microbiome, barrier function, and immune system in inflammatory bowel disease: a tripartite pathophysiological circuit with implications for new therapeutic directions. *Therap Adv Gastroenterol* 9, 606–625. <https://doi.org/10.1177/1756283X16644242>
- Vines, J.B., Yoon, J.-H., Ryu, N.-E., Lim, D.-J., Park, H., 2019. Gold Nanoparticles for Photothermal Cancer Therapy. *Front Chem* 7, 167. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00167>
- Vinken, M., Decroock, E., Doktorova, T., Ramboer, E., De Vuyst, E., Vanhaecke, T., Leybaert, L., Rogiers, V., 2011. Characterization of spontaneous cell death in monolayer cultures of primary hepatocytes. *Arch Toxicol* 85, 1589–1596. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0703-4>
- Vinken, M., Hengstler, J.G., 2018. Characterization of hepatocyte-based in vitro systems for reliable toxicity testing. *Arch Toxicol* 92, 2981–2986. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2297-6>
- Vllasaliu, D., Exposito-Harris, R., Heras, A., Casettari, L., Garnett, M., Illum, L., Stolnik, S., 2010. Tight junction modulation by chitosan nanoparticles: Comparison with chitosan solution. *International Journal of Pharmaceutics* 400, 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.08.020>

- Vogt, A., Combadiere, B., Hadam, S., Stieler, K.M., Lademann, J., Schaefer, H., Autran, B., Sterry, W., Blume-Peytavi, U., 2006. 40nm, but not 750 or 1,500nm, Nanoparticles Enter Epidermal CD1a+ Cells after Transcutaneous Application on Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology* 126, 1316–1322. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700226>
- Walczak, A.P., Fokkink, R., Peters, R., Tromp, P., Herrera Rivera, Z.E., Rietjens, I.M.C.M., Hendriksen, P.J.M., Bouwmeester, H., 2012. Behaviour of silver nanoparticles and silver ions in an *in vitro* human gastrointestinal digestion model. *Nanotoxicology* 7, 1198–1210. <https://doi.org/10.3109/17435390.2012.726382>
- Walde, P., Ichikawa, S., 2001. Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. *Biomolecular Engineering* 18, 143–177. [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(01\)00088-0](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(01)00088-0)
- Walker, A.W., Ince, J., Duncan, S.H., Webster, L.M., Holtrop, G., Ze, X., Brown, D., Stares, M.D., Scott, P., Bergerat, A., Louis, P., McIntosh, F., Johnstone, A.M., Lobley, G.E., Parkhill, J., Flint, H.J., 2011. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J* 5, 220–230. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.118>
- Walter, P., Welcomme, E., Hallégot, P., Zaluzec, N.J., Deeb, C., Castaing, J., Veysseyre, P., Bréniaux, R., Lévêque, J.-L., Tsoucaris, G., 2006. Early Use of PbS Nanotechnology for an Ancient Hair Dyeing Formula. *Nano Lett.* 6, 2215–2219. <https://doi.org/10.1021/nl061493u>
- Wang, Y., Li, P., Truong-Dinh Tran, T., Zhang, J., Kong, L., 2016. Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer. *Nanomaterials* 6, 26. <https://doi.org/10.3390/nano6020026>
- Wang, Z., Hop, C.E., Leung, K.H., Pang, J., 2000. Determination of *in vitro* permeability of drug candidates through a caco-2 cell monolayer by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 35, 71–76. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9888\(200001\)35:1<71:AID-JMS915>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(200001)35:1<71:AID-JMS915>3.0.CO;2-5)
- Weber, C.R., 2012. Dynamic properties of the tight junction barrier: Dynamic properties of the tight junction barrier. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1257, 77–84. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06528.x>
- Wei, H., Zhang, X.-Z., Chen, W.-Q., Cheng, S.-X., Zhuo, R.-X., 2007. Self-assembled thermosensitive micelles based on poly(L-lactide-star block-N-isopropylacrylamide) for drug delivery. *J. Biomed. Mater. Res.* 83A, 980–989. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31295>
- Weir, A., Westerhoff, P., Fabricius, L., Hristovski, K., von Goetz, N., 2012. Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products. *Environ. Sci. Technol.* 46, 2242–2250. <https://doi.org/10.1021/es204168d>
- Weiskirchen, R., Tacke, F., 2014. Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology. *Hepatobiliary Surg Nutr* 3, 344–363. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2014.11.03>
- Wen, Z., Li, G., Lin, D.-H., Wang, J.-T., Qin, L.-F., Guo, G.-P., 2013. [Transport of PLGA nanoparticles across Caco-2/HT29-MTX co-cultured cells]. *Yao Xue Xue Bao* 48, 1829–1835.
- Weng, Y., Liu, J., Jin, S., Guo, W., Liang, X., Hu, Z., 2017. Nanotechnology-based strategies for treatment of ocular disease. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 7, 281–291. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.09.001>
- Werck-Reichhart, D., Feyereisen, R., 2000. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol.* 1, REVIEWS3003. <https://doi.org/10.1186/gb-2000-1-6-reviews3003>

