



**HAL**  
open science

# Etude des effets pro-allergisants des nanoparticules de silice amorphe en réponse aux pneumallergènes

Eléonore Guillet

► **To cite this version:**

Eléonore Guillet. Etude des effets pro-allergisants des nanoparticules de silice amorphe en réponse aux pneumallergènes. Immunité adaptative. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UP-ASQ051 . tel-04815487

**HAL Id: tel-04815487**

**<https://theses.hal.science/tel-04815487v1>**

Submitted on 3 Dec 2024

**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.

# Etude des effets pro-allergisants des nanoparticules de silice amorphe en réponse aux pneumallergènes

*Pro-allergenic effects of amorphous silica nanoparticles in response to pneumallergens*

## Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 569 : innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)

Spécialité de doctorat : Toxicologie

Graduate School : Santé et médicaments. Référent : Faculté de Pharmacie

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Inflammation, Microbiome, Immunosurveillance (Université Paris-Saclay, Inserm)** sous la direction du Dr **Armelle Biola-Vidamment, Maître de Conférences**

Thèse soutenue à Paris-Saclay,  
le 01 décembre 2022, par

**Eléonore GUILLET**

## Composition du Jury

### Membres du jury avec voix délibérative

**Elias FATTAL**

Professeur des Universités, Université Paris-Saclay, Institut Galien Paris-Saclay

Président

**François HUAUX**

Professeur, Université Catholique de Louvain, Louvain Centre for Toxicology and Applied Pharmacology

Rapporteur &  
Examineur

**Françoise PONS**

Professeure des Universités, CNRS Université de Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden

Rapporteuse &  
Examinatrice

**Eric HOUDEAU**

Directeur de Recherche, Toxalim UMR1331, Université de Toulouse

Examineur

**Jacques-Aurélien SERGENT**

Docteur en Sciences, Corporate Product Safety Nanotoxicologist, Laboratoires Solvay (entreprise)

Examineur



**Titre :** Etude des effets pro-allergisants des nanoparticules de silice amorphe en réponse aux pneumallergènes

**Mots clés :** silice amorphe synthétique, nanoparticules, cellules dendritiques, lymphocytes T, Bet v 1a, signalisation

**Résumé :** Les nanoparticules de silice amorphe synthétiques (SAS-NP) sont largement utilisées dans les industries pharmaceutique, cosmétique, agro-alimentaire ou du bâtiment et des travaux publics. Les SAS-NP sont considérées comme sûres par la FDA. Cependant, du fait de leur taille nanométrique et de leur large utilisation, une meilleure évaluation de leur toxicité est nécessaire. L'objectif de ce travail de thèse a été d'évaluer l'effet des SAS-NP sur la réponse immunitaire adaptative. Nous nous sommes intéressés à l'effet des SAS-NP sur les cellules dendritiques (DC) ainsi qu'à leur effet sur l'immunisation contre un aéro-allergène très répandu et majoritaire dans le pollen de bouleau, Bet v 1a. Dans une première partie, nous avons évalué l'effet des SAS-NP sur le phénotype des DC, premier maillon de la réponse immunitaire adaptative. Nous avons montré que les SAS-NP se comportaient comme un signal de danger en induisant l'activation des DC marquée par une augmentation des molécules d'activation et de co-stimulation ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires.

Nous avons alors évalué les voies de signalisation impliquées dans l'effet signal de danger observé. Nos résultats ont montré l'activation de la tyrosine kinase Syk qui semble consécutive à la formation de raft lipidiques. Dans un second volet du projet, nous avons mis en évidence une augmentation du répertoire de lymphocytes T (LT) CD4 naïfs spécifiques de Bet v 1a en présence de SAS-NPs. Nous avons également montré une augmentation de l'internalisation de Bet v 1a, qui reposerait sur un effet cheval de Troie. La modification du répertoire de LT CD4 naïfs spécifiques de Bet v1a pourrait également s'expliquer par une modification de l'apprêtement de l'antigène ou la création de néo-épitopes lors de l'interaction avec les SAS-NP.

*In fine*, notre travail propose un outil d'évaluation de l'immunotoxicité des SAS-NP. Une meilleure compréhension des mécanismes d'action aidera quant à elle à la conception de nanomatériaux plus sûrs.

**Title :** Pro-allergenic effects of amorphous silica nanoparticles in response to pneumallergens

**Keywords :** synthetic amorphous silica, nanoparticles, dendritic cells, T cells, Bet v 1a, signalisation

**Résumé :** Synthetic amorphous silica nanoparticles (SAS-NPs) are widely used in the pharmaceutical, cosmetics, food, and construction industries. SAS-NPs are considered as safe by the FDA. However, due to their nanoscale size and wide use, a better evaluation of their toxicity is needed. The purpose of this work was to evaluate the effect of SAS-NPs on the adaptative immune response. We were interested in the effect of SAS-NPs on dendritic cells (DCs) phenotype as well as their effect on immunisation against a widespread aeroallergen from birch pollen, Bet v 1a. First, we evaluated the effect of SAS-NPs on DCs, the first step in the adaptative immune response. We showed that SAS-NPs behaved as a danger signal by inducing DCs activation marked by an increase in activation and co-stimulation markers and the secretion of pro-inflammatory cytokines. In addition, we evaluated the signaling pathways

involved in the observed danger signal effect. Our results showed the involvement of the tyrosine kinase Syk following lipid raft formation. Secondly, we demonstrated an increase in the repertoire of Bet v 1a-specific naïve CD4 T cells in the presence of SAS-NPs. We also showed an increase in Bet v 1a internalisation relying on a putative Trojan horse mechanism. The modification of the repertoire of Bet v 1a-specific naïve CD4 T cells could also be linked to a modification of antigen processing or to the creation of neo-epitopes upon the interaction of the allergen with the nanoparticles.

Finally, our work proposes a tool for assessing the immunotoxicity of SAS-NPs. A better understanding of these mechanisms will help in the design of safer nanomaterials.



# Remerciements

Avant tout propos, je tiens à exprimer mes remerciements aux membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Je remercie le **Pr Elias Fattal** d'avoir accepté de présider ce jury. Je souhaite remercier le **Pr Françoise Pons** et le **Pr François Huaux** pour le temps consacré en tant que rapporteur de ce travail. Je remercie également le **Dr Eric Houdeau** et le **Dr Jacques-Aurélien Sergent** d'avoir accepté de faire partie de ce jury en tant qu'examineurs.

Mes plus sincères remerciements à ma directrice de thèse, le **Dr Armelle Biola-Vidamment**. Merci pour la confiance et la liberté que tu m'as accordée tout au long de mon parcours. C'est aussi le moment de te remercier de m'avoir suivi depuis ma 3<sup>e</sup> année de pharmacie jusqu'à aujourd'hui. Toujours avec beaucoup de bienveillance. Merci pour tes conseils, ta générosité, tes encouragements, ton calme olympien qui a dû faire face parfois à mon tempérament légèrement volcanique. C'était un plaisir de travailler avec toi et d'aller au bout de ce marathon ensemble.

Je souhaiterais remercier également le **Pr Marc Pallardy**. Merci de m'avoir offert l'opportunité de travailler au sein de ton équipe. Merci d'avoir cru en mes capacités, de m'avoir challengée autant que nécessaire et d'avoir toujours répondu présent pour parler science lorsque j'en avais besoin. J'emporte avec moi le fameux « Quelle est la question posée ? ».

Je souhaiterais remercier toutes les personnes avec qui nous avons collaborés. Merci à nos collègues du projet Allergosil. **Émilie**, un grand grand merci ! Travailler avec toi est un réel bonheur. Tu es toujours pleine d'optimisme et toujours partante. Je garderai de très bons souvenirs des moments passés ensemble, à la paillasse et en dehors. **Céline**, merci d'avoir rejoint le projet et d'avoir mis autant d'énergie à la réalisation des manip. Ça a été un vrai plaisir de partager les efforts et les beaux résultats ensemble. Merci également à **Thierry, Marie** et **Bastien** pour les échanges autour de notre projet commun. J'en profite également pour te remercier **Valérie** pour

ton aide en microscopie. Merci aussi à **François-Xavier** de m'avoir initiée au monde obscur de la caractérisation des nanos.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe 2 de l'UMR-996.

Merci à tous les enseignants-chercheurs de l'équipe. **Sylvie**, je vous remercie pour votre bienveillance et les conseils scientifiques. **Saadia**, merci pour ton soutien, tes conseils dès que j'en ai eu besoin. **Luc**, merci pour ta rigueur et le partage de tes connaissances. **Vanessa**, merci pour tes conseils stats, nos discussions. **Kevin**, merci d'avoir répondu à toutes mes questions membranaires et au-delà. **Isabelle T**, merci de m'avoir donné l'opportunité d'enseigner à tes côtés. C'était un réel plaisir. Je te remercie pour tous tes conseils et plus simplement pour ton amitié.

Je tiens également à remercier le personnel technique de l'équipe. **Isabelle B**, nos discussions vont me manquer. Merci d'avoir toujours fait en sorte de nous simplifier la vie pour que tout soit prêt lorsque l'on avait besoin de manipuler. **Natacha**, « j'ai une question ! », merci pour tes connaissances, tes réponses à mes questions en tout genre. Bon vent pour tes nouvelles aventures. **Marie-Hélène**, merci pour les blots, les discussions. **Benoît**, merci pour le partage de recettes et tes mochis !! Et puis, bien-sûr, notre équipe ne tournerait pas sans toi **Mumu**, ma maman du labo. Merci pour ton aide, toutes nos discussions, ta bienveillance, nos fou-rires et notre amitié.

Merci à mes collègues docteurs, doctorants et post-doctorant : Alexia, Joelle, Maria, Marine, Myriam, Romain, Sara. **Alexia**, merci de m'avoir mis le pied à l'étrier sur le projet nanos lors de mon M2. **Joelle**, merci pour les moments partagés, je te souhaite le meilleur pour la suite ! **Maria**, merci pour toutes les manip partagées, pour toutes nos discussions parfois scientifiques et parfois un peu moins. Tu es talentueuse, je suis certaine que de très beaux résultats sont à venir. Merci mon espion ☺. **Marine**, merci pour tout. Ces derniers mois ont été intenses mais on peut le dire maintenant, on y

est ! Bravo à toi, j'ai toujours admiré ta capacité à tout gérer de front et avec le sourire. Je vous souhaite le meilleur pour votre future vie mancelle. Je ne pourrai pas te remercier sans remercier Sara juste après, mes deux mamans préférées. Merci **Sara** pour ton amitié, ton sourire et ta patience. Oui, il en fallait de la patience pour supporter mes blagues quotidiennes. Je pense que ça n'a pas toujours été facile pour toi. You're next !!! Je n'aurais pas pu avoir de meilleures voisines de bureau.

**Myriam**, ah, Myriam ! Te remercier en quelques lignes serait trop compliqué. Merci de m'avoir transmis tout ce que tu sais, si j'en suis ici aujourd'hui tu y es pour beaucoup. Merci d'avoir toujours été présente lorsqu'il le fallait, même à des milliers de kilomètres. Merci pour les idées, les conseils, ta générosité sans égale. Tout le reste tu le sais. **Romain**, mon compagnon de bêtises. Merci pour tous les moments passés ensemble, pour tes conseils toujours avisés, mais surtout merci de m'avoir autant fait rire !! Merci aussi à toi **Delphine** (enfin je devrais dire « Dédé du 5 »), merci pour ton oreille attentive, nos cafés partagés, les fous rires et ta capacité légendaire à te garer irrécusablement – Frédéric Vidal te salue depuis son ministère des places de parking. Tu n'es plus doctorante depuis un moment, ni post doc, mais je suis certaine que tu seras flattée d'être dans ce paragraphe. Vous avez rendu à vous tous ces années inoubliables. Au-delà d'avoir rencontré des collègues, j'ai rencontré une belle bande de copains.

Je tiens à remercier ma famille et mes amis. **Papa, Maman**, merci de m'avoir donné le goût de l'effort et l'envie d'aller au bout de ce que j'entreprends. Votre soutien inconditionnel depuis le premier jour est une réelle force. J'admire votre parcours, c'est une vraie source d'inspiration. Ça y est, c'est bon cette fois j'arrête les études promises. Merci à toi aussi **Alex**. J'admire ta détermination et l'homme que tu es devenu. Merci **Margaux** pour tes encouragements bienveillants et tous les fous rires partagés. Vous êtes géniaux ensemble, ne changez rien. J'aime la famille que nous formons tous les 6. Merci également à mes grands-parents. A mes deux grands-

mères, **Gabrielle** et **Marie-Antoinette**, merci pour les moments passés à vos côtés, vos bons petits-plats, vos conseils en cuisine, en couture, le partage de vos connaissances en tout genre et la transmission de vos valeurs. Cette dernière année n'a pas été facile, mais elle nous a montré à quel point notre famille fait notre force. A mes deux grands-pères, **Paul** et **Jean**, vous n'aurez pas vu la fin de ce travail, même si je n'ai jamais réussi à vous expliquer réellement ce que je faisais, je pense qu'il doit y avoir un peu de fierté depuis là où vous êtes. Vous avez été deux grands-pères géniaux, des grands-pères que chaque petite fille au monde devrait avoir. Je vous aime.

Je souhaite remercier les copains de Pharma et d'ailleurs **Ophélie**, **Fanny**, **Thomas**, **Elena**, **Donato**, **Marie**, **Mahé**, **Clémentine**, **Victoire** et tous les copains de **LFA & Queens**. **Ophé**, notre binôme d'étude aura bien marché. Merci d'avoir contribué à rendre ces 8 dernières années très agréables. Des premiers partiels en 2<sup>e</sup> année jusqu'à la soutenance de notre PhD, nous aurons tout fait ensemble. Un vrai binôme !! Merci pour ton amitié, tu le sais, elle m'est très précieuse.

Enfin, merci **Valentin**, mon co-équipier, coach et surtout mon futur mari. Mon phare dans les tempêtes. Malgré mes 3786 « c'est bon j'arrête, j'en ai marre ! » on sera allés au bout, notamment grâce à ta patience et à ton calme face à toutes situations. Merci pour l'amour que tu me portes. Merci pour les 5 années écoulées et toutes celles à venir.



# Sommaire

REMERCIEMENTS .....	3
SOMMAIRE.....	9
LISTE DES FIGURES .....	13
LISTE DES ABREVIATIONS .....	17
AVANT-PROPOS .....	21
INTRODUCTION .....	25
CHAPITRE 1 : LES NANOMATERIAUX.....	26
I. <i>Définition des nanomatériaux</i> .....	26
A.    Définition des nanomatériaux, cas particulier des nanoparticules .....	26
B.    Rappel historique .....	29
C.    La réglementation des nanomatériaux.....	31
D.    La silice amorphe .....	32
II. <i>Utilisation des nanomatériaux, cas particulier des nanoparticules de silice amorphe.</i> .....	37
CHAPITRE 2 : TOXICITE DES NANOPARTICULES .....	40
I. <i>Effets chez l'Homme des nanoparticules</i> .....	40
II. <i>Exposition aux nanoparticules et impact sur les systèmes biologiques</i> .....	42
A.    Interactions entre les nanoparticules et la peau.....	44
B.    Interactions entre les nanoparticules et le tube digestif .....	46
C.    Interactions entre les nanoparticules et les poumons .....	49
III. <i>Paramètres physico-chimiques influençant la toxicité des nanoparticules</i> .....	53
A.    Influence de la taille et de la forme.....	53
B.    Influence de la composition et de la chimie de surface .....	58
C.    Influence de la corona .....	61
D.    Influence du degré d'agrégation et d'agglomération .....	64
CHAPITRE 3 : LES MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DE LA REPONSE IMMUNITAIRE ADAPTATIVE AUX NANOPARTICULES .....	66
I. <i>Maturation des cellules présentatrices de l'antigène et présentation de l'antigène</i> .....	66
A.    Cellules présentatrices de l'antigène .....	66
B.    Capture et présentation de l'antigène et mécanismes d'internalisation.....	69
C.    Maturation et migration des cellules dendritiques.....	71
D.    Réponse des lymphocytes T aux cellules dendritiques activées .....	75
II. <i>Effets inflammatoires et adjuvants des nanoparticules</i> .....	79
A.    Effets inflammatoires des nanoparticules.....	79
B.    Effets adjuvants des nanoparticules .....	81
III. <i>Les nanoparticules, signaux de danger émergents</i> .....	84
A.    Interaction cellulaire des nanoparticules avec les récepteurs scavenger.....	85
B.    Interaction cellulaire des nanoparticules avec les TLR .....	86
C.    Interaction cellulaire des nanoparticules de manière indépendante des récepteurs .....	87
OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	93
RESULTATS .....	97
ARTICLE 1.....	98
ARTICLE 2.....	112
RESULTATS COMPLEMENTAIRES .....	155
I. <i>Introduction</i> .....	155

II.	<i>Matériels et méthodes</i> .....	161
A.	Nanoparticules de fumée de silice .....	161
B.	Caractérisation des nanoparticules .....	161
C.	<i>Betula verrucosa</i> (Bet v 1a) commercial .....	162
D.	Expression et purification de Bet v 1a recombinant (rBet v 1a) .....	162
E.	Marquage fluorescent de rBet v 1a.....	164
F.	Isolement et différenciation des cellules dendritiques humaines dérivées de monocytes .....	164
G.	Analyse du phénotype .....	165
H.	Modèle de co-culture autologue .....	166
I.	ELISpot IFN- $\gamma$ .....	166
J.	Analyse par immunoblot .....	167
K.	Vidéomicroscopie.....	168
L.	Analyses statistiques .....	168
III.	<i>Résultats</i> .....	169
A.	Bet v 1a seul n'active pas les DC .....	169
B.	Les SAS-NP augmentent l'activation des LT CD4 <sup>+</sup> naïfs reconnaissant Bet v 1a. ....	170
C.	Les SAS-NP favorisent l'internalisation de l'allergène Bet v 1a.....	172
D.	L'allergène rBet v 1a se lie à la surface des SAS-NP .....	177
<b>DISCUSSION GENERALE</b> .....		<b>179</b>
I.	<i>Évaluation des mécanismes cellulaires impliqués dans la réponse des cellules dendritiques humaines et des lymphocytes T aux nanoparticules de silice amorphe</i> .....	181
A.	Mise au point des conditions expérimentales.....	181
B.	Les SAS-NPs induisent une maturation fonctionnelle des cellules dendritiques humaines .....	187
C.	Mécanismes de l'effet signal de danger .....	192
II.	<i>Étude de l'implication des nanoparticules de silice amorphe dans l'immunisation contre l'allergène majeur du pollen de bouleau, Bet v 1a</i> .....	199
A.	Présentation du modèle de co-culture autologue. ....	199
B.	Effet des SAS-NPs sur l'internalisation de Bet v 1a .....	201
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b> .....		<b>207</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....		<b>211</b>
<b>ANNEXES</b> .....		<b>245</b>



# Liste des figures

<b>Figure 1</b> - Représentation de l'échelle micrométrique et nanométrique par comparaison avec les entités principales du monde vivant. Adapté de Laroui H. 2011 .....	26
<b>Figure 2</b> - Les trois catégories de nano-objets. ....	28
<b>Figure 3</b> - Nombre de publications relatives aux nanomatériaux.....	30
<b>Figure 4</b> - Représentation schématique en deux dimensions de la structure atomique de la silice cristalline et de la silice amorphe. ....	33
<b>Figure 5</b> - Procédés de production des nanoparticules de silice amorphe.....	34
<b>Figure 6</b> - Les mécanismes chimiques mis en jeu pour synthétiser la silice précipitée. ....	36
<b>Figure 7</b> - Schéma du procédé de pyrolyse à flamme. ....	37
<b>Figure 8</b> - Différentes voies de pénétration des nanoparticules dans l'organisme et risques associés .....	43
<b>Figure 9</b> - Voies de pénétration des nanoparticules à travers la peau .....	44
<b>Figure 10</b> - Schéma des voies de translocation des nanoparticules au travers de l'épithélium gastro-intestinal .....	47
<b>Figure 11</b> - Devenir des particules inhalées en fonction de leur taille au niveau pulmonaire. ....	50
<b>Figure 12</b> - Effets potentiels des nano-objets inhalés sur la santé. ....	51
<b>Figure 13</b> - Internalisation cellulaire des nanoparticules en fonction de leur taille. ...	55
<b>Figure 14</b> - Différentes formes de nanoparticules. Adapté de Gattoo et al. 2014.....	56
<b>Figure 15</b> - Groupements chimiques de surface des silices amorphes synthétiques (Cooredor-Rojas et al. 2018).....	59
<b>Figure 16</b> - Représentation schématique d'un groupement nearly-free silanol. ....	60
<b>Figure 17</b> - Formation de la corona sur les nanoparticules. ....	62

<b>Figure 18</b> - Représentation de l'interaction de nanoparticules de silice chargées négativement avec le Curosurf®.....	63
<b>Figure 19</b> - Sous-populations de cellules dendritiques.....	68
<b>Figure 20</b> - Voies d'internalisation des antigènes dans les cellules dendritiques. ....	70
<b>Figure 21</b> - Modifications phénotypiques des cellules dendritiques matures.....	74
<b>Figure 22</b> - Polarisation des lymphocytes T.....	77
<b>Figure 23</b> - Mécanisme général de la signalisation médiée par Syk.....	89
<b>Figure 24</b> - Modèle d'activation de SYK par les motifs ITAM phosphorylés, la phosphorylation de l'interdomaine et la phosphorylation de la boucle d'activation. D'après Mansueto et al. ....	90
<b>Figure 25</b> - Schéma possible de l'activation de la kinase Syk de manière indépendante des récepteurs. ....	91
<b>Figure 26</b> - Bet v 1 a seul n'active pas les DC .....	169
<b>Figure 27</b> - Schéma récapitulatif du protocole de co-culture autologue de cellules dendritiques et de lymphocytes T CD4+ naïfs.....	170
<b>Figure 28</b> - Fréquence de LT CD4+ naïfs spécifiques de Bet v 1a en présence ou en absence de SAS-NP.....	171
<b>Figure 29</b> - Premier scénario d'exposition des moDC à l'allergène Bet v 1a et aux SAS NP. ....	172
<b>Figure 30</b> - Cinétique d'entrée de Bet v 1a dans les moDC lors du premier scénario d'exposition.....	173
<b>Figure 31</b> - Évaluation de l'internalisation de rBet v 1a fluorescent par les moDC.	174
<b>Figure 32</b> - Second scénario d'exposition des moDC à l'allergène Bet v 1 a et aux SAS-NP. ....	175
<b>Figure 33</b> - Cinétique d'entrée de Bet v 1 dans les moDC lors du second scénario d'exposition.....	176

<b>Figure 34</b> - Diamètre hydrodynamique des SAS-NP en fonction de la concentration de rBet v 1a. ....	178
<b>Figure 35</b> - Schéma du mécanisme d'action des SAS-NP sur les cellules dendritiques .....	196
<b>Figure 36</b> - Schéma représentant l'internalisation de Bet v 1a en absence et en présence de SAS-NP, illustrant l'effet cheval de Troie. ....	203

# Liste des abréviations

ADN : acide desoxy-ribonucléique

AFSSET : Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail

ANSES : Agence Nationale Sécurité Sanitaire de l'alimentation et de l'environnement et du travail

ARN : acide ribonucléique

ATP : adénosine tri-phosphate

AuNP : nanoparticules d'or

BMDC : Bone Marrow-Derived Dendritic Cells

BCL-10 : B-Cell Mymphoma 10

CaCO<sub>3</sub> : carbonate de calcium

CARD : CAspase Recruitment Domain

CCL : C-C chemokine ligand

CCR : C-C chemokine receptor

cDC : cellules dendritiques conventionnelles

CDP : Common Dendritic cell Progenitors

CLR : récepteurs lectine de type C

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellules Présentatrices de l'Antigène

CTLA-4 : Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen-4

CXCR : C-X-C motif chemokine receptor

DAMPs : Damage-Associated Molecular Patterns

DC : cellules dendritiques

EFSA : European Food Safety Authority

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

FcR : Récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines

G-CSF : Granulocyte Colony Stimulating Factor

GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor

GMP : Granulocytes/Monocytes Progenitor  
HCl : acide chlorydrique  
HLA : Human Leukocyte Antigen  
HMGB1 : High Mobility Group Box 1  
HSC : cellules souches hématopoïétiques  
HSP : Heat Shock Protein  
IFN : interféron  
Ig: immunoglobuline  
IL : interleukine  
INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité  
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif  
JRC : Joint Research Center  
LB : Lymphocytes B  
LC : cellules de langherans  
LPS : lipopolysaccharide  
LT : lymphocytes T  
MAPK : Mitogen Associated Protein Kinase  
MALT1 : Mucosa Associated Lymphoid Tissue lymphoma translocation protein 1  
MCAM : Melanoma Cell Adhesion Molecule  
MDP : Monocytes-Dendritic cells Progenitors  
MFI : Mean fFuorescence Intensity  
MLP : Multipotent Lymphoid Progenitors  
MSU : urate de sodium monosodique  
MyD88 : Myeloid Differentiation primary response 88  
MWCNT : Multi-Walled Carbon Nanotube  
NAMPs : Nanoparticles-Associated Molecular Patterns  
NF- $\kappa$ B : Nuclear Factor Kappa B  
NFS : Nearly Free Silanols

NLR : NOD-Like Teceptors

NLRP3 : NOD-Like Receptor family Pyrin domain containing 3

NOAEL : No Observed Adverse Effect Level

NP : nanoparticules

NRF-2 : nuclear factor erythroid 2-related factor 2

OVA : ovalbumine

PAMPs : pathogen-associated molecular patterns

pDC : cellules dendritiques plasmocytoïdes

PKC : Protein Kinase C

PPE1 : Phytoprostanes E1

PRR : Pattern Recognition Receptor

RE : Réticulum Endoplasmique

REACH : Règlement sur l'Enregistrement, l'Evaluation et l'Autorisation des produits  
CHimiques

RFI : Relative Fluorescence Intensity

SAS-NP : nanoparticules de silice amorphe synthétique

SiCl<sub>4</sub> : tétrachlorure de silicium

SiO<sub>2</sub> : dioxyde de silicium

SR : scavenger receptor

TCR : T-cell receptor

TGF : Transforming Growth Factor

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

TLR : Toll-Like Receptors

TNF : Tumor Necrosis Factor

TSLP: Thymic Stromal LymphoPoietin

UV : ultraviolet

ZnO : oxide de zinc

ZnS : sulfure de zinc

# Avant-propos

Les nanomatériaux suscitent un intérêt croissant dans de nombreux domaines industriels du fait de leurs propriétés physico-chimiques remarquables. Les nanoparticules manufacturées sont présentes, notamment, dans les composés électroniques, les produits pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires, ainsi que dans l'industrie du bâtiment et des travaux publics. Cette omniprésence mène à un fort potentiel d'exposition pour la population générale mais aussi pour les travailleurs, préférentiellement par inhalation pour ces derniers. Ainsi, les nanoparticules nécessitent une surveillance particulière ainsi qu'une meilleure évaluation de leur toxicité. Plus spécifiquement, le règlement REACH impose aux industriels d'évaluer l'immunotoxicité des nanoparticules qu'ils produisent. Cependant, à ce jour, ils sont face à un manque significatif d'outils pour répondre aux recommandations des autorités sanitaires en matière d'évaluation de la sécurité des nanoparticules mises sur le marché.

L'objectif de ce travail de thèse était de mieux comprendre les mécanismes de l'immunotoxicité des nanoparticules de silice amorphe ainsi que leur rôle dans l'immunisation contre les aéroallergènes.

Mes travaux de thèse se décomposent en deux principales questions. Nous nous sommes d'abord attachés à mieux caractériser les interactions des nanoparticules de silice amorphe avec les cellules immunitaires. Ces travaux originaux m'ont permis de contribuer à la publication d'un premier article dans le journal *Nanomaterials* (Annexe) ainsi que d'un article dans le journal *Toxicological Sciences* en tant que co-premier auteur (**Article n°1**). Nous venons de soumettre un article dans le journal *Particle and Fibre Toxicology* (**Article n°2**). Le premier article décrit l'effet signal de danger des nanoparticules de silice amorphe sur les deux premières étapes de la réponse immunitaire. Le second présente les voies de signalisation et mécanismes impliqués dans la réponse des cellules dendritiques aux nanoparticules de silice amorphe. Nous avons notamment montré que l'effet signal de danger exercé par les nanoparticules

de silice amorphe serait médié par la formation de radeaux lipidiques déclenchant une réponse cellulaire dépendante de la protéine tyrosine kinase Syk.

Le deuxième volet consiste à étudier l'effet des nanoparticules de silice amorphe sur l'immunisation contre l'allergène majeur du pollen de bouleau, Bet v 1a. Ces travaux ont mis en évidence qu'en présence des nanoparticules de silice amorphe, le répertoire de lymphocytes T CD4+ naïfs spécifiques reconnaissant Bet v 1a était plus important. De plus, nous avons montré que les nanoparticules de silice amorphe seraient à l'origine d'une internalisation plus efficace de l'allergène Bet v 1a par les cellules dendritiques. Ces travaux sont regroupés dans la section résultats complémentaires et feront l'objet d'une publication scientifique prochainement.



# Introduction

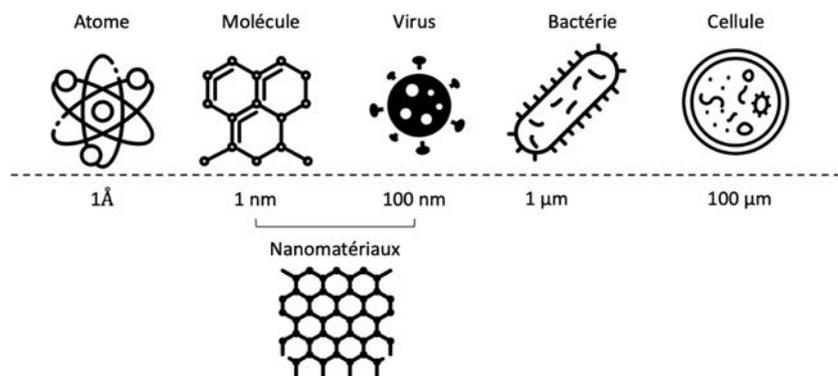
# Chapitre 1 : Les nanomatériaux

## I. Définition des nanomatériaux

### A. Définition des nanomatériaux, cas particulier des nanoparticules

Les nanoparticules, qu'elles soient organiques ou inorganiques, ne sont pas seulement le résultat de recherches scientifiques. Elles peuvent être produites naturellement par les intempéries, les éruptions volcaniques, l'érosion des sols mais aussi des processus microbiens. Les nanomatériaux existent dans la nature depuis toujours, et leur utilisation remonte à l'Antiquité où les artisans renforçaient leurs céramiques à l'aide de nanofibres d'amiante naturelle.

Cependant, jusqu'en 2008, il était difficile de définir les nanomatériaux. C'est cette année-là que l'Organisation Internationale pour la Standardisation (ISO) a proposé une définition différenciant les types de nanomatériaux. Selon la norme ISO TS 80004, « un nanomatériau est un matériau dont au moins une dimension externe est à l'échelle nanométrique c'est-à-dire comprise approximativement entre 1 et 100 nm ou qui possède une structure interne ou de surface à l'échelle nanométrique » (figure 1) (Ruaux 2019).



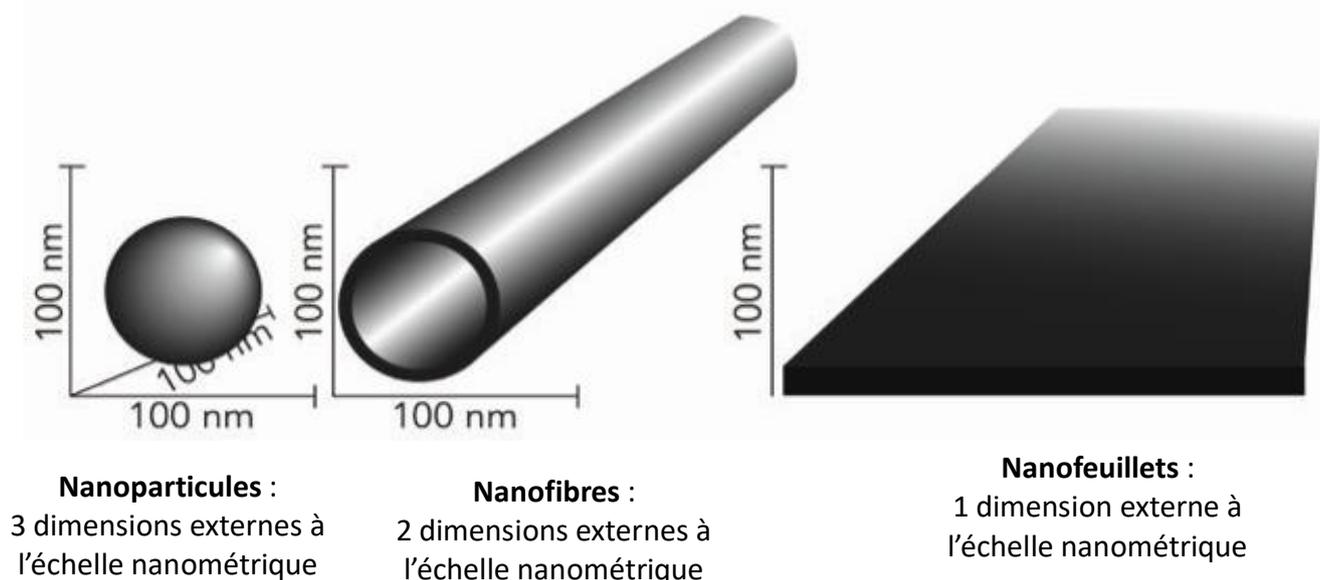
**Figure 1** - Représentation de l'échelle micrométrique et nanométrique par comparaison avec les entités principales du monde vivant. Adapté de Laroui H. 2011

En 2011, la Commission Européenne propose à son tour une définition venant compléter la norme ISO TS 80004. Celle-ci définit un nanomatériau comme « un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50% des particules présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 et 100 nm. » Néanmoins, la Commission Européenne a maintenu un certain flou dans cette définition, puisqu'elle a précisé que « dans des cas spécifiques, lorsque cela se justifie pour des raisons tenant à la protection de l'environnement, à la santé publique, à la sécurité ou à la compétitivité, le seuil de 50% fixé pour la répartition numérique par taille peut être remplacé par un seuil compris entre 1% et 50%. » Par dérogation à ce qui précède, les fullerènes, les flocons de graphène et les nanotubes de carbone à paroi simple présentant une ou plusieurs dimensions externes inférieures à 1 nm sont à considérer comme des nanomatériaux (Commission européenne 2011). Les particularités structurales de ces matériaux à l'échelle nanométrique leur confèrent des propriétés mécaniques, physiques et chimiques remarquables (Etchart-Salas 2008). Elles sont par exemple favorables à des valeurs élevées de limites d'élasticité ou de résistance à la rupture (Lu, Sui, and Lu 2000). La faible taille des nanoparticules peut conférer aux matériaux des propriétés modifiant leur couleur en modulant leur taille et leur forme (Pavel et al. 2008).

A partir de ces définitions, il est cependant possible de différencier deux grandes familles de nanomatériaux que sont les matériaux nanostructurés et les nano-objets. Les matériaux nanostructurés possèdent une structure interne ou de surface à l'échelle nanométrique. Parmi eux, nous pouvons distinguer les agrégats et agglomérats de nano-objets, les nanocomposites ou les matériaux nanoporeux (Ricaud 2012).

Les nano-objets sont des matériaux dont au moins une des trois dimensions externes se situe à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire entre 1 et 100 nm. Au sein de cette famille, nous pouvons distinguer trois catégories (figure 2) :

- Les nanofibres, nanotubes, nanofilaments ou nanobâtonnets ; ce sont des nano-objets dont deux dimensions externes sont à l'échelle nanométrique et la troisième significativement supérieure.
- Les nanofeuillets ou nanoplaquettes possèdent quant à eux une seule dimension externe à l'échelle nanométrique et les deux autres sont significativement supérieures.
- Les nanoparticules sont des nano-objets dont les trois dimensions externes se situent à l'échelle nanométrique.



*Figure 2 - Les trois catégories de nano-objets.*

D'après le dossier « nanomatériaux, nanoparticules » de l'INRS.

Les nanoparticules s'assemblent entre elles pour former des amas dont la stabilité et la réversibilité sont variables. Les agrégats de nanoparticules sont des amas de particules fortement liées entre elles (par exemple par liaison covalente) contrairement aux agglomérats dont les particules individuelles sont liées entre elles par des interactions physiques faibles de type électrostatique, Van der Waals (Eggersdorfer and Pratsinis 2014; Pratsinis 1998; Murugadoss et al. 2020a).

L'agrégation et l'agglomération joueront un rôle dans la toxicité des nanoparticules que nous développerons dans le chapitre 2.

## B. Rappel historique

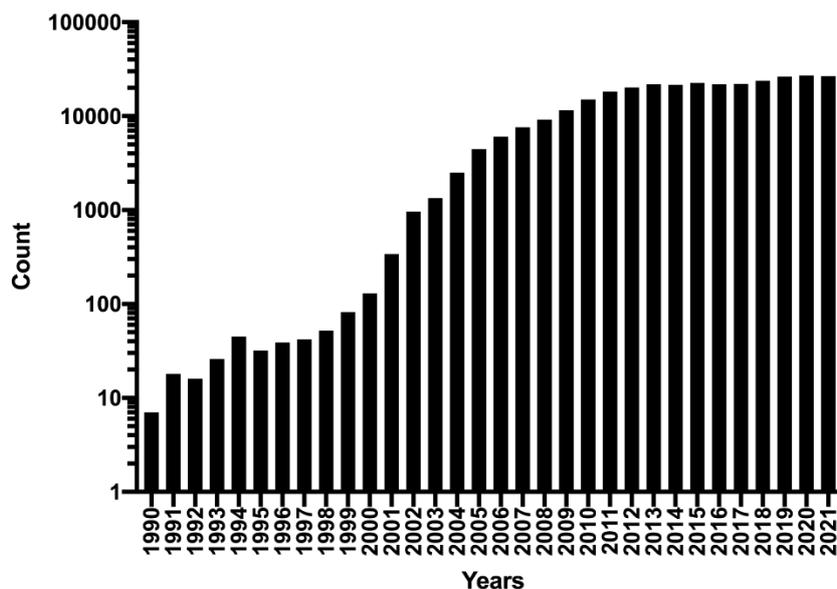
Du fait de leurs propriétés physico-chimiques particulières, les nanomatériaux et par extension les nanoparticules sont utilisés depuis plus de 4500 ans. Au IV<sup>ème</sup> siècle, les Romains ont utilisé les nanoparticules métalliques en les mélangeant au verre en tant que pigment de couleur dans un but esthétique. Les nanoparticules d'or sont utilisées depuis cette époque pour donner au verre une couleur rouge éclatante. L'exemple le plus célèbre est la coupe de Lycurgue. Cette réalisation semble verte lorsqu'elle est éclairée par une lumière de face et paraît rouge lorsqu'elle est éclairée par l'arrière (Heiligtag and Niederberger 2013).

Puis, au IX<sup>ème</sup> siècle, en Mésopotamie, les nanoparticules métalliques ont été utilisées pour leurs propriétés optiques afin de créer un scintillement à la surface des céramiques (Sciau 2012).

D'un point de vue scientifique, la recherche sur les nanoparticules a pris un réel tournant en 1857 avec les travaux de Michael Faraday sur les «Relations expérimentales de l'or (et d'autres métaux) à la lumière» (Faraday 1857). Une des principales motivations à effectuer des recherches sur les nanoparticules est fondée sur ce que l'on appelle l'effet de la taille quantique. Les nanoparticules métalliques et semi-conductrices d'un diamètre de quelques nanomètres seulement, et dont la taille se situe donc entre celle des atomes individuels et celle des matériaux bruts, présentent des propriétés électroniques et optiques dépendantes de leur taille. L'observation de ces effets de taille a fait naître des attentes quant aux performances supérieures des nanomatériaux par rapport à leurs homologues en vrac dans de nombreuses applications, si la taille et la forme des particules peuvent être optimisées de manière rationnelle. Le développement de voies de synthèse permettant le

contrôle de la composition, de la taille des particules, de leur distribution et de leur forme est devenu indispensable pour étudier les propriétés des nanomatériaux en fonction de leur taille.

Au XXème siècle, c'est Richard Feynman qui, lors de son discours « *There's Plenty of Room at the Bottom* » en 1959, introduit la notion de l'infiniment petit. Il y annonçait une future révolution industrielle basée sur la création et la maîtrise de structures de plus en plus petites (Feynman, Richard 1959). Mais c'est en 1974 que le terme « nanotechnologies » a été utilisé pour la première fois par le Japonais Norio Taniguchi pour décrire l'usinage de précision des matériaux à l'intérieur de tolérances dimensionnelles à l'échelle atomique. Depuis, les recherches associées aux nanomatériaux ne cessent d'augmenter (figure 3) (Sauer et al. 2011).



*Figure 3 - Nombre de publications relatives aux nanomatériaux.*

Représentation graphique du nombre de publication en nanotechnologies. Les données ont été extraites de PubMed en mai 2022 en utilisant les requête suivante « Nanotechnologies » OR « Nanomaterials ». Adapté de Sauer U.G - Regul Toxicol 2011

### C. La réglementation des nanomatériaux

Si l'encadrement juridique des nanoparticules a progressé au cours des dernières décennies, les instances gouvernementales et européennes peinent à suivre le rythme rapide du développement et de l'utilisation massive des nanotechnologies. Aucune réglementation spécifique ne régit actuellement la manipulation des nanomatériaux en France. Au niveau européen, le programme REACH (Règlement sur l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des produits chimiques), entré en vigueur en 2007, a pour objectif de sécuriser la fabrication et l'utilisation des substances chimiques dans l'industrie européenne. Au sein de l'Union Européenne (UE), les nanoparticules sont considérées comme des agents chimiques. A ce titre, la réglementation en matière de prévention du risque chimique, prévue par le Code du Travail, s'applique aux nanomatériaux. Cependant, les produits chimiques font l'objet d'un enregistrement auprès de l'Agence Européenne des Produits Chimiques (ECHA) seulement pour des quantités produites et/ou importées supérieures à 1 tonne. Il semble donc évident que certains nanomatériaux produits et/ou importés en quantités inférieures puissent ne pas être déclarés.

La réglementation cosmétique constitue le premier outil légal européen contenant des dispositions spécifiques aux nanomatériaux. En 2009, le Règlement cosmétique a rendu obligatoire à partir de juillet 2013 le signalement de la présence des nanomatériaux dans la liste des ingrédients cosmétiques. (Castillo 2010). Depuis décembre 2014, le consommateur doit voir apparaître la mention [nano] dans les listes d'ingrédients des denrées alimentaires contenant des nanoparticules (Règlement (UE) n°1169/2011). Depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2020, des obligations au titre de REACH s'appliquent aux entreprises qui fabriquent ou importent des nanoformes. Ces obligations de déclaration permettent de répondre à des exigences d'information spécifiques.

En France, la loi du 12 juillet 2010 (n°2010-788) a fixé comme objectif, d'obtenir :

- une meilleure connaissance des nanomatériaux, à savoir leur identité, les quantités manipulées et les différents usages et domaines d'application ;
- leur traçabilité depuis le fabricant ou l'importateur jusqu'au distributeur
- le rassemblement de connaissances sur les nanomatériaux en vue de l'évaluation des risques et de l'information du public.

Les articles L. 523-1 et L.523-2 prévoient que les substances à l'état nanoparticulaire fassent l'objet d'une déclaration annuelle et que les entités concernées transmettent, sur demande, des informations complémentaires relatives aux dangers et aux expositions auxquelles ces substances sont susceptibles de conduire (Loi n°2010-788 L.523-1 et 523-2).

En février 2012, un décret relatif à la déclaration annuelle des substances particulières précise la nature des déclarants concernés, la définition retenue de la substance à l'état nanoparticulaire, le seuil de déclaration fixé à 100 grammes et la possibilité d'effectuer des demandes de confidentialité (décret n°2012-232 du 17 février 2012).

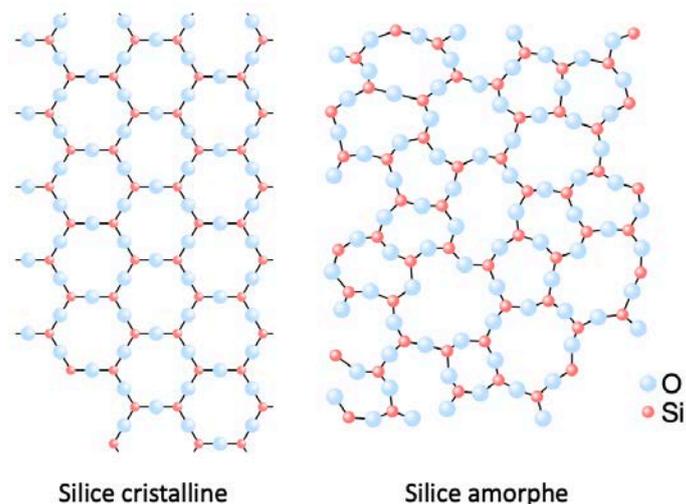
## D. La silice amorphe

### 1. Les différents types de silice

La silice ou dioxyde de silicium ( $\text{SiO}_2$ ) est un solide minéral. Elle est le composé le plus abondant de la croûte terrestre ('Essentials of Geology, 13th Edition'). Il s'agit d'un minéral blanc ou transparent pouvant se présenter sous différentes formes : elle existe à l'état libre sous forme cristalline ou amorphe mais aussi à l'état combiné sous forme de silicates. Le terme cristallin signifie que les constituants sont assemblés de manière régulière : le tétraèdre  $\text{SiO}_4$  se répète de façon périodique dans les trois dimensions de l'espace (figure 4). Le quartz, la cristobalite et la tridymite existent sous forme cristalline. La silice cristalline est un élément clé des produits industriels, présent dans de nombreux matériaux extraits du sol, et est un composant essentiel de nombreux

articles de notre vie quotidienne, notamment les peintures, le verre, les plastiques et les bétons mortiers ou enduits de façade. Ainsi, les travailleurs sont exposés à la silice dans de nombreux milieux professionnels notamment ceux du bâtiment et de la production de pneus, et l'inhalation excessive de silice cristalline respirable est associée à un risque accru de maladies respiratoires et systémiques. La silicose est probablement la maladie professionnelle la plus ancienne décrite liée à l'exposition à la silice. Cependant d'autres pathologies pulmonaires obstructives telles que la bronchopneumopathie pulmonaire obstructive ou des maladies auto-immunes sont d'autres manifestations indésirables liées à une exposition à la silice cristalline (Leung, Yu, and Chen 2012; Steenland and Ward 2014).

Pour son usage industriel, la silice peut également être d'origine synthétique et amorphe. A part la terre de diatomée, qui est d'origine naturelle, la silice amorphe est généralement synthétique. Le terme amorphe désigne le fait que les tétraèdres de  $\text{SiO}_4$  n'ont pas de structure spatiale fixe (figure 4). A l'échelle microscopique, ceux-ci n'ont pas de structure bien agencée.

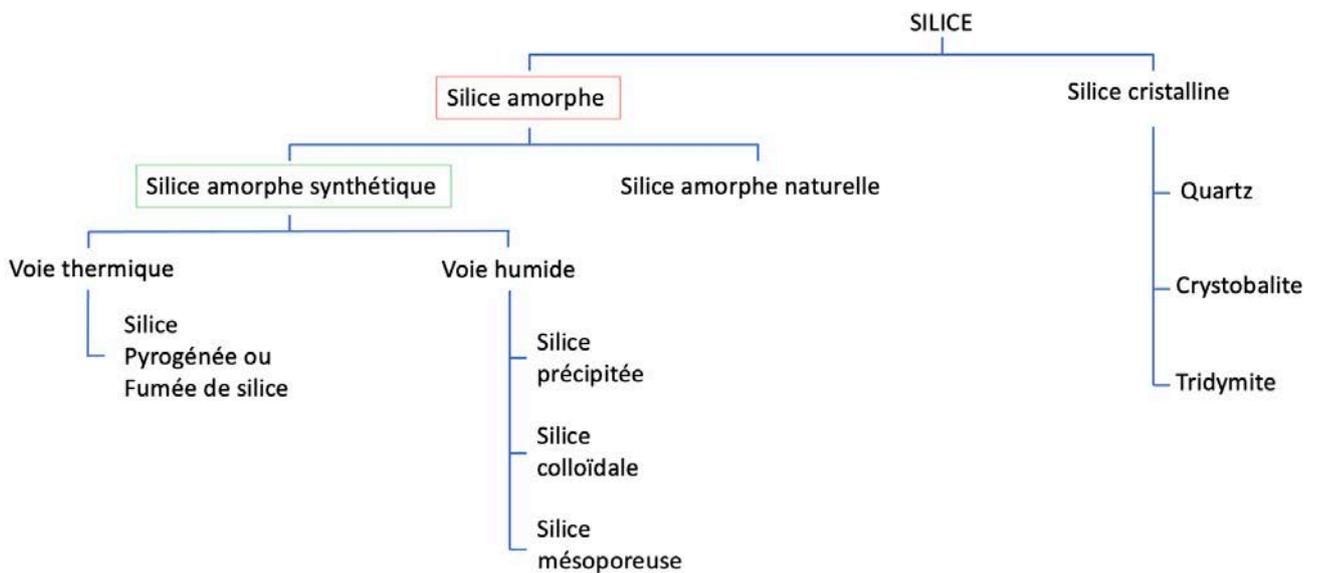


**Figure 4** - Représentation schématique en deux dimensions de la structure atomique de la silice cristalline et de la silice amorphe.

La silice cristalline est un assemblage du tétraèdre  $\text{SiO}_4$  qui se répète de façon périodique dans les trois dimensions de l'espace. La silice amorphe est une répétition de tétraèdres de  $\text{SiO}_4$  sans structure spatiale fixe. Adapté de Chaguetmi, 2010.

## 2. Procédés d'obtention des nanoparticules de silice amorphe

La silice a une structure tétraédrique, chaque atome de silicium étant lié de manière covalente à quatre atomes d'oxygène. Selon le procédé de fabrication, nous distinguons les silices obtenues par voie humide ou celles obtenues par voie thermique (figure 5) (Napierska et al. 2010). La voie de synthèse et donc le type de silice produit aura un impact sur les effets biologiques et toxiques observés (Zhang et al. 2012; Pavan et al. 2013a).

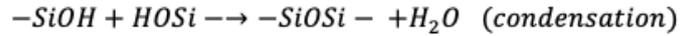
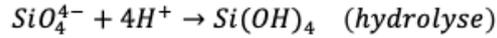


**Figure 5** - Procédés de production des nanoparticules de silice amorphe.

La silice peut être cristalline ou amorphe. La silice amorphe est naturelle ou synthétique. Pour son usage industriel, la silice amorphe est d'origine synthétique. Deux voies de production sont distinguées, la voie thermique et la voie humide. D'après l'OECD SIDS 2004.

La voie humide mène à la silice mésoporeuse, la silice colloïdale et la silice précipitée (figure 5) (Zhang et al. 2012). La silice mésoporeuse sera obtenue par polycondensation d'un précurseur inorganique  $\text{SiO}_4^-$  autour de micelles de tensioactif. Le tensioactif choisi sera porté à une concentration dite « concentration micellaire critique » pour laquelle le tensioactif va s'organiser en réseau hexagonal de micelles

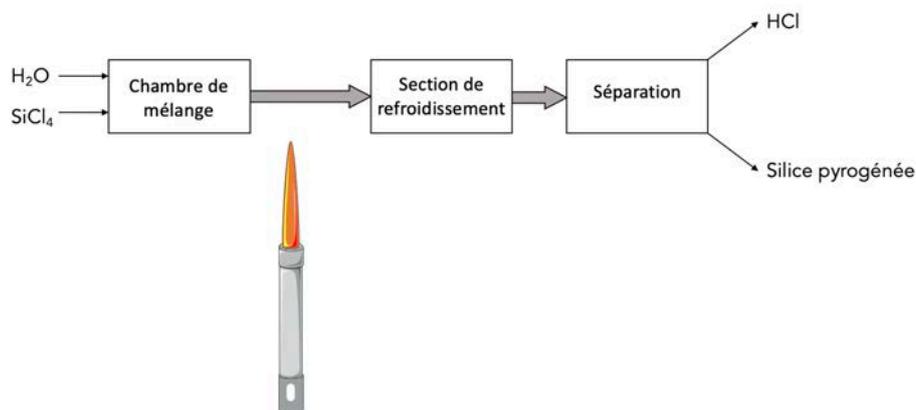
autour desquelles se formera le polymère de silice. Enfin, l'élimination du tensioactif après la formation de la structure de silice mènera à la silice mésoporeuse. La surface spécifique (rapport de la surface réelle d'un objet et de la quantité de matière de l'objet exprimé en  $\text{m}^2/\text{g}$ ) des silices mésoporeuses peut atteindre  $1000 \text{ m}^2/\text{g}$  (Benamor 2011). Le terme « voie humide » regroupe deux procédés que sont la microémulsion et le procédé Sol-Gel. La micro-émulsion est utilisée pour la synthèse de nombreuses nanoparticules telles que celles de  $\text{ZnS}$ ,  $\text{TiO}_2$  ou  $\text{CaCO}_3$ . Elle permet d'obtenir des nano-gouttelettes colloïdales thermodynamiquement stabilisées par un film de tensioactif. Le processus Sol-Gel est une technique fréquemment utilisée pour préparer des nanoparticules de silice. Il implique le développement de réseaux par une suspension colloïdale et une gélification pour former un système en phase liquide continue. Le procédé Sol-Gel nécessite quatre étapes que sont l'hydrolyse, la condensation des groupements silanols, la croissance et l'agrégation (Singh et al. 2014; Shi 2019). Le procédé Sol-Gel permet d'obtenir des silices ayant une surface spécifique comprise entre  $300$  et  $1000 \text{ m}^2/\text{g}$ . Le procédé de fabrication de la silice précipitée consiste en une réaction entre un acide et une solution de silicate. Deux réactions chimiques sont mises en jeu : l'hydrolyse et la condensation. L'hydrolyse consiste en la neutralisation du silicate par l'acide. Ceci permet la formation de groupements silanols. Puis, ces derniers se condenseront pour former des liaisons Si-O-Si, appelés ponts siloxanes (figure 6). Une fois ces deux étapes achevées, des étapes de nucléation, croissance et agrégation et/ou agglomération auront lieu pour mener à une dispersion de silice qui contient les particules de silices, les sels issus des réactions précédentes et de l'eau. La dispersion sera ensuite filtrée, lavée et séchée. La silice précipitée présentera une surface spécifique comprise entre  $20$  et  $600 \text{ m}^2/\text{g}$  (Zhang et al. 2012; Ragueh 2012).



**Figure 6** - Les mécanismes chimiques mis en jeu pour synthétiser la silice précipitée.

Les deux réactions mises en jeu lors de la synthèse des silices précipitées sont l'hydrolyse conduisant à la formation de groupements silanols puis la condensation menant à la formation de ponts siloxanes.

La voie thermique, aussi appelée pyrolyse à flamme, permet d'obtenir la silice pyrolytique ou fumée de silice qui a été utilisée dans notre étude. Cette méthode consiste à réaliser la réaction  $\text{SiCl}_4 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SiO}_2 + 4\text{HCl}$  à des températures allant de 1200°C à 1400°C, suivie d'un refroidissement rapide. Le  $\text{SiCl}_4$  est vaporisé continuellement dans un mélange d'air et de dihydrogène et est introduit dans un brûleur où se formera l'aérosol de silice (figure 7). Au fur et à mesure que les composés progressent dans la chambre de combustion, des particules de taille nanométrique se forment et restent à l'état liquide à haute température. Elles fusionnent ensuite entre elles. Dans les zones plus froides de la flamme, elles commencent à se solidifier pour former des agrégats. La silice est ensuite séparée des gaz contenant du HCl par filtration. La variation de la concentration des réactifs, de la température de la flamme et du temps de séjour du gaz dans la chambre de combustion permet aux fabricants de contrôler les propriétés physico-chimiques de ces silices (Ramussen et al. 2013). En fonction des conditions de production, la surface spécifique des silices obtenues par cette méthode est comprise entre 50 et 380 m<sup>2</sup>/g (Pratsinis 1998; Cho et al. 2009).



*Figure 7 - Schéma du procédé de pyrolyse à flamme.*

Le  $\text{SiCl}_4$  est vaporisé continuellement dans un mélange d'air et de dihydrogène et est introduit dans un brûleur où se formera l'aérosol de silice. Les composés progressent dans la chambre de combustion, des particules de taille nanométrique se forment et restent à l'état liquide à haute température. Elles fusionnent ensuite entre elles. Adapté de Pratsinis 1998.

## II. Utilisation des nanomatériaux, cas particulier des nanoparticules de silice amorphe.

Le marché des nanotechnologies est en très forte croissance, à l'échelle mondiale il est estimé entre 150 et 200 milliards d'euros en 2018 (Laux et al. 2018). Les secteurs principalement concernés sont ceux de la santé et du bien-être. Les nanoparticules sont utilisées comme agent de contraste, comme les nanoparticules de fer. Les nanoparticules de titane sont retrouvées notamment dans les équipements chirurgicaux, jouant le rôle d'antibactériens (Ruaux 2017). Certains cosmétiques comme les crèmes solaires contiennent des nanoparticules de dioxyde de zinc et de titane en raison de leurs propriétés de filtres UV (Monteiro-Riviere et al. 2011). Cet engouement industriel pour les nanoparticules s'explique par leurs propriétés physiques, chimiques et mécaniques. Cependant, il y a un manque de données évident sur l'exposition de la population générale du fait du manque de traçabilité des nanoparticules utilisées dans les produits d'usage courant et surtout des

nanoparticules contenues dans l'alimentation.

Les nanoparticules de silice amorphe ont une utilisation polymorphe (Wang et al. 2015; Hoang Thi et al. 2019). Elles occupent la deuxième position du registre R nano pour la quantité la plus importante de substances à l'état nanoparticulaire agréées présente en France, derrière le noir de carbone et devant le carbonate de calcium. Selon le *Market Analysis Report* de la *Grand View Research*, le marché global des nanosilices pourrait atteindre 5140,2 millions de dollars en 2025.

Les nanoparticules de silice amorphe sont utilisées pour développer des sondes d'imagerie nanométrique dans lesquelles l'agent de contraste est protégé par une matrice de silice. L'encapsulation du fluorophore dans la matrice de silice augmente l'intensité du fluorophore et la stabilité du signal de fluorescence (Kumar et al. 2008). La silice amorphe précipitée est utilisée dans les pneumatiques en association avec le noir de carbone. Elle diminue de 30% leur résistance au roulement et donc la consommation de carburant. Dans les dentifrices, elle permet d'adapter la rhéologie des pâtes et apporte un pouvoir polissant et nettoyant. Elle est également incorporée dans les crèmes en tant qu'agent épaississant. Dans l'industrie agro-alimentaire et pharmaceutique, elle a pour fonction d'épaissir les liquides ou de favoriser l'écoulement des poudres ('Silices synthétiques' 2020). En tant qu'additif alimentaire, les silices amorphes sont plus communément appelées E551. Elles fixent l'humidité et s'opposent ainsi à la prise en masse des poudres. Elles peuvent absorber jusqu'à deux fois leur masse en liquide et sont utilisées parfois comme support de liquides visqueux et hygroscopiques tels que les vitamines utilisées dans les compléments alimentaires.

La silice pyrogénée est notamment utilisée pour ses propriétés thixotropiques dans l'industrie du bâtiment et des travaux publics, phénomène par lequel certains mélanges passent de l'état de gel à celui de liquide par une légère agitation. Elles entrent dans la composition des bétons utilisés notamment pour les ponts routiers, les structures maritimes et les tabliers de ponts soumis à une détérioration constante

causée par le courant, l'abrasion et les attaques chimiques. Elles protègent de l'eau de mer, de la circulation routière et des cycles de gel et de dégel. L'activité de corrosion et la détérioration du béton sont pratiquement éliminées, ce qui minimise les coûts d'entretien. Elles confèrent plus de souplesse de conception dans les immeubles de grande hauteur. Les bétons à haute résistance contenant de la silice pyrogénée sont souvent utilisés dans les poutres préfabriquées permettant des portées plus longues. Nous retrouvons également ce type de silice dans les bétons projetés. Ceci entraîne une utilisation plus efficace et l'obtention d'un béton de meilleure qualité. Il présente une grande force d'adhérence et assure ainsi des applications plus épaisses à chaque passage de la buse à béton avec moins de perte de rebond (Bredy Tuffe et al. 2011; Detwiler, Kojundic, and Fidjestøl 1997).

## Chapitre 2 : Toxicité des nanoparticules

### I. Effets chez l'Homme des nanoparticules

Les études sur le danger des nanoparticules sont nombreuses, cependant les données d'exposition sont encore peu précises et résultent souvent de modélisations mathématiques. Les organes cibles pouvant être atteints par les nanoparticules sont majoritairement la peau, le poumon et le tractus gastro-intestinal. Ils y sont directement exposés en cas de contamination accidentelle des travailleurs dans les usines de production ou en cas d'usage de produits contenant les nanoparticules (Carrière 2012). Avant de fusionner avec l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail), l'AFSSET (Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail) a publié en 2006 des rapports relatifs aux effets des nanomatériaux sur la santé de l'homme, l'environnement et la sécurité au travail. Ces derniers indiquent qu'il faut améliorer la connaissance des nanoparticules et des nanomatériaux, notamment en créant une base de données exhaustive relative aux produits existant sur le marché et établissant leurs caractéristiques. Ils proposent également de déterminer une stratégie globale de surveillance de l'exposition aux nanomatériaux dans les ateliers et dans l'environnement et de mettre au point des tests normalisés de criblage toxicologique à haut débit (AFSSET 2006; Courtois, Bémer, and Binet 2021).

Les connaissances relatives aux effets sur la santé humaine des nanoparticules sont limitées. Le développement d'études épidémiologiques est un défi en raison du manque de données d'exposition, de l'hétérogénéité des données produites et du manque de représentativité des données actuelles sur l'exposition aux nanoparticules. L'étude de l'exposition aux polluants atmosphériques a mis en évidence des effets cardiovasculaires et respiratoires à court terme (Prosie, Lesage, and Deschamps 2008). Parmi les particules pour lesquelles des données

épidémiologiques existent, les particules fines font partie de celles pour lesquelles nous avons le plus de données. Les effets potentiels des particules fines documentés chez l'homme sont issus d'études épidémiologiques de mortalité. L'incidence des symptômes cardiovasculaires pourrait être liée au niveau élevé de concentration de particules ultrafines dans l'atmosphère, provenant principalement des émissions des véhicules. Des études sur 45 volontaires sains ont démontré que le taux de particules inhalées (particules ultrafines  $< 2,5 \mu\text{m}$ ) a des effets directs sur la physiologie cardiovasculaire avec des altérations du rythme cardiaque, se traduisant par la dépression du segment ST, et une altération du diamètre artériel (Pekkanen et al. 2002). L'inhalation des particules ultrafines de carbone chez des volontaires asthmatiques montre une augmentation de l'inflammation de l'épithélium pulmonaire, l'apparition d'une hyper-réactivité bronchique et une vasoconstriction pulmonaire et/ou systémique. Une chute du taux des leucocytes est également mise en avant (Frampton et al. 2006).

Les études épidémiologiques s'intéressant à la silice se sont dans un premier temps intéressées aux effets de la silice cristalline. A l'heure actuelle, il est bien connu que l'exposition à la silice cristalline peut induire des pathologies graves tels que la silicose ou un cancer pulmonaire. L'impact de la silice amorphe sur la santé humaine, est quant à lui, moins étudié (Leung, Yu, and Chen 2012).

Les éventuels effets néfastes des SAS-NP sur la santé ont jusqu'à présent fait l'objet de très peu d'études épidémiologiques. Une étude menée sur 165 travailleurs pendant 8 ans n'a montré aucune association entre l'exposition aux SAS-NP précipitées et la variation de la fonction pulmonaire (Wilson et al. 1979). D'autres auteurs, dans une étude menée sur 131 travailleurs d'une usine de synthèse de vitamine C exposés à la silice amorphe, ont signalé une réduction des débits expiratoires forcés dans le groupe exposé à la silice amorphe en comparaison au groupe témoin, mais aucune relation exposition-réponse n'a été observée (Choudat et al. 1990). Ces données ont été complétées en 2016 par une étude

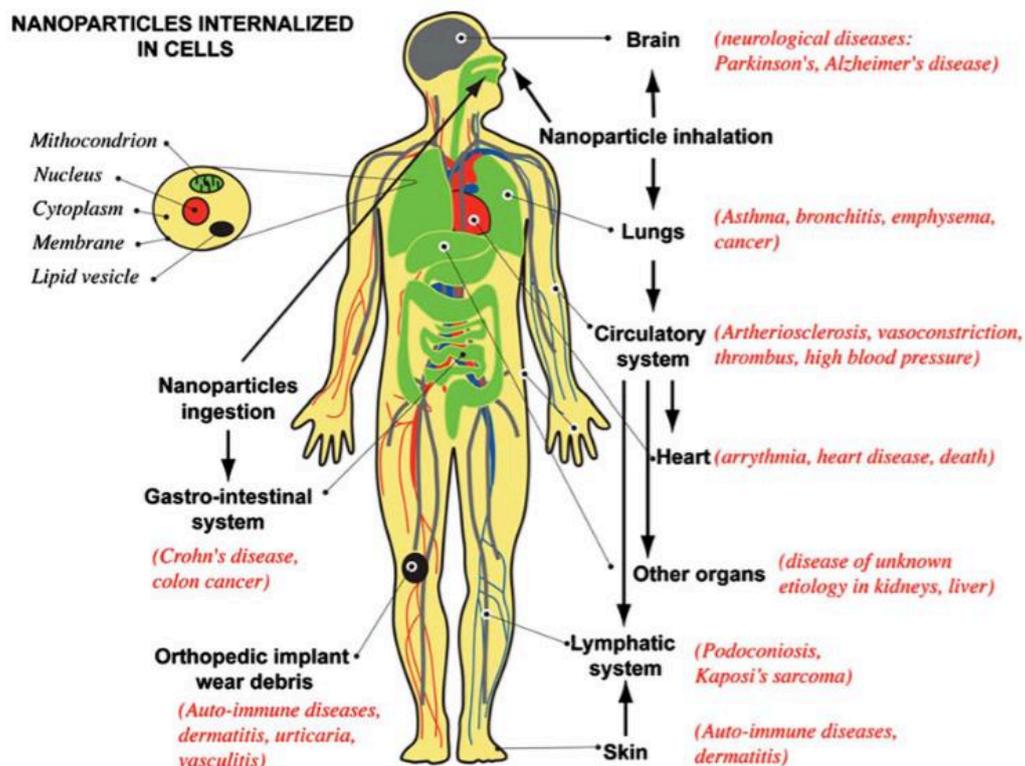
épidémiologique évaluant l'impact sanitaire d'une exposition chronique aux SAS-NP sur la morbidité respiratoire non maligne. Cette étude a été menée sur 460 travailleurs de cinq usines allemandes de production de silice amorphe synthétique. L'exposition à la silice amorphe synthétique a été associée à une réduction de la capacité vitale forcée, mais n'a eu aucun effet sur le volume expiratoire forcé. Cette étude fournit des preuves limitées d'effets mineurs, liés à la dose, de l'exposition chronique à la silice amorphe synthétique sur la fonction pulmonaire (Taeger et al. 2016).

Un appel à données sur l'exposition aux SAS-NP en tant qu'additif alimentaire a été ouvert par l'*European Food Safety Authority* (EFSA) entre octobre 2018 et mai 2020 avec pour objectif la réévaluation de l'utilisation de l'E551. Cependant, faute de réponses, l'autorisation de cet additif alimentaire sera révisée sur la base de l'avis scientifique actuel de l'EFSA. Selon l'ANSES, pour une raison inexplicée, aucun autre appel à données supplémentaire ne sera ouvert. L'autorisation actuelle de cet additif alimentaire serait révisée sur la base de l'avis scientifique actuel de l'EFSA et l'additif pourrait être retiré de la liste des additifs autorisés de l'Union européenne (AVICENN 2022). En attendant de connaître les résultats, des scientifiques signalent des effets indésirables non négligeables tels que des effets allergisants que nous développerons dans les chapitres suivants.

## **II. Exposition aux nanoparticules et impact sur les systèmes biologiques**

Nous pouvons être exposés aux nanoparticules par différentes voies, soit par contact avec la peau, soit par ingestion ou alors par inhalation. Ces différentes voies d'exposition de l'organisme influenceront sur le profil toxicologique des nanoparticules. Plus rarement, pour certaines applications médicales, il est nécessaire d'injecter les nanoparticules directement dans la circulation systémique (produit de contraste). Un consommateur sera majoritairement exposé par contact dermique (cosmétiques,

tatouages) ou par ingestion (additifs alimentaires) alors que certains travailleurs seront exposés par inhalation (industrie du bâtiment et des travaux publics). Un même type de nanoparticules est susceptible d'induire des pathologies différentes selon les voies d'exposition et par conséquent les organes exposés. A titre d'exemple, si les nanoparticules sont inhalées, elles cibleront en premier lieu l'arbre respiratoire. Les nanoparticules qui atteignent les alvéoles sont phagocytées par les macrophages alvéolaires en fonction de leur taille. Ceux-ci, chargés de particules, quittent le niveau alvéolaire et migrent dans l'interstitium alvéolaire vers les ganglions lymphatiques, lieux de prolifération et de différenciation des cellules immunitaires, et vers la circulation sanguine (figure 8) (Oberdörster, et al. 2005; Buzea, Pacheco, and Robbie 2008).



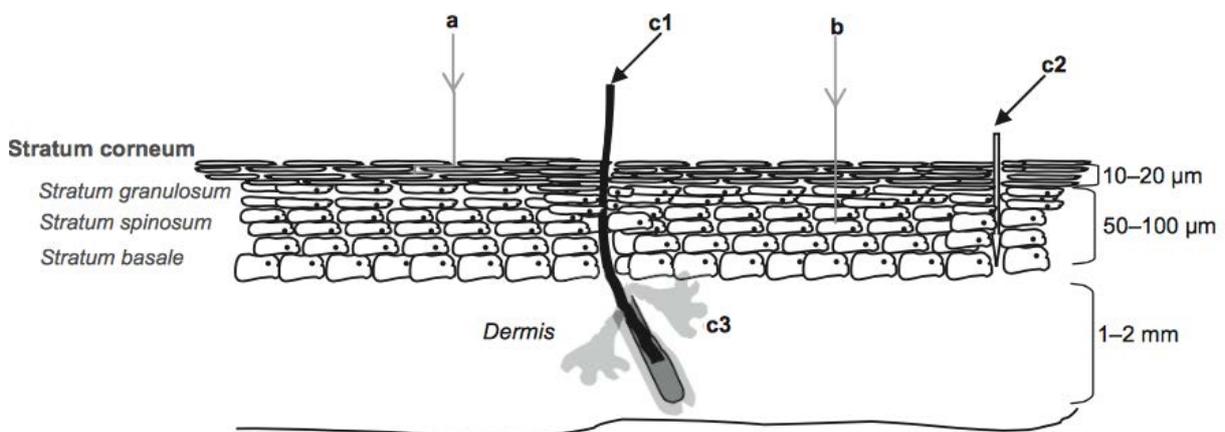
**Figure 8** - Différentes voies de pénétration des nanoparticules dans l'organisme et risques associés

Schéma des différentes voies d'exposition aux nanoparticules, les organes affectés et les maladies associées résultant d'études épidémiologiques, *in vivo* et *in vitro*. D'après Buzea et al. 2007.

## A. Interactions entre les nanoparticules et la peau

La peau est le plus grand organe du corps humain, présentant une surface totale d'environ 2 m<sup>2</sup>. Elle forme une barrière de protection et représente par conséquent l'organe le plus exposé à l'environnement extérieur et potentiellement aux nanomatériaux. Cependant, au même titre que de nombreuses substances, la pénétration des nanoparticules au travers de la peau est toujours controversée.

L'état de la peau ainsi que les contraintes mécaniques jouent un rôle déterminant dans la capacité des nanoparticules à la traverser (Oberdörster, et al. 2005). Bien que plusieurs études révèlent un passage au niveau des follicules pileux, des glandes sébacées et des glandes sudoripares pour rejoindre la circulation systémique et les nœuds lymphatiques (figure 9) (Hoet, Brüske-Hohlfeld, and Salata 2004), d'autres études montrent l'incapacité des nanoparticules à franchir le *stratum corneum* lorsque l'épiderme est sain (Zvyagin et al. 2008).



**Figure 9** - Voies de pénétration des nanoparticules à travers la peau

L'épiderme est constitué de trois couches de cellules : le *stratum basale*, le *stratum spinosum* et le *stratum granulosum*. Les voies de pénétration cutanée des nanoparticules comprennent les voies paracellulaires (a), transcellulaire (b). Elles peuvent pénétrer à travers la peau au niveau des follicules pileux (c1), des pores sudoripares (c2) et des glandes sébacées (c3). D'après Smijs et Pavel, 2011.

Il a été montré *in vivo* et *in vitro* que les SAS-NP pouvaient franchir la barrière cutanée après 28 jours consécutifs d'application topique. Les nanoparticules ont été retrouvées au niveau du *stratum corneum* mais aussi des nœuds lymphatiques, du parenchyme hépatique et du cortex cérébral. *In vitro*, ces études ont montré dans un modèle de kératinocytes que les SAS-NP étaient internalisées par ce type cellulaire et qu'elles diminuaient sa prolifération. Il est également suggéré que la localisation intracellulaire des SAS-NP serait étroitement liée avec l'induction des effets néfastes observés. Par exemple, la localisation de particules les mitochondries serait liée à un dysfonctionnement mitochondrial ou à un stress oxydant (Nabeshi et al. 2011; Matsuo et al. 2016).

Monteiro-Riviere *et al.*, ont montré *in vitro* et *in vivo* sur le porc (modèle animal accepté pour mimer la peau humaine) que des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> et de ZnO contenues dans les écrans solaires pouvaient pénétrer dans les couches supérieures du *stratum corneum* lorsqu'il était lésé. La pénétration reste superficielle et est modulée par les différentes formulations des crèmes solaires (Monteiro-Riviere et al. 2011). Les nanoparticules peuvent aussi atteindre le sang et les ganglions lymphatiques par l'intermédiaire des capillaires sanguins et des cellules phagocytaires (cellules de Langerhans et macrophages). Ceci est observé majoritairement chez les personnes tatouées, dont l'épiderme est perforé pour déposer l'encre au niveau du derme. Les pigments contiennent des particules qui, une fois dans le derme, pourront atteindre la circulation systémique et se distribuer potentiellement dans d'autres organes comme le foie (Sepehri et al. 2017). Une étude sur des explants de peau humaine a souligné que les interactions particules-peau sont encore plus complexes à appréhender que les interactions particules-cellule *in vitro*. En effet, elles abordent la question du comportement des particules au contact de l'environnement multicellulaire de la peau qui pourrait modifier leurs propriétés et, par conséquent, l'internalisation des particules par les cellules présentes dans les couches de la peau. Deux études *in vivo* n'ont mis en évidence aucune toxicité cutanée lorsque les SAS-

NP colloïdales ou mésoporeuses étaient appliquées directement sur la peau saine (Ryu et al. 2014; Lu et al. 2018). En raison de l'utilisation répandue de la silice dans les produits dermatologiques, certaines études tentent d'évaluer si l'utilisation des SAS-NP dans ces derniers pourrait aggraver l'inflammation déjà présente chez des patients atteints de dermatite atopique ou de dermatite de contact. Il a aussi été montré que sur une peau lésée les SAS-NP pouvaient être retrouvées au niveau des kératinocytes du stratum corneum (Rancan et al. 2012). Hirai et al. ont montré *in vivo* sur un modèle de souris NC/Nga, mimant la dermatite atopique, que l'application de SAS-NP, dont le procédé d'obtention n'est pas précisé, associées aux antigènes d'acariens aggrave les lésions cutanées de type dermatite atopique de manière dépendante de la taille. Ceci se traduit par une augmentation de la production d'IL-18 et de TSLP (Thymic stromal lymphopoietin) (Hirai et al. 2012; 2015).

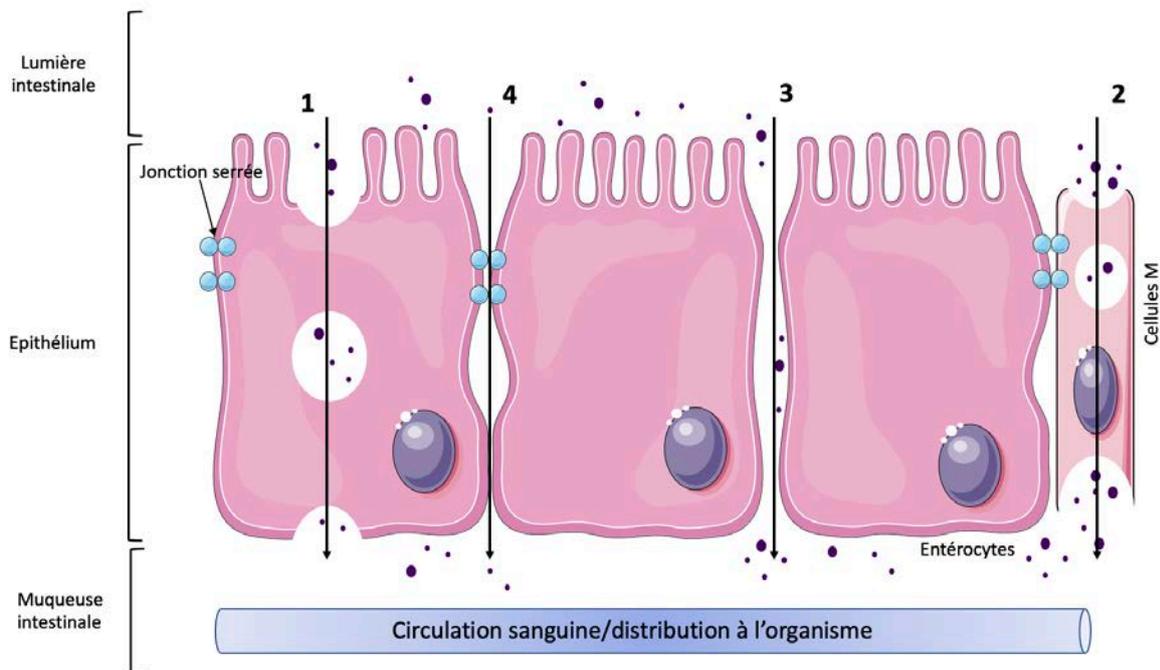
## B. Interactions entre les nanoparticules et le tube digestif

Les nanoparticules sont omniprésentes dans l'industrie agro-alimentaire. Elles sont utilisées en tant qu'additif alimentaire mais peuvent également être présentes dans les emballages. L'ingestion de nanoparticules peut se faire par ingestion directe des nanomatériaux contenus dans l'alimentation, les cosmétiques ou les médicaments. Elles peuvent également être éliminées de la voie respiratoire par le drainage muco-ciliaire et se retrouver alors dans le tractus gastro intestinal (Oberdörster, et al 2005). Avec près de 200 m<sup>2</sup> de surface, l'épithélium intestinal présente une forte capacité d'interaction avec les nanomatériaux.

Selon plusieurs études, après ingestion, la translocation des nanoparticules dans et à travers la muqueuse gastro-intestinale peut se produire par quatre voies différentes (figure 10) :

- L'endocytose médiée par les entérocytes

- La transcytose par les cellules M, cellules présentatrices d'antigène
- La translocation par persorption intestinale et voie paracellulaire
- La translocation paracellulaire



**Figure 10** - Schéma des voies de translocation des nanoparticules au travers de l'épithélium gastro-intestinal

1. Endocytose par les entérocytes (principal type cellulaire de l'épithélium intestinal) par lesquels de très petites NPs (diamètre <50-100nm) peuvent traverser. 2. La transcytose par les cellules M, concentrées dans les plaques de Peyer (amas lymphoïdes dans l'intestin grêle). 3. Passage par persorption au travers de lacunes laissées dans l'épithélium suite à la perte d'entérocytes (apoptose). De petites et larges NPs sont susceptibles d'accéder aux muqueuses de l'intestin par cette voie, qui reste quantitativement peu efficace. 4. Translocation paracellulaire, déterminée par l'efficacité des complexes de protéines des jonctions serrées qui régulent cette voie de passage entre les cellules épithéliales. Le passage paracellulaire est classiquement une voie d'échanges pour l'eau et les électrolytes. Seules des NPs de petites dimensions, hydrophiles, sont susceptibles de traverser l'épithélium intestinal par cette voie chez l'individu sain. Adapté de Powell *et al.* 2010

La voie de transcytose par les cellules M est la voie la plus abondamment décrite pour l'absorption des nanoparticules présentes dans la lumière intestinale, en particulier

pour les NP de grande taille (20-100 nm) et les agrégats submicroniques (100-500 nm) (Turner 2006; Houdeau 2012; 2018).

Les premières études menées sur l'exposition aux nanoparticules par la voie digestive ont été réalisées par Jani *et al.* Après administration orale de nanoparticules de polystyrène chez le rat, une absorption par la muqueuse de ces particules de manière dépendante de leur taille a été constatée (P. Jani *et al.* 1990). Ces particules ont été retrouvées au niveau des plaques de Peyer mais aussi dans certains organes tels que le foie, la rate, la moelle osseuse et les reins. Quelques années plus tard, cette même équipe a mis en évidence le passage de la barrière intestinale après administration orale de nanoparticules de dioxyde de titane à la dose de  $12,5 \text{ mg.kg}^{-1}$  et dont la taille allait jusqu'à 500 nm (Jani, McCarthy, and Florence 1994).

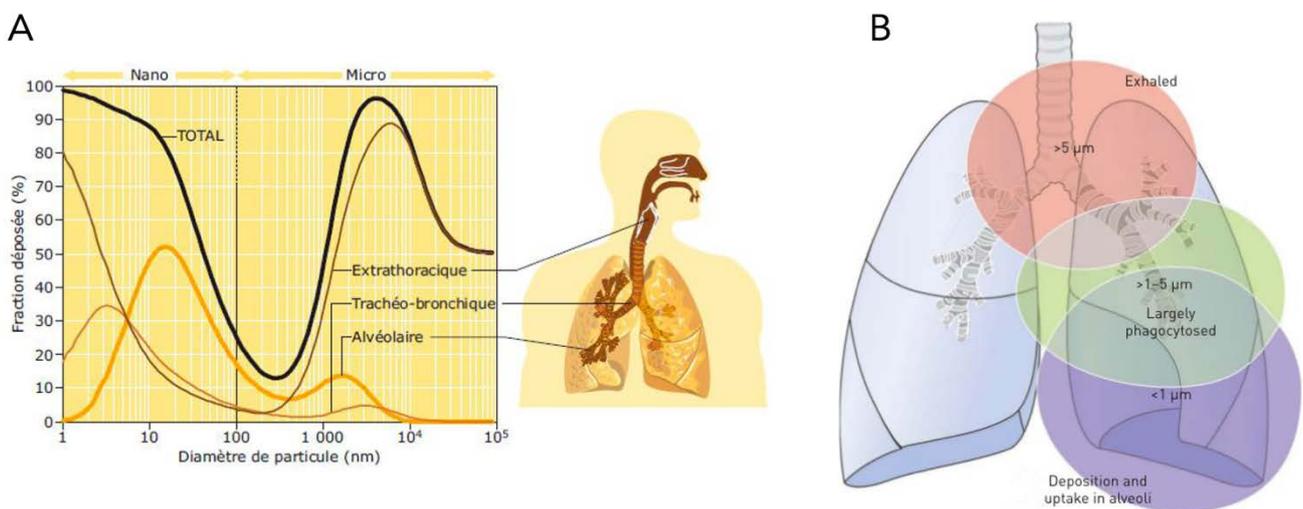
Les SAS-NP sont concernées par l'exposition par voie digestive. Elles sont largement utilisées dans l'industrie agro-alimentaire en tant qu'anti-agglomérant et épaississant depuis 1920. Selon le forum NanoResp (espace de dialogue multi-acteurs dédié aux nanotechnologies), la consommation européenne est en moyenne de  $9,4 \text{ mg.kg}^{-1}$  de poids corporel par jour pour un homme de 70 kg, ce qui équivaut à environ  $660 \text{ mg.jour}^{-1}$  alors que la consommation ne devrait pas dépasser la NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) qui est de  $5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$  ('Compte Rendu NanoResp 2017' 2017; 'Compte Rendu NanoResp 2018' 2018). Des études ont montré sur des modèles de digestion humaine *in vitro* que les SAS-NP devenaient biodisponibles dans des « conditions intestinales », c'est-à-dire à pH faible et en présence d'un fort taux d'électrolytes (Peters *et al.* 2012). Dans un modèle mimant les sacs intestinaux, il a été mis en évidence que des SAS-NP carboxylées d'une taille de 70 nm de diamètre étaient absorbées au niveau intestinal. Cependant, après 28 jours d'exposition de rats à ces particules, aucun effet biologique *in vivo* n'a été observé (Yoshida *et al.* 2014). Plus récemment, dans un modèle de souris atteintes d'une colite, une exacerbation de la pathologie a été observée lorsque les animaux étaient exposés par voie orale à  $3 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$  de SAS-NP de 10 nm de diamètre, dont le procédé d'obtention n'est

pas déterminé, pendant 8 jours. La dose utilisée dans cette étude est comparable à la consommation humaine de SAS-NP en tant qu'additifs alimentaires (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS) et al. 2018). En revanche, aucune influence sur l'inflammation intestinale n'a été observée avec des nanoparticules de plus gros diamètre. Les SAS-NP de plus petit diamètre pénétreraient la barrière muqueuse intestinale pour atteindre la *lamina propria* intestinale, où elles activeraient les macrophages. Le mécanisme d'exacerbation de l'inflammation observé aurait lieu par l'intermédiaire de l'activation de l'inflammasome NLRP3 (*NOD-like receptor family pyrin domain containing 3*). Cependant le mécanisme par lequel les SAS-NP traversent la barrière muqueuse intestinale dans cette étude n'est pas encore compris (Ogawa et al. 2021).

### C. Interactions entre les nanoparticules et les poumons

L'appareil respiratoire constitue une des voies d'exposition aux nanoparticules qui suscite le plus d'intérêt. Cette voie est largement étudiée du fait des maladies pulmonaires professionnelles liées à l'inhalation de silice cristalline et d'amiante pouvant entraîner des pneumoconioses et des cancers (Wagner, Sleggs, and Marchand 1960; Leung, Yu, and Chen 2012). L'exposition professionnelle peut survenir lors de la fabrication et de l'utilisation des nanoparticules. Bien que les travailleurs soient les plus concernés par les risques d'inhalation de nanoparticules, l'opinion publique est plus sensibilisée aux questions relatives à la pollution de l'air par les particules fines et ultrafines. Du fait de leur taille, les nanoparticules se déposent à différents niveaux de l'arbre respiratoire. Les nanoparticules inhalées peuvent soit être exhalées, soit se déposer dans les régions nasopharyngée, trachéobronchique et alvéolaire (figure11). La commission internationale de protection radiologique a mis au point un modèle mathématique prédictif permettant de déterminer les régions de dépôt des particules inhalées au sein de l'appareil

respiratoire. Ces prévisions s'appliquent aux particules inhalées sous forme de singulet et non sous forme d'agrégats (Oberdörster, et al 2005; van Rijt, Bein, and Meiners 2014). En fonction de leur taille, elles n'auront pas le même devenir. Les particules de l'ordre du micromètre seront retrouvées majoritairement au niveau des voies aériennes supérieures (fosse nasale, bouche, pharynx, larynx). Les nanoparticules quant à elles seront retrouvées majoritairement dans les voies respiratoires inférieures notamment au niveau des alvéoles pulmonaires (figure 10) (Carvalho, Peters, and Williams 2011).

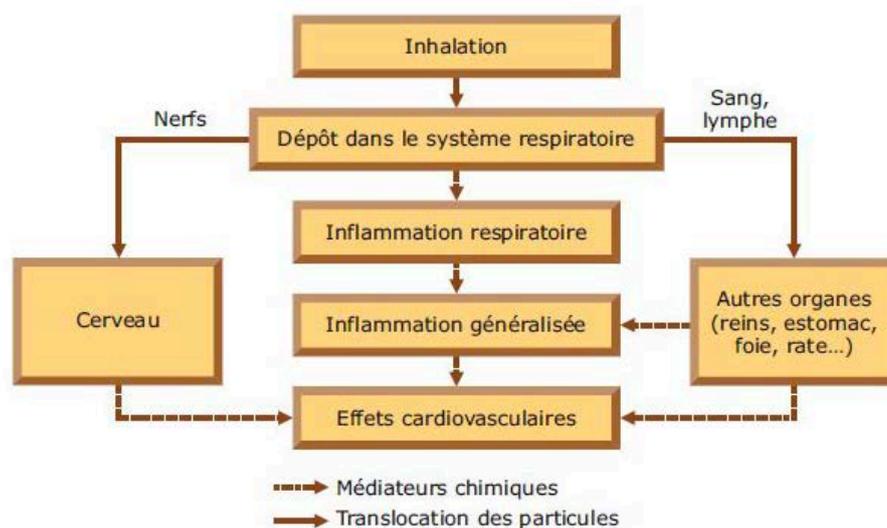


**Figure 11** - Devenir des particules inhalées en fonction de leur taille au niveau pulmonaire.

A) Influence de la taille des particules inhalées sur la répartition au niveau pulmonaire. B) Représentation schématique du dépôt des nanoparticules dans les poumons en fonction de leur taille. D'après l'INRS Dossiers nanomatériaux, nanoparticules et Rijt, Bein et Meiners 2014.