- Westerhout, J., Wortelboer, H., Verhoeckx, K., 2015. Ussing Chamber, in: Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H. (Eds.), *The Impact of Food Bioactives on Health*. Springer International Publishing, Cham, pp. 263–273. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4\\_24](https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_24)
- Wijnen, P. a. H.M., Op den Buijsch, R. a. M., Drent, M., Kuijpers, P.M.J.C., Kuipers, P.M.J.C., Neef, C., Bast, A., Bekers, O., Koek, G.H., 2007. Review article: The prevalence and clinical relevance of cytochrome P450 polymorphisms. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 26 Suppl 2, 211–219. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03490.x>
- Williams, K.M., Gokulan, K., Cerniglia, C.E., Khare, S., 2016. Size and dose dependent effects of silver nanoparticle exposure on intestinal permeability in an in vitro model of the human gut epithelium. *J Nanobiotechnology* 14, 62. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0214-9>
- Win, K.Y., Feng, S.-S., 2005. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* 26, 2713–2722. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.07.050>
- Witschger, O., Fabriès, J.-F., 2005. Particules ultra-fines et santé au travail - Caractéristiques et effets potentiels sur la santé. INRS - Hygiène et sécurité du travail.
- World Health Organization, 1993. *Guidelines for drinking-water quality*, 2nd ed. ed. World Health Organization, Geneva.
- Wu, M., Huang, S., 2017. Magnetic nanoparticles in cancer diagnosis, drug delivery and treatment. *Mol Clin Oncol* 7, 738–746. <https://doi.org/10.3892/mco.2017.1399>
- Xiong, S., George, S., Yu, H., Damoiseaux, R., France, B., Ng, K.W., Loo, J.S.-C., 2013. Size influences the cytotoxicity of poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles. *Arch. Toxicol.* 87, 1075–1086. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0938-8>
- Xu, W., Ling, P., Zhang, T., 2013. Polymeric Micelles, a Promising Drug Delivery System to Enhance Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs. *Journal of Drug Delivery* 2013, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2013/340315>
- Xu, X., An, H., Zhang, D., Tao, H., Dou, Y., Li, X., Huang, J., Zhang, J., 2019. A self-illuminating nanoparticle for inflammation imaging and cancer therapy. *Sci. Adv.* 5, eaat2953. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aat2953>
- Xu, Z.P., Niebert, M., Porazik, K., Walker, T.L., Cooper, H.M., Middelberg, A.P.J., Gray, P.P., Bartlett, P.F., Lu, G.Q. (Max), 2008. Subcellular compartment targeting of layered double hydroxide nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 130, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.05.021>
- Yah, C.S., Simate, G.S., Iyuke, S.E., 2012. Nanoparticles toxicity and their routes of exposures. *Pak J Pharm Sci* 25, 477–491.
- Yang, H., Liu, C., Yang, D., Zhang, H., Xi, Z., 2009. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *J. Appl. Toxicol.* 29, 69–78. <https://doi.org/10.1002/jat.1385>
- Yao, M., He, L., McClements, D.J., Xiao, H., 2015. Uptake of Gold Nanoparticles by Intestinal Epithelial Cells: Impact of Particle Size on Their Absorption, Accumulation, and Toxicity. *J. Agric. Food Chem.* 63, 8044–8049. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03242>
- Ye, D., Bramini, M., Hristov, D.R., Wan, S., Salvati, A., Åberg, C., Dawson, K.A., 2017. Low uptake of silica nanoparticles in Caco-2 intestinal epithelial barriers. *Beilstein J. Nanotechnol.* 8, 1396–1406. <https://doi.org/10.3762/bjnano.8.141>