La taille des particules influencera également leur clairance. Les particules ayant une taille supérieure à 5 μm sont plus facilement éliminées par exhalation. Les particules de taille comprise entre 1 et 5 μm seront largement phagocytées et éliminées par les macrophages alors que les particules de taille inférieure à 1 μm se déposeront au niveau des alvéoles (van Rijt, Bein, and Meiners 2014). Certaines particules ne seront

pas éliminées efficacement par phagocytose, par exemple dans le cas de nanofibres ou nanotubes trop longs pour être entièrement pris en charge par la cellule (Brown et al. 2007). On parle alors de « phagocytose frustrée » ou incomplète. A la suite de ce phénomène, les nanoparticules pourront alors s'accumuler au niveau alvéolaire et seront susceptibles de passer la barrière alvéolo-capillaire pour rejoindre les structures ganglionnaires, atteindre la circulation générale et d'autres organes (figure 12) ( Oberdörster, et al 2005; Rothen-Rutishauser, Kiama, and Gehr 2005). Des mécanismes d'inflammation, de stress oxydant, de génotoxicité ou d'apoptose peuvent être déclenchés (Kuschner and Wright 1976). Une altération de clairance des NP peut également mener à la biopersistance de ces dernières. Sun et *al.* ont montré sur un modèle murin que les SAS-NP pyrogénées pouvaient persister dans le poumon et ainsi provoquer une réaction inflammatoire avec l'assemblage des sous-unités de l'inflammasome NLRP3 (Sun et al. 2016).



**Figure 12** - Effets potentiels des nano-objets inhalés sur la santé.

D'après le rapport de l'INRS nanomatériaux, nanoparticules 2016.

Les SAS-NP sont concernées par l'exposition par voie respiratoire notamment du fait de leur usage dans les industries du bâtiment et des travaux publics et des

pneumatiques. Les effets toxiques par voie pulmonaire ont été confirmés sur des modèles *in vivo*. Ainsi, Guichard *et al.* ont montré que des expositions courtes de 3, 24 ou 48h aux SAS-NP pyrogénées par instillation intratrachéale chez les rats provoquaient une inflammation pulmonaire dose-dépendante (Guichard *et al.* 2015). De même, une perturbation de l'homéostasie vasculaire accompagnée d'un stress oxydant a été observée chez des rats traités par instillation intratrachéale avec des SAS-NP précipitées. Il a également été démontré que des SAS-NP obtenues par la méthode de Stöber administrées par instillation intranasale provoquaient des changements neurodégénératifs (You *et al.* 2018; Li *et al.* 2019). Chez les souris traitées pendant 7 jours par instillation intranasale avec des SAS-NP dont le procédé d'obtention n'est pas précisé, une activation anormale de la cascade de coagulation a été observée, en particulier en raison de l'activation du facteur de coagulation XII et des plaquettes (Yoshida *et al.* 2013). Enfin, une étude chez le rat a permis de mettre en évidence une translocation de SAS-NP, dont le procédé d'obtention n'est pas précisé, dans la circulation ainsi qu'une distribution au niveau cardiaque après une instillation intranasale. Ceci entraînant alors un dysfonctionnement endothélial ainsi que des lésions du myocarde (Du *et al.* 2013; Li *et al.* 2019; Guo, Liu, and Li 2021). Il est nécessaire de souligner que la plupart des études ont été réalisées sur des animaux sains. Cependant nous pouvons constater que de plus en plus d'études menées sur des modèles pathologiques suggèrent que l'inhalation de nanoparticules peut aggraver des pathologies préexistantes (Cao *et al.* 2020; Zhu *et al.* 2021). Récemment, une étude sur des souris déficientes pour l'apoptotéine E (modèle utilisé pour mimer les pathologies métaboliques et largement utilisé dans la recherche en nanotoxicologie) a permis de mettre en évidence une inflammation systémique et une exacerbation de la fibrose tissulaire lors d'une exposition hebdomadaire par instillation intratrachéale de SAS-NP précipitées. Ceci se traduisait par la sécrétion de médiateurs inflammatoires par les mastocytes tels que l'IL-4, l'IL-13, le GM-CSF pouvant contribuer à la mise en place de la réponse immunitaire et à la progression

de la fibrose pulmonaire notamment (Li et al. 2022). L'IL-4 et l'IL-13 ont été décrits comme des médiateurs inflammatoires cruciaux dans la pathogénèse de la fibrose tissulaire, y compris la prolifération des fibroblastes et la synthèse du collagène (Jakubzick et al. 2004; Fichtner-Feigl et al. 2006). Il a également été prouvé que le GM-CSF jouait un rôle dans la promotion de l'inflammation et de la fibrose interstitielle progressive dans les lésions tardives d'ischémie-reperfusion rénale (Xu, Sharkey, and Cantley 2019).

### III. Paramètres physico-chimiques influençant la toxicité des nanoparticules

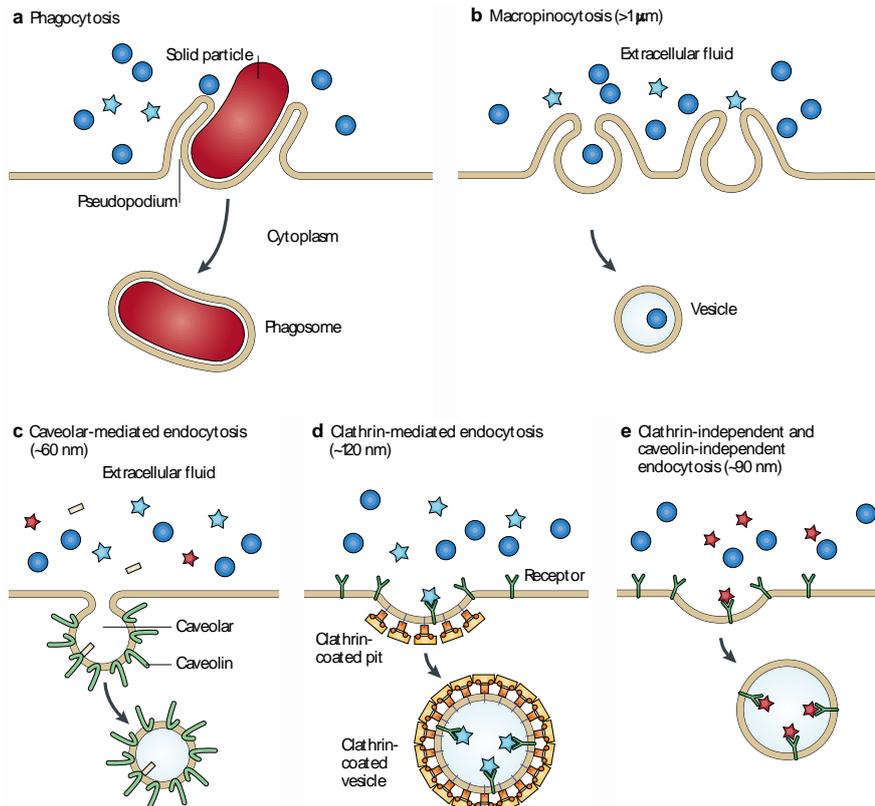
Du fait de leur taille à l'échelle nanométrique, d'une grande surface spécifique, de leur réactivité de surface et de leur composition chimique, les nanoparticules interagissent différemment avec les systèmes biologiques en comparaison à des particules de taille plus importante du même matériau (Seydoux et al. 2014). L'interaction des nanomatériaux avec leurs cibles ainsi que leur internalisation sont affectées par leurs propriétés physico-chimiques telles que la taille, la charge ou encore la forme.

#### A. Influence de la taille et de la forme

La taille joue un rôle majeur dans le potentiel toxique des nanoparticules. Plus la taille des nanoparticules diminue, plus le rapport surface/volume augmente, ce qui les rend plus réactives et ainsi potentiellement plus toxiques. Pour un même volume occupé, les particules à l'échelle nanométrique auront davantage de surface exposée au milieu

extérieur que des particules micrométriques. Ceci augmente alors les possibilités d'interactions avec les différents composants du milieu environnant (Sukhanova et al. 2018).

La taille des nanoparticules conditionnera également leur capacité à traverser les barrières physiologiques telles que la peau, la barrière alvéolo-capillaire mais aussi leur site de dépôt, notamment au niveau respiratoire. A l'échelle cellulaire, la taille affectera leur internalisation par les cellules mais aussi leur devenir (figure 13). Différents mécanismes pourront être mis en jeu. L'endocytose est le processus le plus fréquent pour les particules inférieures à 200 nm de diamètre. C'est un phénomène membranaire entraînant l'invagination de la membrane plasmique pour former des vésicules qui internaliseront du matériel extracellulaire. La pinocytose et la macropinocytose (figure 13b) permettent d'internaliser de manière non-spécifique des particules de tailles supérieures à 1µm. La pinocytose est un type d'endocytose permettant la capture de micromolécules et de solutés dans de petites vésicules qui seront redirigées vers les lysosomes. La macropinocytose, quant à elle, est une invagination de la membrane cellulaire par l'intermédiaire de filaments d'actine pour former une poche qui internalisera du liquide extracellulaire. Enfin, la phagocytose permet d'internaliser des particules allant d'une taille d'un à une dizaine de micromètres de diamètre. Elle est décrite comme un type d'endocytose particulier, internalisant des substances étrangères solides à l'échelle nanométrique (Jiang et al. 2008; Petros and DeSimone 2010; Rancan et al. 2012; Bannunah et al. 2014). La taille des objets peut également mener à une phagocytose frustrée. Schinwald, Chernova et al. ont montré que les nanofibres d'argent allant de 3 à 10 µm de longueur pouvaient être complètement phagocytées par les macrophages pulmonaires murins tandis que les mêmes nanofibres de 14 µm de longueur subissaient une phagocytose frustrée et provoquaient l'apparition d'une inflammation au niveau pulmonaire (Schinwald, Chernova, and Donaldson 2012).



**Figure 13** - Internalisation cellulaire des nanoparticules en fonction de leur taille.

(a) Internalisation des particules jusqu'à 10 μm par phagocytose ; (b) internalisation de particules plus petites par macropinocytose (environ 1μm) ; internalisation de particules plus petites par endocytose cavéole-dépendante, invaginations recouvertes de cavéolines et enrichies en cholestérol et en sphingolipides. (c), Clathrine dépendante : internalisation de particules médiée par des récepteurs induisant la formation d'un réseau de clathrine provoquant l'invagination de la membrane (d) et vacuole et clathrine indépendante, internalisation de matériel médiée par des récepteurs ne faisant appel ni aux cavéoles ni aux clathrines (e) avec chacune des contraintes de taille spécifiques. D'après Petro et al., 2010.

*In vivo*, il a été montré que l'installation intranasale de SAS-NP, dont le procédé d'obtention n'est pas précisé, induisait une distribution des nanoparticules dépendante de la taille. Les particules de silice les plus grandes (300 et 1000 nm) ont été retrouvées dans les cellules épithéliales de la cavité nasale et dans les cellules épithéliales alvéolaires de type II du poumon, tandis que les SAS-NP de taille inférieure à 100 nm traversaient la cavité nasale et étaient distribuées dans le foie et le cerveau. Ceci était accompagné d'une activation anormale de la cascade de coagulation (Yoshida et al. 2013).

Une étude a montré *in vitro* sur un modèle de cellules endothéliales issues de veines ombilicales que les SAS-NP de taille comprise entre 14 et 16 nm étaient plus cytotoxiques que les nanoparticules de plus grosse taille comprises entre 20 et 60 nm (Napierska et al. 2009). *In vivo*, il a été montré sur un modèle de souris BALB/c que la taille influençait l'effet adjuvant observé. Ce dernier était augmenté lorsque la taille des particules diminuait (Toda and Yoshino 2016).

La forme, qui peut être très variable, contribue aussi aux effets toxiques engendrés par les nanoparticules. Les formes caractéristiques des nanoparticules sont sphériques, ovales, cylindriques ou encore cubiques (figure 14). La toxicité des nanoparticules dépend fortement de leur forme. Ceci a été démontré pour de nombreuses nanoparticules de différentes formes et compositions chimiques (Hamilton et al. 2009; Kong et al. 2011).

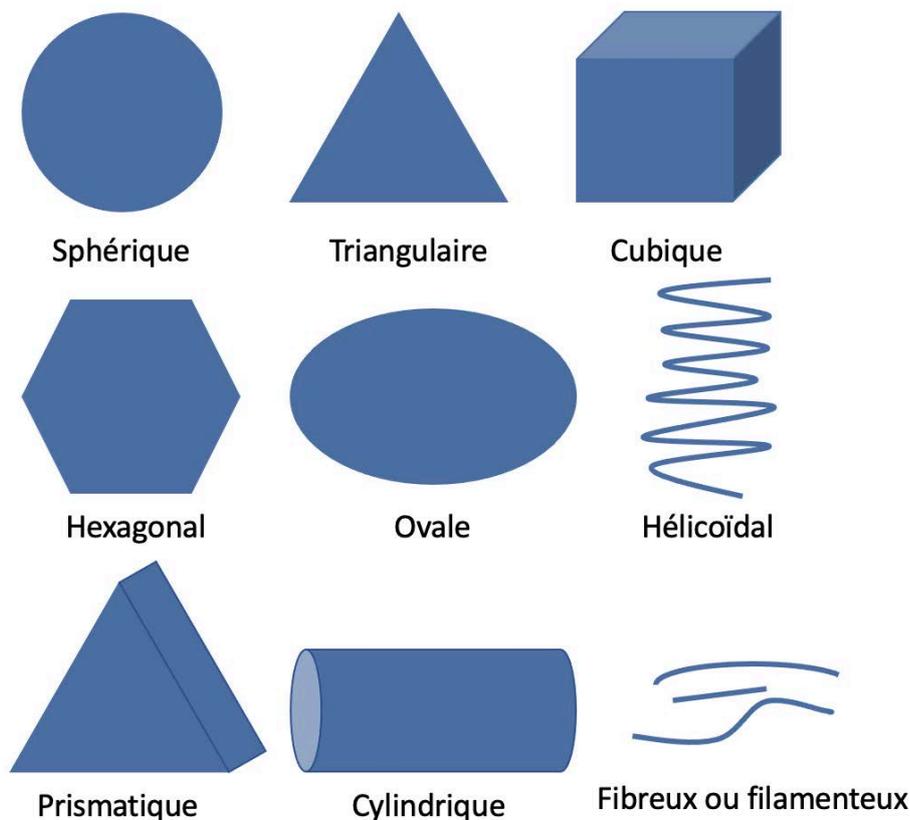


Figure 14 - Différentes formes de nanoparticules. Adapté de Gatoo et al. 2014

La toxicité semble être aggravée par la forme fibreuse ou filamenteuse des nano-objets. Les particules longues comme les nanotubes ou les nanofilaments seraient plus toxiques que les particules sphériques de composition chimique identique. Ceci a notamment pu être observé avec des nanoparticules de polystyrène ainsi que pour les nanotubes de carbone (Petros and DeSimone 2010; Porter et al. 2013). La forme jouerait également un rôle dans l'internalisation par les cellules, les nanoparticules sphériques étaient plus aptes à l'endocytose que les nanotubes et les nanofibres (Champion and Mitragotri 2006; Petros and DeSimone 2010). Il a été observé que les nanoparticules de polystyrène sphériques étaient internalisées plus rapidement et en plus grande quantité que les nanoparticules en forme de bâtonnets ou de fibres (Gatoo et al. 2014). De plus, des études réalisées sur des nanoparticules du dioxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ) et d'oxyde de zinc ( $\text{ZnO}$ ) suggèrent que les nanoparticules sphériques seraient moins cytotoxiques et induiraient une moindre production d'IL-8 que des nanotubes de diamètres équivalents (Hsiao and Huang 2011; Porter et al. 2013). D'après les travaux de Porter et al., contrairement aux souris exposées aux nanosphères de  $\text{TiO}_2$ , celles exposées aux nanotubes de  $\text{TiO}_2$  présentent une inflammation et des lésions pulmonaires dépendantes de la dose (Porter et al. 2013). Des résultats similaires ont également été observés avec des nanoparticules d'hydroxyapatite (Zhao et al. 2013).

Deux études, *in vitro* et *in vivo*, ont mis en évidence que la forme des SAS-NP mésoporeuses avait un effet sur l'internalisation, les fonctions cellulaires mais aussi sur la biodistribution. *In vitro*, dans des cellules de mélanome A375, les SAS-NP en tiges courtes (NSR) et en tiges longues (NLR) induisaient une plus forte apoptose ainsi qu'une diminution de l'expression de la molécule d'adhésion MCAM (*melanoma cell adhesion molecule*) en comparaison à des SAS-NP sphériques de même diamètre. De plus, la même équipe a montré que la forme des SAS-NP avait un impact sur leur biodistribution ainsi que leur clairance. Les SAS-NP NSR se distribuaient plus

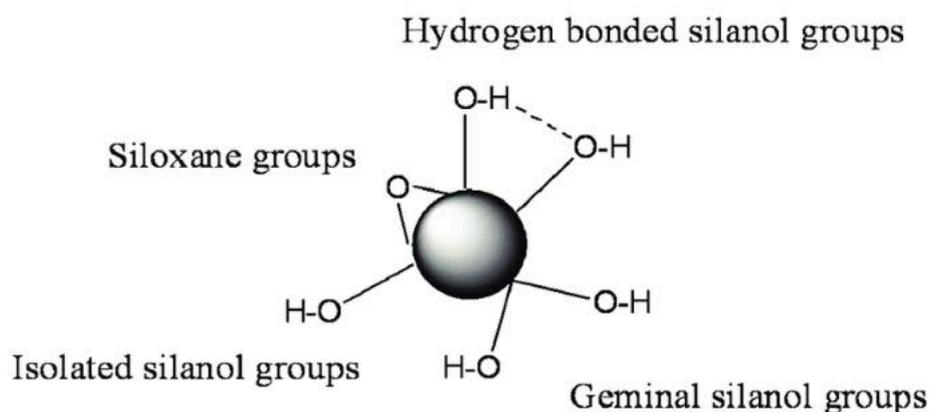
facilement dans le foie tandis que les NLR se concentraient dans la rate. De plus, les NLR avaient une clairance plus rapide que les NSR (Huang et al. 2010; 2011).

## B. Influence de la composition et de la chimie de surface

La composition chimique des nanoparticules est un facteur clé contribuant à leur toxicité (Gatoo et al. 2014). Elle est très variable étant donné que tous les groupes de matériaux sont concernés par l'influence de la composition chimique, bien que les nanoparticules métalliques soient les plus représentées dans la littérature. La composition du matériau peut avoir plusieurs impacts sur le devenir des nanoparticules. Elle peut jouer, par exemple, sur sa capacité de dissolution. Certains métaux tels que le zinc se dissolvent plus facilement une fois internalisés et les ions libérés engendreront une cytotoxicité se traduisant par une fuite du cytoplasme, une diminution significative de la viabilité cellulaire. La dissociation intracellulaire des nanoparticules de ZnO en ion  $Zn^{2+}$  perturbera l'homéostasie des ions zinc, entraînant une augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et perturbant ainsi l'intégrité membranaire, la fonction mitochondriale et menant à la nécrose cellulaire (Wang et al. 2014).

La composition des nanoparticules influence par conséquent leur chimie de surface. Celle des nanoparticules métalliques telles que les nanoparticules d'or, d'argent ou de cobalt peut engendrer une toxicité en produisant des radicaux libres et des ions superoxydes (Fu et al. 2014).

A leur surface, les SAS-NP vont exprimer différents groupements chimiques tels que les silanols isolés, vicinaux, géminaux et les siloxanes (figure 15) (Croissant et al. 2020). La toxicité des SAS-NP dépendrait de la densité et de la répartition de ces groupements à leur surface (Pavan et al. 2014; Sun et al. 2015; Pavan et al. 2020).

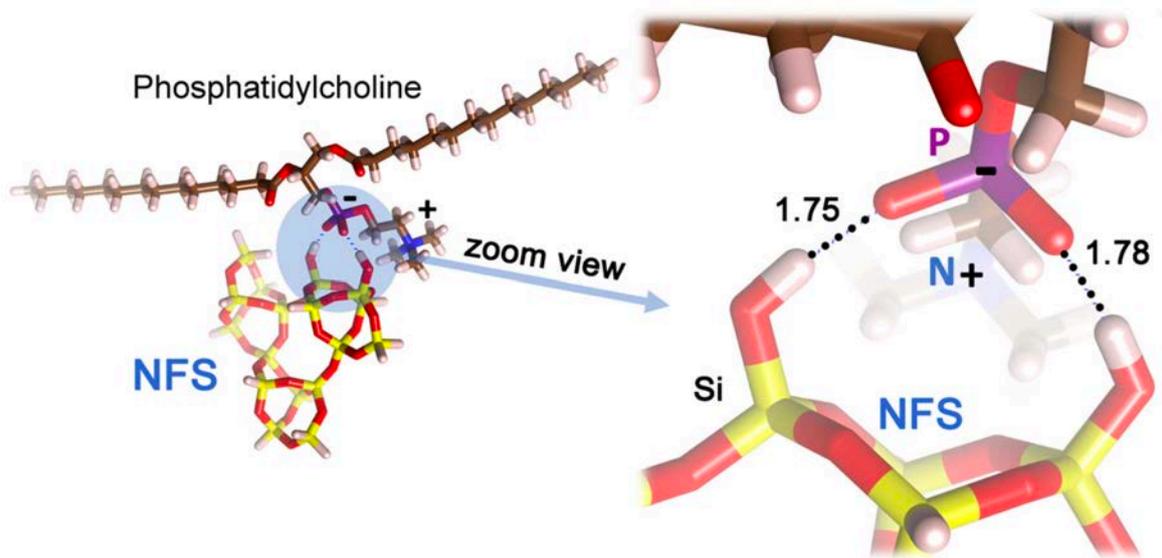


**Figure 15** - Groupements chimiques de surface des silices amorphes synthétiques (Cooredor-Rojas et al. 2018)

La chimie de surface des SAS-NP est dépendante de leur voie de synthèse. Les silices précipitées présentent une plus grande densité de silanols que les silices pyrogénées. Il semblerait que plus les nanoparticules possèdent de groupements silanols, plus elles sont réactives vis-à-vis des membranes cellulaires (Zhang et al. 2012). Il a été montré que les effets inflammatoires dans le poumon des SAS-NP obtenues par pyrolyse à flamme (AEROSIL, Evonik) sont réduits lorsque l'on diminue le nombre de groupements silanols à leur surface. Ceci est réalisé soit par un processus de calcination (condensation des groupements silanols à la surface) soit par un processus de dopage à l'aluminium par pyrolyse à flamme (Sun et al. 2015).

Les silanols endommageraient les membranes des phagolysosomes et des macrophages pulmonaires, activant ainsi l'inflammasome NLRP3, conduisant à la libération d'IL-1 $\beta$  (Pavan et al. 2019). Cependant, l'activité toxique des SAS-NP ne semble pas être expliquée seulement par la densité de silanols mais aussi par leur répartition à la surface des particules. L'équipe de Pavan et al. a montré que ce ne serait pas la densité mais plutôt la répartition des groupements silanols et siloxanes à la surface des nanoparticules qui jouerait un rôle sur leur activité hémolytique, en d'autres termes leur capacité à altérer la membrane des globules rouges induisant la libération d'hémoglobine. En effet, les silanols et siloxanes donneurs d'hydrogène interagiraient avec les phospholipides de la membrane des globules rouges,

engageant alors des interactions électrostatiques et menant à l'hémolyse (Pavan et al. 2013). Plus récemment, la même équipe a mis en évidence la formation de NFS (*Nearly Free Silanols*) à la surface des SAS-NP. Ces derniers seraient composés de plusieurs groupements silanols situés à une distance comprise entre 4 et 6 Å les uns des autres formant de faibles interactions de type liaisons hydrogènes et liaisons de Van der Waals. Les NFS favoriseraient l'établissement d'interactions avec les composants membranaires tels que la phosphatidylcholine (figure 16) et l'initiation des évènements pro-inflammatoires observés *in vitro*. La découverte des motifs NFS est pertinente pour le développement de nouveaux tests toxicologiques prédictifs. Les NFS contribueraient aux mécanismes de reconnaissance moléculaire qui orchestrent les réponses immunitaires humaines aux nanomatériaux à base de silice (Pavan et al. 2020; 2022).



**Figure 16** - Représentation schématique d'un groupement nearly-free silanol.

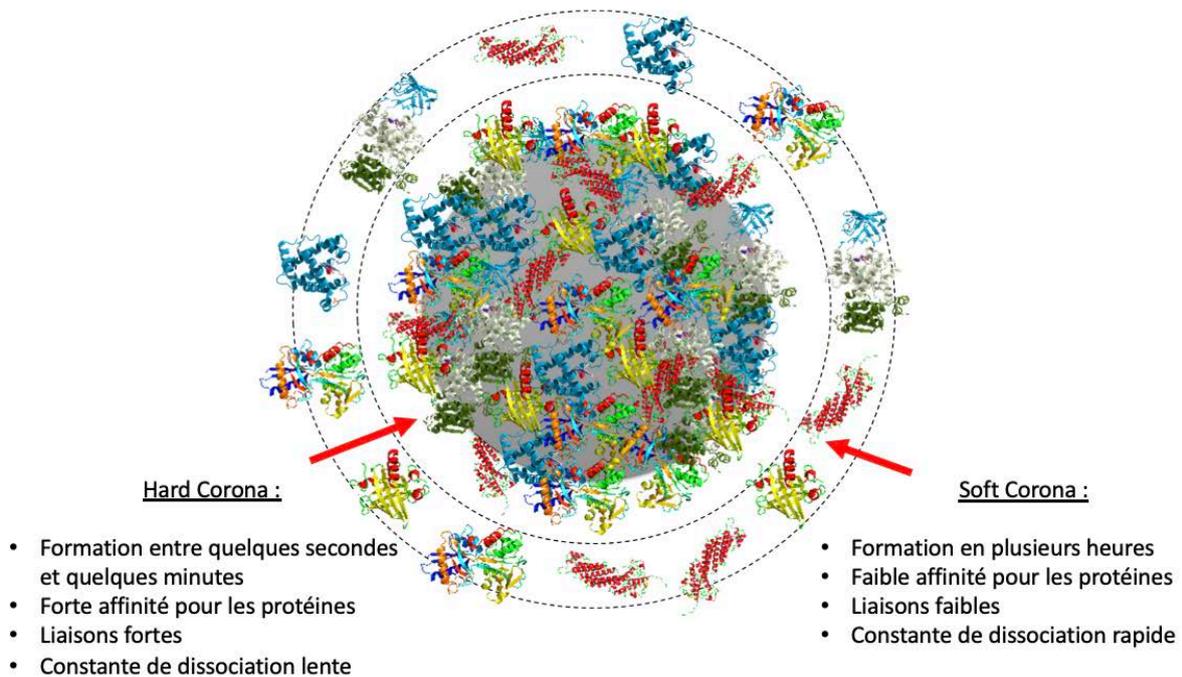
Représentation schématique d'un groupement NFS interagissant avec la phosphatidylcholine, un élément constitutif des membranes cellulaires. Les distances entre les groupements H du NFS et les oxygènes du groupement phosphate sont exprimés en ångströms. D'après Pavan et al. 2019.

### C. Influence de la corona

Le phénomène d'adsorption de protéines sur des particules a été décrit pour la première fois en 1962 lors de l'étude des interactions entre des poudres hydrophobes et des échantillons de plasma (Vroman 1962). Cependant, c'est en 2007 que le terme corona protéique a été introduit pour décrire la structure dynamique qui se forme à la surface des nanomatériaux lors de leur interaction avec les milieux biologiques (protéines, lipides) (Walczyk et al. 2010; Monopoli et al. 2012; García-Álvarez and Vallet-Regí 2021). Cedervall et al. ont mis en évidence l'importance de cette corona pour la bio-identité des nanomatériaux et donc de leurs potentiels effets bénéfiques ou toxiques (Cedervall et al. 2007; Monopoli et al. 2012; Brun and Sicard – Roselli 2014).

La corona est décrite comme une structure dynamique multicouche formée par les composants du milieu adsorbés à la surface des nanomatériaux au contact de leur environnement physiologique (Docter et al. 2015). La corona peut être divisée en deux parties : la « hard corona » et la « soft corona ». La hard corona correspond à la couche la plus interne de composants étroitement liés aux nanoparticules avec une constante de dissociation lente. La couche externe, constituée de composants faiblement liés ayant une constante de dissociation plus rapide que la hard corona, est appelée soft corona (figure 17) (Ke et al. 2017; García-Álvarez and Vallet-Regí 2021).

La nature des composants formant la corona dépend notamment de la voie d'exposition et définira en partie les réactions qui vont se produire par la suite : reconnaissance cellulaire, internalisation, organes cibles et toxicité.

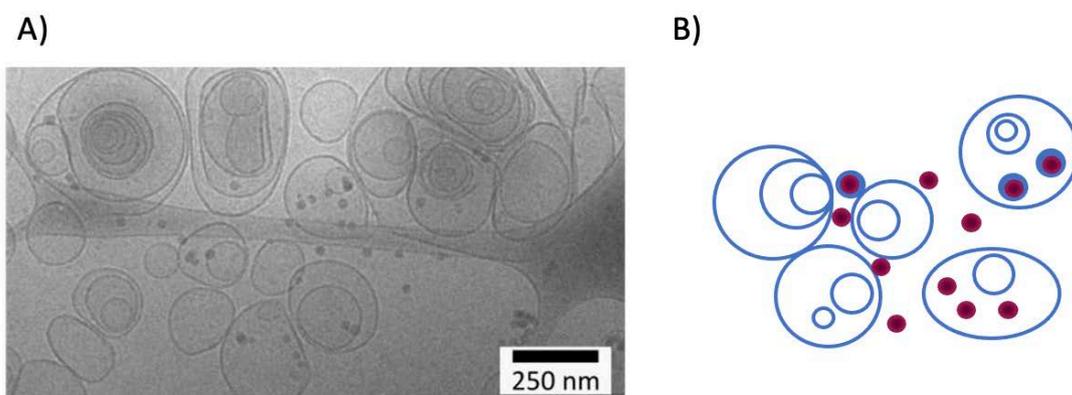


*Figure 17 - Formation de la corona sur les nanoparticules.*

Lorsque les nanoparticules sont au contact des milieux biologiques, elles se recouvrent de certains de leurs composants formant alors une couronne, également appelée corona. En fonction de la force des liaisons entre les composants du milieu et les nanoparticules, deux types de corona se formeront, la « hard corona » et la « soft corona ». Adapté de Garcia-Àlvarez and Vallet-Regi, 2021)

L'une des principales voies d'entrée des nanoparticules dans le corps est la voie respiratoire. Dans les poumons, les nanoparticules interagiront d'abord avec le surfactant pulmonaire avant de franchir la paroi alvéolaire (Rothen-Rutishauser, Kiama, and Gehr 2005). De ce fait, il est pertinent de se demander si la formation de la corona qui suit l'interaction des particules avec le surfactant pulmonaire pourrait impacter leurs effets. Le surfactant pulmonaire est composé essentiellement de phospholipides mais aussi de protéines, il est sécrété par les pneumocytes de type 2 et forme un film mince recouvrant la totalité de la surface des alvéoles pulmonaires. Une étude menée sur les nanoparticules contenues dans les gaz d'échappements (dioxyde de titane, dioxyde de silice, oxyde de zinc) a mis en évidence que la formation de la corona suite à l'interaction avec le liquide bronchoalvéolaire favoriserait leur internalisation ainsi que la sécrétion d'IL-8 par la lignée cellulaire THP-1 (Shaw et al. 2016).

Il a été montré que certains composants du surfactant tels que la protéine SP-D pourraient moduler l'internalisation des particules de pollen et diminuer la réponse inflammatoire induite (Schleh et al. 2012). Il a été suggéré qu'en présence d'une corona formée au contact de surfactant pulmonaire, il y aurait une diminution de l'internalisation des SAS-NP colloïdales par les cellules épithéliales pulmonaires et les macrophages alvéolaires. Le surfactant influencerait la sédimentation des nanoparticules, préviendrait leur contact avec les membranes cellulaires et ainsi leur internalisation (Vranic et al. 2013). Les effets observés pourraient être expliqués par les objets formés lors de l'interaction entre le surfactant pulmonaire et les SAS-NP. Les travaux de F. Mousseau ont mis en évidence que les SAS-NP, suite au contact avec le surfactant pulmonaire, seraient prises au piège au sein de vésicules lipidiques (figure 18). Ceci modifierait alors leur réactivité vis-à-vis de leur environnement biologique, notamment leur internalisation par les cellules présentes à la barrière broncho-alvéolaire (Mousseau 2017).



**Figure 18** - Représentation de l'interaction de nanoparticules de silice chargées négativement avec le Curosurf®.

A) Image de cryo-microscopie électronique à transmission d'une dispersion de Curosurf® et de nanoparticules de silices chargées négativement. Des particules sont libres en solution, certaines sont en amas de quelques unités et d'autres sont en interaction avec des vésicules de Curosurf®. B) Représentation schématique des différentes structures formées par les nanoparticules de silice négatives et le Curosurf®. D'après Mousseau, 2017.

Une autre étude a montré que la préincubation de nanotubes de carbone à paroi multiple avec 3% de substitut de surfactant pulmonaire provoque l'augmentation de la production d'ERO, une libération de chimiokines inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  et l'IL-8, ainsi que l'apoptose de macrophages dérivés de monocytes humains. Les composants du Curosurf<sup>®</sup> liés aux nanotubes de carbone affectent non seulement la réponse intracellulaire aux nanotubes de carbone mais aussi la cinétique d'absorption de ceux-ci et donc probablement les temps de réaction des cellules aux nanotubes de carbone (Gasser et al. 2012). Les quantités de Curosurf<sup>®</sup> et les unités de mesure utilisées dans la littérature sont très hétérogènes. Il est donc difficile d'estimer l'exposition que cela pourrait représenter *in vivo*.

La formation de la corona peut également moduler la conformation des protéines qui s'adsorbent à la surface et ainsi moduler leur effet. Ceci a été observé lors de l'interaction entre des nanoparticules d'or et de fibrinogène induisant le dépliement de ce dernier et son interaction avec le récepteur Mac-1 (Deng et al. 2011). Cette étude sera détaillée dans le chapitre 3.

#### D. Influence du degré d'agrégation et d'agglomération

Comme précisé dans le chapitre précédent, les nanoparticules peuvent se présenter sous forme d'agrégats ou d'agglomérats de tailles et de formes variables. Ces propriétés influenceront leur toxicité. Les états d'agrégation et d'agglomération dépendent notamment de la taille, la charge et la composition des nanoparticules (Gatoo et al. 2014). Les agglomérats de nanoparticules sont des amas de petite taille, inférieure à 500 nm. Leur cohésion est majoritairement due à des liaisons faibles électrostatiques ou des forces de Van der Waals. De ce fait, ils peuvent être rompus facilement (Yan et al. 2017). Chez des souris exposées par voie intraveineuse à des nanotubes de carbone pendant 3 mois, il a été observé que les nanotubes de carbone s'accumuleraient principalement dans le foie, la rate et les poumons sans entraîner de

toxicité aiguë. Ils induisent des effets cytotoxiques, marqués par une baisse du taux de glutathion (GSH), en raison de l'accumulation d'agrégats à long terme (Yang et al. 2008). L'équipe de Murugadoss et al. a quant à elle démontré que les gros agrégats de SAS-NP précipitées induisaient une plus faible cytotoxicité *in vitro* en comparaison aux particules non agrégées et aux petits agrégats. Cependant les agrégats de nanoparticules de silice compris entre 100 et 600 nm présentent une cytotoxicité similaire aux particules primaires (Murugadoss et al. 2020).

Des liaisons covalentes s'établissent entre les nanoparticules libres pour former des agrégats de plus grande taille et difficiles à rompre. La taille la plus importante de ces agrégats entraîne leur sédimentation. Cela rend leur internalisation par les cellules plus difficile. Ainsi la formation d'agrégats modifie la toxicité des nanomatériaux (Gunter Oberdörster 2001). Il a été observé sur une lignée cellulaire de mésothéliome humain MSTO-211H que les agrégats de nanotubes de carbone étaient plus cytotoxiques que des nanotubes de carbone dispersés. Ils entraînent également une augmentation de la fibrose pulmonaire (Wick et al. 2007).

# Chapitre 3 : Les mécanismes cellulaires et moléculaires de la réponse immunitaire adaptative aux nanoparticules

Le système immunitaire a la charge de répondre aux diverses attaques extérieures, qu'elles soient bactériennes, virales ou parasitaires. La défense de l'hôte repose sur une action concertée de l'immunité innée non spécifique de l'antigène et de l'immunité adaptative qui, elle, est spécifique de l'antigène. Une fois l'antigène détecté et apprêté par les cellules présentatrices de l'antigène (CPA), l'immunité adaptative se mettra en place afin de prodiguer une protection durable contre l'antigène. Dans ce chapitre, nous détaillerons les mécanismes cellulaires et moléculaires de la réponse immunitaire aux nanoparticules.

## I. Maturation des cellules présentatrices de l'antigène et présentation de l'antigène

### A. Cellules présentatrices de l'antigène

Les CPA sont des cellules sentinelles de l'organisme. Elles échantillonnent constamment l'environnement et détectent les signaux de danger ou pathogènes au contact de l'organisme.

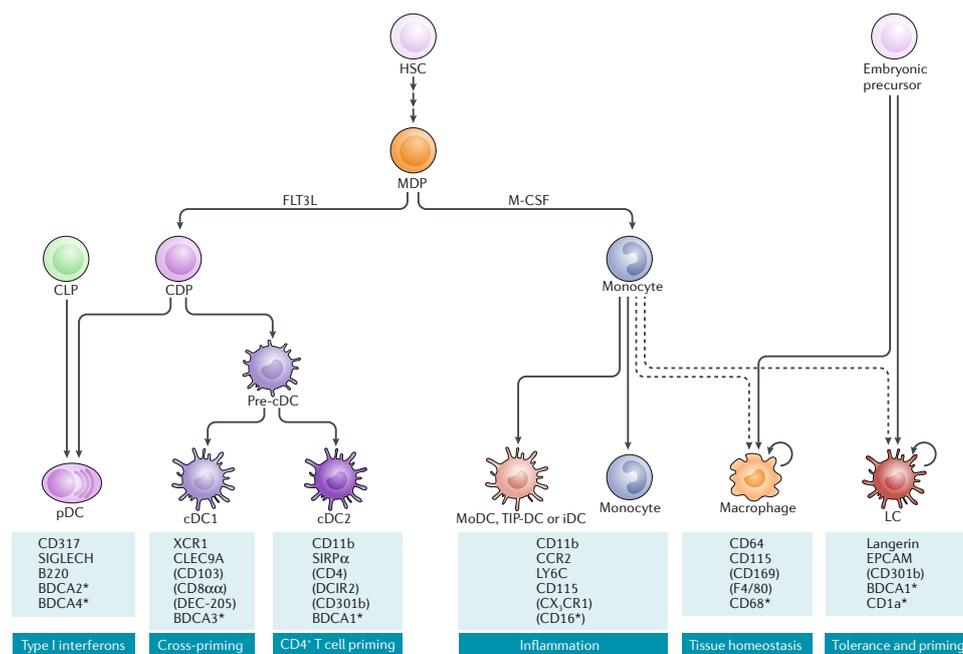
On distingue deux catégories de CPA. Celles dites non professionnelles, comprenant tous les types de cellules nucléées capables de présenter des antigènes endogènes via les molécules de complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I associées à la  $\beta$ -2 microglobuline (Kambayashi and Laufer 2014). Les CPA professionnelles quant à elles sont spécialisées dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T (Mann and Li 2014). Elles sont caractérisées par leurs capacités d'internalisation mais aussi par la présence de molécules de CMH de classe II à leur

surface. Les principaux types de CPA sont les cellules dendritiques (DC), les macrophages et les lymphocytes B (LB) (Kambayashi and Laufer 2014).

Les cellules dendritiques sont des cellules professionnelles présentatrices d'antigène uniques car elles sont les seules capables d'induire des réponses immunitaires primaires, permettant l'établissement d'une mémoire immunologique (Banchereau et al. 2000). Il existe une grande diversité de DC, toutes issues des mêmes progéniteurs hématopoïétiques, à l'exception des cellules de Langherans (LC) qui sont d'origine médullaire. Dans la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques (*hematopoietic stem cells* - HSC) se différencient en précurseurs lymphoïdes (*multi lymphoid progenitor* - MLP) et myéloïdes (*granulocyte/monocyte progenitor* - GMP) puis en précurseurs des macrophages et des cellules dendritiques (*monocyte-dendritic cell progenitors* - MDP). Les monocytes issus des MDP migrent vers le sang puis vers les organes périphériques pour s'y différencier en DC présentant des profils inflammatoires. Les DC inflammatoires sont retrouvées lors d'un état inflammatoire ou infectieux. Elles sont produites à partir des monocytes, recrutées en réponse à des *stimuli* microbiens ou lors du déclenchement d'une inflammation et disparaissent lorsque l'inflammation est résolue (Guilliams et al. 2014; Satpathy et al. 2012; Merad et al. 2013). Les DC inflammatoires humaines sont caractérisées par l'expression de molécules exprimées par d'autres populations de cellules dendritiques (CMH II, CD11c, BDCA1, CD1a, FC $\epsilon$ RI) mais également de molécules habituellement considérées comme des marqueurs des macrophages, telles que CD206, CD14 et CD11b (Segura and Amigorena 2014). Les MDP peuvent également se différencier en progéniteurs communs des DC (*common dendritic cell progenitors* - CDP) qui selon le contexte, évolueront en DC plasmacytoïdes ou en pré-DC (Haniffa, Collin, and Ginhoux 2013).

Selon leur localisation, fonction et origine, les DCs sont subdivisées en plusieurs sous-populations (figure 19). Elles seront réparties en DC plasmacytoïdes (pDC), majoritairement localisées dans les organes lymphoïdes, DC conventionnelles (cDC1

et cDC2), résidentes dans les organes lymphoïdes ou dans les tissus où elles entrent en contact avec les antigènes, DC inflammatoires, différenciées à partir de monocytes sanguins lors d'une inflammation ou d'une infection, et les LC résidentes de l'épiderme. La fonction première des cDC est la présentation des antigènes et l'activation de LT naïfs. Les cDC2 sont décrites comme les principales cellules activatrices de LT CD4<sup>+</sup> naïfs. Les pDCs sont spécialisées dans la production d'interféron de type I et possèdent une faible capacité de présentation. Les DC inflammatoires ont pour fonction de détecter les antigènes et de migrer vers les tissus où elles se localisent dans les ganglions lymphatiques pour activer les LT naïfs (Eisenbarth 2019).



**Figure 19 - Sous-populations de cellules dendritiques.**

L'expression des marqueurs indiqués varie en fonction des tissus. \* : marqueurs exprimés uniquement sur les cellules humaines. cDC : cellules dendritiques conventionnelles ; CDP : progéniteur commun aux cellules dendritiques ; CLP : progéniteur lymphoïde commun ; iDC : cellules dendritiques inflammatoires ; HSC : cellule souche hématopoïétique ; LC : cellules de Langerhans ; MDP : progéniteur commun aux macrophages et aux cellules dendritiques ; MoDC : cellules dendritiques dérivées de monocytes ; pDC : cellules dendritiques plasmacytoïdes ; TIP-DC : cellules dendritiques produisant du TNF-α et des oxydes nitriques. D'après Eisenbart, 2019.

## B. Capture et présentation de l'antigène et mécanismes d'internalisation

A l'état immature, les cellules dendritiques présentent une forte capacité de reconnaissance et de capture des antigènes dans les tissus périphériques.

Les DC peuvent capturer les antigènes selon trois mécanismes (figure 19). La macropinocytose permet aux DC de capturer de manière non spécifique du fluide extracellulaire contenant diverses molécules dont l'antigène soluble. Ce processus dépendant de l'actine nécessite l'implication de molécules intracellulaires dont les GTPases (Cdc42 et Rac) qui interviennent dans le réarrangement du cytosquelette (Liu and Roche 2015). Lors de la macropinocytose, des protrusions membranaires se forment et permettent alors d'internaliser les antigènes solubles. Ce mécanisme semble être impliqué dans l'internalisation des allergènes de pollen (Noirey et al. 2000).

La phagocytose permet d'internaliser des antigènes plus larges, des cellules apoptotiques et des pathogènes opsonisés (figure 20). Ce processus peut être déclenché après l'activation de molécules de surface (récepteurs Fc, récepteurs scavenger MARCO et CD36) suite à la liaison des ligands à leurs récepteurs. La polymérisation des filaments d'actine entraîne la réorganisation de la membrane autour des particules à internaliser. Les phagosomes formés fusionnent avec les lysosomes ou les compartiments formés de lysosomes et d'endosomes tardifs, riches en molécules du CMH de classe II, ce qui permet l'apprêtement des antigènes et la formation de complexes CMH/peptides (Roche and Furuta 2015).

L'endocytose médiée par les récepteurs permet la capture d'antigènes solubles dans de petites vésicules recouvertes de clathrine (figure 20). Il existe plusieurs récepteurs de surface impliqués tels que les récepteurs lectine de type C (CLR), les récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines (FcR) (Liu and Roche 2015; Roche and Furuta 2015).

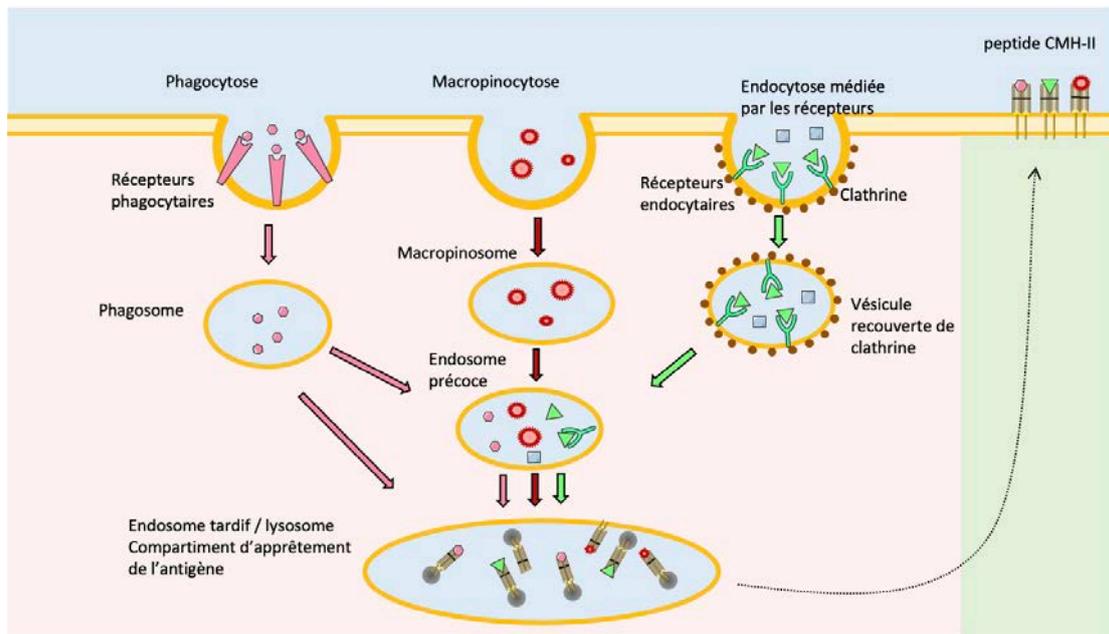


Figure 20 - Voies d'internalisation des antigènes dans les cellules dendritiques.

Adapté de Liu and Roche, 2015.

Une fois les antigènes capturés par les DC, ils seront chargés sur des molécules du CMH ou molécules HLA (*Human leukocyte antigen*) afin d'être présentés aux LT. Il existe deux classes de molécules du CMH. Les molécules du CMH de classe I présentent principalement les peptides endogènes souvent localisés dans le cytosol. Elles s'associent dans le réticulum endoplasmique (RE) aux peptides produits dans le cytosol via la voie du protéasome et transloqués dans le RE par l'intermédiaire de transporteurs dépendant de l'ATP (TAP1/2). Elles présentent ensuite ces peptides antigéniques aux lymphocytes T cytotoxiques, exprimant les co-récepteurs CD8 (Neefjes et al. 2011). Les molécules du CMH de classe II présentent aussi bien des protéines endogènes membranaires ou sécrétées que des protéines exogènes entrées dans les CPA par internalisation. Ces molécules sont exprimées de manière constitutive sur les CPA professionnelles (DC, LB, monocytes et macrophages). Les molécules du CMH de classe II sont synthétisées et transportées depuis le RE vers la voie endocytique où elles s'associeront à des peptides antigéniques. Cette classe

présente des peptides aux lymphocytes T auxiliaires (ou CD4<sup>+</sup>) (Amigorena 1999; Neefjes et al. 2011; Roche and Furuta 2015).

### C. Maturation et migration des cellules dendritiques

#### 1. Reconnaissance des signaux de danger par les cellules dendritiques

La capture de l'antigène induit des changements phénotypiques et fonctionnels des cellules dendritiques qui passent de cellules capturant les antigènes à cellules présentatrices d'antigène. La maturation des DC est fortement liée à leur migration des tissus périphériques vers les organes lymphoïdes drainants.

Cependant, les DC seront activées de manière optimale seulement si elles sont en présence de molécules les alertant que leur microenvironnement devient dangereux. Cette notion a été introduite en 1994 par Polly Matzinger sous le terme de signal de danger. Cette théorie explique que la présence de ce signal entraîne le déclenchement de la réponse immunitaire alors que l'absence d'un tel signal induit la tolérance (Matzinger 1994; Pradeu and Cooper 2012). La conséquence de cette alerte est l'acquisition d'un phénotype immunogène par les DC en opposition au phénotype tolérogène adopté en l'absence de signaux de danger.

Ces derniers peuvent être de plusieurs natures. Les signaux de danger exogènes, *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) correspondent à des motifs conservés exprimés par les pathogènes. Ces signaux sont portés par les bactéries, les virus ou les champignons. Ceux-ci peuvent être des acides nucléiques, des protéines bactériennes ou encore des composants de la paroi bactérienne. Les signaux de danger peuvent être endogènes, il s'agit alors des *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs) qui sont libérés par des tissus ou cellules endommagés ou ayant subi un stress (Gallo and Gallucci 2013). Plus récemment, un troisième type de signal de danger a été proposé, il s'agit des *Nanoparticles-Associated Molecular Patterns*

(NAMPs). Ce sont des motifs associés aux nanoparticules (Gallo and Gallucci 2013; Farrera and Fadeel 2015; Pallardy, Turbica, and Biola-Vidamment 2017). Ces derniers seront développés dans la partie suivante (Chapitre 3, II).

Les signaux de danger endogènes ou exogènes sont reconnus par des récepteurs appelés *Pattern Recognition Receptor* (PRR). Ils sont exprimés dans plusieurs compartiments cellulaires. Certains sont présents à la surface de la cellule, où ils reconnaîtront les agents pathogènes extracellulaires comme les *Toll-like receptors* (TLR) 2, 4 ou 5 et les récepteurs de type lectine C (Delneste, Beauvillain, and Jeannin 2007). D'autres, localisés dans le compartiment endosomal ou le cytosol, pourront détecter des signaux de danger intracellulaires. Il s'agit des TLR 3, 7, 8 ou 9 ou des *NOD-like receptors* (NLR) comme les NOD 1,2 et 3 (Athman and Philpott 2004). Ces PRR pourront interagir avec les DAMPs (ATP, acide urique) et les PAMPs (peptidoglycane, acides nucléiques viraux) cytoplasmiques. L'interaction entre un signal de danger et un PRR activera des voies de signalisation diverses en fonction du PRR engagé. La liaison d'un signal de danger à un TLR, à l'exception du TLR 3, activera une voie de signalisation dépendante de la protéine adaptatrice *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) qui aboutira à l'activation de la voie des MAPK et des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1. L'activation des récepteurs NOD1 et 2 mènera également à l'activation des voies des MAPK et de NF- $\kappa$ B. Ces voies de signalisation induiront le processus de maturation et de migration de la DC (Banchereau et al. 2000).

## 2. Maturation et migration des cellules dendritiques

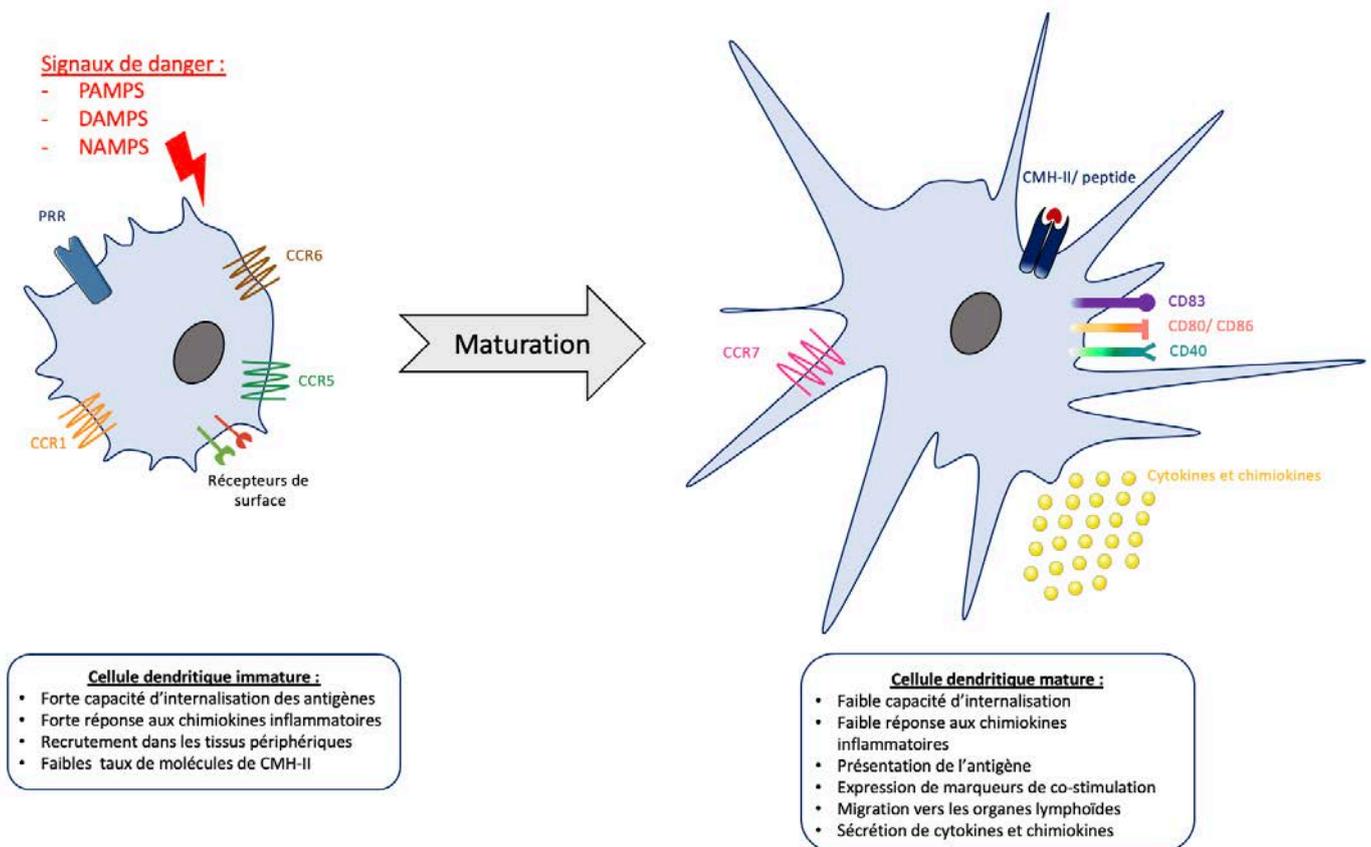
L'internalisation des antigènes et la reconnaissance des signaux de danger favorisent la maturation des cellules dendritiques en induisant des changements morphologiques, phénotypiques et fonctionnels de ces cellules. La maturation des cellules dendritiques est un processus continu initié au niveau des tissus périphériques lors de la rencontre avec l'antigène et/ou des cytokines inflammatoires et complété

lors de l'interaction entre les cellules dendritiques et les lymphocytes T. De nombreux facteurs induisent et/ou régulent la maturation des cellules dendritiques, incluant des molécules provenant de pathogènes comme le LPS, l'ADN bactérien, l'ARN double brin. Ces facteurs modulent aussi la balance entre signaux pro- et anti-inflammatoires dans le microenvironnement comme TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$  et les prostaglandines (Gallucci and Matzinger 2001; Kaplan, Igyártó, and Gaspari 2012).

Les changements morphologiques accompagnant la maturation des DC incluent la perte des structures adhésives, la réorganisation du cytosquelette et l'acquisition d'une grande mobilité cellulaire. Ainsi les DC perdent leur forme initiale et acquièrent une structure présentant des prolongements cytoplasmiques appelés dendrites. Les changements morphologiques de la cellule, comme la formation de voiles et de dendrites, peuvent favoriser la mise en place des interactions entre les cellules dendritiques et les lymphocytes T (Steinman, Pack, and Inaba 1997; Verdijk et al. 2004).

Les DC acquièrent un phénotype dit « mature ». La maturation des DC induit une réduction de leurs capacités d'internalisation avec une diminution de l'expression des récepteurs impliqués dans la phagocytose et l'endocytose. Le processus de maturation est associé à plusieurs événements coordonnés, en supplément de ceux déjà évoqués ci-dessus, tels qu'une expression élevée de molécules du CMH de classe II à la surface des cellules, une production accrue et une expression membranaire de molécules co-stimulatrices (CD40, CD80, CD86) et activatrices (CD83) indispensables à l'activation des LT (Bakdash et al. 2013). Ceci mène aussi à l'activation de la machinerie de traitement de l'antigène, notamment une prise en charge de l'antigène par les compartiments lysosomaux et une augmentation de l'expression membranaire de la protéine associée aux DC et aux lysosomes (DC-LAMP). Les DC matures réguleront à la baisse l'expression des récepteurs CCR1, CCR2, CCR5, CCR6 et CXCR1, responsables de leur recrutement vers les tissus périphériques grâce aux chimiokines CCL3, CCL5, CCL20 et IL-8. Les DCs matures

voient l'expression de certains récepteurs augmenter comme CCR7 et CXCR4 qui favoriseront la migration des DCs vers les nœuds lymphatiques (figure 21) (Nagorsen, Marincola, and Panelli 2004; Sato and Fujita 2007). Cette maturation déclenche aussi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires induisant l'activation et la polarisation des LT que nous détaillerons dans les parties à venir (Brennan and Gilmore 2018).



**Figure 21 - Modifications phénotypiques des cellules dendritiques matures.**

Les DC matures perdent leurs capacités d'internalisation de l'antigène au profit de la migration et de la présentation de l'antigène. PAMPS = pathogen-associated molecular patterns, DAMPs = damage-associated molecular patterns, NAMPS = Nanoparticle-associated molecular patterns, PRR = pattern recognition receptor, CMH-II = complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

La maturation des DC est finement régulée par un réseau de signalisations intracellulaires. La littérature décrit notamment que les MAPK sont impliquées dans l'expression de molécules de co-stimulation et dans la production de cytokines pro-inflammatoires en réponse à des *stimuli* tels que le nickel, le cobalt, le DNCB (2,4-

dinitrochlorobenzène) ou encore des SAS-NP mésoporeuses (Boislève, Kerdine-Römer, and Pallardy 2005; Ade et al. 2007; Kang and Lim 2012). La voie NF- $\kappa$ B est également impliquée dans le processus de maturation des DC en réponse à des sensibilisants de contact (Ade et al. 2007; Antonios et al. 2009; 2010). Des SAS-NP, dont la voie d'obtention n'est pas précisée, induiraient également l'activation des voies des MAPK ainsi que la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$  et IL-8) en réponse à cette activation (Kang and Lim 2012; Nakanishi et al. 2016). Plus récemment, la voie NF- $\kappa$ B a elle aussi été décrite comme étant impliquée dans la réponse de cellules HUVEC aux SAS-NP pyrogénées (Liu et al. 2021).

#### D. Réponse des lymphocytes T aux cellules dendritiques activées

##### 1. Activation et prolifération des lymphocytes T par les cellules dendritiques

L'activation des LT et leur orientation en LT effecteurs nécessite la présentation de l'antigène par les DC matures. A la suite de la capture et de l'apprêtement des antigènes, les DC matures migrent vers les organes lymphoïdes secondaires de manière dépendante de CCR7 pour présenter l'antigène aux LT CD4<sup>+</sup> dont l'activation dépend de trois signaux (Land 2018). Les interactions se feront dans la synapse immunologique, une structure moléculaire et spatiale dont l'objectif est de relocaliser de façon optimale les partenaires nécessaires à l'activation lymphocytaire.

Le premier signal d'activation consiste en l'interaction des DC avec les LT par l'intermédiaire du complexe CMH/peptide et du récepteur T (*T-cell receptor* – TCR) induisant une réorganisation des molécules de surface facilitant la formation d'une synapse immunologique (Chen and Flies 2013).

Ceci conduit alors à la mise en place du deuxième signal d'activation, ou signal de co-stimulation. L'activation du TCR sera suivie de modifications intracellulaires mais

aussi d'une redistribution des protéines de surface et de transport intracellulaire. Ce signal est médié par les molécules de co-stimulation (CD80 et CD86) qui se lieront à la molécule CD28 à la surface des LT, ce qui favorisera leur activation. Les DC et les LT expriment également à leur surface des molécules de co-inhibition contrôlant l'activation des LT en induisant un signal inhibiteur intracellulaire. A titre d'exemple, les molécules CD80 et CD86 peuvent se lier non pas à la molécule CD28, mais à la molécule *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4* (CTLA-4), entraînant l'anergie des LT activés afin de contrôler la réponse induite. La conséquence de l'interaction entre les DC et les LT sera également l'augmentation de la sécrétion d'IL-2 mais aussi l'interaction de la molécule CD40 avec son ligand CD40L présent à la surface des LT. Ces deux signaux permettent la survie et la prolifération des LT mais ne sont pas suffisants pour obtenir une différenciation fonctionnelle (Fooksman et al. 2010; Land 2018; Bakdash et al. 2013).

La sécrétion de cytokines, telles que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-12, l'IL-23, le TNF- $\alpha$  par les DC matures constitue le troisième signal nécessaire à la survie, la prolifération et la polarisation des LT. La diversité de ce signal explique la multitude de fonctions jouées par les LT CD4 que nous détaillerons dans la partie suivante (Blanco et al. 2008).

## 2. Polarisation des lymphocytes T

Les LT CD4 sont initialement naïfs, n'ayant encore rencontré aucun antigène et se situant dans les organes lymphoïdes secondaires. Les DC matures migrent vers ces derniers, où la réponse T sera mise en place. La sécrétion de cytokines par les DC permet l'orientation de la réponse lymphocytaire T. Un LT CD4<sup>+</sup> naïf peut se différencier en lymphocytes Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, T folliculaires (T<sub>FH</sub>) ou T régulateurs (T<sub>reg</sub>) (figure 22) (Deenick et al. 2011). Les LT présentent une grande plasticité, leur orientation peut être modifiée en fonction des cytokines présentes dans leur microenvironnement (Zhu 2018). Les cytokines sécrétées par les DC contrôlent l'expression et l'activation de facteurs de transcription spécifiques dans les

LT. Ces facteurs de transcription sont spécifiquement exprimés dans une population particulière de cellules T et jouent un rôle majeur dans la stabilisation du phénotype de la polarisation (Chalmin et al. 2018).

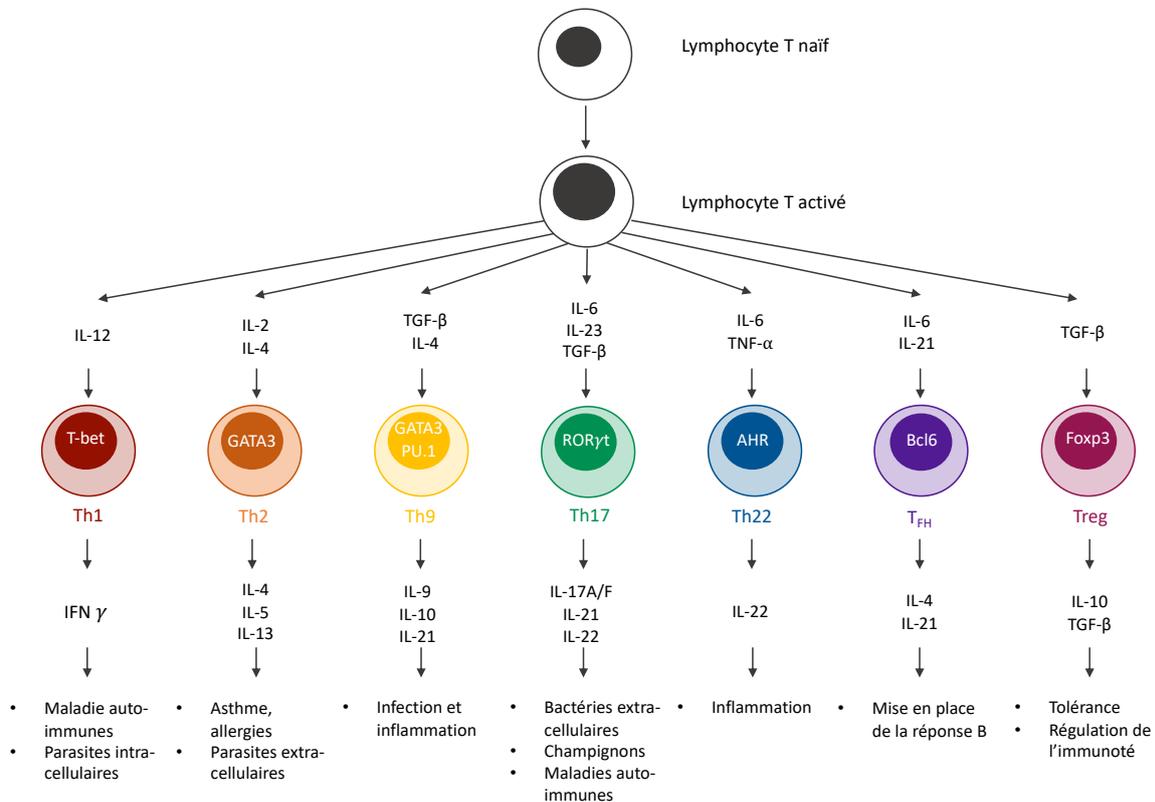


Figure 22 - Polarisation des lymphocytes T.

Le cocktail cytokinique présent dans le microenvironnement des LT influence leur polarisation vers la réponse lymphocytaire adaptée. AHR = *aryl hydrocarbon receptor*, Bcl-6 = *B-cell lymphoma 6*, Foxp3 = *forkhead box P3*, GATA3 = *GATA binding protein 3*, IFN = *interferon*, IL = *interleukine*, ROR $\gamma$ t = *retinoic acid-related orphan receptor gamma t*, T-bet = *T-box-containing protein expressed in T cells*, TGF- $\beta$  = *transforming growth factor beta*. Adapté de Deenick et al. 2011, Walsh and Mills 2013.

La différenciation en lymphocytes Th1 est initiée par l'IL-12. La sécrétion d'IL-12 par les cellules dendritiques est l'un des facteurs principaux favorisant la transcription du facteur T-bet indispensable à la polarisation Th1 des lymphocytes T (figure 22). Les LT Th1 orchestrent la réponse immunitaire dirigée contre les agents pathogènes intracellulaires (bactéries, virus) ou les agents tumoraux. Ils exercent leur fonction via l'IFN- $\gamma$  qu'ils sécrètent (Walsh and Mills 2013). La sécrétion d'IFN- $\gamma$  stimulera la

maturation des DC et soutiendra les fonctions phagocytaires et bactéricides des macrophages (Deenick et al. 2011; Chalmin et al. 2018).

Les lymphocytes Th2 sont responsables d'une réponse humorale dirigée contre les pathogènes extracellulaires (parasites, bactéries, toxines). Ils sont également responsables du développement des allergies par l'intermédiaire de leur coopération avec les lymphocytes B sécrétant des anticorps spécifiques d'isotype IgE et par l'activation des basophiles et des éosinophiles (Li, Zhang, and Sun 2011). Cette réponse se met en place dans un environnement cellulaire riche en IL-4, induit la transcription du facteur de transcription GATA-3 qui contrôle la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 (figure 22) (Agarwal, Avni, and Rao 2000; Zhu, Yamane, and Paul 2010).

La présence de champignons ou de bactéries à gram négatif mène à la sécrétion d'IL-23 et d'IL-1 $\beta$  par les DC. Ces cytokines induiront l'activation transcriptionnelle du facteur ROR- $\gamma$ t conduisant à une réponse Th17. Les LT Th17 sécrèteront de l'IL-17 A et F et de l'IL-22 qui jouent un rôle clé dans le recrutement et l'activation des polynucléaires neutrophiles et engendrent la destruction des pathogènes et une inflammation (figure 22). Les Th17 sont impliqués dans plusieurs pathologies auto-immunes telles que le psoriasis, la polyarthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Zhu, Yamane, and Paul 2010; Chen and Flies 2013).

Les LT régulateurs (T<sub>reg</sub>) quant à eux sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et de la tolérance immunitaire. Ils remplissent leurs fonctions par la sécrétion de cytokines immunosuppressives telles que le TGF- $\beta$  ou l'IL-10 (figure 22). Les T<sub>reg</sub> modulent directement la maturation et les fonctions des cellules présentatrices de l'antigène. Ils expriment à leur surface des molécules inhibitrices capables de se lier au CMH de classe II et de limiter l'activation des cellules T effectrices (Huang et al. 2004). Un défaut dans le développement des T<sub>reg</sub> contribue au développement de maladies auto-immunes, d'allergie ou de rejet de greffes. Après l'élimination des

agents pathogènes, les  $T_{reg}$  limitent les réponses inflammatoires et inhibent l'activité des Th1, des cellules Natural Killer et macrophages, limitant ainsi les dommages tissulaires causés par l'inflammation (Ouyang et al. 2012).

#### IV. Effets inflammatoires et adjuvants des nanoparticules

Comme précédemment évoqué, les nanoparticules interagissent avec le système immunitaire via trois voies principales : la voie respiratoire, la voie digestive et la voie cutanée. Les DC présentes à ces points d'entrée de l'organisme détecteront les particules. L'immunotoxicité peut se manifester par un effet inflammatoire mais également par des effets immunomodulateurs (Farrera and Fadeel 2015b). Des NP lipidiques PEGylées peuvent être utilisées en tant que véhicule d'administration pour délivrer localement des agents immunosuppresseurs (Chen, May, and Li 2013; Gharagozloo, Majewski, and Foldvari 2015), mais elles peuvent également avoir un effet immunosuppresseur direct (Maldonado et al. 2015). Il a été montré *in vivo* que les SAS-NP colloïdales chargées négativement avaient des propriétés immunomodulatrices en réduisant la prolifération des lymphocytes via une diminution de la concentration sérique des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-12p70, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) (Kim et al. 2014). Dans cette partie nous nous intéresserons plus particulièrement aux effets inflammatoires et aux effets adjuvants des NP.

##### A. Effets inflammatoires des nanoparticules

L'induction d'une réponse inflammatoire est un phénomène fréquemment décrit lors de l'exposition aux NP en général. Cette inflammation se manifeste généralement précocement et est caractérisée par un afflux de cellules inflammatoires, transitoire ou persistant. Ceci a largement été décrit pour les NP d'oxydes métalliques (ZnO, AuNP, TiO<sub>2</sub>). En effet, une augmentation du nombre de cellules inflammatoires (telles

que les macrophages et les neutrophiles) dans les lavages broncho-alvéolaires de rat et de souris exposées à des NP de TiO<sub>2</sub> est observée dès 6 heures et jusqu'à 2 semaines après exposition (Warheit et al. 2007; Baisch et al. 2014). Ceci est également accompagné d'une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'IL-8 qui participeront au maintien de la réponse inflammatoire (Moon et al. 2010; Yazdi et al. 2010; Baisch et al. 2014).

Les SAS-NP précipitées et pyrogénées ont elles aussi la capacité d'induire une réaction inflammatoire. Ceci a été démontré notamment dans les macrophages. L'exposition des macrophages aux SAS-NP pyrogénées induit une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$ ) ainsi que l'activation de l'inflammasome NLRP3. L'inflammation observée se traduit également par la production d'ERO ( Park and Park 2009a; Yazdi et al. 2010; Di Cristo et al. 2016; H. Yang et al. 2009). Il a aussi été mis en évidence l'effet pro-inflammatoire des SAS-NP pyrogénées sur les cellules HUVEC et des cellules épithéliales pulmonaires. Les SAS-NP étudiées induisent une production d'ERO et activent l'inflammasome NLRP3, en conséquence une augmentation de l'expression et de la translocation de HMGB1 est observée ainsi qu'une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  (Peeters et al. 2013; 2014; Liu et al. 2021). Dans des BMDC (*bone marrow-derived dendritic cells*), il a été montré que les SAS-NP obtenues par pyrolyse à flamme sont capables d'induire la production de *novo* d'IL-1 $\beta$  dépendante de MyD88 à la suite de l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Winkler et al. 2017).

Les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules qui leur confèrent des propriétés uniques (chimie de surface, taille, état d'agglomération) peuvent être à l'origine de leurs propriétés toxiques. En effet, en ce qui concerne les SAS-NP, il a été montré *in vitro* que les effets inflammatoires dans le poumon induits par les SAS-NP pyrogénées étaient atténués lorsque l'on diminuait la densité de groupements silanols à la surface (Sun et al. 2015).

Parmi les propriétés physico-chimiques des nanoparticules, la composition de la corona, étroitement liée à la chimie de surface, joue un rôle crucial dans l'immunotoxicité des NP. En effet, la corona constitue ce que les cellules voient dès le premier contact avec les NP. La formation de la corona à la surface des NP influencera l'immunotoxicité des nanoparticules. Les NP d'or revêtues de citrate ont une activité anti-inflammatoire du fait d'une régulation négative des voies inflammatoires induites par l'IL-1 $\beta$  dans les cellules THP-1. Ceci serait la conséquence de la neutralisation extracellulaire de l'IL-1 $\beta$  par une interaction avec ces nanoparticules empêchant alors l'IL-1 $\beta$  d'induire une réaction inflammatoire (Chen et al. 2013; Huang et al. 2012; Sumbayev et al. 2013).

## B. Effets adjuvants des nanoparticules

Le système immunitaire et particulièrement les cellules phagocytaires sont une première ligne de défense contre les nanomatériaux. Elles y seront préférentiellement exposées (Faddeel 2012). Certaines études ont permis de souligner que l'exposition professionnelle au cours de la production ou de l'utilisation de nanoparticules pourrait comporter des risques pour la santé (Eisen et al. 2011). Dans certaines conditions, l'inhalation de NP pourrait exacerber ou contribuer à la mise en place de pathologies respiratoires comme l'asthme, la bronchite chronique ou encore les rhinites allergiques (Eisen et al. 2011; Inoue and Takano 2011).

L'asthme et les affections allergiques représentent des pathologies très fréquentes dans les pays développés. On estime qu'il y a dans le monde 150 millions d'asthmatiques, avec une mortalité d'environ 100 000 sujets par an (Données épidémiologiques - Asthme et affections allergiques).

L'équipe de Li et al. a montré que l'exposition à des particules ultrafines provenant de la pollution atmosphérique lors de la phase de sensibilisation à l'ovalbumine (OVA), allergène expérimental communément utilisé, pouvait augmenter le

développement et la sévérité des réactions allergiques chez les souris BALB/c (Li et al. 2010; 2009). Les particules ultrafines joueraient le rôle d'adjuvant en augmentant la réponse immunitaire adaptative lors de la phase de sensibilisation à l'OVA. Il a été montré *in vivo* que l'exposition de souris BALB/cByT à des nanotubes de carbone multifeuillets (*multi-walled carbon nanotube* – MWCNT) augmenterait de manière dépendante de la concentration la réponse du système immunitaire ainsi que la fibrose induite par l'exposition aux acariens. Les MWCNT induiraient alors une aggravation de la réponse immunitaire induite par un allergène ainsi que l'inflammation des voies respiratoires et leur remodelage (Ronzani, Casset, and Pons 2014). Il a également été montré que les NP de TiO<sub>2</sub> pouvaient avoir un effet adjuvant. *In vitro*, ceci se traduit par une augmentation de l'expression des marqueurs CD83 et CD86 avec une plus forte production de l'IL-12p40. *In vivo*, la co-administration de TiO<sub>2</sub> et d'OVA résulte en une augmentation de l'activité adjuvante. Ceci se traduit par une augmentation du taux des IgE et IgG1 circulantes spécifiques de l'OVA et une augmentation du taux d'IL-4 dans les nœuds lymphatiques (Vandebriel et al. 2018). Les effets adjuvants des NP sont étroitement liés aux effets inflammatoires précédemment décrits.

En ce qui concerne les SAS-NP, leurs effets pro-adjuvants ont été mis en évidence *in vivo* par plusieurs études. Ces dernières montrent une augmentation de la réponse allergique à l'ovalbumine chez la souris. Cet effet adjuvant se traduit par une augmentation du taux d'IgE circulantes, par une infiltration éosinophilique et la production de cytokines pro-inflammatoires orientant vers une réponse mixte Th1, Th2 et Th17. L'effet observé est inversement proportionnel à la taille. En effet, plus les particules sont petites, plus l'effet adjuvant observé est important (Brandenberger et al. 2013). Une seule équipe a conduit des études *in vitro* sur des DC humaines issues de monocytes. Elle porte sur les SAS-NP mésoporeuses, et met en avant un effet taille et concentration-dépendant sur la cytotoxicité, l'internalisation et l'augmentation de l'expression des marqueurs d'activation et de co-stimulation CD80,

CD86, CD83 et CD40 ainsi qu'une augmentation de l'expression du CMH-II. La même équipe a également montré que les DC humaines issues de monocytes traitées par ces SAS-NP pouvaient induire la prolifération de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs sécrétant de l'INF- $\gamma$ , de l'IL-4 et de l'IL-13 (Vallhov et al. 2007).

La formation de la corona à la surface des NP influencera également les propriétés adjuvantes des NP. Elle peut être à l'origine d'un effet cheval de Troie. Cet effet consiste en une pénétration accrue d'une substance adsorbée à la surface des NP (corona). L'internalisation des NP favoriserait l'entrée de la substance dans la cellule. Du fait de l'effet cheval de Troie, les nanoparticules se comporteraient également comme un transporteur d'allergène. Il a été mis en évidence que les nanoparticules d'or pouvaient adsorber à leur surface différents allergènes comme celui du pollen de bouleau (Bet v1), de la fléole des prés (Phl p 5) et des acariens (Der p 1) (Radauer-Preiml et al. 2016a). Ces conjugués allergènes-NP, en comparaison aux allergènes non liés, induisent une plus forte réaction des patients allergiques. Pour évaluer le potentiel allergisant de ces conjugués, le test d'activation des basophiles a été utilisé. L'Académie européenne d'allergie et d'immunologie présente ce test comme étant un test *in vitro* hautement spécifique pour évaluer l'activité allergénique (Radauer-Preiml et al. 2016). Une autre étude a mis en évidence la capacité des SAS-NP et TiO<sub>2</sub>-NP à se recouvrir de Bet v 1, en quantifiant les allergènes adsorbés à la surface des NP après une nuit d'incubation à 4°C (Grotz et al. 2018). Ces interactions entre NP et allergènes mèneraient à une plus grande internalisation des allergènes concernés et potentiellement une plus forte réponse dirigée contre ceux-ci.

Les NP d'or, lors du contact avec la circulation sanguine, sont capables de lier le fibrinogène. Ceci peut mener à son dépliement qui favorisera l'interaction avec le récepteur des intégrines Mac-1. L'activation de ce récepteur induit l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et de ce fait favorise la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  et l'IL-8 (Deng et al. 2012; 2011).

## V. Les nanoparticules, signaux de danger émergents

Comme développé ci-dessus, les signaux de danger proviennent principalement d'agents pathogènes (PAMPs) ou de lésions cellulaires (DAMPs). Néanmoins de plus en plus de données suggèrent que les nanomatériaux pourraient être reconnus par les DC en tant que signaux de danger, et appelés NAMPs (Pallardy, Turbica, and Biola-Vidamment 2017). De nombreuses études ont montré que les nano-objets sont capables d'induire l'activation des DC. La plupart d'entre elles ont démontré une augmentation de l'expression du CMH de classe II, CD80 et CD86. Il a ainsi été montré, dans des BMDC, que les NP de noir de carbone induisaient une augmentation de l'expression des marqueurs CD86, CD80 et CMH de classe II associée à une induction de la prolifération de LT allogéniques (Koike et al. 2008). Des résultats similaires ont été observés avec des NP de TiO<sub>2</sub> et de SAS-NP (Zhu et al. 2014; Winkler et al. 2017; Winter et al. 2011). Nous allons à présent développer les mécanismes induisant la reconnaissance des nanoparticules par les DC en tant que signaux de danger.

Les cellules du système immunitaire disposent de nombreux capteurs permettant d'interagir avec un large panel de molécules, qu'elles soient d'origine étrangère ou non. Ceci leur permet d'échantillonner en permanence leur environnement. Ainsi, les nano-objets sont susceptibles d'interagir avec des récepteurs cellulaires, d'être reconnus en tant que signal de danger et d'induire l'activation de voies de signalisation cellulaires conduisant à la maturation des DC. Ici, nous étudierons par quels mécanismes les NP sont reconnues par les DC et quelles sont les voies de signalisation impliquées.

## A. Interaction cellulaire des nanoparticules avec les récepteurs scavenger

Les récepteurs scavenger sont exprimés par divers types cellulaires, notamment les macrophages et les cellules dendritiques. Les récepteurs scavenger de classe A et B sont des PRR participant à la réponse cellulaire aux nanomatériaux (Shannahan, Bai, and Brown 2015).

Les récepteurs scavenger A (SR-A) comprenant SR-A1 et MARCO (*macrophage receptor with collagenous structure*) possèdent des domaines extracellulaires riches en motifs *collagen-like* (Józefowski 2012; Chao et al. 2012). La modélisation moléculaire a suggéré que ces domaines pouvaient être responsables de l'interaction des SR-A avec les nanomatériaux chargés négativement (Chao et al. 2013). Le récepteur MARCO reconnaît des NP de polystyrène, des nanotubes de carbone et des NP de silice cristalline, favorisant l'internalisation de ces particules par les macrophages pouvant exacerber leur toxicité (Kanno, Furuyama, and Hirano 2007; Hirano et al. 2012; Hamilton et al. 2006). Les récepteurs scavenger de classe A participent à la reconnaissance des SAS-NP précipitées dans une lignée cellulaire de macrophages. Dans des macrophages déficients pour les récepteurs SR-A, l'internalisation des SAS-NP est diminuée mais aussi la sécrétion de médiateurs inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$  et le G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*) (Orr et al. 2011).

Plus récemment, le récepteur scavenger SR-B1 a été décrit comme un « récepteur de la silice », reconnaissant et fixant spécifiquement les nanoparticules de silice cristalline et amorphe sur les macrophages. La reconnaissance de ces deux types de NP par le récepteur SR-B1 induit une sécrétion marquée d'IL-1 $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$ , l'activation de l'inflammasome canonique ainsi que la mort cellulaire des macrophages murins. Cette inflammation séquentielle peut entraîner une inflammation chronique et une fibrose des tissus ciblés (Tsugita et al. 2017).

## B. Interaction cellulaire des nanoparticules avec les TLR

Les NP pourraient également interagir avec d'autres PRR tels que les TLR. Une étude de modélisation moléculaire a proposé que certains TLR (notamment les TLR 1, 2 et 6) auraient des sites d'affinités hydrophobes pour certains nanomatériaux comme les nanotubes de carbone et les fullerènes (Turabekova et al. 2014).

Les NP pourraient également interagir avec les TLR 3, 4 et 7 qui joueraient un rôle dans la réponse aux NP de TiO<sub>2</sub>. Celles-ci traverseraient la membrane suite à l'internalisation de récepteurs tels que le TLR 4. La liaison des NP au TLR 4 au niveau de la membrane plasmique entraînerait l'activation de NF- $\kappa$ B et l'induction de l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires. Les NP libres dans le cytoplasme pourraient engendrer la dénaturation de protéines cytoplasmiques et l'induction ultérieure de la réponse HSP70 (*heat shock proteins*) dirigeant ces protéines vers le protéasome. Plus tardivement, les TLR 3 ou TLR 7 (situés sur la membrane endosomale) induiraient également l'activation de NF- $\kappa$ B. Tous ces événements regroupés mèneraient à une réponse inflammatoire (Chen, Kanehira, and Taniguchi 2013).

Une étude a montré que les SAS-NP pyrogénées induiraient une réponse dépendante de la protéine MyD88 dans des DC murines. Les résultats de Winkler et al. indiquent que les SAS-NP seraient internalisées par macropinocytose dépendante de l'actine et se localiseraient dans les vésicules endosomales. Lors de l'acidification de ces vésicules, les SAS-NP seraient reconnues par des TLR endosomaux dont l'engagement induirait l'activation de MyD88 ainsi que la synthèse de pro-IL-1 $\beta$  puis son clivage menant à la sécrétion d'IL-1 $\beta$ . Il est cependant peu probable que les TLR impliqués soient les TLR 2, 3, 4, 7 et 9 car la synthèse de pro-IL-1 $\beta$  est indépendante de ces derniers (Winkler et al. 2017).

Plus récemment, Liu *et al.* ont suggéré un mécanisme pour expliquer l'effet signal de danger des SAS-NP. Les SAS-NP induiraient une production accrue d'ERO ainsi qu'une activation de l'inflammasome NLRP3 dans des cellules HUVEC, qui déclencherait la translocation de la protéine HMGB1 du noyau vers le cytoplasme et sa sécrétion. Cette dernière étant un DAMP, elle serait reconnue par le TLR4, menant à l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B de façon Myd88-dépendante (Liu *et al.* 2021).

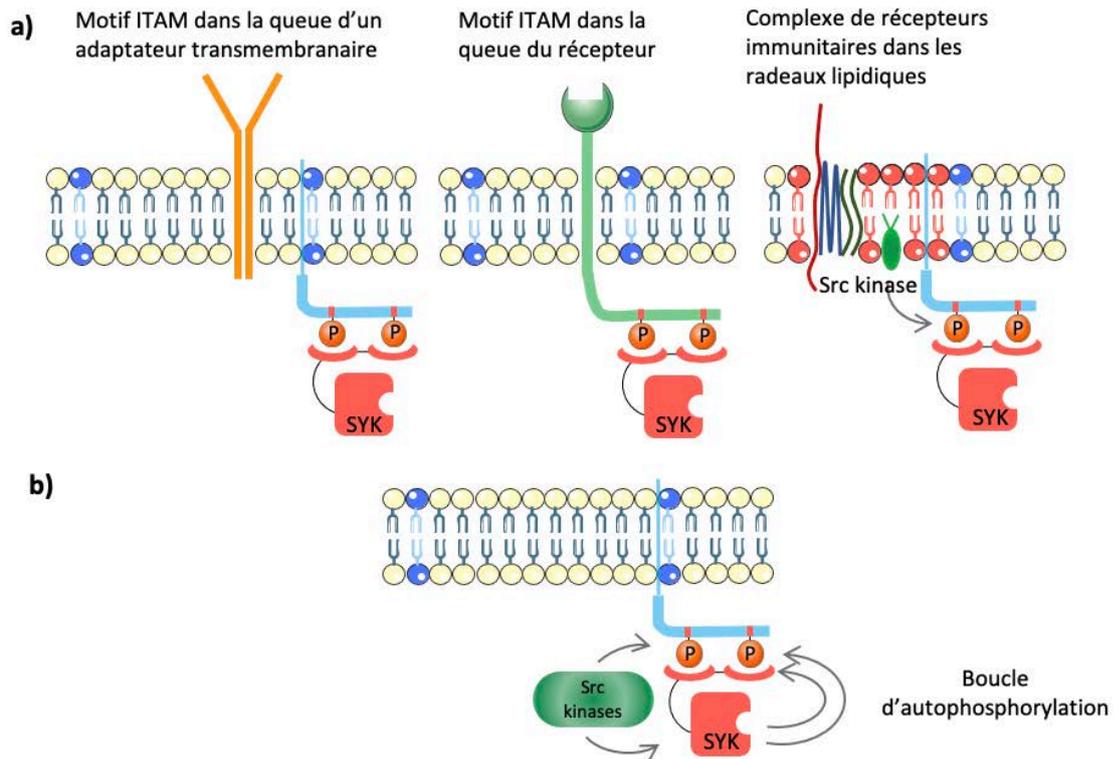
### C. Interaction cellulaire des nanoparticules de manière indépendante des récepteurs

Certaines études décrivent que les NP pourraient interagir directement avec la membrane plasmique, sans passer par l'engagement d'un récepteur. La membrane plasmique est une entité en mouvement constant. La fluidité membranaire est une des caractéristiques majeures des membranes biologiques. La fluidité et l'intégrité membranaires sont nécessaires pour maintenir l'homéostasie et les fonctions physiologiques et biochimiques cellulaires. Les silices cristalline et amorphe auraient la capacité d'induire l'hémolyse érythrocytaire en lysant la membrane des globules rouges (Zhang *et al.* 2012; Pavan *et al.* 2014). Il a également été montré que les SAS-NP pyrogénées pouvaient exercer une toxicité membranaire sur les macrophages murins, potentialiser la peroxydation lipidique, augmenter la libération de LDH et réduire la fluidité membranaire (Yang *et al.* 2009).