- Yu, L.C.-H., 2018. Microbiota dysbiosis and barrier dysfunction in inflammatory bowel disease and colorectal cancers: exploring a common ground hypothesis. *J. Biomed. Sci.* 25, 79. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0483-8>
- Yu, Yang, Li, Yang, Wang, W., Jin, M., Du, Z., Li, Yanbo, Duan, J., Yu, Yongbo, Sun, Z., 2013. Acute Toxicity of Amorphous Silica Nanoparticles in Intravenously Exposed ICR Mice. *PLoS ONE* 8, e61346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061346>
- Zanger, U.M., Schwab, M., 2013. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics* 138, 103–141. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>
- Zeigerer, A., Wuttke, A., Marsico, G., Seifert, S., Kalaidzidis, Y., Zerial, M., 2017. Functional properties of hepatocytes in vitro are correlated with cell polarity maintenance. *Experimental Cell Research* 350, 242–252. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.11.027>
- Zeissig, S., Bürgel, N., Günzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A.J., Zeitz, M., Fromm, M., Schulzke, J.-D., 2007. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 56, 61–72. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.094375>
- Zhang, 2010. Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes. *IJN* 771. <https://doi.org/10.2147/IJN.S8428>
- Zhang, H., Wu, Q., Berezin, M.Y., 2015. Fluorescence anisotropy (polarization): from drug screening to precision medicine. *Expert Opin Drug Discov* 10, 1145–1161. <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1075001>
- Zhang, Y.-N., Poon, W., Tavares, A.J., McGilvray, I.D., Chan, W.C.W., 2016. Nanoparticle–liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination. *Journal of Controlled Release*. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.020>
- Zhao, M.-X., Zeng, E.-Z., 2015. Application of functional quantum dot nanoparticles as fluorescence probes in cell labeling and tumor diagnostic imaging. *Nanoscale Res Lett* 10, 171. <https://doi.org/10.1186/s11671-015-0873-8>
- Zhou, S.-F., Liu, J.-P., Chowbay, B., 2009. Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metabolism Reviews* 41, 89–295. <https://doi.org/10.1080/03602530902843483>
- Zhou, Y., Quan, G., Wu, Q., Zhang, X., Niu, B., Wu, B., Huang, Y., Pan, X., Wu, C., 2018. Mesoporous silica nanoparticles for drug and gene delivery. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 8, 165–177. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.01.007>
- Zhou, Z., Xu, M.-J., Gao, B., 2016. Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. *Cell Mol Immunol* 13, 301–315. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.97>
- Zouiten-Mekki, L., Serghini, M., Fekih, M., Kallel, L., Matri, S., Ben Mustapha, N., Boubaker, J., Filali, A., 2013. Rôle de la cellule épithéliale dans l'homéostasie intestinale et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Med Sci (Paris)* 29, 1145–1150. <https://doi.org/10.1051/medsci/20132912019>





# ANNEXES

---



## Liste des communications orales

- Cornu R., Chrétien C., Béduneau A., Martin H. **Différences interespèces dans l'activité des cytochromes P450 d'hépatocytes exposés à des nanoparticules de PLGA et de silice : étude *in vitro* et *in vivo*.** *Société de Biologie de Besançon, Besançon, Décembre 2017*  
⇒ 1<sup>er</sup> prix des communications orales obtenu
- Cornu R., Chrétien C., Béduneau A., Martin H. **Les nanoparticules de dioxyde de silice impactent la perméabilité intestinale.** *Journée de la FHU InCREASE (Fédération Hospitalo-Universitaire Integrated Center for REsearch in inflammatory diseASes), Besançon, Avril 2018*  
⇒ 1<sup>er</sup> prix des communications orales obtenu
- Cornu R., Chrétien C., Béduneau A., Martin H. **Les nanoparticules de silice impactent la perméabilité de la barrière intestinale humaine.** *Forum des Jeunes Chercheurs, Besançon, Juin 2018*
- Cornu R., Chrétien C., Pellequer Y., Martin H., Béduneau A. *Congrès SFNano C'Nano, Dijon, Décembre 2019 : en cours de préparation.*

## Liste des communications affichées

- Cornu R., Béduneau A., Martin H. **Sécurité des nanomédicaments : Evaluation de la toxicité hépatique de nanoparticules de PLGA.** *Forum des Jeunes Chercheurs, Dijon, Juin 2017*  
⇒ Poster n°1
- Cornu R., Chrétien C., Béduneau A., Martin H. **Silica nanoparticles impact the permeability of the human intestinal barrier.** *Congrès Eurotox 2018, Bruxelles, Septembre 2018*  
⇒ Poster n°2
- Cornu R., Chrétien C., Béduneau A., Martin H. **Transient opening of intestinal tight junctions induced by small silica nanoparticles.** *Congrès de la Société Française de Toxicologie (SFT), Lille, Novembre 2018*  
⇒ Poster n°3
- Cornu R., Chrétien C., Pellequer Y., Martin H., Béduneau A. *Congrès de la Société Française de Toxicologie (SFT), Paris, Novembre 2019*  
⇒ Poster n°4 en cours de préparation

**Poster n°1**

**Sécurité des nanomédicaments : Evaluation de la toxicité hépatique  
de nanoparticules de PLGA.**

Cornu R., Béduneau A., Martin H.

Forum des Jeunes Chercheurs

Dijon, Juin 2017



CORNU R., BEDUNEAU A., MARTIN H.