Certains travaux suggèrent que, au moins pour les DC, le contact de surface de particules d'urate de sodium monosodique (MSU) avec la membrane est suffisant pour induire un signal d'activation au travers de la membrane plasmique. Les particules de MSU formeraient une liaison intermoléculaire spatialement serrée (supposément de nature liaison hydrogène) avec le cholestérol membranaire. Ces interactions mèneraient à une réorganisation lipidique ainsi que la formation de rafts lipidiques

induisant le recrutement de récepteurs FcR contenant des motifs ITAM (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). Dans les DC, la protéine kinase Syk serait recrutée à la suite de l'accumulation des motifs ITAM à la membrane (figure 23) (Ng et al. 2008).

La protéine Syk est une protéine kinase membranaire de 70 kDa faisant partie de la famille de protéines du même nom. Cette famille compte deux protéines : Zap 70 majoritairement retrouvée dans les cellules T et les natural-killer et Syk. Cette dernière est largement retrouvée dans de nombreuses cellules immunitaires comme les DC et les LT (Sada et al. 2001; Garcia 2016). La protéine Syk présente de nombreuses tyrosines phosphorylables, notamment la tyrosine 130 qui, une fois phosphorylée, augmente l'activité basale de Syk et les tyrosines 525/526 nécessaires pour la signalisation en aval de Syk (Bonnerot et al. 1998; Garcia 2016). Syk joue un rôle dans la phagocytose et la maturation des DC à travers l'activation de cascades de signalisation comme ERK, Akt, NF- $\kappa$ B (figure 23) (Babin, Goncalves, and Girard 2015; Corr, Cunningham, and Dunne 2016). L'activation de la voie Syk peut activer à son tour la GTPase Rac qui est impliquée dans l'activation de protéines telles que JNK et NF- $\kappa$ B mais aussi dans la polymérisation de l'actine jouant ainsi un rôle dans la phagocytose et l'internalisation de matériel extracellulaire.



Ligands directs de SYK

VAV      PLC $\gamma$       PI3K

Intermédiaires de signalisation

p38      JNK      ERK      AKT  
 NF- $\kappa$ B      Complexe CARD-BCL-10-MALT1

Réponse cellulaire

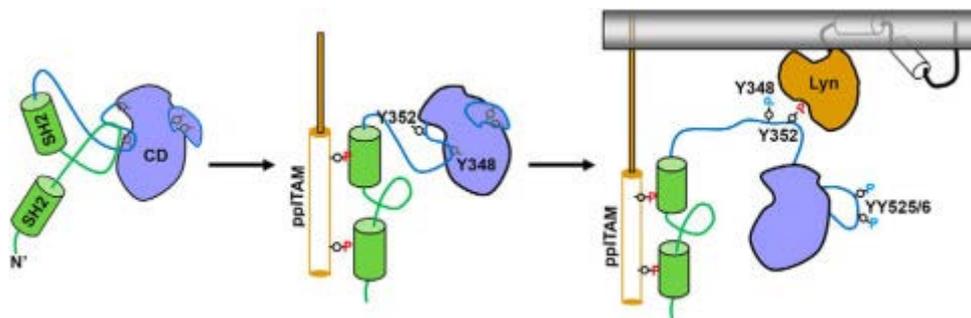
Réorganisation du cytosquelette      Production d'ERO      Différenciation Maturation      Prolifération      Production de cytokines

**Figure 23** - Mécanisme général de la signalisation médiée par Syk.

D'après Mocsai et al. 2010 et Sezgin et al. 2017. a) le recrutement de la protéine tyrosine kinase Syk aux récepteurs de la membrane plasmique se produit par la liaison des domaines SH2 de Syk aux tyrosines phosphorylées présentes dans les motifs ITAM. Les ITAM sont présents soit dans les adaptateurs transmembranaires associés aux récepteurs soit dans la région intracytoplasmique de récepteurs. Les kinases de la famille Src sont présentes au niveau des radeaux lipidiques. Les Src associés aux radeaux sont impliquées dans la régulation de la phosphorylation de Syk. b) La transduction du signal est principalement initiée par la phosphorylation des résidus tyrosines des motifs ITAM par les Src. Le recrutement de Syk vers les motifs ITAM déclenche son activation et les voies de signalisation

sous-jacentes. BCL-10, B cell lymphoma 10; CARD, caspase-recruitment domain; ERK, extracellular signal-regulated kinase; MALT1, mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1; NF- $\kappa$ B, nuclear factor- $\kappa$ B; PKC, protein kinase C; ERO, espèces réactives de l'oxygène.

Syk est connue pour être activée lors de l'engagement de récepteurs tels que Fc $\gamma$ R, Dectin-1 ou Mincle (Kerrigan and Brown 2011). Syk se lie à des motifs ITAM, phosphorylés ce qui la rend accessible à la phosphorylation sur les tyrosines 348 et 352 par les Src kinases et initie ainsi une boucle d'autophosphorylation (figure 24) (Mansueto et al. 2019).

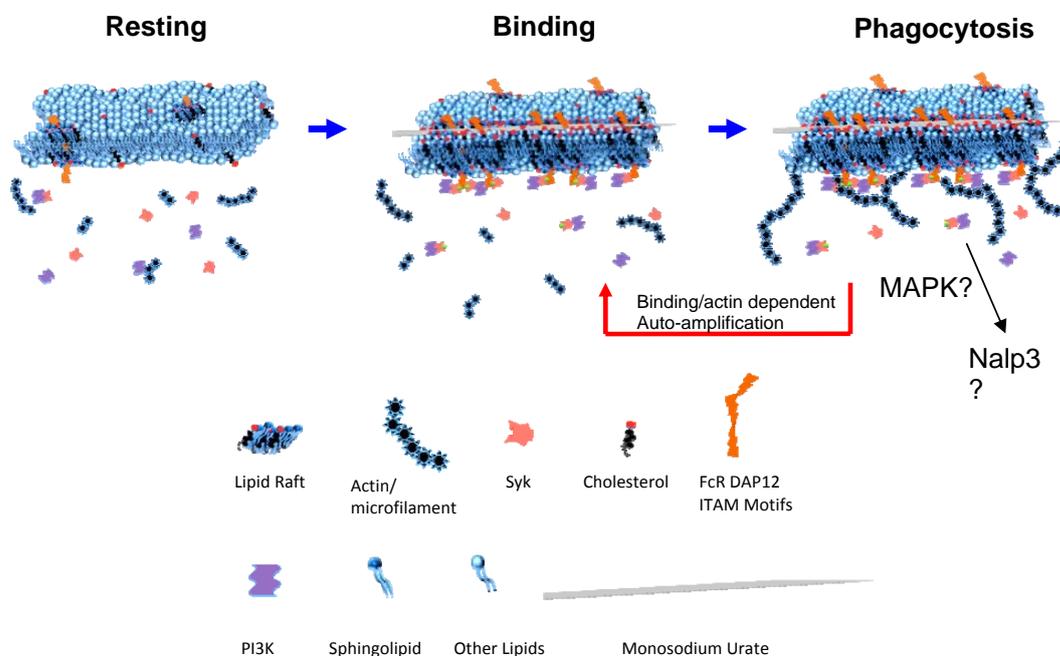


**Figure 24** - Modèle d'activation de SYK par les motifs ITAM phosphorylés, la phosphorylation de l'interdomaine et la phosphorylation de la boucle d'activation. D'après Mansueto et al.

La première phosphorylation de Syk aura lieu par l'intermédiaire des Src kinases. Puis, une boucle de phosphorylation de Syk se mettra en place : la phosphorylation de Syk serait principalement liée à une phosphorylation directe par les Src kinases mais aussi par l'autophosphorylation de Syk par des molécules Syk déjà phosphorylées (figure 24). Ainsi, l'activation de Syk présenterait une cinétique d'accumulation exponentielle (El-Hillal et al. 1997; Zhang et al. 2000; Mansueto et al. 2019).

Il est maintenant bien établi que le phénomène d'agrégation des nanomatériaux peut faciliter de nombreux événements de signalisation (Lee et al. 2010; Murugadoss et al.

2020). Il a été montré que des particules de MSU ou des agrégats de particules d'aluminium pouvaient induire l'agrégation de radeaux lipidiques (figure 25) (Ng et al. 2008; Flach et al. 2011). La formation de radeaux lipidiques peut à elle seule permettre à certains événements membranaires de se produire, entraînant alors une activation cellulaire. Parmi ces événements, le recrutement à la membrane de Syk peut être déclenché par une activation des récepteurs protéiques tels que les récepteurs BcR ou les FcR ce qui entraîne alors la phosphorylation des ITAM (Abram and Lowell 2007). Cependant, une phosphorylation basale des ITAM est couramment observée.



**Figure 25** - Schéma possible de l'activation de la kinase Syk de manière indépendante des récepteurs.

A gauche, la membrane des DC est à l'état basal où les radeaux lipidiques sont dispersés et le recrutement de Syk à la membrane est limité. Au milieu, lors de la liaison des particules de MSU, un réarrangement lipidique se produit en raison d'une interaction entre les MSU et le cholestérol membranaire. Ceci permet d'agréger les motifs ITAM associés au radeau contenant des molécules de signalisation. A droite, Syk/PI3K conduit à une réorganisation de l'actine et de la topologie de la membrane. D'après Ng et al. 2008.

D'autres études ont permis de mettre en évidence le rôle clé de la protéine Syk dans la signalisation cellulaire des DC murines en réponse aux cristaux de MSU. Les travaux de Kool *et al.* montrent qu'*in vitro* lorsque Syk est inhibée, il n'y a plus de production d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  en réponse aux cristaux de MSU dans les DC inflammatoires. Ceci suggère alors que cette voie est impliquée dans l'induction de la production des cytokines pro-inflammatoires dans les DC. L'administration orale de l'inhibiteur de Syk BAY-91-3606 réduit l'afflux de monocytes inflammatoires OVA-positifs dans le péritoine de souris à 24h. L'administration de ce même inhibiteur a fortement réduit la lymphocytose dans les voies respiratoires (Kool *et al.* 2011). Les données décrites ci-dessus suggèrent qu'une attention particulière doit être portée aux interactions entre les matériaux particuliers et les membranes cellulaires. Dans

# Objectifs du travail

Du fait de l'essor de l'emploi des nanoparticules dans de nombreuses industries et de la forte exposition de la population générale par l'alimentation comme par les produits de soin, une meilleure compréhension et évaluation de leur toxicité semble indispensable. L'objectif principal de ce travail de thèse a été de comprendre l'effet des nanoparticules de silice amorphe sur les mécanismes de la réponse immunitaire adaptative. Dans la première partie, nous avons évalué l'effet d'une exposition des cellules dendritiques, premier acteur de la réponse immunitaire adaptative, aux SAS-NP. Nous avons évalué leur potentiel effet signal de danger et la signalisation mise en place lors de cette exposition. Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés à l'effet des SAS-NP dans l'immunisation contre un pneumallergène, l'allergène majeur du pollen de bouleau, Bet v 1a.

De nombreuses études se sont intéressées aux effets des NP sur les DC, cependant les modèles utilisés étaient des DC murines ou des lignées cellulaires. Dans ce travail de thèse, dans l'objectif d'évaluer l'immunotoxicité des NP en s'affranchissant de la barrière d'espèce, nous avons fait le choix d'utiliser un modèle de cellules dendritiques humaines.

Les études immunotoxicologiques publiées dans la littérature reposant majoritairement sur une seule évaluation phénotypique, notre premier objectif dans ce travail a été la mise au point d'une méthode robuste d'évaluation de l'immunotoxicité des nanoparticules reposant sur l'évaluation phénotypique des DC, la prolifération des LT mais aussi la sécrétion de cytokines par les deux types cellulaires (Feray et al. 2020 en annexe).

Nous nous sommes alors appuyés sur ce travail préliminaire pour construire la suite du projet, qui va se décomposer en deux grandes parties.

Dans la première partie de ce travail de thèse, en appliquant la méthodologie précédemment décrite (Feray et al. 2020) aux nanoparticules de silice amorphe pyrogénées, notre objectif était d'évaluer l'effet signal de danger de ces dernières.

Nous souhaitons combler un point faible de la littérature qui est le manque de précision sur la nature des nanoparticules de silice amorphe utilisées dans les études. Souvent, le terme générique de silice amorphe synthétique est utilisé dans la littérature aussi bien pour celles obtenues par voie thermique que celles obtenues par voie humide, ce qui ne permet pas d'apprécier une éventuelle différence de toxicité. Nous avons donc projeté de comparer les effets de plusieurs silices amorphes synthétiques avec des procédés d'obtention différents, soit deux silices pyrogénées et une silice colloïdale représentatives.

Dans un second temps, nous avons souhaité évaluer les mécanismes par lesquels les SAS-NP pyrolytiques exerçaient leur effet signal de danger. Cet aspect, bien que plus fondamental, est crucial à la compréhension des facteurs clés menant à la reconnaissance des SAS-NP en tant que signal de danger par les DC. Pour ce faire, nos objectifs étaient d'identifier les voies de signalisation mobilisées dans les DC lors de l'interaction avec les SAS-NP et de comprendre les événements les plus précoces initiant cette signalisation. La compréhension de ces mécanismes constitue en effet un élément clé afin de concevoir des NP plus sûres par une approche *safer-by-design*.

Dans le deuxième volet de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux effets des SAS-NP dans l'immunisation contre un aéroallergène très répandu, l'allergène majeur du pollen de bouleau Bet v 1a. Du fait de leur taille à l'échelle nanométrique et de leur grande réactivité de surface, les nanoparticules se recouvrent des composants du milieu environnant formant à leur surface une corona. L'utilisation polymorphe des SAS-NP engendre une large exposition de la population mais aussi des travailleurs. Ainsi, l'exposition par voie pulmonaire mène à une probable exposition des cellules du système immunitaire telles que les macrophages et les cellules dendritiques.

Dans la littérature, seules quelques publications se sont intéressées à la co-exposition aux allergènes et aux nanoparticules. Pourtant, dans la population générale comme chez les travailleurs, l'exposition aux SAS-NP peut avoir lieu par voie respiratoire et

rendre très vraisemblable une telle co-exposition. Ainsi, il nous a semblé important d'en évaluer *in vitro* les conséquences.

Pour évaluer ceci, un modèle de co-culture autologue dans lequel les DC et les LT sont issus du même donneur humain sain a été retenu afin d'évaluer l'effet signal de danger des SAS-NP sur la réponse lymphocytaire T dirigée contre Bet v 1a. Notre défi était d'adapter ce modèle pour qu'il nous permette de procéder à une telle évaluation. Comme évoqué précédemment, la corona des NP est composée des molécules présentes dans leur milieu environnant. Dans le contexte d'une co-exposition entre les SAS-NP et Bet v 1a, il nous a également semblé pertinent d'explorer un rôle de cheval de Troie, entraînant une meilleure internalisation de l'allergène et ainsi une modification de la réponse dirigée contre ce dernier.

# Résultats

## Article 1

Notre hypothèse de travail est que les nanoparticules pourraient exercer un effet pro-allergisant sur le système immunitaire en étant reconnues par les cellules dendritiques en tant que signal de danger.

Les effets adjuvants des particules ont été décrits dans la littérature avec les DEP (Knox et al. 1997; Tsien et al. 1997; Sarkar et al. 2014) et des nanoparticules de silice amorphe (Brandenberger et al. 2013; Toda and Yoshino 2016), notamment en étudiant leur impact sur les réactions allergiques. Ces travaux suggèrent que l'exposition à ces particules pourrait renforcer la sensibilisation aux allergènes et/ou favoriser une plus grande manifestation de la maladie allergique lors d'expositions secondaires aux allergènes. Cependant, ces travaux ont été menés sur des modèles murins ou des lignées humaines de cellules dendritiques « like » telles que les THP-1, rendant l'extrapolation à l'homme difficile. L'objectif de l'**article n°1** (Feray et al. 2021) a donc été d'évaluer l'effet signal de danger des SAS-NP sur les deux premières étapes de la réaction immunitaire dans des DC et LT issus de donneurs humains sains. Nos résultats montrent que les SAS-NP induisent une augmentation significative de l'activation des DC se traduisant par une augmentation de l'expression des marqueurs d'activation et de co-stimulation accompagnée d'une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Les modifications phénotypiques induites par les SAS-NP sur les DC induisent également des modifications de la réponse lymphocytaire T dans un modèle de co-culture allogénique caractérisé par une augmentation de la prolifération des LT et une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Ces résultats suggèrent que les SAS-NP joueraient un rôle de signal de danger induisant des modifications phénotypiques fonctionnelles donnant lieu à la prolifération des lymphocytes T. Ces travaux se démarquent de ceux proposés dans la littérature par plusieurs aspects. Nous avons utilisé un modèle de

DC humaines. De plus, nous proposons ici un outil robuste pour évaluer la toxicité des NP avec une évaluation phénotypique et fonctionnelle de l'effet des SAS-NP.

# Synthetic Amorphous Silica Nanoparticles Promote Human Dendritic Cell Maturation and CD4+ T-Lymphocyte Activation

Alexia Feray,<sup>\*</sup> Éléonore Guillet,<sup>\*</sup> Natacha Szely,<sup>\*</sup> Marie Hullo,<sup>\*</sup> François-Xavier Legrand,<sup>†</sup> Emilie Brun,<sup>‡</sup> Thierry Rabilloud,<sup>§</sup> Marc Pallardy,<sup>\*</sup> and Armelle Biola-Vidamment <sup>\*,1</sup>

<sup>\*</sup>Université Paris-Saclay, Inserm, Inflammation, Microbiome and Immunosurveillance, 92290 Châtenay-Malabry, France, <sup>†</sup>Université Paris-Saclay, CNRS, Institut Galien Paris Saclay, 92296 Châtenay-Malabry, France, <sup>‡</sup>Université Paris-Saclay, CNRS, Institut de Chimie Physique, 91405 Orsay, France, and <sup>§</sup>UMR CNRS 5249, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, CEA-Grenoble, 38 054 Grenoble, France

Alexia Feray and Éléonore Guillet are cofirst authors and contributed equally to this study.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed at INSERM UMR-996, Faculté de pharmacie, Université Paris-Saclay, 5 rue JB Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France. E-mail: armelle.biola-vidamment@universite-paris-saclay.fr.

## ABSTRACT

Innate immune cells such as dendritic cells (DCs) sense and engulf nanomaterials potentially leading to an adverse immune response. Indeed, as described for combustion-derived particles, nanomaterials could be sensed as danger signals, enabling DCs to undergo a maturation process, migrate to regional lymph nodes and activate naive T lymphocytes. Synthetic amorphous silica nanoparticles (SAS-NPs) are widely used as food additives, cosmetics, and construction materials. This work aimed to evaluate *in vitro* the effects of manufactured SAS-NPs, produced by thermal or wet routes, on human DCs functions and T-cell activation. Human monocyte-derived DCs (moDCs) were exposed for 16 h to 3 endotoxin-free test materials: fumed silica NPs from Sigma-Aldrich (no. S5505) or the JRC Nanomaterial Repository (NM-202) and colloidal LudoxTMA NPs. Cell viability, phenotypical changes, cytokines production, internalization, and allogeneic CD4+ T-cells proliferation were evaluated. Our results showed that all SAS-NPs significantly upregulated the surface expression of CD86 and CD83 activation markers. Secretions of pro-inflammatory cytokines (CXCL-8 and CXCL-12) were significantly enhanced in a dose-dependent manner in the moDCs culture supernatants by all SAS-NPs tested. In an allogeneic coculture, fumed silica-activated moDCs significantly increased T-lymphocyte proliferation at all T-cell: DC ratios compared with unloaded moDCs. Moreover, analysis of coculture supernatants regarding the production of T-cell-derived cytokines showed a significant increase of IL-9 and IL-17A and F, as well as an upregulation of IL-5, consistent with the pro-inflammatory phenotype of treated moDCs. Taken together, these results suggest that SAS-NPs could induce functional moDCs maturation and play a role in the immunization process against environmental antigens.

**Key words:** amorphous silica nanoparticles; dendritic cells; danger signal; T lymphocytes; immunotoxicology.

Synthetic amorphous silica nanoparticles (SAS-NPs) are among the 3 most-produced nanomaterials worldwide and have long

been considered highly biocompatible when compared with their crystalline counterparts (Croissant *et al.*, 2020). They are

**IMPACT STATEMENT**

Synthetic amorphous silica nanoparticles (SAS-NPs) promote the 2 first steps of adaptive immune response by increasing the maturation of human DCs and triggering a T-lymphocyte response, characterized by increased proliferation and cytokine secretion. SAS-NPs may therefore play a role in the immunization process against environmental antigens, in situations where simultaneous exposure with nanoparticles could occur in the workplace, as well as in everyday life.

industrially produced by wet (colloidal) or thermal (pyrogenic) routes (Croissant *et al.*, 2020). Fumed silica, a pyrogenic SAS-NPs, is found in everyday products such as cosmetics as an anti-caking or emulsifying agent (SCCS and Hoet, 2016) or in dehydrated food as the widespread food additive E 551 (Winkler *et al.*, 2016; Younes *et al.*, 2018). Colloidal SAS-NPs are not authorized as food additives but are nonetheless used in a broad range of industrial applications. In addition to everyday “intentional” exposure, the use of SAS-NPs both in manufacturing processes and more generally in the workplace also raises the issue of the safety of “accidental” exposure, which may depend on the procedures and protective measures implemented. For these reasons, SAS-NPs belong to the OECD list of prioritized engineered nanoparticles having relevance in the workplace.

Pulmonary exposure to SAS-NPs causes a reversible inflammatory response in mice (Arts *et al.*, 2007; Napierska *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2016). Interestingly, repetitive intratracheal instillation of fumed silica every week for 3 consecutive weeks results in profibrotic effects in the lung and biopersistence linked to a defect in lung clearance (Sun *et al.*, 2016). Moreover, ingestion of SAS-NPs provokes intestinal inflammation in rodent models (Jani *et al.*, 1990). Less is known on the potential of these nanomaterials to cause unintended immune responses, either promoting the development of allergic diseases or exacerbating the severity of established allergic conditions (Shannahan and Brown, 2014). Several *in vivo* studies in animals suggest that SAS-NPs could act as adjuvants, consistent with the pro-inflammatory effects described above. Indeed, polyethylene glycol-coated 90-nm SAS-NPs promoted allergic airway disease in mice coexposed to ovalbumin using intranasal instillation during sensitization (Brandenberger *et al.*, 2013). Moreover, intranasal administrations of spherical, mesoporous, and pegylated SAS-NPs in mice showed an adjuvant effect in a model of ovalbumin-induced allergic airway inflammation with higher cytokines levels (IL-5, IL-13, IL-1 $\beta$ , and IFN- $\gamma$ ) and enhanced inflammatory cell infiltration in bronchoalveolar lavage fluid (Han *et al.*, 2016).

Phagocytic cells such as macrophages and dendritic cells (DCs) are among the first immune cell types to uptake and process nanoparticles (Gustafson *et al.*, 2015). DCs are professional antigen-presenting cells that reside in nonlymphoid tissues in an immature antigen-capturing state. Located at the gates of antigen entry, DCs are constantly sampling their environment. Intestinal, skin, and pulmonary DCs, predominantly located underneath the epithelial basement membrane, sense and capture antigens and present sampled antigens to T lymphocytes. However, depending on the cellular microenvironment and its effect on DC phenotype, the consequence can be either an immunogenic or a tolerogenic immune response (Lutz and Schuler, 2002; Tan and O’Neill, 2005).

The presence of various stimuli such as “danger signals” in the microcellular environment (Gallo and Gallucci, 2013), causes DCs to undergo a maturation process resulting in the upregulation of major histocompatibility complex class II (MHC II), costimulatory molecules, cytokines and chemokine receptors. DCs

then migrate to regional lymph nodes to present the antigen and to activate specific naive T lymphocytes (Worbs *et al.*, 2017). Classic danger signals are either derived from pathogens and released during infections (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) or result from tissue damages and necrotic dying cells (damage-associated molecular patterns, DAMPs) (Pradeu and Cooper, 2012). But there are newly emerging danger signals, among which man-made nanomaterials, which may activate DCs in aseptic conditions in a similar manner to the microbial molecular patterns (Fadeel, 2012; Pallardy *et al.*, 2017). These are designated as NAMPs (nanoparticles-associated molecular patterns) (Farrera and Fadeel, 2015; Gallo and Gallucci, 2013).

*In vitro* studies have explored the danger signal effects of SAS-NPs by focusing on the activation of key immune cells such as DCs. For example, increased activation of murine bone-marrow DCs (BMDCs) with CD86 and MHC II upregulation along with the production of IL-1 $\beta$  (Winter *et al.*, 2011) and TNF- $\alpha$  pro-inflammatory cytokines (Kang and Lim, 2012) have both been demonstrated. More recently, internalization of food-grade fumed silica nanoparticles was evidenced in murine steady-state DCs, as well as secretion of IL-1 $\beta$  in a MyD88-dependent mechanism (Winkler *et al.*, 2017). But few studies have been performed using human DCs, and reports addressing DC-phenotypic changes upon exposure to NPs and functional consequences on the immune system are needed (Barillet *et al.*, 2019; Vallhov *et al.*, 2007, 2012).

Understand how SAS-NPs could participate in inappropriate activation of the immune system and establish pertinent *in vitro* endpoints for robust immunotoxicological evaluation of nanomaterials is essential. This work aims to evaluate the effects of relevant pyrogenic or colloidal SAS-NPs on human DCs expression of maturation markers and cytokine secretion and to address the consequences on the T-cell response.

**MATERIALS AND METHODS****Reagents and materials**

The fumed silica NPs mainly used in this work were commercially available (S5505, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France, batch SLBR6988V). According to the manufacturer, their specific surface determined by BET (Brunauer-Emmett-Teller), is 196 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>. The NPs suspension was prepared from fumed silica dry powder dispersed in filtered ultrapure water at a final concentration of 50 mg.mL<sup>-1</sup>. The suspension was then left for 8 h in a water bath at 80°C to sterilize the suspension. The absence of bacterial growth in the nanoparticle’s suspension was checked after the process, and a LAL test was performed on each batch to address endotoxin contamination. Before each experiment, an intermediate dilution at a concentration of 500  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> was prepared in RPMI 1640 medium supplemented with Glutamax, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 ng.mL<sup>-1</sup> streptomycin, and 100 U.mL<sup>-1</sup> penicillin (Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France). The suspension was sonicated for 15 min before DCs treatment. The SiO<sub>2</sub>-NM202-JRCNM02002 (vial JRCNM02002a990868) was obtained

from the European Commission, Joint Research Center JRC Nanomaterial Repository, Ispra, Italy. NM-202 NPs are produced via a high-temperature process and have been thoroughly characterized as they are used as benchmark materials, representative of the nanosized fraction of silicon dioxide contained in the E551 food additive. Their specific surface determined by BET is  $204 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ . The suspension was dispersed in filtered ultrapure water at a final concentration of  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  and sterilized as previously described for S5505. The Ludox TMA NPs (420859, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France, batch MKBV6154V) is an aqueous dispersion of negatively charged silica particles with a particle size of 22 nm and not stabilized by a counter ion. They display a specific surface of  $134 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  and are supplied as a 34% suspension in water and stored at room temperature. Ludox TMA NPs are sonicated in an ultrasound bath for 15 min before use and then vortexed and diluted to the desired concentration in fetal calf serum-free culture medium.

### Characterization of synthetic amorphous silica nanoparticles

The hydrodynamic diameter of particles was determined at  $25^\circ\text{C}$  by dynamic light scattering (DLS) using a Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Orsay, France) operating at a fixed scattering angle at  $90^\circ$  and equipped with a helium-neon laser source with a wavelength of 633 nm. Measurements were performed in disposable 4-ml cuvettes with 1-cm optical pathway and 4 optical faces (Sarstedt, Marnay, France) containing an appropriate volume (1 mL) of the sample, prepared as described above, after dilution to  $125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  in the desired medium. The hydrodynamic diameter values were calculated using the Stokes-Einstein equation assuming a spherical shape of the particles. The particle size profile was obtained from the intensity-weighted distribution and the hydrodynamic diameter value corresponds to the median diameter derived from the cumulative distribution curve. The  $\zeta$ -potential measurements were carried out with the same instrument at  $25^\circ\text{C}$  by laser Doppler velocimetry at a detection angle of  $17^\circ$  in DTS 1060 disposable cells (Malvern Instruments, Orsay, France) loaded with approximately 1 mL of each sample diluted to  $375 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  in the desired medium. Due to the ionic strength of the samples leading to high conductivity, measurements were performed using the monomodal mode and the Smoluchowski approximation was used to convert the electrophoretic mobility to  $\zeta$ -potential. Values are given as mean values of ten measurements. We carried out the characterization before and after heating at  $80^\circ\text{C}$ . The results (DLS and zeta potential) showed no significant difference, confirming that sterilization does not alter the physico-chemical characteristics of fumed silica nanoparticles (data not shown).

For transmission electron microscopy (TEM) experiments,  $2 \mu\text{l}$  of  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  aqueous suspension of NPs was deposited onto a formvar/carbon-coated copper grid and observed using a JEOL 1400 TEM instrument (JEOL Ltd, Tokyo, Japan) operating at 120 kV. Analysis of recorded images was performed using the FIJI (Schindelin et al., 2012).

### Endotoxin detection

Possible endotoxin contamination was analyzed with the Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay (GenScript, Piscataway, New Jersey). All batches showed values below the threshold of endotoxin positivity ( $0.05 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).

### Generation of primary cultures of human moDCs

Human monocyte-derived dendritic cells (moDCs) were derived from monocytes isolated from human peripheral blood supplied by the French Blood Bank (EFS, Rungis, France). Healthy donors gave their written consent for the use of blood donation for research purposes. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were sorted from buffy coats by density centrifugation on a Ficoll gradient. Monocytes were then isolated through positive magnetic selection using MidiMacs separation columns and anti-CD14<sup>+</sup> antibodies coated on magnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Finally, CD14<sup>+</sup> cells were differentiated in immature moDCs for 4 days in RPMI 1640 supplemented with GlutaMAX (Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France), 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France),  $550 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rh-GM-CSF, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany),  $550 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  interleukin-4 (rh-IL4, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), 1 mM sodium pyruvate (Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France),  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  streptomycin and  $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  penicillin (Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France).

### In vitro exposure of immature moDCs to synthetic amorphous silica nanoparticles

After proper differentiation, immature human moDCs were collected, washed, and resuspended in a fresh complete culture medium (RPMI supplemented with 10% FBS, 1 mM sodium pyruvate,  $0.1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  streptomycin, and  $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  penicillin) at a final density of  $10^6 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Cells were then exposed 16 h either to 0, 12.5, 25 or  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  of sonicated SAS-NPs (fumed silica S5505, Ludox TMA, NM-202) or to  $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  of lipopolysaccharide (LPS, ref: L6529, Escherichia coli, serotype 055-B5, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) as a positive control of moDCs activation. Cells were exposed in the absence of FBS for the first hour of exposition to minimize the impact of serum proteins. Then, the medium was returned to 10% FBS for the proper survival of the cells during the next 15 h.

### Cytotoxicity assay

Viability was assessed by labeling with propidium iodide (PI, Invitrogen, Saint Aubin, France). After treatment with SAS-NPs at 0, 12.5, 25, or  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , cells were washed with PBS and incubated with PI at  $6.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , and the percentage of viability was measured by flow cytometry. We previously tested that under these experimental conditions, SAS-NPs did not interfere with the result of the cytotoxicity test.

### Phenotypic analysis

To assess the effects of SAS-NPs exposure on moDCs phenotype, several surface maturation markers were studied. After 16 h of exposure to either 0, 12.5, 25, or  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  SAS-NPs or  $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  LPS, moDCs were collected, washed with PBS, and incubated for 20 min either with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (mAbs) or with appropriate isotype control antibodies (IgGs). The following mAbs were used: CD80 (FITC-Mouse anti-human CD80/FITC Mouse IgG1 Isotype control, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), CD83 (PE-Mouse anti-human CD83/PE Mouse IgG1 Isotype control, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), CD86 (APC-Mouse anti-human CD86/APC Mouse IgG1 Isotype control, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), CXCR-4 (APC Mouse anti-human

CD184/APC Mouse IgG1 Isotype control, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), CD40 (FITC-Mouse anti-human CD40/FITC Mouse IgG1 Isotype control, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) and PDL-1 (FITC-Mouse anti-human CD274/FITC Mouse IgG1 Isotype control, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). After incubation, moDCs were washed with PBS and then analyzed on a FACS Attune NxT acoustic focusing cytometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts). Results were expressed as the fold increase of the percentage of the positive cells compared to control (untreated moDCs).

### Internalization of nanoparticles by moDCs

After NP exposure (as described above), cells were rinsed with PBS, fixed in 2.5% glutaraldehyde 2% PFA in cacodylate buffer (0.1 M pH 7.4) for 1h30 at room temperature, then rinsed with cacodylate buffer. Postfixation was achieved in 1% osmium tetroxide 1.5% potassium ferrocyanide solution at room temperature for 1 h. After extensive washings with water, pellets were included in 2% LMP agarose and cut in mm<sup>3</sup> blocks. They were dehydrated through a graded series of ethanol before being embedded in Epon resin. Ultrathin sections of 70 nm were cut with an EM UC6 ultramicrotome (Leica Microsystems) and stained for 10 min with 2% uranyl acetate (Merck) and 3 min with Reynolds lead citrate (Agar). They were then observed in TEM with a JEOL JEM-1400 electron microscope operating at 120 kV.

### Coculture of moDCs and CD4+ T cells

As described previously (Feray et al., 2020), CD4+ T cells were isolated from PBMC by positive selection with midiMACS separation columns and anti-CD4 antibodies coated on magnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). These T cells were confirmed to have purity greater than 95%, based on CD4 expression evaluated by flow cytometry (561841, RPA-T4, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). CD4+ T lymphocytes were labeled with 0.5 mM carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE, Invitrogen, Saint Aubin, France), following the manufacturer's instruction. MoDCs were stimulated by 0, 12.5, or 25 µg.mL<sup>-1</sup> of S5505 fumed silica NPs or 25 ng.mL<sup>-1</sup> of LPS (positive control for danger signal effects) for 16 h and then washed and cocultured with allogeneic CD4+ T cells at a 1:20 (1 moDC for 20 CD4+ T cells), 1:50 (1 moDC for 50 CD4+ T cells), or 1:100 (1 moDC for 100 CD4+ T cells) DC: T-cell ratio for 5 days, in RPMI 1640 Glutamax (Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France) supplemented with 10% FBS in round-bottom 96-well plates (Cellstar, Greiner bio-one, Courtaboeuf, France) as described previously (Feray et al., 2020). A DC: T-cell coculture loaded with the mitogen phytohaemagglutinin (PHA, Invitrogen, Saint Aubin, France) was used as a positive control for T-cell proliferation. Analysis of T-cell proliferation was assessed as the CFSE<sub>low</sub> cells by flow cytometry, on a FACS Attune NxT acoustic focusing cytometer (ThermoFisher Scientific).

### Cytokine quantification in cell culture supernatants

MoDCs mono or coculture supernatants were measured in duplicate for IL-1β, IL-6, CXCL-8, IL-12p40, CCL-2 (MCP-1), CXCL-12 and CXCL-10 (IP-10), IL-17A, IL-17F, IL-5, IL-13, IL-9, IFN-γ, IL-10, and IL-22 using Meso Scale Discovery multiplex assay (MSD, Rockville, Maryland) following manufacturer's instructions.

## RESULTS

### Characterization of Synthetic Amorphous Silica Nanoparticles

Silica exists in a multitude of different forms for industrial applications. SAS-NPs are synthesized through low-temperature colloidal or high-temperature pyrolysis routes (Croissant et al., 2020). In this study, we mainly focused on 2 fumed silica NPs (commercially available S5505 and NM-202 benchmark material). For comparison, Ludox TMA NPs were also studied.

TEM is among the gold-standard method for NPs characterization as it allows the assessment of the morphology and external dimensions of the constituent particles. S5505 fumed silica or Ludox TMA NPs dispersed in water were deposited onto TEM grids for analysis (Supplementary Figs. 1A and 1B). S5505 fumed silica NPs were rounded shaped and appeared fused as chain-like structures (Supplementary Figure 1A). The median diameter of the identifiable constituent nanoparticles was  $14.4 \pm 5.3$  nm (Supplementary Figure 1B) which is in the same range as the values determined by Sun et al. (2016) and Winkler et al. (2017). According to DLS measurements, which are based on Brownian motion (Supplementary Figure 1C), S5505 fumed silica in RPMI 1640 medium led to a bimodal distribution with a first main population centered on  $123 \pm 53$  nm and a second one on  $8.7 \pm 0.3$  µm, testifying of agglomeration and/or aggregation processes. The addition of 1% of FBS to the medium also led to a bimodal distribution. However, the size corresponding to the first main population increased to  $2.2 \pm 1.1$  µm whereas the second population remained unchanged (hydrodynamic diameter close to  $8.5 \pm 0.8$  µm). Supplementation with 10% FBS did not greatly change the sizes of the 2 populations ( $1.5 \pm 0.6$  µm and  $7.7 \pm 1.9$  µm) but led to an increase in the proportion of the second population. Optical microscopy, and in particular granulomorphometry (data not shown), was used to search for additional details but the contrast between the particles and the buffer was weak in the same manner as previously described by Doi (1982). The ζ-potential value for S5505 in RPMI 1640 was  $-22.5 \pm 1.4$  mV and increased to  $-13.5 \pm 1.5$  and  $-8.5 \pm 1.9$  mV in the presence of 1% and 10% of FBS, respectively (Supplementary Figure 1D). This increase, even at low serum concentration, suggests that a protein layer is formed on particles (Monopoli et al., 2011). It should be noted that the sterilization step at 80°C for 8 h does not modify the size and ζ-potential behavior of S5505 fumed silica (data not shown) as the same tendency was observed with or without FBS.

Regarding NM-202 DLS size measurements, 2 peaks were observed in pure RPMI 1640 at  $160 \pm 33$  nm and  $8.9 \pm 0.5$  µm, showing similar behavior to fumed silica (Supplementary Figure 1C). The addition of 10% of FBS led to an increase in the first population to  $423 \pm 189$  nm whereas the second population remained unchanged (hydrodynamic diameter close to  $7.0 \pm 3.2$  µm). Moreover, free serum proteins were detected at  $7.4 \pm 1.0$  nm. The ζ-potential values for NM-202 nanoparticles were equal to  $-20.1 \pm 0.5$  and  $-6.9 \pm 0.5$  mV in absence of FBS and with 10% of FBS, respectively (Supplementary Figure 1D), confirming adsorption of FBS components to the particle surface as for S5505 fumed silica NPs.

As for Ludox TMA NPs, they present higher size and shape homogeneities according to TEM images (Supplementary Figs. 1A and 1B). Their median diameter determined by TEM was  $16.5 \pm 2.0$  nm (Supplementary Figure 1B) which is lower than the median hydrodynamic diameter measured by DLS ( $27.2 \pm 0.3$  nm) (Supplementary Figure 1C). This phenomenon is

classic as the dispersion of NPs into an electrolyte led to a layer on the surface, measured by DLS, which is composed of ions and molecules of the dispersion medium. Supplementation with 1% of FBS led to a bimodal distribution with a first large population centered on  $50.8 \pm 4.3$  nm and a second one at  $7.8 \pm 0.4$   $\mu$ m bearing out an agglomeration/aggregation (Supplementary Figure 1C). The addition of 10% of FBS to the medium led to a trimodal distribution. The sizes corresponding to the 2 previous populations remained unchanged (hydrodynamic diameters close to  $48.8 \pm 7.5$  nm and to  $8.6 \pm 0.5$   $\mu$ m, respectively) whereas a new population was detected at  $144 \pm 31$  nm corroborating the agglomeration/aggregation mechanism (Supplementary Figure 1C). This phenomenon can be explained by the adsorption of serum proteins at the particle surface. Indeed,  $\zeta$ -potential measurements have shown an increase in  $\zeta$ -potential in the presence of FBS, this phenomenon is all the more pronounced as there is a high content of FBS (Supplementary Figure 1D).

Thus, as expected given their synthesis routes, fumed silica S5505 and NM-202 NPs have comparable physicochemical properties while differing from Ludox TMA NPs.

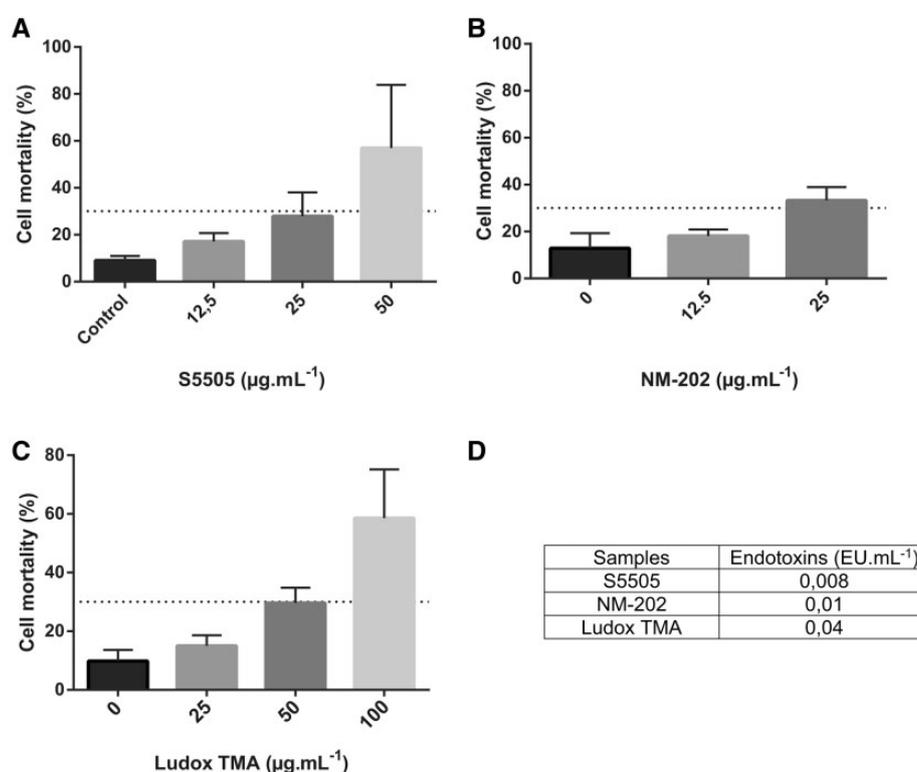
### Cytotoxicity of Synthetic Amorphous Silica Nanoparticles

Phagocytic cells, such as DCs, are suspected to be sensitive to NPs cytotoxicity because of their capability to attain a large intracellular load. To analyze the cytotoxicity of SAS-NPs, human moDCs were incubated for 16 h with 12.5, 25, 50, or 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> of S5505 or NM-202 fumed silica or Ludox TMA NPs. Cell viability

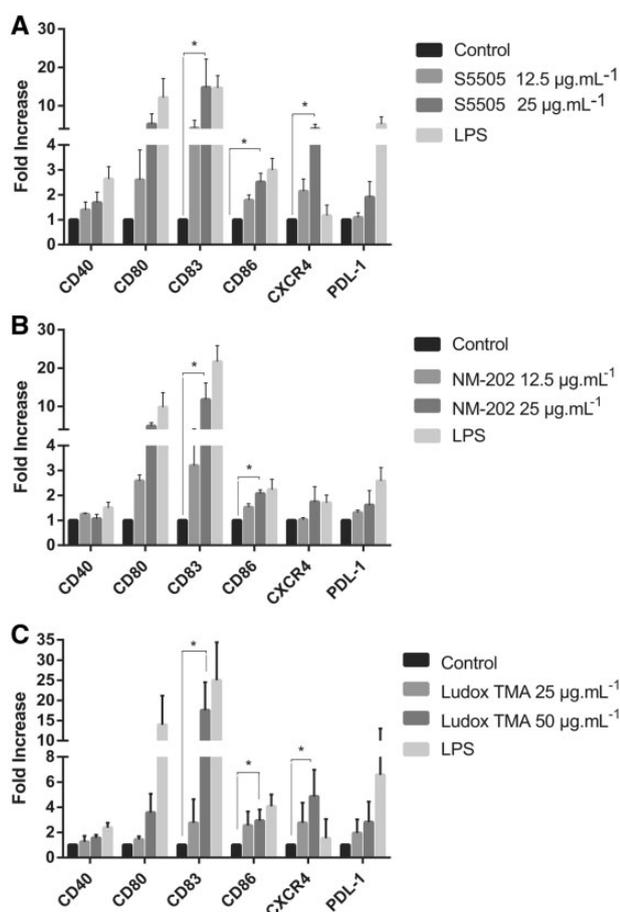
was then analyzed by flow cytometry using PI staining. Results showed that all SAS-NPs decreased moDCs viability in a concentration-dependent manner (Figure 1). The 50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> concentration of S5505 NPs and 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> of Ludox TMA were highly cytotoxic with a 60% cell mortality. Both the 12.5 and 25  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> concentrations of S5505 or NM-202 fumed silica (Figs. 1A and 1B) and 25 and 50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> of Ludox TMA NPs (Figure 1C) were below or slightly above the 30% cytotoxicity established threshold and were retained for further experiments. These cytotoxicity results led us to select different working concentrations for each type of nanoparticle, so as not to exceed the 30% cytotoxicity threshold. Moreover, based on a sensitive LAL assay, all SAS-NPs tested were below the threshold of endotoxin positivity (0.05 EU.mL<sup>-1</sup>) (Figure 1D).

### Synthetic Amorphous Silica Nanoparticles Modulated moDCs Phenotype

To examine the phenotypic changes of moDCs, cells were incubated with 12.5 and 25  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> of S5505 or NM-202 fumed silica NPs, or 25 and 50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> of Ludox TMA. LPS was used as a positive control for moDCs maturation. The maturation status of the moDCs was then assessed using FACS analysis and measurement of CD80, CD86, CD83, CD40, CXCR4, and PDL-1 expressions. Interestingly, expressions of CD83 and CD86 molecules increased in a dose-dependent manner reaching statistical significance for 25  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> of S5505 and NM-202 NPs (Figs. 2A and 2B) and 50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> of Ludox TMA (Figure 2C). The expression of CXCR-4 was significantly induced by 25  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> of S5505 and 50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> of Ludox TMA NPs (Figs. 2A and 2C). CD40 and PDL-1



**Figure 1.** Cytotoxicity and endotoxin levels of synthetic amorphous silica nanoparticles. MoDCs were incubated with 12.5, 25, and 50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> of S5505 fumed silica NPs (A) or 12.5 and 25  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> of NM-202 NPs (B) or 0, 25, 50, or 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> of Ludox TMA nanoparticles (C) for 16 h. Cells were then collected, washed, and cell viability analyzed by flow cytometry using propidium iodide staining. Results were expressed in percentage of cell mortality and represented the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. \* $p < .05$ , \*\* $p < .01$ , \*\*\* $p < .001$ , 1-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test. (D) Endotoxin levels were analyzed with the Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay. Representative results. The limit of detection was 0.01 EU.mL<sup>-1</sup> and the threshold of endotoxin positivity was 0.05 EU.mL<sup>-1</sup>.



**Figure 2.** Synthetic amorphous silica nanoparticles modulated moDCs phenotype. Cells were incubated with 12.5 and 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  of S5505 fumed silica nanoparticles (A) or NM-202 (B) or Ludox TMA (C) for 16 h. LPS was used as a positive control. Cells were then collected, washed, and the maturation status of the moDCs was assessed by FACS analysis. Unloaded moDCs were used as control. Results were expressed as a fold increase of the percentage of positive cells compared with untreated cells and represented the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. \* $p < .05$  1-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (statistics for LPS are not shown).

expressions were also slightly augmented but did not reach statistical significance. Taken together, our findings suggested that all SAS-NPs tested, whether produced via thermal or wet processes, significantly affected moDCs maturation through upregulation of the same markers.

### Synthetic Amorphous Silica Nanoparticles Induced the Production of Pro-Inflammatory Cytokines and Chemokines by moDCs

To further document the effect of SAS-NPs on human moDCs phenotype, we assessed the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines from particles-treated cells. Again, moDCs were exposed to 12.5, 25, or 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  of SAS-NPs. The moDCs culture supernatants were collected and analyzed using U-PLEX MSD technology for IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8, IL-23, CCL-2 (MCP-1), CXCL-12, CXCL-10 (IP-10), and TNF- $\alpha$  production. Interestingly, secretions of CXCL-8 and CXCL-12 were significantly enhanced in a concentration-dependent manner in the presence of 12.5–25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  of S5505 and NM-202 fumed silica NPs (Figs. 3A and 3B), as well as 25 and 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  of Ludox TMA (Figure 3C). Noticeably, IL-6 and CXCL-10 were also significantly

upregulated by both concentrations of NM-202 (Figure 3B). IL-1 $\beta$ , IL-23, and TNF- $\alpha$  secretions were slightly augmented but did not reach significance (Supplementary Figure 2). From these results, we showed that all SAS-NPs tested were able to increase the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines by moDCs, suggesting the existence of an inflammatory signature.

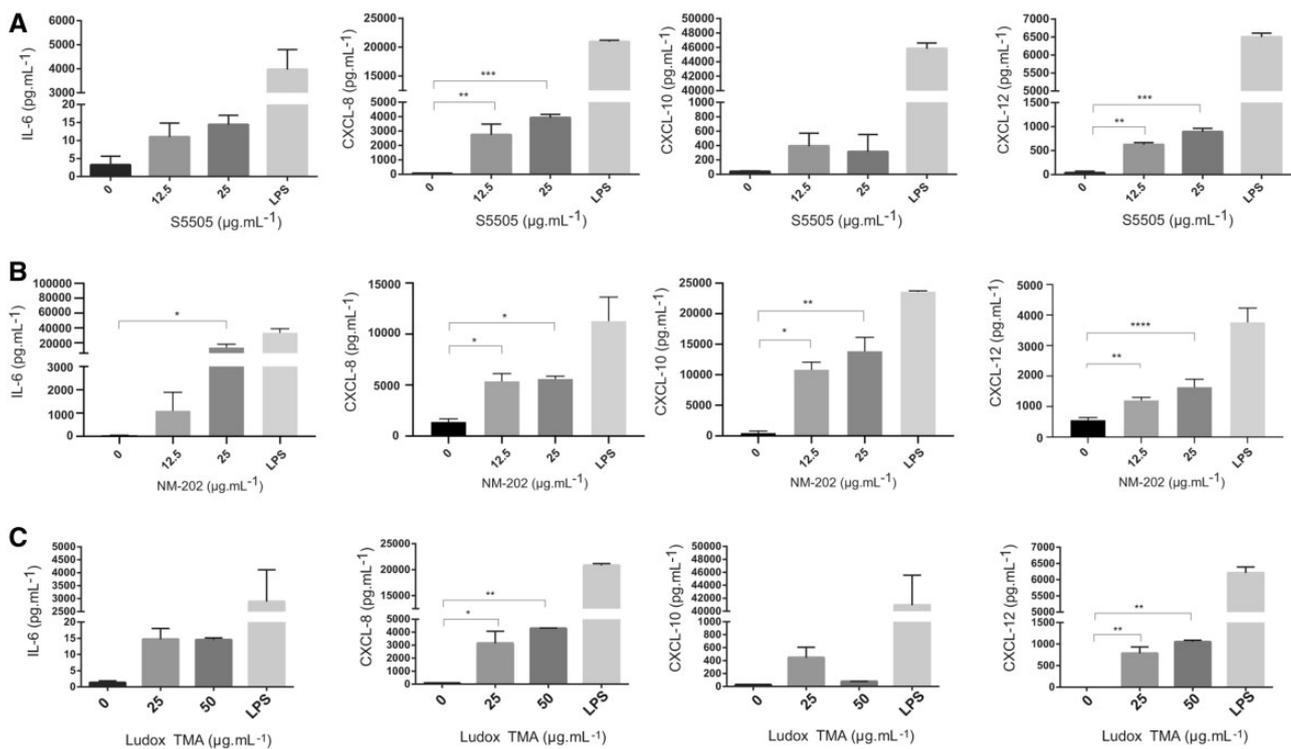
### Human moDC Internalized S5505 Fumed Silica Nanoparticles

To investigate the potential uptake of nanoparticles by moDCs, we performed TEM observations. This technique allows to visualize cellular compartments at a nanometer scale and discriminates internalization from membrane adsorption. We focused on S5505 fumed silica which gave comparable results with the benchmark material NM-202 for DC maturation. Control immature DCs were mostly roundly shaped (Figs. 4A and 4E). In treated cells, NPs can be observed outside, nearby, and inside DCs. In Figures 4B and 4F, 2 representative images of S5505 fumed silica-treated cells are shown, as well as higher magnifications depicted by the selection squares (Figs. 4C and 4D for 4B, 4G and 4H for 4F). Interestingly, SAS-NPs aggregates are present close to the plasma membrane (white arrows) and could be visualized inside cytoplasmic vesicles (black arrows). Intracellular “free” cytoplasmic SAS-NPs aggregates were not detected. Interestingly, SAS-NPs were sometimes partially surrounded by the membrane or dendrites (arrowheads), suggesting an ongoing process of trapping in endocytic vesicles (Figs. 4C and 4D). Moreover, after NP exposure, cells tend to present more numerous and longer arborizing dendrites, consistent with an NPs-driven shift of MoDCs maturation.

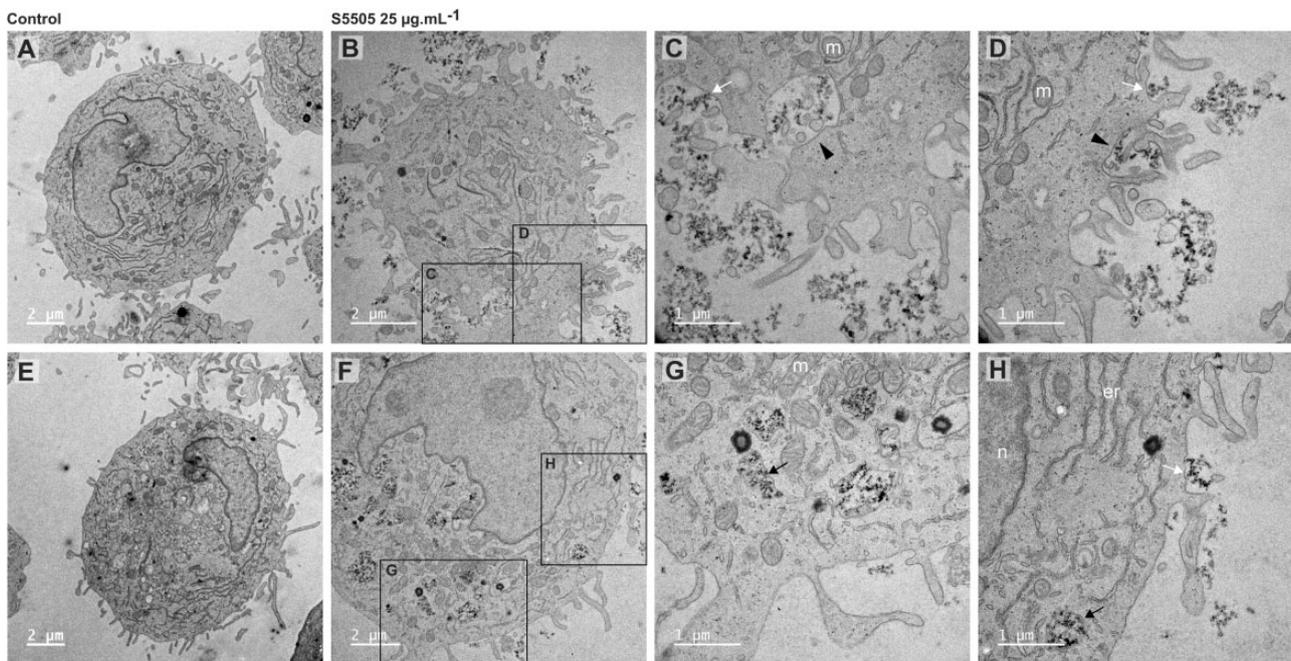
### MoDCs Stimulated With S5505 Fumed Silica Nanoparticles Enhanced CD4+ T-Cell Proliferation

To evaluate the functional consequences of moDCs maturation, we analyzed the capacity of moDCs treated with S5505 fumed silica to augment allogeneic CD4+ T-cell proliferation. To limit the cytotoxicity induced by NPs during the allogeneic coculture, we decided to expose moDCs at the lowest concentration (12.5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) of S5505 NPs. Treated moDCs were then washed and cocultured with allogeneic CD4+ T cells loaded with CFSE at several DC: T-cell ratios. Proliferation was assessed after 5 days of coculture as the percentage of CFSE<sub>low</sub> CD4+ T cells. A DC: T-cell coculture stimulated with PHA was used as a positive control for T-cell proliferation and LPS-treated moDCs as a positive control for danger signal effects. The proliferation of T cells not exposed to DCs was comparable to the background noise (Figure 5A). Using a 1:20 DC: T-cell ratio, the addition of non-treated allogeneic moDCs induced a basal T-cell proliferation of about 30% that was statistically increased by the exposure of moDCs to S5505 NPs (Figure 5A). Interestingly, T-cell proliferation levels triggered by S5505 NPs were comparable with those induced by LPS, a well-known danger signal (Figure 5A).

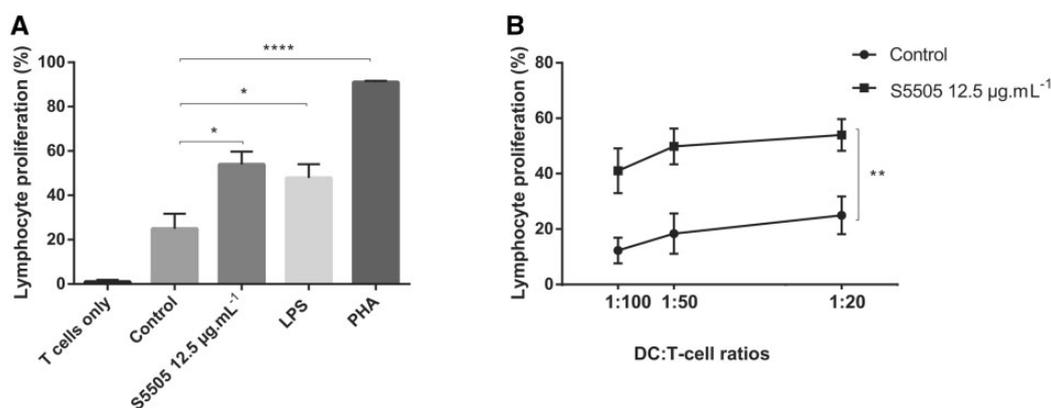
Among the variables that regulate the activation of CD4+ T cells by DCs, the maturation state of the DCs and the relative amounts of stimulating moDCs and responding CD4+ T cells are of particular importance (Hopken et al., 2005). As described previously, the use of several DC: T-cell ratios is particularly important to confirm the NPs effect and to increase the sensitivity of the method (Feraÿ et al., 2020). We therefore tested the following ratios: 1:100 (corresponding to 1 moDC per 100 T cells), 1:50 (1 moDC for 50 T cells), and 1:20 (1 moDC for 20 T cells). We observed that reducing the DC: T-cell ratios from 1:20 to 1:100



**Figure 3.** Synthetic amorphous silica nanoparticles induced moDCs inflammatory cytokines and chemokines secretion. Cells were incubated with 12.5 and 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  of S5505 fumed silica nanoparticles (A) or NM-202 (B) or Ludox TMA (C) for 16 h. LPS was used as a positive control. The moDCs culture supernatants were collected and analyzed using U-PLEX MSD technology. Unloaded moDCs were used as control. Results were expressed in the quantity of detected cytokines ( $\text{pg.mL}^{-1}$ ) and represented the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. \*\* $p < .01$ , \*\*\* $p < .001$ , \*\*\*\* $p < .0001$ , 1-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (statistics for LPS are not shown).



**Figure 4.** MoDCs treated with S5505 fumed silica nanoparticles showed membrane-wrapped aggregates and vesicular uptake of NPs. Cells were incubated with 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  of S5505 fumed silica nanoparticles for 24 h or left untreated. A, E: untreated MoDCs. B, F: MoDCs incubated with 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  of S5505 fumed silica NPs for 24 h. C, D: magnified images of (B). G, H: magnified images of (F). Cytoplasmic vesicles containing SAS-NPs (black arrows), SAS-NPs close to the plasma membrane (white arrows), SAS-NPs partially surrounded by the membrane or dendrites (arrowheads). Designations: m, mitochondria; n, nucleus; er, endoplasmic reticulum. Scale bars correspond to 2  $\mu\text{m}$  (A, B, E, F) or 1  $\mu\text{m}$  (C, D, G, H).



**Figure 5.** MoDCs treated with S5505 fumed silica nanoparticles increased allogeneic T-cell proliferation. A, Cells were incubated with 12.5 µg.mL<sup>-1</sup> of S5505 fumed silica nanoparticles for 16 h. LPS and PHA were used as positive controls. Treated moDCs were cocultured with allogeneic CD4<sup>+</sup> T cells loaded with CFSE at a ratio of 1 moDC for 20 CD4<sup>+</sup> T cells. Proliferation was measured after 5 days of coculture as the percentage of CFSE<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup> T cells. Untreated moDCs were used as control. Results were expressed as a percentage of increase in lymphocyte proliferation and represented the mean ± SEM of 3 independent experiments. \**p* < .05, \*\*\*\**p* < .0001, 1-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test. B, S5505 fumed silica nanoparticles increased T-cell proliferation at all DC: T-cell tested ratios. Cells were incubated with 12.5 µg.mL<sup>-1</sup> of S5505 fumed silica nanoparticles for 16 h. LPS and PHA were used as positive controls. Treated moDC were cocultured with allogeneic CD4<sup>+</sup> T cells loaded with CFSE at different ratios: 1:100 (1 moDC per 100 T cells), 1:50 (1 moDC for 50 T cells) and 1:20 (1 moDC for 20 T cells). Proliferation was measured after 5 days of coculture as the percentage of CFSE<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup> T cells. Untreated moDCs were used as control. Results were expressed as a percentage of increase in lymphocyte proliferation and represented the mean ± SEM of 3 independent experiments. \*\**p* < .01, 2-way ANOVA and Sidak's multiple comparison test.

decreased basal proliferation (Figure 5B). Consequently, T cells showed a higher index of proliferation when moDCs were stimulated with S5505 SAS-NPs. The increase in T lymphocytes proliferation in the presence of SAS-NPs-treated moDCs was statistically significant for all tested ratios compared with unloaded moDCs (Figure 5B).

#### S5505 Fumed Silica Nanoparticles Increased the Production of IL-9 and IL-17A/F by CD4<sup>+</sup> T Cells

To get insight into the mechanism of the CD4<sup>+</sup> T-cell response, we next analyzed the production of T-cell cytokines in the coculture supernatants (Figure 6). Results showed that when moDCs were exposed to 12.5 µg.mL<sup>-1</sup> of S5505 fumed silica NPs, the production of IL-9, IL-17A, and IL-17F in the supernatant of cocultures was significantly augmented. Moreover, an increase in IL-5 production was also observed but was nonsignificant due to the high variability of the results. IFN-γ, IL-22, and IL-13 were also augmented but the levels were also not statistically different from controls. Interestingly, SAS-NPs caused a more significant production of IL-9 than LPS (Figure 6).

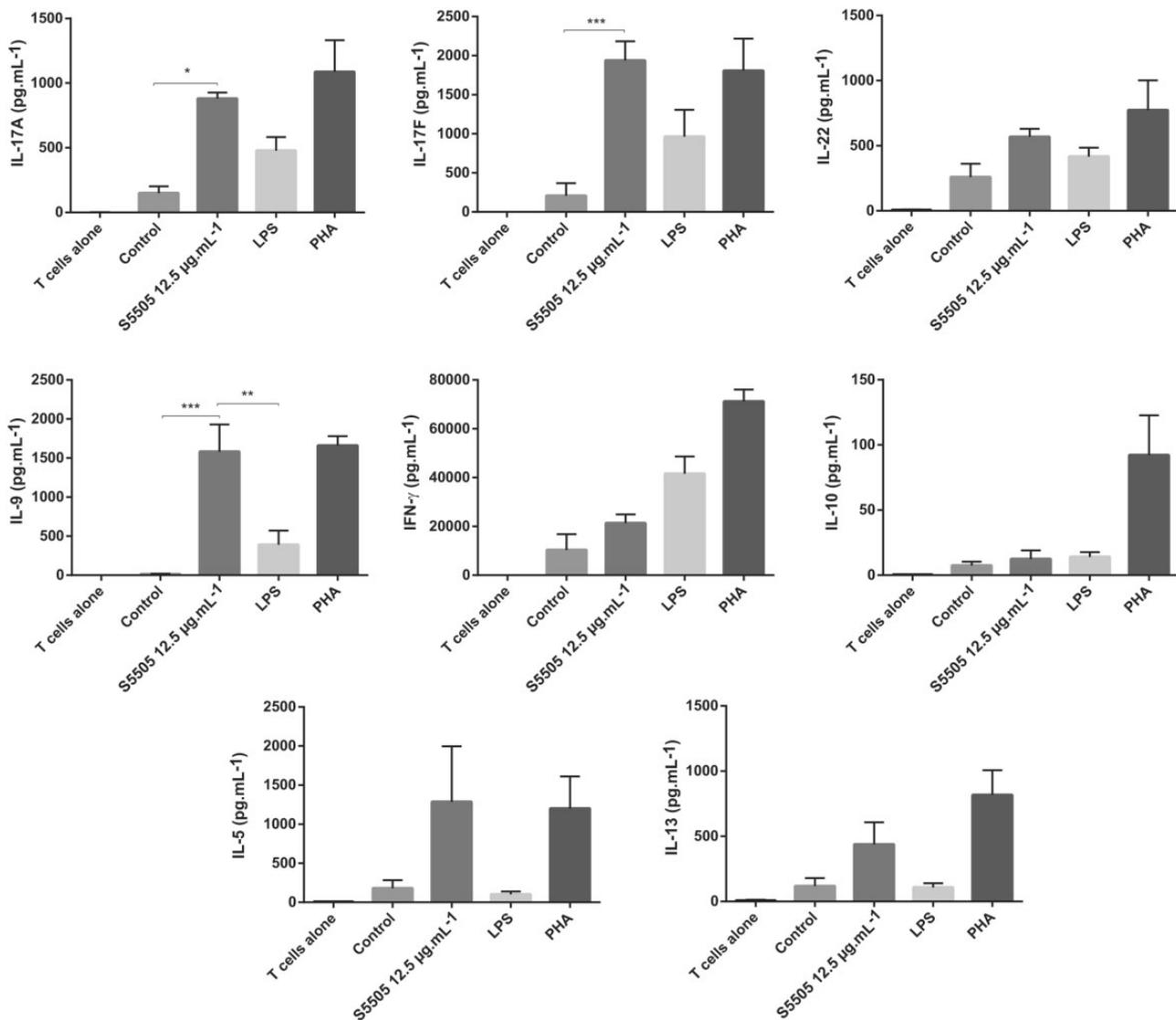
## DISCUSSION

As a first-line defense against nonself-entities, DCs are sentinels of the immune system, actively sampling the antigenic environment and sensing danger. The "danger theory" explains how immune responses could take place in aseptic conditions (Matzinger, 1994). Among the patterns sounding the alarm, Gallo and Gallucci proposed the NAMPs (Gallo and Gallucci, 2013). Nanomaterials may be considered as "emerging" danger signals activating DCs either directly or indirectly as a result of cell injury (Gallo and Gallucci, 2013; Pallardy et al., 2017), enabling them to undergo a full maturation process and to migrate to regional lymph nodes and activate naive T lymphocytes (Pallardy et al., 2017). Our results suggested that human DCs could sense SAS-NPs as danger signals, potentially altering the immunogenicity of environmental antigens (Shannahan and Brown, 2014). Indeed, as described previously for air pollution particles (de Haar et al., 2008), there is increasing evidence for

the impact of nanomaterials on allergic airway disease (Meldrum et al., 2017) and skin sensitization (Yoshioka et al., 2017). Although only a few *in vivo* studies explored to date the danger signal hypothesis for SAS-NPs, their results comfort our *in vitro* observations (Brandenberger et al., 2013; Han et al., 2016). However, significant gaps remain concerning the effects of nanomaterials on DCs, and the relevance of the selected experimental models for humans.

The effects of different nanoparticles including Micromod colloidal silica (Hirai et al., 2012; Nakanishi et al., 2016), Sigma "ultrafine" silica (Kang and Lim, 2012), or Aerosil 380F and 200 F (Winkler et al., 2017) have been previously studied using the murine BMDCs. Most studies examined the DCs phenotype, with a large variety of markers (CD40, CD69, CD80, CD86, MHC II) and the production of pro-inflammatory cytokines (Heng et al., 2011; Zhu et al., 2014) has not yet been extensively studied. This approach would benefit from more functional tests such as DCs migration assays (Li et al., 2010) or allogeneic coculture to explore the ability of activated DCs to induce T-cell proliferation (Koike et al., 2008). Moreover, the extrapolation of these results to humans remains challenging and some investigators decided to use human DC obtained from either CD34<sup>+</sup> progenitor cells or monocytes (Andersson-Willman et al., 2012; Barillet et al., 2019; Laverny et al., 2013; Schanen et al., 2013; Vandebriel et al., 2018). The effects of silica NPs on human DCs have been thoroughly explored for mesoporous silica particles (Kupferschmidt et al., 2014; Vallhov et al., 2007, 2012), known to display a unique pore structure and extremely large surface area, making them suitable for drug and vaccine delivery systems. Our work is part of a different approach addressing the immunotoxic effects of unintentional, passive exposure to SAS-NPs used in consumer products or industry, such as fumed or colloidal silica. To this end, our experiments were designed to propose a robust *in vitro* model of human innate immune responsiveness using primary DCs. We specifically explored NPs impact on human DCs using an integrated *in vitro* model able to measure the DCs phenotype alterations following SAS-NPs exposure but also the consequences of such alterations on T-cell responses.

The criteria to identify danger signals comprise DCs activation and maturation and the ability to regulate their migratory



**Figure 6.** S5505 Fumed silica nanoparticles increased the production of IL-9 and IL-17A/F by CD4+ T cells. Cells were incubated with 12.5 μg.mL<sup>-1</sup> of S5505 fumed silica nanoparticles for 16 h. LPS and PHA were used as positive controls. Treated moDCs were cocultured with allogeneic CD4+ T cells loaded at a ratio of 1 moDC for 20 CD4+ T cells. On day 5, cytokines levels were measured in coculture supernatants using U-PLEX MSD technology. Untreated moDCs were used as control. Results were expressed in the quantity of detected cytokines (pg.mL<sup>-1</sup>) and represented the mean ± SEM of 3 independent experiments. \*p < .05, \*\*p < .01, \*\*\*p < .001 1-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

properties. In our study, DCs maturation was clearly evidenced by phenotypical modifications of human moDCs with increased expression of CD83, CD86, and CXCR4 on the cell surface, a feature which appears common to all the SAS-NPs we tested. CD83 is a membrane-bound glycoprotein considered one of the hallmarks of fully matured DCs (Prechtel and Steinkasserer, 2007) whereas CXCR4 binds the CXCL12 chemokine that plays a role in mature DCs migration through the afferent lymphatic vessels to the lymph nodes (Pozzobon et al., 2016). SAS-NPs-induced moDCs activation was further supported by an increase in the secretion of pro-inflammatory cytokines, particularly CXCL-8 and CXCL-12, again for all the pyrogenic and colloidal silica tested. These phenotypical modifications are unlikely due to contamination by LPS because the SAS-NPs used did not contain detectable levels of endotoxins, as verified using the LAL test (Li et al., 2017). Using human moDCs, Vallhov et al. tested mesoporous silica calcinated AMS-6 nano- and AMS-

8 microparticles and found a slight but significant increase of CD86, no significant effect on CD83 and MHC II expression, and a reduced expression of the CD40 and CD80 costimulatory molecules (Vallhov et al., 2007). The conclusion was that mesoporous silica modified DCs phenotype in a relatively immature state confirmed later with the SBA-15 mesoporous silica particles (Vallhov et al., 2012). These contrasting effects can be attributed to the distinct characteristics of the silica NPs tested. Indeed, Winter et al. demonstrated on murine BMDCs that fumed silica NPs, which seem comparable to S5505 in terms of physicochemical characteristics, significantly increased the expression of MHC II as well as CD80 and CD86 (Winter et al., 2011). More recently, Winkler et al. suggested that high concentrations of pyrogenic SAS-NPs could activate BMDCs with a weak but nonsignificant upregulation of CD40 and CD86 expressions and release of IL-1β and TNF-α (Winkler et al., 2017). The ability of SAS-NPs to increase the release of pro-inflammatory cytokines

such as IL-6 and CXCL-8 was previously demonstrated on human epithelial cell lines (Gualtieri et al., 2012; Hetland et al., 2001). In the RAW 264.7 macrophage-like cell line, SAS-NPs increase the gene expression of IL-1, IL-6, and TNF- $\alpha$  (Park and Park, 2009) or the persistent production of IL-6 and TNF- $\alpha$  (Torres et al., 2020).

We then explored by TEM the ability of human DCs to internalize SAS-NPs. Our work shows for the first time the internalization of 25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  S5505 fumed silica in human DCs within 24 h. As intracellular nanoparticles were only seen in cytoplasmic vesicles, this suggests endocytosis processes. Considering the observation of ca 100 different cell sections per condition, it seems that NPs-treated cells present more dendrites than control cells, in agreement with their maturation. Consistent with our results, the presence of fumed silica NPs clusters was demonstrated at the plasma membrane and in endosome-like vesicles in BMDCs, for 250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  SAS-NPs concentration (Winkler et al., 2017). In MoDCs, the internalization of mesoporous silica was also observed (Vallhov et al., 2012).

The term “mature” is commonly used as a phenotypic rather than a functional state, designating DCs expressing high levels of maturation and costimulation molecules on their surface. However, phenotypically mature DCs do not always promote T-cell immunity (Reis e Sousa, 2006). The ultimate consequence of functional DCs maturation for the immune response is T-cell activation and proliferation, only possible after productive interaction with activated DCs. We then addressed the consequences of SAS-NPs-induced DCs phenotype alterations on T-lymphocytes activation using an allogeneic DC: T-cell coculture model. Our results showed a strong augmentation of T-cell proliferation when moDCs were stimulated with S5505 fumed silica NPs. Interestingly, this effect was comparable to LPS, a well-known danger signal. This increase in T-cell proliferation was accompanied by an increase in T-cell cytokine secretion, notably IL-17A/F and IL-9. IL-5 was also increased but in a nonsignificant manner. These results are consistent with the pro-inflammatory phenotype of DCs described above and with the danger signal hypothesis. The production of such cytokines suggested that these activated T cells could preferentially adopt a Th2 and Th17 orientation, but this remains to be confirmed by performing intracellular cytokine measurements. There are only few studies in the literature using coculture of T-cells and DCs to assess the functional DCs maturation in the presence of NPs (Barillet et al., 2019; Schanen et al., 2013; Vallhov et al., 2012; Yang et al., 2010) but these results strongly supported the observations of phenotypic alterations. Those conducted on carbon black (Koike et al., 2008) and CeO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> NPs (Schanen et al., 2013) suggested that these nanomaterials could drive the polarization of the T-cell response, but experiments specifically designed to explore T-cells polarization would be needed. Vallhov et al. conducted an elaborated autologous coculture experiment using naive CD4+ T lymphocytes with anti-CD3 stimulation on day 7 (Vallhov et al., 2012). They showed that mesoporous SAS-NPs SBA-15 could drive T-cell polarization with IFN- $\gamma$ , IL-4, and IL-13 production, highlighting the adjuvant effect of this material and the interest to explore the DC: T-cell interaction. In our study, the allogeneic coculture experiments were designed to specifically address the functional maturation of DCs, which expressed high surface levels of CD83 and CD86 molecules and produced cytokines.

Remarkably, pyrogenic or colloidal NPs induced the maturation of human DCs by regulating the expression of the same markers and the production of the same pro-inflammatory cytokines. It would be interesting to identify the characteristics responsible for

these common immunotoxic properties, such as the silanol groups and siloxane rings. Reducing their surface expression has been demonstrated to decrease fumed silica NPs cytotoxic effects in THP-1 cells (Sun et al., 2015). A major role was attributed to their concentration (Zhang et al., 2012) and specific surface arrangement in biological membranes damages (Pavan et al., 2013), closely linked to the initiation of inflammatory reactions and IL-1 $\beta$  release (Pavan et al., 2014). Recently, the “nearly free silanols,” in their repartition and local density, were presented as key molecular moieties in silica toxicity (Pavan et al., 2019, 2020). Although controversial, the generation of reactive oxygen species (ROS) by SAS-NPs could contribute to membrane damage (Di Cristo et al., 2016; Sun et al., 2015; Zhang et al., 2012). Strained siloxane rings of fumed silica, absent in colloidal silicas, could be the precursors of hydroxyl radicals (Zhang et al., 2012). Zhang et al found higher toxicity of fumed silica NPs compared with “Stöber” colloidal silica in epithelial and macrophage cells (Zhang et al., 2012). In our experiments, the concentrations of Ludox TMA leading to DCs activation were higher than those of fumed silica, but we found nevertheless comparable immunotoxic effects.

In conclusion, recent studies have challenged the assumed biocompatibility of SAS-NPs, particularly with immune cells (Himly et al., 2017; Mocan et al., 2016; Shannahan and Brown, 2014), suggesting that a comprehensive evaluation of their actual immunotoxicity must be carried out. In this work, we demonstrated using human DCs that SAS-NPs promoted the 2 first steps of adaptive immune response by increasing the maturation of human DCs and augmenting allogeneic T-lymphocyte response, characterized by increased proliferation and cytokine secretion. Given their effects on DCs activation, SAS-NPs may therefore play a role in the immunization process against environmental antigens, in situations where simultaneous exposure with nanoparticles could occur in the workplace, as well as in everyday life.

## SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available at *Toxicological Sciences* online.

## DECLARATION OF CONFLICTING INTERESTS

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Alexia Feray and Éléonore Guillet were master fellows of DIM QI2 (Réseau de recherche Qualité de l'air en Ile-de-France). The present work has benefited from the CYTOMETRY/ELECTRONIC MICROSCOPY/LIGHT MICROSCOPY facility of Imagerie-Gif (<http://www.i2bc.paris-saclay.fr>), member of IBISA (<http://www.ibisa.net>), supported by “France-BioImaging” (ANR-10-INBS-04-01), and the Labex “Saclay Plant Sciences” (ANR-10-LABX-0040-SPS). The authors thank Eugénie Deschamps for her help in the characterization of NM-202 nanoparticles. They warmly acknowledge Dr Vanessa Lievin-Le Moal for the microbiological tests of nanoparticles and Dr Eric Finster for his careful reading and English corrections of the revised manuscript.

## FUNDING

The French National Research Program for Environmental and Occupational Health of ANSES funded the study

(PNREST 2015/032 Silimmun grant and 2020/01/199 Allergosil grant). Alexia Feray is a recipient of a LERMIT (Laboratoire d'excellence en recherche sur le médicament et l'innovation thérapeutique) PhD fellowship.

## REFERENCES

- Andersson-Willman, B., Gehrmann, U., Cansu, Z., Buerki-Thurnherr, T., Krug, H. F., Gabrielsson, S., and Scheynius, A. (2012). Effects of subtoxic concentrations of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles on human lymphocytes, dendritic cells and exosome production. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **264**, 94–103.
- Arts, J. H., Muijser, H., Duistermaat, E., Junker, K., and Kuper, C. F. (2007). Five-day inhalation toxicity study of three types of synthetic amorphous silicas in wistar rats and post-exposure evaluations for up to 3 months. *Food Chem. Toxicol.* **45**, 1856–1867.
- Barillet, S., Fattal, E., Mura, S., Tsapis, N., Pallardy, M., Hillaireau, H., and Kerdine-Romer, S. (2019). Immunotoxicity of poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: Influence of surface properties on dendritic cell activation. *Nanotoxicology* **13**, 606–622.
- Brandenberger, C., Rowley, N. L., Jackson-Humbles, D. N., Zhang, Q., Bramble, L. A., Lewandowski, R. P., Wagner, J. G., Chen, W., Kaplan, B. L., Kaminski, N. E., et al. (2013). Engineered silica nanoparticles act as adjuvants to enhance allergic airway disease in mice. *Part. Fibre Toxicol.* **10**, 26.
- Croissant, J. G., Butler, K. S., Zink, J. I., and Brinker, C. J. (2020). Synthetic amorphous silica nanoparticles: Toxicity, biomedical and environmental implications. *Nat. Rev. Mater.* **5**, 886–909.
- de Haar, C., Kool, M., Hassing, I., Bol, M., Lambrecht, B. N., and Pieters, R. (2008). Lung dendritic cells are stimulated by ultra-fine particles and play a key role in particle adjuvant activity. *J. Allergy Clin Immunol.* **121**, 1246–1254.
- Di Cristo, L., Movia, D., Bianchi, M. G., Allegri, M., Mohamed, B. M., Bell, A. P., Moore, C., Pinelli, S., Rasmussen, K., Riegosintes, J., et al. (2016). Proinflammatory effects of pyrogenic and precipitated amorphous silica nanoparticles in innate immunity cells. *Toxicol. Sci.* **150**, 40–53.
- Doi, K. (1982). Structure changes in amorphous silica by neutron-irradiation. *J. Non-Cryst. Solids* **51**, 367–380.
- Fadeel, B. (2012). Clear and present danger? Engineered nanoparticles and the immune system. *Swiss Med. Wkly* **142**, w13609.
- Farrera, C., and Fadeel, B. (2015). It takes two to tango: Understanding the interactions between engineered nanomaterials and the immune system. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **95**, 3–12.
- Feray, A., Szely, N., Guillet, E., Hullo, M., Legrand, F. X., Brun, E., Pallardy, M., and Biola-Vidamment, A. (2020). How to address the adjuvant effects of nanoparticles on the immune system. *Nanomaterials* **10**, 425.
- Gallo, P. M., and Gallucci, S. (2013). The dendritic cell response to classic, emerging, and homeostatic danger signals. Implications for autoimmunity. *Front. Immunol.* **4**, 138.
- Gualtieri, M., Skuland, T., Iversen, T. G., Lag, M., Schwarze, P., Bilanicova, D., Pojana, G., and Refsnes, M. (2012). Importance of agglomeration state and exposure conditions for uptake and pro-inflammatory responses to amorphous silica nanoparticles in bronchial epithelial cells. *Nanotoxicology* **6**, 700–712.
- Gustafson, H. H., Holt-Casper, D., Grainger, D. W., and Ghandehari, H. (2015). Nanoparticle uptake: The phagocyte problem. *Nano Today* **10**, 487–510.
- Han, H., Park, Y. H., Park, H. J., Lee, K., Um, K., Park, J. W., and Lee, J. H. (2016). Toxic and adjuvant effects of silica nanoparticles on ovalbumin-induced allergic airway inflammation in mice. *Respir. Res.* **17**, 60.
- Heng, B. C., Zhao, X., Tan, E. C., Khamis, N., Assodani, A., Xiong, S., Ruedl, C., Ng, K. W., and Loo, J. S. (2011). Evaluation of the cytotoxic and inflammatory potential of differentially shaped zinc oxide nanoparticles. *Arch. Toxicol.* **85**, 1517–1528.
- Hetland, R. B., Schwarze, P. E., Johansen, B. V., Myran, T., Uthus, N., and Refsnes, M. (2001). Silica-induced cytokine release from a549 cells: Importance of surface area versus size. *Hum. Exp. Toxicol.* **20**, 46–55.
- Himly, M., Mills-Goodlet, R., Geppert, M., and Duschl, A. (2017). Nanomaterials in the context of type 2 immune responses—fears and potentials. *Front Immunol.* **8**, 471.
- Hirai, T., Yoshioka, Y., Takahashi, H., Ichihashi, K.-I., Yoshida, T., Tochigi, S., Nagano, K., Abe, Y., Kamada, H., Tsunoda, S.-I., et al. (2012). Amorphous silica nanoparticles enhance cross-presentation in murine dendritic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **427**, 553–556.
- Hopken, U. E., Lehmann, I., Droese, J., Lipp, M., Schuler, T., and Rehm, A. (2005). The ratio between dendritic cells and T cells determines the outcome of their encounter: Proliferation versus deletion. *Eur. J. Immunol.* **35**, 2851–2863.
- Jani, P., Halbert, G. W., Langridge, J., and Florence, A. T. (1990). Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: Quantitation and particle size dependency. *J. Pharm. Pharmacol.* **42**, 821–826.
- Kang, K., and Lim, J. S. (2012). Induction of functional changes of dendritic cells by silica nanoparticles. *Immune. Netw.* **12**, 104–112.
- Koike, E., Takano, H., Inoue, K., Yanagisawa, R., and Kobayashi, T. (2008). Carbon black nanoparticles promote the maturation and function of mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Chemosphere* **73**, 371–376.
- Kupferschmidt, N., Qazi, K. R., Kemi, C., Vallhov, H., Garcia-Bennett, A. E., Gabrielsson, S., and Scheynius, A. (2014). Mesoporous silica particles potentiate antigen-specific T-cell responses. *Nanomedicine* **9**, 1835–1846.
- Laverny, G., Casset, A., Purohit, A., Schaeffer, E., Spiegelhalter, C., de Blay, F., and Pons, F. (2013). Immunomodulatory properties of multi-walled carbon nanotubes in peripheral blood mononuclear cells from healthy subjects and allergic patients. *Toxicol. Lett.* **217**, 91–101.
- Li, A., Qin, L., Zhu, D., Zhu, R., Sun, J., and Wang, S. (2010). Signalling pathways involved in the activation of dendritic cells by layered double hydroxide nanoparticles. *Biomaterials* **31**, 748–756.
- Li, Y., Fujita, M., and Boraschi, D. (2017). Endotoxin contamination in nanomaterials leads to the misinterpretation of immunosafety results. *Front. Immunol.* **8**, 472.
- Lutz, M. B., and Schuler, G. (2002). Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: Which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* **23**, 445–449.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 991–1045.
- Meldrum, K., Guo, C., Marczylo, E. L., Gant, T. W., Smith, R., and Leonard, M. O. (2017). Mechanistic insight into the impact of nanomaterials on asthma and allergic airway disease. *Part. Fibre Toxicol.* **14**, 45.
- Mocan, T., Matea, C. T., Iancu, C., Agoston-Coldea, L., Mocan, L., and Orasan, R. (2016). Hypersensitivity and nanoparticles: Update and research trends. *Clujul. Med.* **89**, 216–219.