EA4267 – Pathologies et Epithéliums : Prévention, Innovation, Traitements, Evaluation  
UFR Sciences Médicales et Pharmaceutiques, 19 rue Ambroise Paré, 25000 Besançon

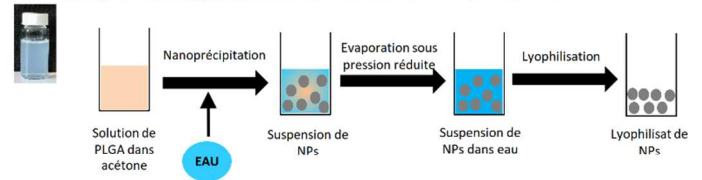
## INTRODUCTION :

- Les nanoparticules (NPs) représentent une classe majeure de **nanomédicaments**. L'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA) est très largement utilisé pour la synthèse des NPs polymériques. Les NPs de PLGA sont utilisées avec succès dans des traitements anticancéreux, maladies inflammatoires ou les vaccinations [1].
- Seulement 5 minutes après injection *i.v.*, 2/3 des NPs de PLGA sont localisées dans le foie [2], organe majeur de détoxification via les cytochromes P450 (CYP).
- En fonction de leurs propriétés (taille, charge...), les NPs de PLGA sont éliminées par phagocytose par les cellules de Kupffer ou métabolisées par les hépatocytes [3].

➔ **Nécessité d'étudier l'effet des NPs de PLGA sur la fonction hépatique, en particulier sur l'activité métabolique : une modification du niveau d'expression ou de l'activité des CYP impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques pourrait moduler le métabolisme et l'élimination des médicaments encapsulés.**

## MATÉRIEL et MÉTHODES :

- Synthèse de 6 types de NPs de PLGA par nanoprécipitation :



- Etude *in vitro* sur cultures primaires d'hépatocytes de rats et humains de l'activité des CYP1A et 2B par fluorimétrie et CYP3A par luminométrie.

## OBJECTIF :

Evaluation de la **nanohépatotoxicité** de NPs de PLGA, en particulier la fonction hépatique en utilisant des cultures primaires d'hépatocytes.

## RÉSULTATS :

### Caractéristiques des NPs de PLGA

Nanoparticules	Description	Diamètre moyen (nm)	Index de polydispersité	Potentiel Zeta (mV)
<b>NPs synthétisées</b>				
NP1	Sans surfactant	178 ± 7	0.105 ± 0.033	-31.5 ± 1.4
NP2	Sans surfactant	122 ± 4	0.128 ± 0.036	-30.1 ± 1.6
NP3	Sans surfactant	78 ± 2	0.106 ± 0.070	-29.2 ± 1.5
NP4	Opsonisation	216 ± 6	0.101 ± 0.017	-11.0 ± 0.6
NP5	Recouvrement PVA	241 ± 19	0.097 ± 0.027	- 1.7 ± 0.4
NP6	Recouvrement PEI	242 ± 8	0.099 ± 0.035	+ 5.4 ± 0.4
<b>NPs commerciales</b>				
NP7	Silice	33 ± 1	0.153 ± 0.034	- 8.4 ± 0.6
NP8	Silice	67 ± 0.3	0.043 ± 0.013	-21.1 ± 0.4

Propriétés physicochimiques des NPs de PLGA lyophilisées puis reconstituées dans du milieu de culture (n≥3 lots de NPs).

- [PLGA] ↑ dans acétone ⇒ diamètre des NPs ↑
- Sans surfactant ⇒ charge de surface négative
- Avec PVA (surfactant non ionique) ⇒ charge de surface nulle
- Avec PEI (polyélectrolyte cationique) ⇒ charge de surface positive
- Avec Sérum ⇒ |charge de surface| ↓

### Activité des CYP chez le rat et l'Homme

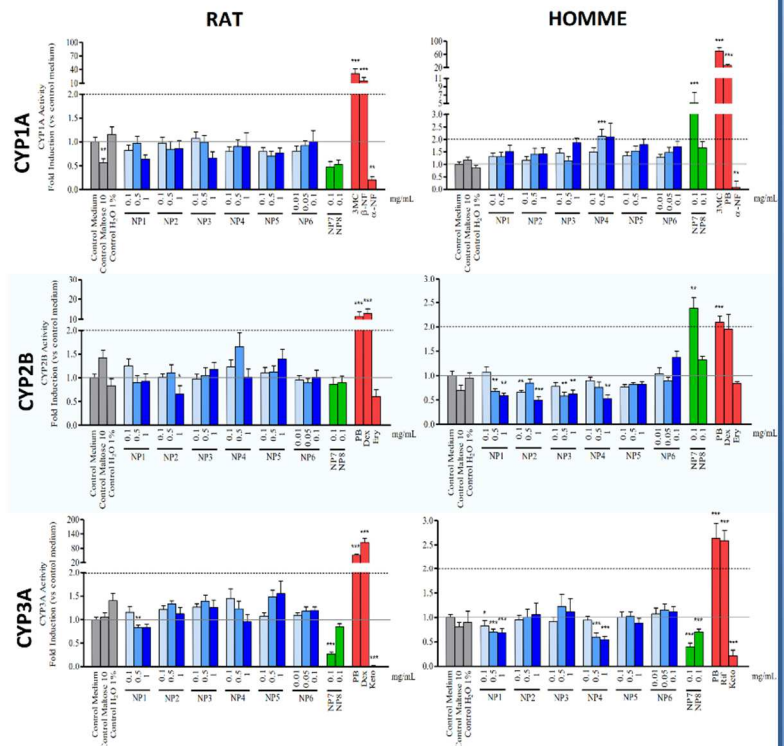
- Chez le rat** → les NPs de PLGA **ne modifient pas** significativement l'activité des trois CYP étudiés quelles que soient leur taille et leurs propriétés de surface.

→ en accord avec les données préliminaires *in vivo*

- Chez l'Homme** → NP1, NP2, NP3 et NP4 **inhibent** très fortement l'activité du **CYP2B**.

→ NP1 et NP4 **inhibent** l'activité du **CYP3A**

➔ **Différences interspèces très importantes**



Effet des NPs de PLGA sur l'activité des CYP1A, 2B et 3A sur des cultures primaires d'hépatocytes de rats et humains exposées aux NPs pendant 72h (n≥3 cultures d'hépatocytes).

## CONCLUSION / PERSPECTIVES :

- Modulation de l'activité des CYP2B et 3A chez l'Homme dépendante des propriétés physico-chimiques des NPs
- Différences interspèces : pas d'effet des NPs sur l'activité des CYP chez le rat vs forte inhibition chez l'Homme
  - ➔ Importance d'utiliser des tissus d'origine humaine
- Etudier les interactions entre les différents types cellulaires du foie (Cocultures cellules de Kupffer/hépatocytes, tranches de foie...)
  - ➔ Importance de développer de nouveaux modèles *in vitro* chez l'Homme

[1] Danhier et al., PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications, *J Control Release*. (2012)

[2] Gref et al., "Stealth" corona-core nanoparticles surface modified by PEG: influences of the corona and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption, *Colloids Surf B Biointerfaces*. (2000)

[3] Zhang et al., Nanoparticle-liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination, *J Control Release*. (2016)





**Poster n°2**

**Silica nanoparticles impact the permeability of the human intestinal barrier.**

Cornu R., Chrétien C., Béduneau A., Martin H.

Congrès Eurotox 2018  
Bruxelles, Septembre 2018



Cornu R., Chrétien C., Béduneau A., Martin H.

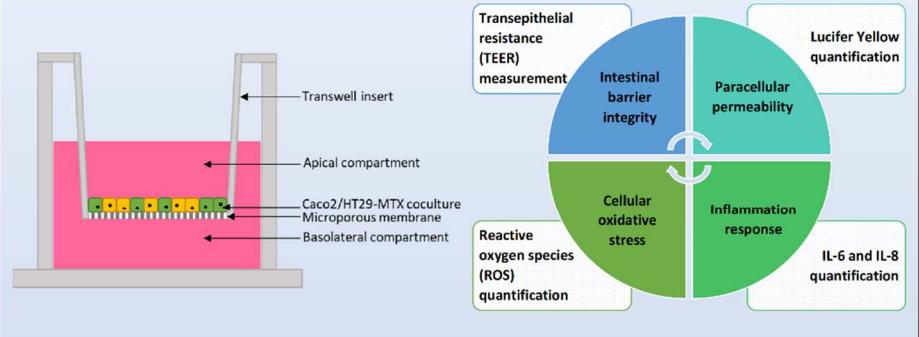
EA4267 PEPITE, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France

raphael.cornu@univ-fcomte.fr // This poster is supported by a grant of the Société Française de Toxicologie.

## INTRODUCTION

Silica nanoparticles (NPs) contained in additive E551 are extensively used in food industry as an anti-caking agent. The safety of engineered NPs in consumer products is more and more questioned due to their particular properties. Recent toxicological studies alarmed on a potential human health risk linked to the ingestion of the additive E551 (van der Zande *et al.* and Winkler *et al.*). Due to their size and their high specific surface area, NPs interact strongly with the intestinal mucosa, triggering inflammation responses and sometimes cytotoxic effects. However, the effects of silica NPs on the permeability of the intestinal barrier are still unclear despite the importance of this physical barrier in the protection of the organism.

## METHODOLOGY



## AIM

Evaluating the oral toxicity of the additive E551 and investigating the size effect of silica nanoparticles in the intestinal permeability.