- Monopoli, M. P., Walczyk, D., Campbell, A., Elia, G., Lynch, I., Bombelli, F. B., and Dawson, K. A. (2011). Physical-chemical aspects of protein corona: Relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 2525–2534.
- Nakanishi, K., Tsukimoto, M., Tanuma, S., Takeda, K., and Kojima, S. (2016). Silica nanoparticles activate purinergic signaling via p2x7 receptor in dendritic cells, leading to production of pro-inflammatory cytokines. *Toxicol. In Vitro* **35**, 202–211.
- Napierska, D., Thomassen, L. C., Lison, D., Martens, J. A., and Hoet, P. H. (2010). The nanosilica hazard: Another variable entity. *Part. Fibre Toxicol.* **7**, 39.
- Pallardy, M. J., Turbica, I., and Biola-Vidamment, A. (2017). Why the immune system should be concerned by nanomaterials? *Front. Immunol.* **8**, 544.
- Park, E. J., and Park, K. (2009). Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicol. Lett.* **184**, 18–25.
- Pavan, C., Delle Piane, M., Gullo, M., Filippi, F., Fubini, B., Hoet, P., Horwell, C. J., Huaux, F., Lison, D., Lo Giudice, C., et al. (2019). The puzzling issue of silica toxicity: Are silanols bridging the gaps between surface states and pathogenicity? *Part. Fibre Toxicol.* **16**, 32.
- Pavan, C., Rabolli, V., Tomatis, M., Fubini, B., and Lison, D. (2014). Why does the hemolytic activity of silica predict its pro-inflammatory activity? *Part. Fibre Toxicol.* **11**, 76.
- Pavan, C., Santalucia, R., Leinardi, R., Fabbiani, M., Yakoub, Y., Uwambayinema, F., Ugliengo, P., Tomatis, M., Martra, G., Turci, F., et al. (2020). Nearly free surface silanols are the critical molecular moieties that initiate the toxicity of silica particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **117**, 27836–27846.
- Pavan, C., Tomatis, M., Ghiazza, M., Rabolli, V., Bolis, V., Lison, D., and Fubini, B. (2013). In search of the chemical basis of the hemolytic potential of silicas. *Chem. Res. Toxicol.* **26**, 1188–1198.
- Pozzobon, T., Goldoni, G., Viola, A., and Molon, B. (2016). Cxcr4 signaling in health and disease. *Immunol. Lett.* **177**, 6–15.
- Pradeu, T., and Cooper, E. L. (2012). The danger theory: 20 years later. *Front. Immunol.* **3**, 287.
- Prechtel, A. T., and Steinkasserer, A. (2007). Cd83: An update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells. *Arch. Dermatol. Res.* **299**, 59–69.
- Reis e Sousa, C. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 476–483.
- SCCS, and Hoet, P. H. (2016). Opinion of the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS): Revision of the opinion on the safety of the use of silica, hydrated silica, and silica surface modified with alkyl silylates (nano form) in cosmetic products. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **74**, 79–80.
- Schanen, B. C., Das, S., Reilly, C. M., Warren, W. L., Self, W. T., Seal, S., and Drake, D. R., 3rd. (2013). Immunomodulation and t helper th(1)/th(2) response polarization by ceo(2) and tio(2) nanoparticles. *PLoS One* **8**, e62816.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682.
- Shannahan, J. H., and Brown, J. M. (2014). Engineered nanomaterial exposure and the risk of allergic disease. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **14**, 95–99.
- Sun, B., Pokhrel, S., Dunphy, D. R., Zhang, H., Ji, Z., Wang, X., Wang, M., Liao, Y. P., Chang, C. H., Dong, J., et al. (2015). Reduction of acute inflammatory effects of fumed silica nanoparticles in the lung by adjusting silanol display through calcination and metal doping. *ACS Nano* **9**, 9357–9372.
- Sun, B., Wang, X., Liao, Y. P., Ji, Z., Chang, C. H., Pokhrel, S., Ku, J., Liu, X., Wang, M., Dunphy, D. R., et al. (2016). Repetitive dosing of fumed silica leads to profibrogenic effects through unique structure-activity relationships and biopersistence in the lung. *ACS Nano* **10**, 8054–8066.
- Tan, J. K., and O'Neill, H. C. (2005). Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. *J. Leukoc. Biol.* **78**, 319–324.
- Torres, A., Dalzon, B., Collin-Faure, V., Diemer, H., Fenel, D., Schoehn, G., Cianferani, S., Carriere, M., and Rabilloud, T. (2020). How reversible are the effects of fumed silica on macrophages? A proteomics-informed view. *Nanomaterials* **10**, 1939.
- Vallhov, H., Gabrielsson, S., Stromme, M., Scheynius, A., and Garcia-Bennett, A. E. (2007). Mesoporous silica particles induce size dependent effects on human dendritic cells. *Nano. Lett.* **7**, 3576–3582.
- Vallhov, H., Kupferschmidt, N., Gabrielsson, S., Paulie, S., Stromme, M., Garcia-Bennett, A. E., and Scheynius, A. (2012). Adjuvant properties of mesoporous silica particles tune the development of effector T cells. *Small* **8**, 2116–2124.
- Vandebriel, R. J., Vermeulen, J. P., van Engelen, L. B., de Jong, B., Verhagen, L. M., de la Fonteyne-Blankestijn, L. J., Hoonakker, M. E., and de Jong, W. H. (2018). The crystal structure of titanium dioxide nanoparticles influences immune activity in vitro and in vivo. *Part. Fibre Toxicol.* **15**, 9.
- Winkler, H. C., Kornprobst, J., Wick, P., von Moos, L. M., Trantakis, I., Schraner, E. M., Bathke, B., Hochrein, H., Suter, M., and Naegeli, H. (2017). Myd88-dependent pro-interleukin-1beta induction in dendritic cells exposed to food-grade synthetic amorphous silica. *Part. Fibre Toxicol.* **14**, 21.
- Winkler, H. C., Suter, M., and Naegeli, H. (2016). Critical review of the safety assessment of nano-structured silica additives in food. *J. Nanobiotechnol.* **14**, 44.
- Winter, M., Beer, H. D., Hornung, V., Kramer, U., Schins, R. P., and Forster, I. (2011). Activation of the inflammasome by amorphous silica and tio2 nanoparticles in murine dendritic cells. *Nanotoxicology* **5**, 326–340.
- Worbs, T., Hammerschmidt, S. I., and Forster, R. (2017). Dendritic cell migration in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 30–48.
- Yang, D., Zhao, Y., Guo, H., Li, Y., Tewary, P., Xing, G., Hou, W., Oppenheim, J. J., and Zhang, N. (2010). [gd@c(82)(oh)(22)](n) nanoparticles induce dendritic cell maturation and activate th1 immune responses. *ACS Nano* **4**, 1178–1186.
- Yoshioka, Y., Kuroda, E., Hirai, T., Tsutsumi, Y., and Ishii, K. J. (2017). Allergic responses induced by the immunomodulatory effects of nanomaterials upon skin exposure. *Front. Immunol.* **8**, 169.
- Younes, M., Aggett, P., Aguilar, F., Crebelli, R., Dusemund, B., Filipić, M., Frutos, M. J., Galtier, P., Gott, D., Gundert-Remy, U., et al.; EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). (2018). Re-evaluation of silicon dioxide (e 551) as a food additive. *EFSA J.* **16**, e05088.
- Zhang, H., Dunphy, D. R., Jiang, X., Meng, H., Sun, B., Tarn, D., Xue, M., Wang, X., Lin, S., Ji, Z., et al. (2012). Processing pathway dependence of amorphous silica nanoparticle toxicity: Colloidal vs pyrolytic. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 15790–15804.
- Zhu, R., Zhu, Y., Zhang, M., Xiao, Y., Du, X., Liu, H., and Wang, S. (2014). The induction of maturation on dendritic cells by tio2 and fe(3)o(4)@tio(2) nanoparticles via nf-kappab signaling pathway. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **39**, 305–314.

### **Figure S1. Characterization of synthetic amorphous silica nanoparticles.**

**A.** Typical TEM image of unstained S5505 fumed silica or Ludox<sup>®</sup> TMA nanoparticles suspended in water. **B.** Distribution histogram and cumulative distribution of the constituent nanoparticle size determined by TEM (Total count: 334 particles for S5505 and 311 for Ludox<sup>®</sup> TMA). **C.** Intensity-weighted size distribution profiles of S5505 fumed silica, Ludox<sup>®</sup> TMA or NM-202 nanoparticles in pure RPMI 1640, in RPMI 1640 supplemented with 1% of Fetal Calf Serum and in RPMI 1640 supplemented with 10% of Fetal Calf Serum were obtained using Dynamic Light Scattering. Each measure was repeated ten times. **D.**  $\zeta$ -potential variations of S5505 fumed silica nanoparticles, Ludox<sup>®</sup> TMA or NM-202 in RPMI 1640 with or without fetal bovine serum ( $\zeta$ -potential data are represented as mean  $\pm$  SD of ten independent measurements). \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ , one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

### **Figure S2. Synthetic amorphous silica nanoparticles induced moDCs inflammatory cytokines and chemokines secretion**

Cells were incubated with 12.5 and 25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of S5505 fumed silica nanoparticles (**A**) or NM-202 (**B**) or Ludox<sup>®</sup> TMA (**C**) for 16 hours. LPS was used as a positive control. The moDCs culture supernatants were collected and analyzed using U-PLEX MSD technology. Unloaded moDCs were used as control. Results were expressed in the quantity of detected cytokines ( $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and represented the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ , one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (statistics for LPS are not shown).

Figure S1

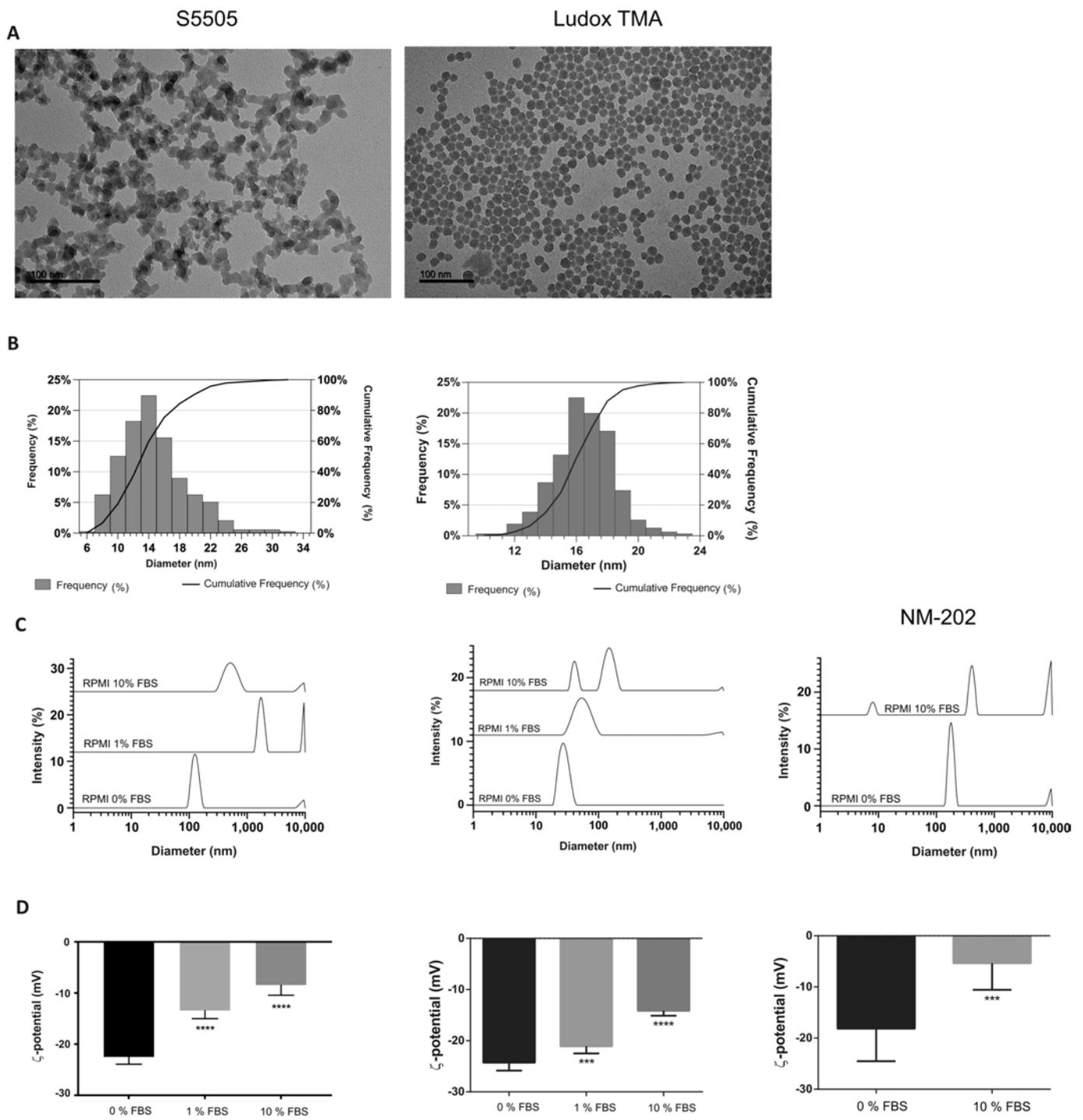
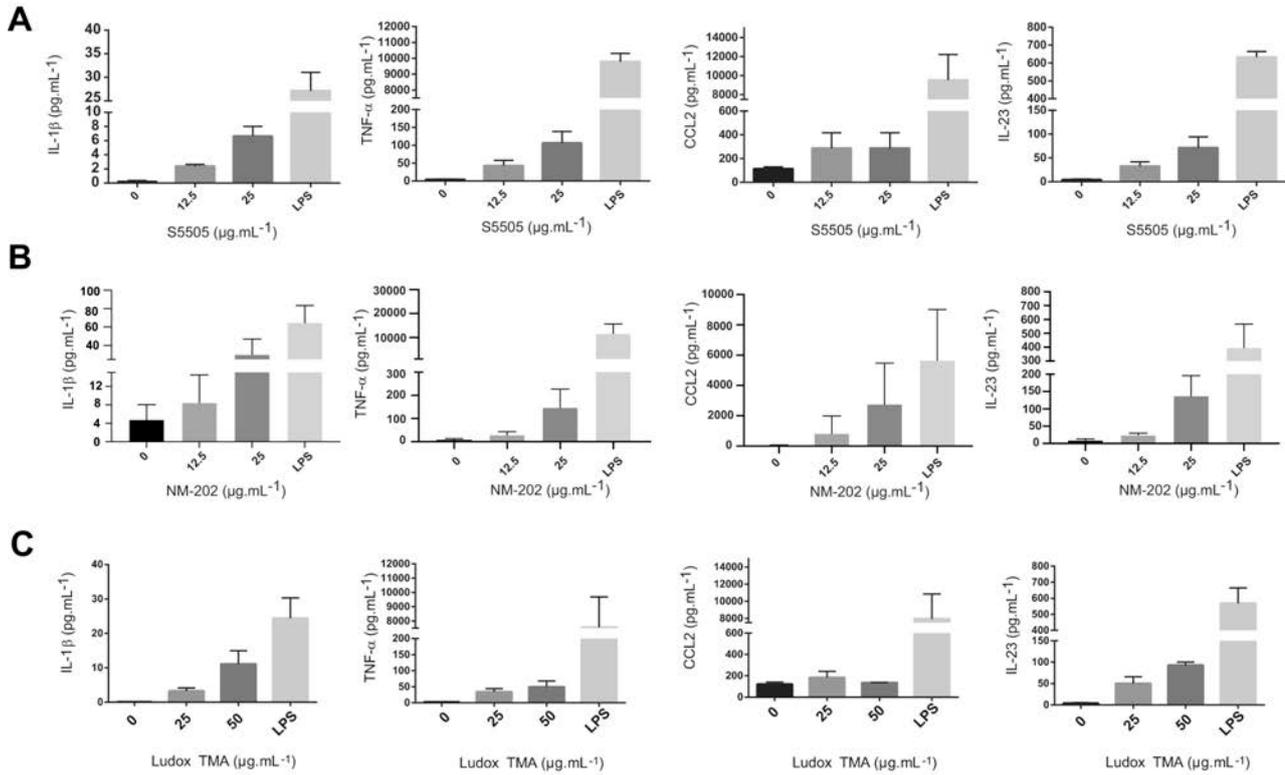


Figure S1. Characterization of synthetic amorphous silica nanoparticles.

**A** Typical TEM image of unstained S5505 fumed silica or Ludox® TMA nanoparticles suspended in water.  
**B** Distribution histogram and cumulative distribution of the constituent nanoparticle size determined by TEM (total count: 334 particles for S5505 and 311 for Ludox® TMA).  
**C** Intensity-weighted size distribution profiles of S5505 fumed silica, Ludox® TMA or NM-202 nanoparticles in pure RPMI 1640, in RPMI 1640 supplemented with 1% of Fetal Bovine Serum and in RPMI 1640 supplemented with 10% of Fetal Bovine Serum were obtained using Dynamic Light Scattering. Each measure was repeated ten times.  
**D** Zeta-potential variations of S5505 fumed silica nanoparticles, Ludox® TMA or NM-202 in RPMI 1640 with or without fetal bovine serum (zeta-potential data are represented as mean  $\pm$  SD of ten independent measurements).  
 \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ , one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

Figure S2



**Figure S2. Synthetic amorphous silica nanoparticles induced moDCs inflammatory cytokines and chemokines secretion.**

Cells were incubated with 12.5 and 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  of S5505 fumed silica nanoparticles (A) or NM-202 (B) or Ludox® TMA (C) for 16 hours. LPS was used as a positive control. The moDCs culture supernatants were collected and analyzed using U-PLEX MSD technology. Unloaded moDCs were used as control. Results were expressed in the quantity of detected cytokines ( $\text{pg.mL}^{-1}$ ) and represented the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ , one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (statistics for LPS are not shown).

## Article 2

L'objectif de l'article suivant a été de comprendre quels étaient les mécanismes sous-jacents à l'activation des DC en réponse aux SAS-NP (**article n°2, soumis**). Les interactions entre les nanoparticules et les DC ainsi que les voies de signalisation pouvant être impliquées dans l'activation des DC à la suite de ces interactions sont très peu décrites dans la littérature. La protéine kinase Syk est centrale dans la signalisation intracellulaire et est connue pour être impliquée dans la maturation des DC après l'interaction de ligands avec leurs récepteurs ou à des interactions membranaires directes entre les particules et la membrane plasmique. Très peu d'études se sont intéressées à l'activation de Syk suivant une perturbation membranaire. Cependant, il a été montré pour des particules d'urate de sodium, des particules d'aluminium et des cristaux de cholestérol que la protéine Syk pouvait être phosphorylée à la suite d'une liaison membranaire de ces particules et un réarrangement lipidique (Ng et al. 2008; Flach et al. 2011). De plus, l'équipe de Pavan *et al.* a mis en évidence que la réactivité de surface serait un élément clé favorable à la mise en place d'interactions entre la silice et les composants membranaires pouvant initier la toxicité (Pavan et al. 2013; 2020). Nous avons donc entrepris d'explorer les effets membranaires des SAS-NP sur les DC et la signalisation Syk. Nos résultats montrent que les SAS-NP induisent un réarrangement lipidique nécessaire à l'activation de Syk. Nous avons montré que la phosphorylation de Syk était nécessaire à l'activation de la MAPK JNK ainsi qu'aux modifications phénotypiques et à la prolifération des lymphocytes T en réponse aux SAS-NP. Ensemble, ces résultats suggèrent pour la première fois que la maturation des cellules dendritiques induite par les SAS-NP serait dépendante de Syk et déclenchée par une réorganisation des rafts lipidiques.

1 Human dendritic cell maturation induced by amorphous silica nanoparticles is syk-  
2 dependent and triggered by lipid raft reorganization.

3

4 Eléonore Guillet<sup>1</sup>, Emilie Brun<sup>2</sup>, Céline Ferard<sup>2</sup>, Kévin Hardonnière<sup>1</sup>, Francois-Xavier  
5 Legrand<sup>3</sup>, Marc Pallardy<sup>1</sup> and Armelle Biola-Vidammment<sup>1</sup>

6

7 <sup>1</sup> Université Paris-Saclay, Inserm, Inflammation, Microbiome and Immunosurveillance,  
8 91405, Orsay, France.

9 <sup>2</sup> Université Paris-Saclay, CNRS, Institut de Chimie Physique, 91405, Orsay, France.

10 <sup>3</sup> Université Paris-Saclay, CNRS, Institut Galien Paris-Saclay, 91405 Orsay, France

11

12

13 \*Corresponding author: Armelle Biola-Vidammment, INSERM UMR-996, Faculté de  
14 Pharmacie, Université Paris-Saclay, 17, Avenue des Sciences 91400 Orsay. Phone : 33-  
15 1 80 00 64 48.

16 E-mail: armelle.biola-vidammment@universite-paris-saclay.fr.

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

1 **Abstract (max 350 words)**

2 **Background:** Synthetic amorphous silica nanoparticles (SAS-NPs) are widely employed  
3 in pharmaceuticals, cosmetics, food and concretes. Thus, workers and the general  
4 population are exposed daily *via* diverse exposure routes. SAS-NPs are generally  
5 recognized as safe (GRAS) by the Food and Drug Administration, but because of their  
6 nanoscale size and extensive uses, a better assessment of their immunotoxicity is  
7 required. In the presence of "danger signals", dendritic cells (DCs) undergo a  
8 maturation process resulting in their migration to regional lymph nodes where they  
9 activate naive T-cells. We have previously shown that fumed silica pyrogenic SAS-NPs  
10 promote the two first steps of adaptative immune response by triggering DCs  
11 maturation and T-lymphocytes response, suggesting that SAS-NPs could behave as  
12 immune "danger signals". The presents work aims to identify the signalling pathways  
13 involved in the response to pyrogenic SAS-NPs. Spleen tyrosine kinase (Syk) is a  
14 pivotal intracellular signalling molecule whose phosphorylation was associated with  
15 DCs maturation. We hypothesize that Syk may play a central role in SAS-NPs-induced  
16 DCs response.

17 **Results:** In human monocytes-derived dendritic cells (moDCs) exposed to SAS-NPs,  
18 Syk inhibition prevented the induction of the expression of co-stimulation and  
19 activation markers, CD83 and CD86. A significant decrease in the T-cell proliferation  
20 and IFN- $\gamma$ , IL-17F and IL-9 productions were found in an allogeneic moDC:T-cell co-  
21 culture. These results suggest that the activation of Syk is necessary for the

1 establishment of the T-cell response. Moreover, Syk phosphorylation, observed 30  
2 minutes after SAS-NPs exposure, occurred upstream of the c-Jun N-terminal kinase  
3 (JNK) Mitogen-activated protein kinases (MAPK) and was elicited by the Src family of  
4 protein tyrosine kinases. The latter are likely to be recruited to the membrane during  
5 SAS-NPs-induced aggregation of lipid rafts.

6 **Conclusions:** We showed that SAS-NPs were recognized by DCs as a danger signal  
7 by a Syk-dependent pathway. Our findings revealed an original mechanism whereby  
8 the interaction of SAS-NPs with DCs cell membranes promoted aggregation of lipid  
9 rafts, through which a Src kinase-initiated activation loop could trigger Syk activation  
10 and functional DC maturation.

11

12 **Keywords:** amorphous silica, nanoparticles, dendritic cells, Syk, lipid rafts, Src kinases

13

14

15

16

17

18

19

20

21

## 1 Background

2 If many nanoparticles are generated from natural sources such as fires, volcanic  
3 eruptions, oceans, and groundwater, engineered nanoparticles have been  
4 increasingly used in electronics, cosmetics, food, and pharmaceuticals over the past  
5 decades (1). Synthetic amorphous silica nanoparticles (SAS-NPs) are among the three  
6 most-produced nanomaterials (2) obtained either by a wet process for precipitated  
7 silica or by high-temperature flame pyrolysis for pyrogenic silica (3). Fumed silica is  
8 found in various daily used products such as cosmetics as an anticaking agent or  
9 dehydrated food as an E551 additive (4,5). The manufacturing and industrial uses raise  
10 the issue of occupational exposure, mainly occurring through the respiratory route  
11 and enabling contact with immune cells in the respiratory tract, such as macrophages  
12 or dendritic cells (DCs) (6). SAS-NPs have been described as Generally Recognized As  
13 Safe (GRAS) by the Food and Drug Administration and have long been considered  
14 biocompatible compared with crystalline silica. However, recently we and others have  
15 found that SAS-NPs may cause immunotoxic effects (7).

16 DCs are professional antigen-presenting cells (APCs) with phagocytic capabilities (8).  
17 They sample their environment and behave as immunological sentinels (9). Indeed,  
18 DCs reside in non-lymphoid tissues in an immature antigen-capturing state until a  
19 danger signal warns them that their microenvironment is getting dangerous (10,11).  
20 A maturation process is consequently engaged, which allows them to migrate to  
21 regional lymph nodes. Exogenous danger signals, known as Pathogen-Associated

1 Molecular Patterns (PAMPs), are evolutionary conserved common structures shared  
2 by many pathogens but not found in their eukaryotic hosts. Endogenous danger  
3 signals, also called alarmins or Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs), are  
4 constitutive or inducible and released by cells or tissues undergoing non-physiological  
5 stress or death. More recently, a new danger category has been proposed, the  
6 Nanoparticle-Associated Molecular Patterns (NAMPs), which are nonetheless  
7 undefined and dependent on the physicochemical properties, as well as the nature of  
8 the components interacting with the particles when they encounter biological fluids  
9 (12,13). Observations from both *in vivo* and *in vitro* studies support the hypothesis of  
10 SAS-NPs being a danger signal. Indeed, upon repetitive inhalation exposure, a  
11 reversible inflammation was evidenced in rodents, associated with IL-1 $\beta$  production .  
12 In mice, SAS-NPs could act as adjuvants in allergic responses when the nanoparticles  
13 are administered by intranasal instillation (16,17). Furthermore, intraperitoneal  
14 exposure to SAS-NPs showed an adjuvant effect in a model of mice ovalbumin-  
15 induced allergy. This was demonstrated by higher anti-OVA IgG1, IgG2a, IgE  
16 antibody production, and enhanced cytokines production (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-17)  
17 (18). Winter *et al.* have demonstrated that SAS-NPs could induce an *in vitro* activation  
18 of murine DCs reflected by increased expression of the CD80, CD86 markers and  
19 major histocompatibility complex II (MHC-II) as well as IL-1 $\beta$  secretion (19,20) and  
20 TNF- $\alpha$  pro-inflammatory cytokines (21). Vallhov *et al.* showed that mesoporous SAS-  
21 NPs increase the expression of CD86 on human monocyte-derived dendritic cells

1 (moDCs) (22). Moreover, our previous results have shown that SAS-NPs increased the  
2 expression of CD83, CD86 and CXCR4 markers as well as the secretion of pro-  
3 inflammatory cytokines (CXCL-8 and CXCL-12) by moDCs. Fumed silica-activated DCs  
4 significantly increased T-lymphocyte proliferation in an allogeneic co-culture (23,24).  
5 Taken together, these observations strongly support that SAS-NPs could behave as  
6 immunogenic danger signals. However, there is very limited data so far on the early  
7 events initiated by the interaction of nanomaterials with DCs and the signalling  
8 pathways that could be turned on and thus participate in the activation of these cells.  
9 Syk is a central protein kinase in intracellular signalling known to be involved in DCs  
10 maturation following the engagement of receptors or direct interactions of particles  
11 with the plasma membrane (25–27). The initial activation of Syk is mainly linked to its  
12 phosphorylation by Src family kinases, initiating a phosphorylation loop (28,29). Sedlik  
13 *et al.* have shown that Syk plays a crucial role in the signalling process following Fc $\gamma$ R  
14 binding, which leads to the induction of DCs maturation (30). This has also been  
15 demonstrated in response to therapeutic protein aggregates following their  
16 interaction with Fc $\gamma$ R (27). Syk is involved in DCs maturation through the activation of  
17 signalling cascades such as Rac GTPase pathways, which are involved in c-Jun N-  
18 terminal kinase (JNK) activation but also in phagocytosis and antigen internalization  
19 (31,32). The activation of Syk and the signalling pathways engaged following  
20 nanomaterials interactions with DCs have not been investigated yet. However, studies  
21 on monosodium urate crystals (MSU) and alum particles showed that Syk could be

1 phosphorylated following MSU direct membrane binding leading to cell surface lipid  
2 sorting (25,33). A similar phenomenon has been demonstrated with cholesterol  
3 crystals (26). Although little is known about the early activation of the Syk axis  
4 following nanomaterials interactions with DCs, it is well established that Syk is at the  
5 crossroads of several subjacent signalling pathways such as Phosphoinositide 3-  
6 kinases (PI3K) or Mitogen-activated protein kinases (MAPK). The purpose of this work  
7 was to investigate whether Syk fulfils a role in DCs activation in response to SAS-NPs  
8 and to identify the mechanisms of Syk activation following the interaction of DCs with  
9 SAS-NPs.

10

# 1 Results

## 2 *Characterization of SAS-NPs*

3 We used fumed silica SAS-NPs supplied by Sigma-Aldrich (S5505, Sigma-Aldrich, St  
4 Quentin Fallavier, France) selected as a model of silicas of industrial origin, showing  
5 comparable results with the NM-202 benchmark material from the Joint research  
6 center repository on the moDCs phenotype, inflammatory cytokines and chemokines  
7 secretion (7). The silica nanopowder is presented by the manufacturer as having an  
8 average primary particle size of 14 nm and a surface area of  $200 \pm 25 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ . A precise  
9 characterization of the SAS-NPs used in this study has been previously published (7).  
10 The main characteristics are summarized in Table 1.

Table 1. Characteristics of SAS-NPs

Reference	Specific Surface Area <sup>1</sup>	Nominal Primary Particle Diameter <sup>1</sup>	Primary particle Diameter <sup>2</sup>	DLS distribution <sup>3</sup>	ζ-potential Value <sup>3</sup>
S5505, Sigma-Aldrich	196 m <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup>	14 nm	14.4 ± 5.3 nm	123 ± 53 nm 8.7 ± 0.3 μm	- 22.5 ± 1.4 mV

11 <sup>1</sup>Data provided by the supplier, <sup>2</sup>Analyzed by TEM, <sup>3</sup>in RPMI 1640

## 12 *Syk controls moDCs phenotype in response to SAS-NPs*

13 We have previously shown that SAS-NPs are recognized as a danger signal by moDCs  
14 (7). As the role of Syk in DCs maturation has already been described (27), we aimed  
15 to evaluate whether Syk was involved in the response of moDCs to SAS-NPs. To this  
16 end, we used a well-described pharmacological inhibitor of Syk, BAY 61-3603 also  
17 called Syk Inhibitor IV (figure 1). Cells were pre-treated for one hour with BAY 61-3603  
18 and then stimulated with SAS-NPs for 16 hours. The inhibitor's concentration was

1 optimized to avoid cellular toxicity (data not shown). As previously demonstrated (7),  
2 in the absence of Syk inhibitor IV, SAS-NPs induced a significant increase in the CD83  
3 and CD86 markers expressions, at 12.5 and 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  for CD83 and only at 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$   
4 for CD86. The inhibitor had a slight effect on the basal expression of CD83 and  
5 CD86, and completely prevented the induction caused by SAS-NPs, whether at 12.5  
6 or 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (figure 1). Consequently, Syk is thought to play a major role in SAS-NPs-  
7 induced DCs maturation.

8

9 *Activation of Syk in moDCs controls T-cell proliferation induced by SAS-NPs-treated*  
10 *moDCs and cytokines production by T-cells*

11 To assess whether Syk activation was necessary for the establishment of the T-cell  
12 response, we performed an allogeneic moDC:T-cell co-culture. MoDCs were pre-  
13 treated for 1 hour with BAY 61-3603 and then stimulated with SAS-NPs or not. T-cell  
14 proliferation was assessed on day 5 as the percentage of CFSE<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup> T-cells (figure  
15 2A). Using a 1:20 DC:T-cell ratio as previously stated (23), the addition of non-treated  
16 allogeneic moDCs induced a basal T-cell proliferation of 40% that was statistically  
17 increased upon exposure of moDCs to SAS-NPs. The inhibition of Syk in SAS-NPs-  
18 treated cells caused a significant decrease in the percentage of CFSE<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup> T-cells  
19 compared with SAS-NPs-activated moDCs, suggesting that Syk is necessary for the  
20 establishment of the T-cell response following the treatment of moDCs with SAS-NPs  
21 (figure 2A).

1 We have previously demonstrated that SAS-NPs increased the production of IL-9 and  
2 IL-17 A/F by CD4<sup>+</sup> T-cells compared to untreated moDCs (7). Moreover, INF- $\gamma$  was  
3 also augmented but the levels were not statistically different from controls (7). We  
4 therefore assessed whether Syk could contribute to cytokines production by CD4<sup>+</sup> T-  
5 cells in response to SAS-NPs. To this end, we measured cytokines in the moDCs:CD4<sup>+</sup>  
6 T-cell co-culture supernatants presented in figure 2A. Interestingly, we detected a  
7 significant decrease of IFN- $\gamma$ , IL-17F and IL-9 production following Syk inhibition  
8 (figure 2B). These results reinforce the conclusion that the activation of Syk in moDCs  
9 following SAS-NPs treatment would be necessary for the establishment of the T-cell  
10 response.

11

#### 12 *Syk signalling pathway is activated in SAS-NPs-treated moDCs*

13 To characterize Syk activation in the moDCs upon SAS-NPs exposure, we next  
14 measured the kinetics of its phosphorylation using Western Blotting (figure 3). Despite  
15 the inherent inter-individual variability between donors, we reproducibly detected a  
16 phosphorylation of Syk 30 min after stimulation with SAS-NPs (figure 3A). Interestingly,  
17 at that very time, the phosphorylation increased in a concentration-dependent  
18 manner, slightly at the lowest concentration (12.5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) but significantly different  
19 from the control at the highest concentration of 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (figure 3B).

20 Syk is a protein tyrosine kinase known to be upstream of many signalling pathways  
21 such as MAPK (26,34) which have been described to be involved in moDCs maturation

1 (35–39). To evaluate whether MAPKs also contribute to the response of moDCs to  
2 SAS-NPs, we assessed their phosphorylation using Western blotting (figure 4A). Two  
3 MAPKs, JNK and p38, were found significantly activated at 90 and 120 minutes  
4 respectively after SAS-NPs addition (figure 4B). These results show that the MAPK  
5 pathway is activated following the interaction between moDCs and SAS-NPs, but this  
6 delayed phosphorylation suggests an indirect activation where an upstream signalling  
7 pathway would be turned on first. To ascertain whether Syk is required for MAPK  
8 activation in response to SAS-NPs, we measured the JNK and p38 phosphorylations  
9 upon Syk inhibition. Cells were pre-treated for one hour with BAY 61-3603 and then  
10 stimulated for 90 or 120 minutes with SAS-NPs (figure 4C). A significant decrease in  
11 JNK phosphorylation in response to SAS-NPs was observed while no effect on p38  
12 phosphorylation was detected (figure 4D). Taken together, our results indicate that  
13 phosphorylation of Syk in response to SAS-NPs occurs upstream of the JNK MAPK.  
14 Moreover, the phosphorylation of the two kinases appears to be dependent on Syk.

15

16 *Src family protein kinases play a role in Syk phosphorylation in response to SAS-NPs*

17 As previously stated, activation of Syk can result from the Syk activation loop, initiated  
18 by Src family kinases and then relayed and amplified by other activated Syk molecules  
19 (28). We therefore assessed whether Syk phosphorylation observed in response to  
20 SAS-NPs could be achieved by a Src family protein kinase. To this end, cells were pre-  
21 treated for one hour with Saracatinib (Lyn, Fyn and Lck inhibitor) and then stimulated

1 for 30 minutes with SAS-NPs (figure 5A). The inhibitor's concentration was optimized  
2 to avoid cellular toxicity (data not shown). Results showed a significant decrease in  
3 Syk phosphorylation in response to SAS-NPs when the three Src kinases were blocked  
4 (figure 5B). This result highlights that the Src family kinases are involved in the  
5 phosphorylation of Syk in response to SAS-NPs. Since the post-translational acylations  
6 and association with lipid rafts have been reported to be critical in the regulation and  
7 activation of Src kinases (40), we then hypothesized that an early effect on the plasma  
8 membrane leading to lipid raft aggregation could be involved in SAS-NPs-elicited Syk  
9 phosphorylation.

10

#### 11 *Involvement of lipid rafts in SAS-NPs-treated moDCs*

12 Lipid-rafts are cell membranes microdomains forming liquid-ordered domains of  
13 decreased membrane fluidity. They are enriched in cholesterol and sphingolipids  
14 such as monosialotetrahexosylganglioside (GM1), widely used as a marker of these  
15 rafts and whose receptor is cholera toxin B. Importantly, lipid rafts represent a  
16 supramolecular platform for cellular signalling events, bringing together receptors,  
17 channels (41), concentrating proteins in the inner face of the plasma membrane such  
18 as the dually acylated Src kinases Lck, Fyn and Lyn (42). Since activation of Syk has  
19 been linked to lipid rafts formation in DCs stimulated with MSU crystals (25), we  
20 investigated whether Syk activation by SAS-NPs could be linked to lipid rafts  
21 formation. As a first step, using an Alexa Fluor conjugate of the cholera toxin B

1 subunit, we assessed whether the interaction of moDCs with SAS-NPs could trigger  
2 lipid rafts formation (figure 6). In untreated moDCs, as expected, GM1 featured a  
3 diffuse distribution (figure 6A). The staining of the raft-associated GM1  
4 glycosphingolipid showed that SAS-NPs led to visible raft aggregation starting 15  
5 minutes after treatment (figure 6B), which seems to be lowered but still observable  
6 after 30 minutes (figure 6C). These time points appear to be consistent with the  
7 activation sequence of Syk (significant after 30 minutes of stimulation, figure 3).

8 To further support our observation, we investigated whether Syk activation following  
9 SAS-NPs exposure could occur in the absence of lipid rafts. Cholesterol plays a key  
10 structural role in the microdomain architecture and the use of cholesterol-  
11 sequestering drugs to disrupt membrane rafts is now well established (43). As a  
12 second step, we used methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) to extract cholesterol from the  
13 membranes and investigated the consequences of such a cholesterol depletion on  
14 Syk activation by SAS-NPs (figure 7). After 30 minutes of SAS-NPs treatment,  
15 cholesterol depletion resulted in undetectable Syk phosphorylation (figure 7A).  
16 Indeed, at this time, Syk phosphorylation was significantly decreased compared to the  
17 control without M $\beta$ CD (figure 7B). Together, these results indicate that SAS-NPs  
18 induce lipid rafts formation and that these rafts are required for the activation of Syk  
19 in response to SAS-NPs.

20

21

## 1 Discussion

2 DCs are sentinels of the immune system, actively sampling their antigenic  
3 environment and sensing danger. Some nanomaterials have been shown to activate  
4 DCs, either directly or as a result of cell injury or death, and could thus be considered  
5 as an emerging category of danger signals (44). We have previously demonstrated  
6 that it applies to SAS-NPs, which induce efficient DCs maturation and pro-  
7 inflammatory cytokines release (7). As a further step in this work, we describe here for  
8 the first time that in DCs, SAS-NPs induce cell maturation by promoting lipid rafts  
9 formation and the subsequent activation of a signalling cascade involving sequentially  
10 Src, Syk and the MAPK, consistent with a functional maturation process.

11 The JNK and p38 MAPK were found activated, but surprisingly at the late time points  
12 of 90 and 120 minutes respectively (figure 1 and 4A). This activation is in line with the  
13 literature, where MAPK have been widely involved in DCs maturation in response to  
14 various *stimuli* such as sensitizing molecules (nickel, cobalt or dinitrochlorobenzene)  
15 (37,39) but also to Sigma "ultrafine" silica particles (21). However, the late  
16 phosphorylation detected here seems highly suggestive of an indirect activation,  
17 involving upstream events unlikely to result from a receptor engagement. We have  
18 therefore chosen to focus on these upstream events, which have not been described  
19 in the literature yet.

20 We have shown here that the response of DCs and T-cells to SAS-NPs is Syk-  
21 dependent (figure 1 and 2). Moreover, Syk is required for JNK phosphorylation but

1 not for p38 (figure 4B). It has already been described in rat vascular smooth muscle  
2 cells that both JNK and p38 signalling pathways can be independently activated in  
3 response to the same stimulus, since only the activation of JNK but not of p38 was  
4 mediated by Src kinases in presence of hydrogen peroxide (45). The involvement of  
5 Syk in the maturation of DCs in response to nanomaterials has not been described  
6 elsewhere. However, it has been reported for other nanoobjects such as therapeutic  
7 protein aggregates, MSU or alum crystals (25,27,33). Syk is commonly known to be  
8 activated upon a receptor engagement with Fc $\gamma$ R, Dectin-1 or Mincle (46). In this case,  
9 its activation is detected only a few minutes after the interaction between the ligand  
10 and its specific receptor (27,47). However, in our study, we observed a rather late  
11 activation of Syk after 30 minutes of stimulation, again more in line with a receptor-  
12 independent process. Noteworthy, earlier stimulation times were analysed, but no  
13 phosphorylation was observed either (data not shown).

14 It is well established that the aggregation of lipid rafts significantly facilitates many  
15 cellular events including signal transduction, endocytosis, vesicular transport and cell  
16 adhesion (48,49). Lipid sorting and then raft reorganisation are necessary for receptor  
17 anchoring and it was suggested that it could also occur because of direct membrane  
18 interaction between particles and the membrane. Indeed, Ng *et al.* have  
19 demonstrated in BMDC that solid structures like MSU were triggering immune cell  
20 activation *via* membrane lipids alterations without the requirement for specific cell  
21 surface receptors (25). Interestingly, they also demonstrated that this original pathway

1 was linked to the activation of the Syk kinase. Indeed, lipid sorting aggregates ITAM-  
2 containing receptors, which are preferentially segregated into  
3 cholesterol/sphingolipid rich regions of lipid rafts (50). Syk kinase would be recruited  
4 by this accumulation and then activated, triggering the downstream signalisation (25).  
5 We can therefore speculate that such a mechanism could be observed with SAS-NPs.  
6 We have shown lipid rafts aggregation as early as 15 minutes after SAS-NPs  
7 stimulation (figure 6), consistent with the late phosphorylation of Syk detected after  
8 30 minutes (figure 3). In the literature, the formation of lipid rafts has been linked to  
9 the recruitment of proteins binding glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins,  
10 transmembrane proteins and doubly acylated protein tyrosine kinases of the Src family  
11 (51). Dual acylation is important for their attachment to lipid rafts, allowing the spatial  
12 activation of membrane-anchored Src kinases signalling (52). We demonstrated here  
13 that the Src family kinases are involved in the phosphorylation of Syk in response to  
14 SAS-NPs (figure 5). Consistent with these findings, it has been shown in antigen-  
15 presenting cells such as B cells that Src kinases can be associated with the activation  
16 of Syk (27). Indeed, Src kinases are thought to induce the phosphorylation of Syk,  
17 which then sets up an autophosphorylation loop of other Syk molecules. By  
18 generating the first few molecules of activated Syk, the Src kinases would act here as  
19 the initiating trigger.

20 Our results suggest that SAS-NPs are responsible for lipid rafts aggregation (figure 6),  
21 which is necessary for Syk activation (figure 7). It remains to be understood how SAS-

1 NPs would induce lipid raft formation. Lipid rafts are known to aggregate in response  
2 to various stimuli but to our best knowledge, no study has reported yet molecular  
3 description of such phenomena involving nanoparticles. Indeed, even data  
4 describing interaction between nanoparticles and lipid rafts are scarce. According to  
5 molecular dynamics simulations, Lin et al. showed that ligand hydrophobicity, length  
6 and density (54) as well as ligand rigidity (55) affect preferred localization of  
7 nanoparticles. In giant unilamellar vesicles, membrane gelation and decrease of  
8 membrane fluidity were reported for oppositely-charged silica NPs (56). In trout gill  
9 epithelial cells, super resolution fluorescence microscopy experiments showed that  
10 primary amine-terminated quantum dots preferentially co-localize with lipid rafts (57).  
11 Recent results from Pavan et al. (58) shed a new light on this topic. As lipid rafts are  
12 richer in sphingomyelin that exhibits a zwitterionic phosphocholine, their local charge  
13 is lower, allowing a more favorable interaction with negatively-charged silica NPs.  
14 These authors emphasized the role of nearly-free silanols (NFS), as the main surface  
15 pattern responsible for silica particles toxicity (59). Beside isolated, geminal or vicinal  
16 silanols (60), NFS are defined as silanols presenting a very weak mutual interaction  
17 through H-bonding. Their inter-distance (4-6 Å) allows the clamping of the phosphate  
18 group of phospholipids, that may result in an increase of membrane rigidity. Indeed,  
19 in liposome models, these authors observed a restricted motion of the lipophilic  
20 fluorescent probe Di-4-ANEPPDHQ, by time-resolved anisotropy measurements (58).  
21 Through DFT modeling of small molecules, they also reported favorable weak

1 bonding between positive methyl of the ammonium group of DOPC and  
2 deprotonated oxygen of the NFS. They propose that the membranolytic activity of  
3 silica NPs on red blood cells they documented (61,62) might occur in sphingomyelin-  
4 enriched lipid domains, as they could be specific sites of interaction between  
5 membranes and NFS. Among all the different particles studied, pyrogenic amorphous  
6 silica present the higher percentage of exposed NFS (17.3%). Such interaction  
7 between DCs and NFS possibly present in the SAS-NPs we studied could stiffen DCs  
8 membrane and trigger the aggregation of lipid rafts and thus the downstream  
9 intracellular signalisation.