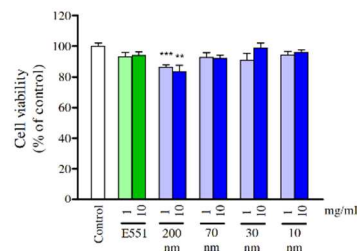
## RESULTS

### Characteristics of silica NPs

Nanoparticles	Mean diameter (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)
200 nm	215 ± 10	0.026 ± 0.15	-21.3 ± 0.60
70 nm	71 ± 3	0.018 ± 0.019	-19.0 ± 2.57
30 nm	32 ± 1	0.055 ± 0.031	-17.7 ± 0.71
10 nm	20 ± 1	0.236 ± 0.010	-18.5 ± 1.11
E551	268 ± 18	0.231 ± 0.029	-20.5 ± 0.56

Physicochemical characterization of silica NPs in saline transport buffer (n=3).

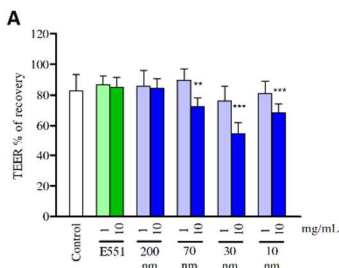
### Cell viability



→ Except for the 200 nm NPs, silica NPs do not impact the cell viability.

Cell viability of the Caco2/HT29-MTX coculture exposed to silica NPs for 2h determined by MTT assay (n=3).

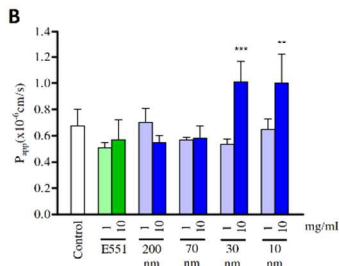
### Integrity and paracellular permeability of the intestinal barrier



30 and 10 nm NPs at a high concentration decrease the TEER and facilitate the Lucifer Yellow paracellular transport.

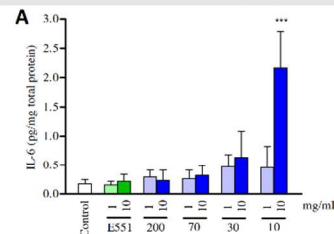
Additive E551 has no significant effect on the integrity and the paracellular permeability.

→ Silica NPs impact the permeability of human intestinal barrier in a size and concentration manner.



Effect of silica NPs on the integrity (TEER) (A) and paracellular permeability (B) (Lucifer Yellow) on Caco2/HT29-MTX coculture exposed to NPs for 2h (n=6 for A and n=3 for B).

### Inflammation response and cellular oxidative stress

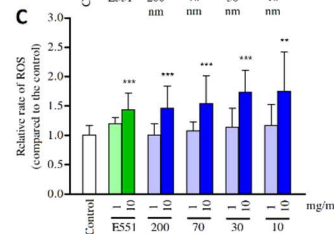
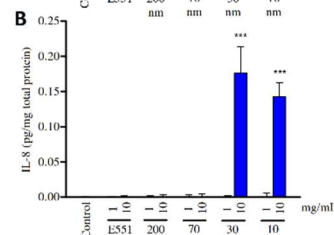


Only 10 nm NPs at 10 mg/ml increase the IL-6 production. 10 nm and 30 nm NPs at the highest concentrations induce the IL-8 secretion.

Additive E551 and large NPs has no effect on the inflammatory response.

All NPs include additive E551 generate ROS production at a high concentration.

→ Silica NPs lead to an inflammatory response depending on their size and concentration. NPs generate also a cellular oxidative stress according to their concentration.



Quantification of IL-6 (A), IL-8 (B) and ROS production (C) of Caco2/HT29-MTX coculture exposed to silica NPs for 2h (n=3).

## CONCLUSIONS/PERSPECTIVES

- Silica NPs impact the human intestinal barrier according to a size and a concentration effect.
- Are these effects related to the rate of internalization of silica NPs in these cells and/or a modification of the expression of some proteins present in tight junctions?
- Silica NPs generate an oxidative stress and the smallest NPs induce a release of proinflammatory cytokines.
- Additive E551 seems to be safe for the intestinal barrier especially in terms of impact on permeability.

H.C. Winkler *et al.*, Critical review of the safety assessment of nano-structured silica additives in food. *Journal of Nanobiotechnology* (2016)  
van der Zande *et al.*, Sub-chronic toxicity study in rats orally exposed to nanostructured silica. *Particle and Fibre Toxicology* (2014)



**Poster n°3**

**Transient opening of intestinal tight junctions induced by small silica nanoparticles.**

Cornu R., Chrétien C., Béduneau A., Martin H.

Congrès de la Société Française de Toxicologie (SFT)  
Lille, Novembre 2018





# Transient opening of intestinal tight junctions induced by small silica nanoparticles

Cornu R., Chrétien C., Béduneau A., Martin H.

EA4267 PEPITE, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France

## INTRODUCTION

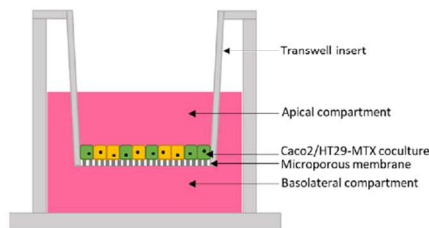
Silica nanoparticles (NPs) contained in additive E551 are extensively used in food industry as anti-caking agent. The safety of engineered NPs in consumer products is more and more questioned due to their particular properties such as the small size and the high specific surface area. Recent toxicological studies alarmed on a potential human health risk linked to the ingestion of the additive E551 (van der Zande *et al.* and Winkler *et al.*). Some NPs, especially inorganic particles can interact strongly with the intestinal mucosa, triggering inflammation responses and inducing sometimes cytotoxic effects. However, the effects of silica NPs on the permeability of the intestinal barrier are still unclear despite the importance of this physical barrier in the protection of the organism.

## AIM

Evaluating the oral toxicity of the additive E551 and investigating the size effect of silica nanoparticles in the intestinal permeability.

## METHODOLOGY

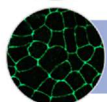
### Coculture cell model in Transwell insert



Intestinal barrier integrity :  
Trans epithelial electrical resistance (TEER) measurement



Paracellular permeability :  
Lucifer Yellow quantification



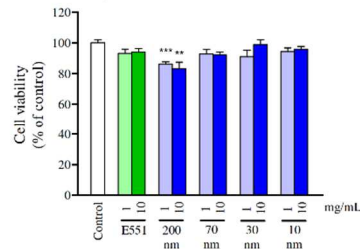
Tight junction proteins expression :  
Western-Blotting and immunofluorescence

### Physicochemical characteristics of silica NPs

Nanoparticles	Mean diameter (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)
200 nm	215 ± 10	0.026 ± 0.15	-21.3 ± 0.60
70 nm	71 ± 3	0.018 ± 0.019	-19.0 ± 2.57
30 nm	32 ± 1	0.055 ± 0.031	-17.7 ± 0.71
10 nm	20 ± 1	0.236 ± 0.010	-18.5 ± 1.11
E551	268 ± 18	0.231 ± 0.029	-20.5 ± 0.56

## RESULTS

### Cell viability

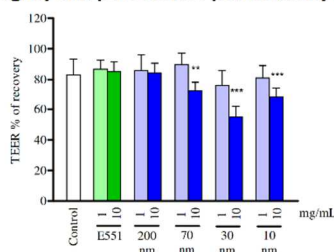


→ Except for the 200 nm NPs, silica NPs do not impact the cell viability.

Cell viability of the Caco2/HT29-MTX coculture exposed to silica NPs for 2h determined by MTT assay (n=3).

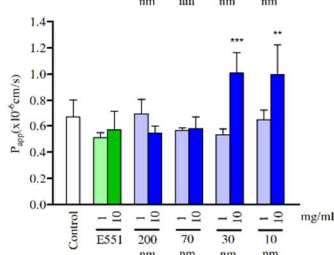
### Integrity and paracellular permeability of intestinal barrier

#### A



30 and 10 nm NPs at a high concentration decrease the TEER and facilitate the Lucifer Yellow paracellular transport. Additive E551 has no significant effect on the integrity and the paracellular permeability.

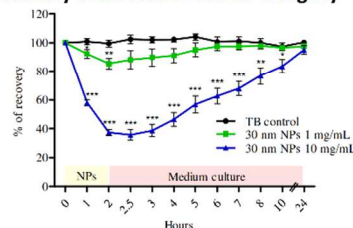
#### B



→ Silica NPs impact the permeability of human intestinal barrier in a size and concentration manner.

Effect of silica NPs on the integrity (TEER) (A) and paracellular permeability (B) (Lucifer Yellow) on Caco2/HT29-MTX coculture exposed to NPs for 2h (n=6 for A and n=3 for B).

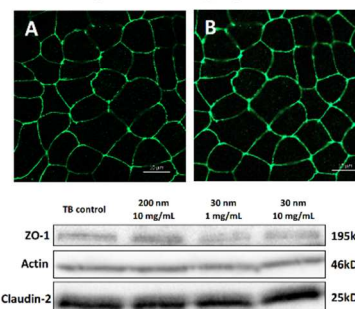
### Recovery of intestinal barrier integrity



→ Intestinal barrier integrity is recovered in less than 24h after treatment with small silica NPs.

TEER measurement during 24h on Caco2 culture exposed to 30 nm NPs for 2h (n=3).

### Protein expression of tight junctions



→ Small silica NPs do not impact the expression of proteins involved in tight junctions.

Immunofluorescence of ZO-1 protein on Caco2 culture exposed to TB medium (A) or 30 nm NPs (B) for 2h. Western Blot of ZO-1, Actin and Claudin-2 of Caco2 culture exposed to TB medium, 200 nm or 30 nm NPs for 2h (Representative images of 3 experiments).

## CONCLUSIONS/PERSPECTIVES

- 30 nm and 10 nm silica NPs impact the human intestinal barrier in a concentration-dependent manner. The enhanced paracellular permeability was reversible 24 hours after exposure. No modification of the expression of some proteins present in tight junctions such as ZO-1 and Claudin-2 was observed, suggesting a mechanical effect of small NPs.
- Regulation of tight junction openings and closings may provide a sensitive means to modulate barrier function without changing protein expression (C.R. Weber).
- Additive E551 seems to be safe for the intestinal barrier especially in terms of impact on permeability.

H.C. Winkler *et al.*, Critical review of the safety assessment of nano-structured silica additives in food. *Journal of Nanobiotechnology* (2016)

van der Zande *et al.*, Sub-chronic toxicity study in rats orally exposed to nanostructured silica. *Particle and Fibre Toxicology* (2014)

C. R. Weber, Dynamic properties of the tight junction barrier. *Annals of the New York Academy of Sciences* (2012)







## Nanoparticules et santé : de grandes promesses thérapeutiques mais pour quel risque ?

**Mots clés :** nanoparticules, toxicologie, modèles *in vitro*, santé humaine, foie, intestin

**Résumé :** Les nanoparticules sont définies comme des structures sphériques dont le diamètre maximum est de 100 nanomètres. Les domaines d'applications des nanoparticules incluant l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique, sont extrêmement nombreux. L'Homme peut être quotidiennement exposé à des nanoparticules via différentes voies d'administration (orale, intraveineuse, pulmonaire et cutanée). En raison de leur taille nanométrique, les nanoparticules possèdent des propriétés physico-chimiques uniques, induisant de fortes interactions avec l'environnement biologique. Ces caractéristiques ont été largement exploitées pour la conception de nanomédicaments pour le diagnostic et la thérapie. Cependant, les problèmes liés à leur toxicité ont été mis en lumière parallèlement à leur développement. Ce travail de thèse vise à étudier la toxicité potentielle des nanoparticules. L'évaluation toxicologique a été réalisée à l'aide de modèles cellulaires adaptés aux voies systémique et orale. Les mécanismes impliqués dans la nanotoxicité ont été étudiés afin

d'identifier des facteurs de toxicité. La première partie de ce travail a été consacrée à l'étude de la toxicité hépatique *in vitro* et *in vivo* des nanoparticules de PLGA et de silice. Les nanoparticules de PLGA sont utilisées comme vecteurs de médicaments alors que les nanoparticules de silice jouent le rôle d'agent antiagglomérant dans l'industrie alimentaire et également d'excipients pharmaceutiques. Leurs effets sur la fonction hépatique et en particulier sur l'activité des cytochromes P450 ont été évalués. La seconde partie de ce travail a consisté à étudier l'impact des nanoparticules de silice sur la barrière intestinale, en particulier sur la perméabilité paracellulaire et l'intégrité de la barrière. En mettant en exergue les différences interspèces ou le rôle protecteur du mucus, ce projet a démontré que le choix des outils toxicologiques était crucial pour une évaluation prédictive de la nanotoxicité. La taille, les propriétés de surface et la composition ont été identifiées comme des facteurs importants de toxicité.

## Nanoparticles and human health: big therapeutic promises, but what about the risk?

**Keywords :** nanoparticles, toxicology, *in vitro* models, human health, liver, intestinal barrier

**Abstract :** Nanoparticles are defined as spherical structures with a maximum diameter of 100 nanometers. The application fields of nanoparticles including food and pharmaceutical industries are extremely broad. Human can be exposed daily to nanoparticles through various administration routes (oral, intravenous, pulmonary and cutaneous). Due to their size at the nanoscale, nanoparticles have unique physicochemical, inducing strong interactions with the biological environment. These features were widely exploited for the conception of nanomedicines for the diagnosis and the therapy. However, issues relative to their biological toxicity were addressed in the same time. This thesis work aims to investigate the potential toxicity of nanoparticles. Toxicological evaluation was performed using cell models adapted for the systemic and the oral routes. Mechanisms involved in the nanotoxicity were

studied to identify toxicity factors. The first part of the work focused on the *in vitro* and *in vivo* hepatic toxicity of PLGA and silica nanoparticles. PLGA nanoparticles are used as drug carriers while silica nanoparticles play the role of anticaking agent in food industry and of pharmaceutical excipients. Their effects on the liver function and especially on the cytochrome P450 activity were investigated. The second part of the work consisted to study the impact of silica nanoparticles on the intestinal barrier, especially on the paracellular permeability and the integrity of the barrier. By emphasizing interspecies differences or the protective role of mucus, this project demonstrated that the choice of toxicological tools was crucial for a predictive nanotoxicity evaluation. Size, surface properties and composition were identified as major toxicity factors.