10

## 1 **Conclusions**

2 In summary, we showed that SAS-NPs were recognised by DCs as a danger signal by  
3 a Syk-dependent mechanism. This involved lipid rafts aggregation leading to the  
4 recruitment of Src kinases, inducing the activation of Syk which in turn leads to the  
5 phosphorylation of JNK and DCs maturation. Taken together, our results provide new  
6 insights into the mechanism by which SAS-NPs play their danger signal role. We  
7 hypothesize that surface chemistry is at the core of the interactions between SAS-NPs  
8 and DCs. A more detailed understanding of the interactions between the chemical  
9 groups present at the nanoparticles surface and membranes could lead to a safer  
10 production of SAS-NPs through a safer-by-design approach.

11

## 1 **Methods**

### 2 *Synthetic amorphous silica nanoparticles*

3 The fumed silica NPs used in this work are commercially available (S5505, Sigma-  
4 Aldrich, St Quentin Fallavier, France, batch SLBR6988V). According to the  
5 manufacturer, their specific surface determined by BET (Brunauer-Emmett-Teller) is  
6  $196 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ . The suspension was prepared from fumed silica dry powder dispersed in  
7 filtered ultrapure water at a final concentration of  $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The suspension was  
8 then left for 8 hours in a water bath at  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  for sterilization. The absence of bacterial  
9 growth in the NPs suspension was checked after the process, and a Limulus  
10 amoebocyte lysate (LAL) test was performed on each batch to address endotoxin  
11 contamination. Before each experiment, an intermediate dilution at a concentration  
12 of  $500 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  was prepared in RPMI 1640 medium supplemented with Glutamax,  
13  $1 \text{ mM}$  sodium pyruvate,  $0.1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  streptomycin, and  $100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  penicillin (Gibco,  
14 Invitrogen, Saint Aubin, France). The suspension was sonicated for 15 minutes before  
15 DCs treatment.

16

### 17 *Characterization of synthetic amorphous silica nanoparticles*

18 The hydrodynamic diameter of particles was determined at  $25^\circ\text{C}$  by Dynamic Light  
19 Scattering (DLS) using a Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Orsay, France)  
20 operating at a fixed scattering angle of  $90^\circ$  and equipped with a Helium-Neon laser  
21 source with a wavelength of  $633 \text{ nm}$ . Measurements were performed in disposable 4-

1 mL cuvettes with a 1-cm optical pathway and four optical faces (Sarstedt, Marnay, France) containing an appropriate volume (1 mL) of the sample, prepared as described above, after dilution to  $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$  in the desired medium. The hydrodynamic diameter values were calculated using the Stokes-Einstein equation assuming a spherical shape of the particles. The particle size profile was obtained from the intensity-weighted distribution, and the hydrodynamic diameter value corresponds to the median diameter derived from the cumulative distribution curve. The  $\zeta$ -potential measurements were carried out with the same instrument at  $25^\circ\text{C}$  by laser doppler velocimetry at a detection angle of  $17^\circ$  in DTS 1060 disposable cells (Malvern Instruments, Orsay, France) loaded with approximately 1 mL of each sample diluted to  $375 \mu\text{g.mL}^{-1}$  in the desired medium. Due to the ionic strength of the samples leading to high conductivity, measurements were performed using the monomodal mode, and the Smoluchowski approximation was used to convert the electrophoretic mobility to  $\zeta$ -potential. Values are given as mean values of ten measurements. We carried out the characterisation before and after heating at  $80^\circ\text{C}$ . The results (DLS and zeta potential) showed no significant difference, confirming that sterilization does not alter the physicochemical characteristics of fumed silica NP (data not shown).

18

19

20

21

1 *Endotoxin detection*

2 Possible endotoxin contamination was analysed with the Limulus amoebocyte lysate  
3 (LAL) assay (GenScript, Piscataway, NJ, USA). All batches showed values below the  
4 threshold of endotoxin positivity (0.05 EU.mL<sup>-1</sup>).

5

6 *Generation of primary cultures of human moDCs*

7 Human monocyte-derived dendritic cells (moDCs) were derived from monocytes  
8 isolated from human peripheral blood supplied by the French Blood Bank  
9 (Établissement Français du Sang, Rungis, France). Healthy donors gave their written  
10 consent for the use of blood donation for research purposes. Peripheral blood  
11 mononuclear cells (PBMC) were sorted from buffy coats by density centrifugation on  
12 a Ficoll gradient. Monocytes were then isolated through positive magnetic selection  
13 using MidiMacs separation columns and anti-CD14<sup>+</sup> antibodies coated on magnetic  
14 beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Finally, CD14<sup>+</sup> cells were  
15 differentiated in immature moDCs for 4 days in RPMI 1640 supplemented with  
16 GlutaMAX (Gibco, Invitrogen), 10 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS,  
17 Gibco) 550 U.mL<sup>-1</sup> interleukin-4 (rh-IL4, Miltenyi Biotec), 1 mM sodium pyruvate  
18 (Gibco), 100 µg.mL<sup>-1</sup> streptomycin and 100 U.mL<sup>-1</sup> penicillin (Gibco) at 37°C and 5%  
19 of CO<sub>2</sub>. On day 4, the differentiation of moDCs was evaluated by flow cytometry. The  
20 moDCs used will show the following phenotype: CD83<5%, CD86<30%, CD1a>80%  
21 and DC-SIGN>90%. moDCs are then used at the density of 1 million per mL.

## 1 *Treatment of moDCs*

2 On day 4, immature moDCs were stimulated from 15 minutes to 16 hours either to 0,  
3 12.5 or 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  of sonicated SAS-NPs or to 25  $\text{ng.mL}^{-1}$  of lipopolysaccharide (LPS,  
4 ref: L6529, *Escherichia coli*, serotype 055-B5, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier,  
5 France) as a positive control of moDCs activation. Cells were treated in the absence  
6 of fetal bovine serum (FBS) for the first hour of treatment to minimize the impact of  
7 serum proteins' corona formation. Then, the medium was completed to 10% FBS to  
8 maintain DCs survival during the following 15 hours of treatment. In some conditions,  
9 moDCs were pre-treated for one hour with Syk inhibitor IV (1  $\mu\text{M}$ ), methyl- $\beta$ -  
10 cyclodextrin (5mM) or Saracatinib (10  $\mu\text{M}$ ). Syk inhibitor IV (BAY 61-3606) and methyl-  
11  $\beta$ -cyclodextrin were purchased from Millipore (Massachussets, USA). Saracatinib was  
12 purchased from Selleck Chemicals (Texas, USA).

13

## 14 *Phenotypical analysis*

15 After pre-treatment or not with Syk inhibitor, moDCs were stimulated for 16 h with  
16 SAS-NPs and moDCs viability and phenotype were evaluated by flow cytometry. Cell  
17 viability was assessed in preliminary experiments by propidium iodide (PI) (Invitrogen,  
18 California, USA) staining, used at a final concentration of 625  $\text{ng.mL}^{-1}$  on a small  
19 fraction of moDCs cultures. Under these experimental conditions, SAS-NPs did not  
20 interfere with the result of the cytotoxicity test. Cell viability after treatment was never  
21 less than 70%. For the phenotypic analysis, the surface labeling procedure was as

1 follows:  $2 \times 10^5$  cells.mL<sup>-1</sup> were washed in cold phosphate-buffered saline (PBS)  
2 supplemented with 0.5% bovine serum albumin (BSA) and stained with monoclonal  
3 antibodies (mAbs) in the dark, at 4°C for 20 minutes. The following mAbs with  
4 appropriate isotype controls were used: CD80<sup>FITC</sup> (557226, BD Biosciences, Le Pont  
5 de Claix, France), CD83<sup>PE</sup> (556855, BD Biosciences), CD86<sup>APC</sup> (555660, BD  
6 Biosciences). Cells were analyzed on an Attune Nxt (Invitrogen) using FlowJo software  
7 (version 10; FlowJo LLC, Oregon, USA). We used a gating strategy to exclude dead  
8 cells, based on the FSC/SSC criteria. The data acquisition was performed on a  
9 minimum of 10,000 living cells. Results were expressed as the relative fluorescence  
10 intensity (RFI), using the corrected mean fluorescence intensity (cMFI) as follows:  
11  $cMFI = MFI - MFI \text{ of isotype control}$ ;  $RFI = cMFI \text{ of treated cells} / cMFI \text{ of untreated cells}$ .

12

### 13 *Allogeneic co-cultures of moDC and T cells*

14 CD4<sup>+</sup> T cells were isolated from PBMC by positive selection with MidiMACS  
15 separation columns and anti-CD4 antibodies coated on magnetic beads (Miltenyi  
16 Biotec). These T cells were confirmed to have a purity > 95%, based on CD4  
17 expression evaluated by flow cytometry (561841, RPA-T4, BD Biosciences). CD4<sup>+</sup> T  
18 lymphocytes were labeled with 0.5 mM carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)  
19 (Invitrogen), following the manufacturer's instructions. MoDC were pre-treated or not  
20 with inhibitors and stimulated as previously described, then washed and co-cultured  
21 with allogeneic CD4<sup>+</sup> T cells at a 1:20 DC/T-cell ratio for 5 days, in RPMI 1640

1 Glutamax supplemented with 10% human serum (Sigma Aldrich, Missouri, USA) in  
2 round-bottom 96-well plates. CFSE fluorescence was analyzed using flow cytometry,  
3 on an Attune Nxt (Invitrogen) using FlowJo software (version 10; FlowJo LLC).  
4 Proliferating T cells corresponded to low CFSE fluorescence.

5

#### 6 *Cytokine and chemokine quantification in the cell culture supernatants*

7 MoDC/CD4<sup>+</sup> T cell coculture supernatants were measured in duplicate for IFN- $\gamma$ , IL-5,  
8 IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F, and IL-22 using Meso Scale Discovery multiplex assay  
9 (MSD, Rockville, MA, USA) following manufacturer's instructions. The quantification  
10 ranges were as follows: IFN- $\gamma$ , 21.26–87,100 pg.ml<sup>-1</sup>; IL-5, 5.07–20,800 pg.ml<sup>-1</sup>; IL-9,  
11 0.3–1,230 pg.ml<sup>-1</sup>; IL-10, 4.76–19,500 pg.ml<sup>-1</sup>; IL-13, 2.40–9,832 pg.ml<sup>-1</sup>; IL-17A,  
12 29.29–120,000 pg.ml<sup>-1</sup>; and IL-22, 0.83–3,420 pg.ml<sup>-1</sup>.

13

#### 14 *Immunoblot analysis*

15 After pre-treatment or not with inhibitors, moDC were incubated for 30 to 120 minutes  
16 with 12.5 and 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  SAS-NP and washed in cold PBS before lysis. Cells were  
17 lysed in lysis buffer (40 mM Tris HCl, pH 7,4; 274 mM NaCl; 4 mM EDTA; 2% Triton  
18 X-100; 4mM Sodium pyrophosphate; 20% Glycerol and H<sub>2</sub>O) to which phosphatase  
19 and protease inhibitors were added (aprotinin 1 mg.mL<sup>-1</sup>; leupeptin 1 mg.mL<sup>-1</sup>;  
20 phenylmethylsulfonylfluoride 0,1M; sodium orthovanadate 100 mM, pepstatin 10  
21 mg.mL<sup>-1</sup>; 2,5%  $\beta$ -glycerophosphate). Thirty micrograms of denatured protein were

1 loaded into 12% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes, which  
2 were successively incubated with antibodies directed against the phosphorylated and  
3 total forms of Syk (Tyr525/526). Immunoreactive bands were detected by their  
4 chemiluminescence using the ChemiDoc XRS + System (Bio-Rad Laboratories,  
5 Marnes-La-Coquette, France). Bands were quantified with ImageLab software.

6

#### 7 *Fluorescent staining of lipid rafts and confocal laser scanning microscopy (CLSM)*

8 Lipid rafts were stained, using the Cholera Toxin Subunit B, Alexa Fluor 488 Conjugate  
9 (Molecular Probes, Invitrogen) after 15 and 30 minutes of stimulation with SAS-NP.

10 The samples were imaged with an inverted confocal laser scanning microscope TCS  
11 SP8 –gSTED Leica (Leica, Germany) using a HC PL APO CS2 63x/1.40 oil immersion  
12 objective lens. The instrument was equipped with a WLL Laser (488 nm excitation  
13 wavelength). Green fluorescence was collected with a 490-600 nm wide emission slit  
14 on a PMT detector. Transmission images were acquired with a PMT-trans detector.  
15 The pinhole was set at 1.0 Airy unit giving an optical slice thickness of 0.89 $\mu$ m. 12-bit  
16 numerical images were done with the Leica Application Suite X software (Version  
17 3.5.5; Leica).

18

19

20

21

1 *Statistical analysis*

2 Data were expressed as means  $\pm$  SEM. Differences between groups were analyzed  
3 using a non-parametric unpaired Kruskal-Wallis test (Prism software; GraphPad, La  
4 Jolla, CA). When the data complied with the normality test (Shapiro Wilk test), one-  
5 way ANOVA with Bonferroni's post-test was conducted. The  $p$  values  $<0.05$  were  
6 considered statistically significant.

7

8 **List of abbreviations**

9 SAS-NPs : amorphous silica nanoparticles ; DCs : dendritic cells ; moDCs : monocyte-  
10 derived dendritic cells ; MHC-II : major histocompatibility complex class II ; LPS :  
11 lipopolysaccharide ; PHA : phytohaemagglutinin ; DLS : dynamic light scattering ; LAL  
12 : limulus amebocyte lysate ; PBMC : peripheral blood mononuclear cells ; PI :  
13 propidium iodide ; CFSE : carboxyfluorescein succinimidyl ester.

14

15 **Declarations**

16 *Ethics approval and consent to participate*

17 Human monocyte-derived dendritic cells (moDCs) were derived from monocytes  
18 isolated from human peripheral blood supplied by the French Blood Bank (EFS,  
19 Rungis, France). Healthy donors gave their written consent for the use of blood  
20 donation for research purposes.

21

22 *Consent for publication*

23 Not applicable.

24

25 *Availability of data and materials*

26 Not applicable.

1 *Competing interests*

2 The authors declare that they have no competing interests.

3

4 *Funding*

5 This research was funded by INSERM institutional grants and by The French National  
6 Research Program for Environmental and Occupational Health of Anses  
7 (2020/01/199), Allergosil Grant.

8

9

10 *Authors' contributions*

11 EG, EB, CF processed the experimental data, performed the analysis, drafted the  
12 manuscript and designed the figures. KH contributed to the experimental design and  
13 analysis of lipid rafts experiments. F-XL and EB performed NP characterizations. ABV  
14 and MP participated in the design of the study and in the interpretation of the results.  
15 EG performed the statistical analysis. EG and ABV wrote the manuscript. ABV  
16 coordinated the study. All authors read and approved the final manuscript.

17

18 **Acknowledgements**

19 Eléonore Guillet was a master fellow of DIM QI2 (Réseau de recherche Qualité de l'air  
20 en Ile-de-France).

21

22

23

24

25

26

27

28

1 **Figure legends**

2

3 ***Figure 1 : Syk controls moDCs phenotype in response to SAS-NPs***

4 Immature moDCs were pre-treated for 1 hour with Syk inhibitor IV, BAY61-3603 (1  
5  $\mu\text{M}$ ) and then treated for 16 h with SAS-NPs (12.5 or 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Cells were then  
6 collected, washed, and analyzed by flow cytometry for surface markers expression.  
7 Results are expressed as relative fluorescence intensity (RFI) compared with non-  
8 stimulated cells and represented as the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments.  
9 \*:  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$  One-way Anova, Kruskal-Wallis test.

10

11 ***Figure 2 : Syk is necessary for the establishment of the T-cell response to SAS-NPs***  
12 ***treated moDCs.***

13 Immature moDCs were pre-treated for 1 hour with Syk inhibitor IV (1  $\mu\text{M}$ ) and then  
14 treated for 16 h with 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  of SAS-NPs. Treated moDCs were co-cultured with  
15 allogeneic CD4+ T cells loaded with CFSE at a ratio of 1 moDC for 20 CD4+ T cells.  
16 A) Proliferation was measured after 5 days of co-culture as the percentage of CFSE<sub>low</sub>  
17 CD4+ T cells. Untreated moDCs were used as control. B) On day 5, cytokine levels  
18 were quantified in co-culture supernatants in duplicate, using an electroluminescent  
19 multiplex assay. Detection limits are indicated in the Methods section. Results for  
20 lymphocyte proliferation and cytokine production are expressed as a percentage of  
21 increase and represented as the mean  $\pm$  SEM of 6 independent experiments. \* $p <$   
22 0.05 One-way Anova and Kruskal-Wallis test.

23

24 ***Figure 3 : Syk is phosphorylated in response to SAS-NPs***

25 Immature moDCs were treated for 30, 60, 90 and 120 minutes with SAS-NPs (12.5 or  
26 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Immunoblotting of whole-cell extracts was used to quantify the  
27 phosphorylated form of Syk. A) Representative experiment. B) Results of 3  
28 independent experiments are represented. Bands were quantified using the Image

1 Lab software. Results are expressed as the fold induction, representing the ratio of  
2 the normalized intensity of specific bands of treated cells divided by the normalized  
3 intensity of bands of untreated cells, \*:  $p < 0.05$  One-way Anova, Kruskal-Wallis test.

4

5 ***Figure 4 : JNK and p38 MAPK are phosphorylated in response to SAS-NPs***

6 A and B. Immature moDCs were treated for 30, 60, 90 and 120 minutes with SAS-NPs  
7 ( $12.5$  or  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A) Representative experiment. B) Immunoblotting of whole-cell  
8 extracts was used to quantify the phosphorylated forms of JNK and p38 kinases.

9 C and D. Immature moDCs were pre-treated for 1 hour with Syk inhibitor IV ( $1 \mu\text{M}$ )  
10 and then treated for 90 or 120 minutes with  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$  of SAS-NPs. C) Representative  
11 experiment. D) Immunoblotting of whole-cell extracts was used to quantify the  
12 phosphorylated form of JNK and p38.

13 The results of 3 independent experiments are represented. Bands were quantified  
14 using the Image Lab software. Results are expressed as the fold induction,  
15 representing the ratio of the normalized intensity of specific bands of treated cells  
16 divided by the normalized intensity of bands of untreated cells, \*:  $p < 0.05$  One-way  
17 Anova, Kruskal-Wallis test.

18

19 ***Figure 5 : Src kinases are required to initiate Syk phosphorylation in response to SAS-***  
20 ***NPs***

21 Immature moDCs were pre-treated for 1 hour with Saracatinib ( $10 \mu\text{M}$ ) and then  
22 treated for 30 minutes with  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$  of SAS-NPs. A) Representative experiment. B)  
23 Immunoblotting of whole-cell extracts was used to quantify the phosphorylated form  
24 of Syk. The results of 3 independent experiments are represented. Bands were  
25 quantified using the Image Lab software. Results are expressed as the fold induction,  
26 representing the ratio of the normalized intensity of specific bands of treated cells  
27 divided by the normalized intensity of bands of untreated cells, \*:  $p < 0.05$  One-way  
28 Anova, Kruskal-Wallis test.

1

2 **Figure 6 : SAS-NPs induce lipid raft aggregation in moDCs**

3 Visualization of lipid rafts by conventional fluorescence microscopy using cholera toxin  
4 subunit B conjugated with Alexa Fluor 488 which binds the raft-associated  
5 glycosphingolipid GM1. Immature moDC were treated for 15 (B) or 30 minutes (C)  
6 with SAS-NPs ( $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) or left untreated (A) and then stained with GM1.

7

8 **Figure 7 : Lipid rafts are necessary to activate Syk in response to SAS-NPs**

9 Immature moDCs were pre-treated for 1 hour with Methyl  $\beta$  cyclodextrin (5 mM) and  
10 then treated for 15, 30 and 60 minutes with  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$  SAS-NPs. A) Representative  
11 experiment. B) Immunoblotting of whole-cell extracts was used to quantify the  
12 phosphorylated form of Syk. The results of 3 independent experiments are  
13 represented. Bands were quantified using the Image Lab software. Results are  
14 expressed as the fold induction, representing the ratio of the normalized intensity of  
15 specific bands of treated cells divided by the normalized intensity of bands of  
16 untreated cells, \*\*\*\*:  $p < 0.0001$  One-way ANOVA and Bonferroni's multiple  
17 comparison test.

18

19

20

Figure 1

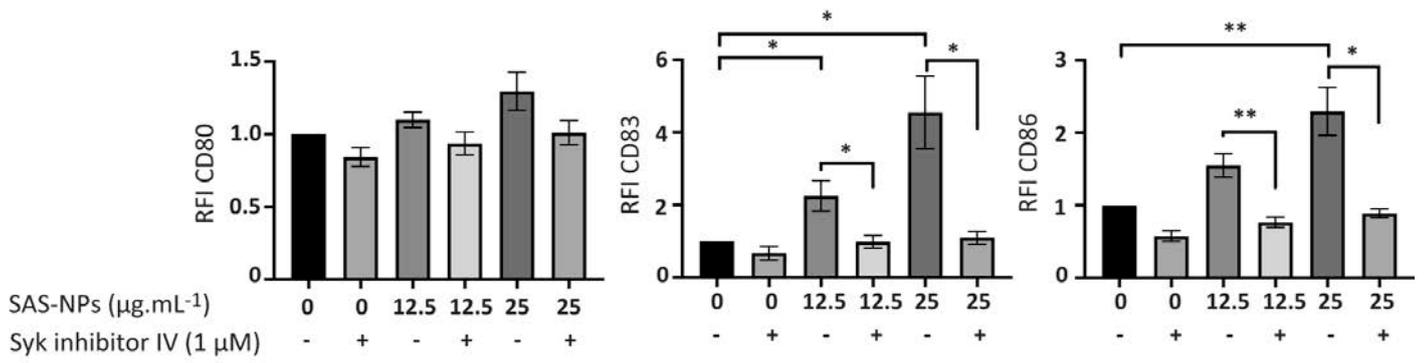


Figure 2

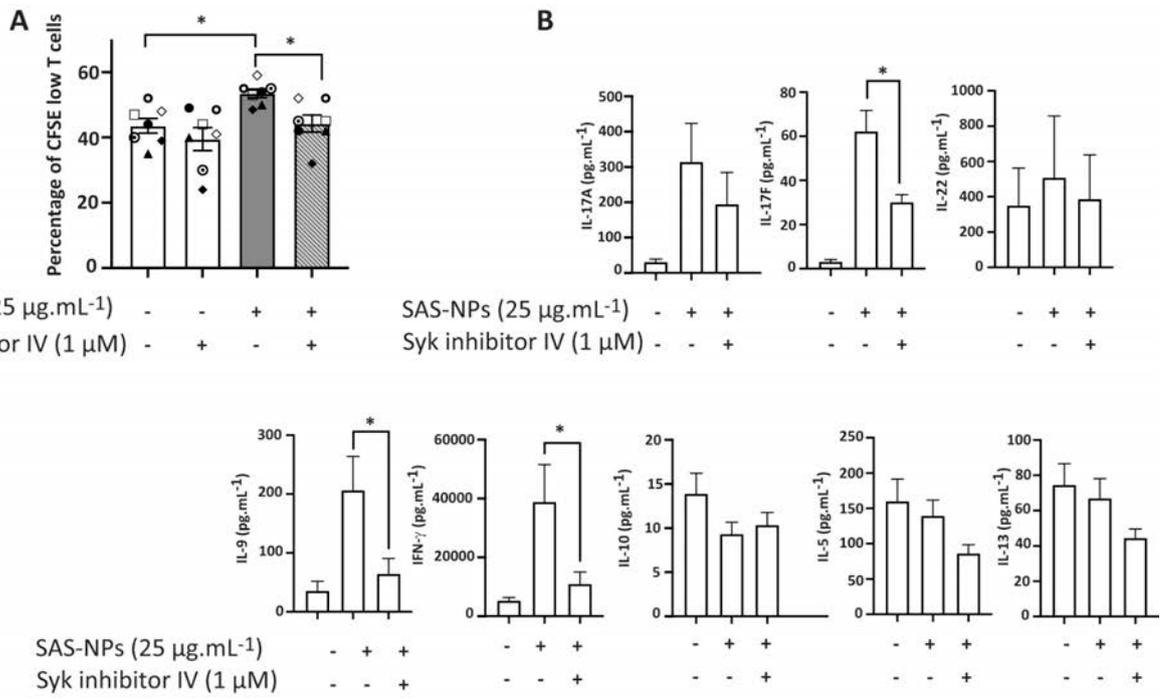


Figure 3

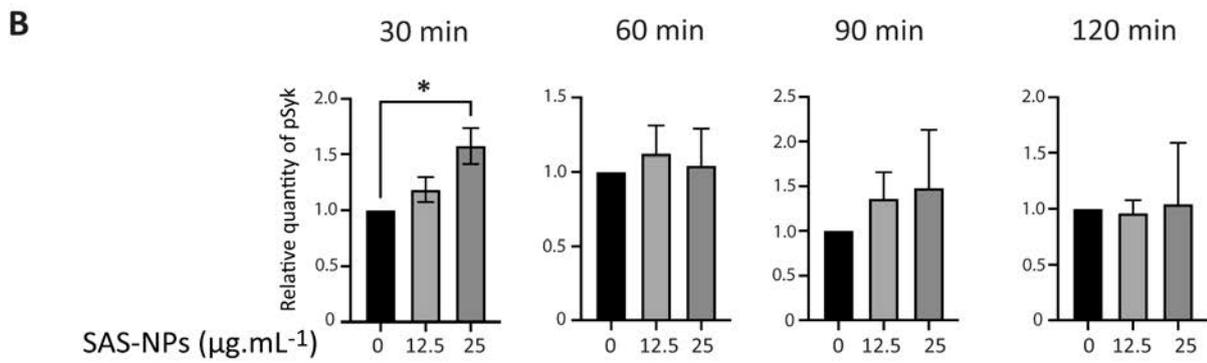
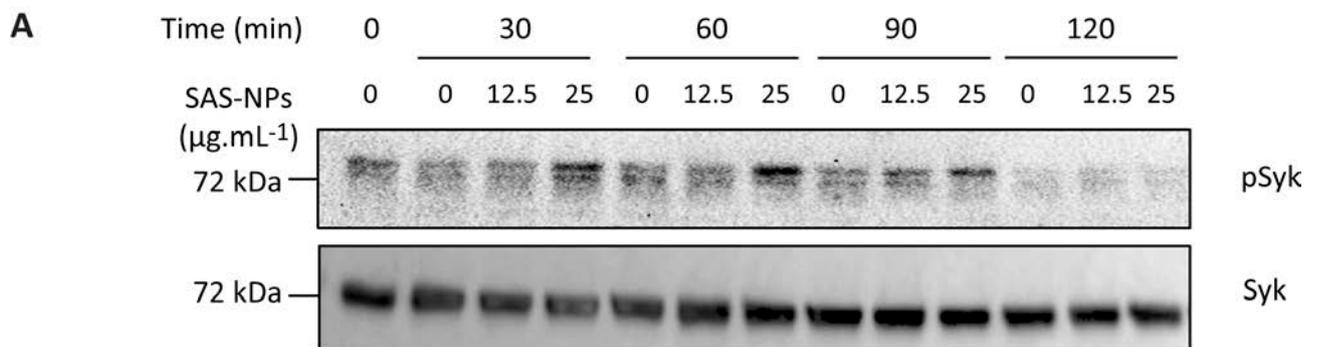
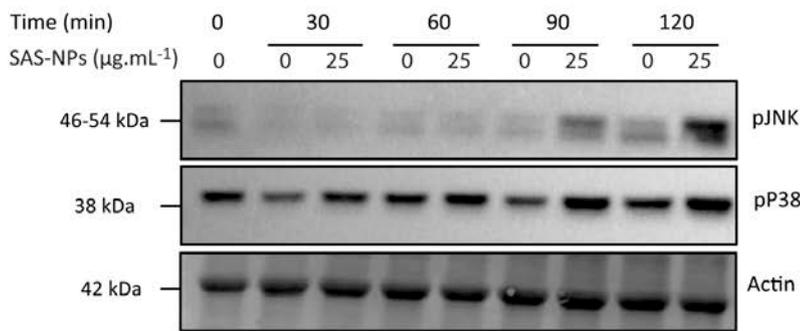
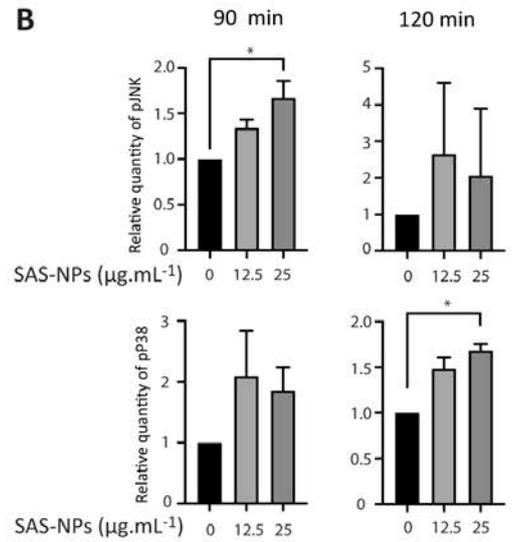


Figure 4

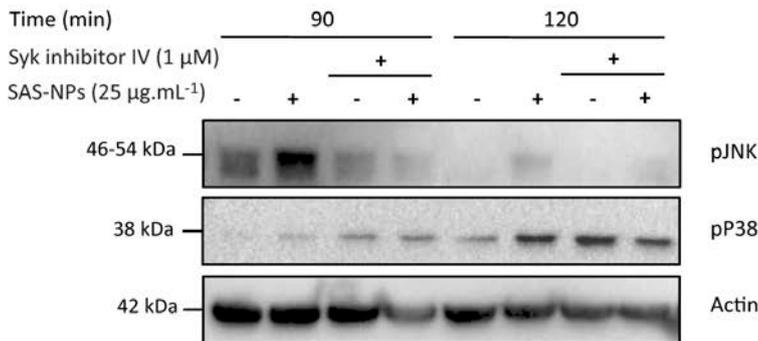
**A**



**B**



**C**



**D**

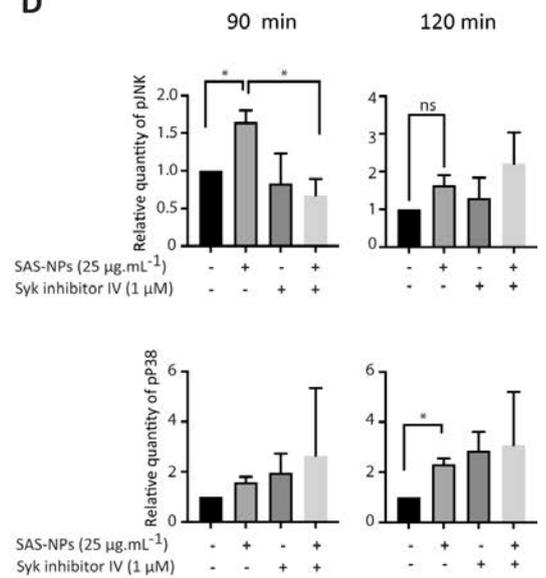


Figure 5

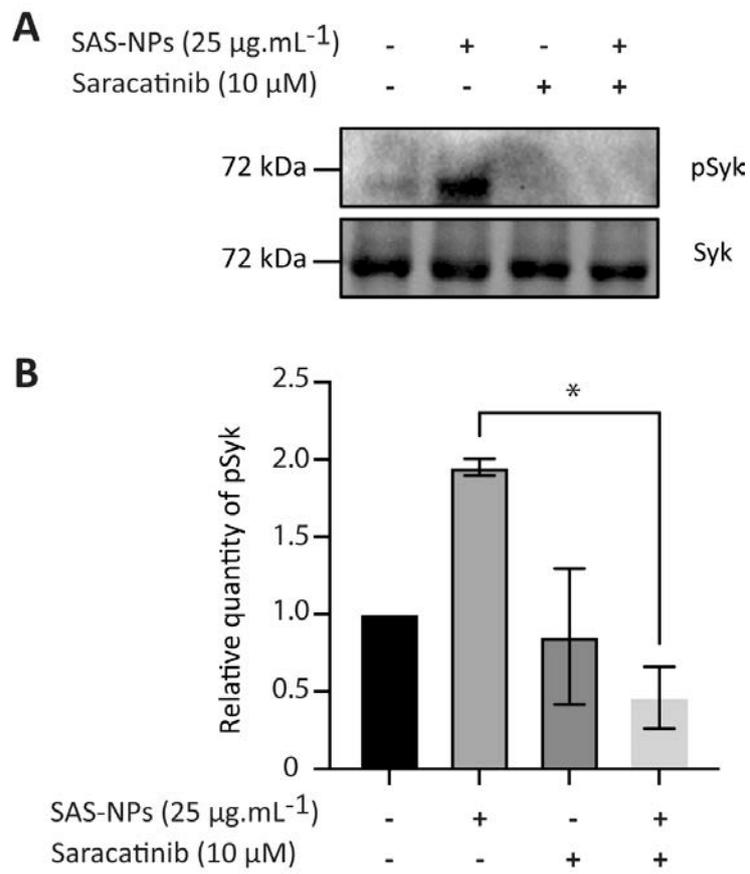


Figure 6

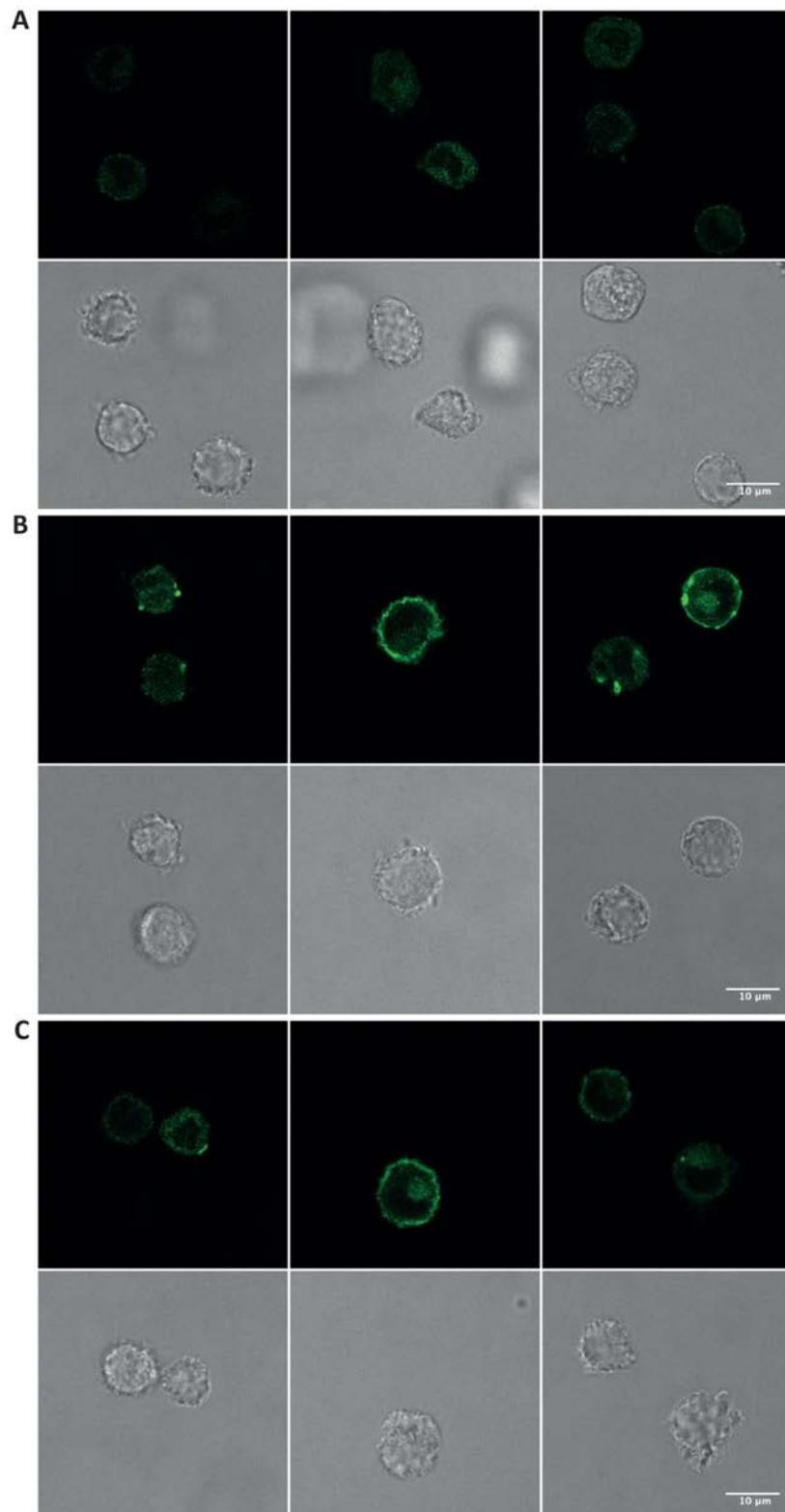
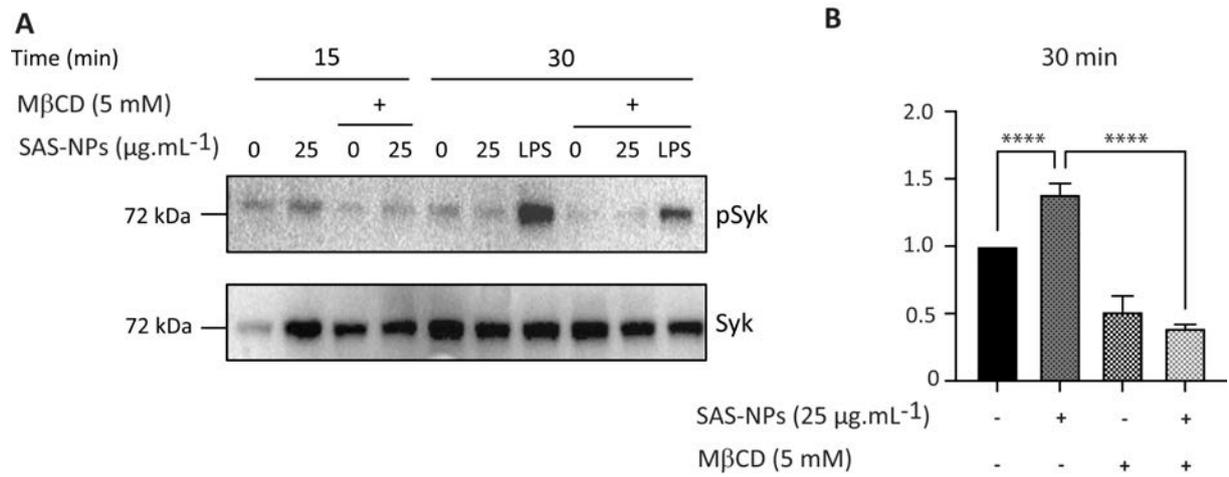


Figure 7



## 1 References

- 2 1. Hochella MF, Mogk DW, Ranville J, Allen IC, Luther GW, Marr LC, et al. Natural,  
3 incidental, and engineered nanomaterials and their impacts on the Earth system. *Science*.  
4 2019 Mar 29;363(6434):eaau8299.
- 5 2. Croissant JG, Butler KS, Zink JI, Brinker CJ. Synthetic amorphous silica  
6 nanoparticles: toxicity, biomedical and environmental implications. *Nat Rev Mater*. 2020  
7 Dec;5(12):886–909.
- 8 3. Zhang H, Dunphy DR, Jiang X, Meng H, Sun B, Tarn D, et al. Processing pathway  
9 dependence of amorphous silica nanoparticle toxicity: colloidal vs pyrolytic. *J Am Chem Soc*.  
10 2012 Sep 26;134(38):15790–804.
- 11 4. Fruijtier-Pölloth C. The toxicological mode of action and the safety of synthetic  
12 amorphous silica-a nanostructured material. *Toxicology*. 2012 Apr 11;294(2–3):61–79.
- 13 5. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), Younes  
14 M, Aggett P, Aguilar F, Crebelli R, Dusemund B, et al. Re-evaluation of silicon dioxide (E  
15 551) as a food additive. *EFSA J*. 2018;16(1):e05088.
- 16 6. Fadeel B. Clear and present danger? Engineered nanoparticles and the immune  
17 system. *Swiss Med Wkly*. 2012;142:w13609.
- 18 7. Feray A, Guillet É, Szely N, Hullo M, Legrand FX, Brun E, et al. Synthetic  
19 Amorphous Silica Nanoparticles Promote Human Dendritic Cell Maturation and CD4+ T-  
20 Lymphocyte Activation. *Toxicol Sci*. 2021 Dec 28;185(1):105–16.
- 21 8. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology  
22 of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767–811.
- 23 9. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*.  
24 1998 Mar 19;392(6673):245–52.
- 25 10. Matzinger P. The evolution of the danger theory. *Expert Rev Clin Immunol*. 2012  
26 May;8(4):311–7.
- 27 11. Pradeu T, Cooper EL. The danger theory: 20 years later. *Front Immunol*. 2012;3:287.
- 28 12. Gallo PM, Gallucci S. The Dendritic Cell Response to Classic, Emerging, and  
29 Homeostatic Danger Signals. Implications for Autoimmunity. *Front Immunol* [Internet]. 2013  
30 Jun 10;4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3677085/>
- 31 13. Fadeel B. Clear and present danger? Engineered nanoparticles and the immune  
32 system. *Swiss Med Wkly* [Internet]. 2012 Jun 17 [cited 2022 Jun 22];(25). Available from:  
33 <https://smw.ch/article/doi/smw.2012.13609>
- 34 14. Arts JHE, Muijser H, Duistermaat E, Junker K, Kuper CF. Five-day inhalation toxicity  
35 study of three types of synthetic amorphous silicas in Wistar rats and post-exposure  
36 evaluations for up to 3months. *Food Chem Toxicol*. 2007 Oct 1;45(10):1856–67.
- 37 15. Sun B, Wang X, Liao YP, Ji Z, Chang CH, Pokhrel S, et al. Repetitive Dosing of  
38 Fumed Silica Leads to Pro-Fibrogenic Effects Through Unique Structure-Activity  
39 Relationships and Biopersistence in the Lung. *ACS Nano*. 2016 Aug 23;10(8):8054–66.
- 40 16. Brandenberger C, Rowley NL, Jackson-Humbles DN, Zhang Q, Bramble LA,  
41 Lewandowski RP, et al. Engineered silica nanoparticles act as adjuvants to enhance allergic  
42 airway disease in mice. *Part Fibre Toxicol*. 2013 Jul 1;10:26.
- 43 17. Han H, Park YH, Park HJ, Lee K, Um K, Park JW, et al. Toxic and adjuvant effects of  
44 silica nanoparticles on ovalbumin-induced allergic airway inflammation in mice. *Respir Res*.  
45 2016;17:60.
- 46 18. Toda T, Yoshino S. Enhancement of ovalbumin-specific Th1, Th2, and Th17 immune  
47 responses by amorphous silica nanoparticles. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2016  
48 Sep;29(3):408–20.
- 49 19. Winkler HC, Kornprobst J, Wick P, von Moos LM, Trantakis I, Schraner EM, et al.  
50 MyD88-dependent pro-interleukin-1 $\beta$  induction in dendritic cells exposed to food-grade

1 synthetic amorphous silica. Part Fibre Toxicol [Internet]. 2017 Jun 23 [cited 2019 May 2];14.  
2 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5481969/>

3 20. Winter M, Beer HD, Hornung V, Krämer U, Schins RPF, Förster I. Activation of the  
4 inflammasome by amorphous silica and TiO<sub>2</sub> nanoparticles in murine dendritic cells.  
5 *Nanotoxicology*. 2011 Sep 1;5(3):326–40.

6 21. Kang K, Lim JS. Induction of Functional Changes of Dendritic Cells by Silica  
7 Nanoparticles. *Immune Netw*. 2012 Jun 30;12(3):104–12.

8 22. Lundqvist M, Stigler J, Cedervall T, Berggård T, Flanagan MB, Lynch I, et al. The  
9 Evolution of the Protein Corona around Nanoparticles: A Test Study. *ACS Nano*. 2011 Sep  
10 27;5(9):7503–9.

11 23. Feray A, Szely N, Guillet E, Hullo M, Legrand FX, Brun E, et al. How to Address the  
12 Adjuvant Effects of Nanoparticles on the Immune System. *Nanomaterials*. 2020  
13 Mar;10(3):425.

14 24. Feray A, Guillet É, Szely N, Hullo M, Legrand FX, Brun E, et al. Synthetic  
15 Amorphous Silica Nanoparticles Promote Human Dendritic Cell Maturation and CD4<sup>+</sup> T-  
16 Lymphocyte Activation. *Toxicol Sci*. 2022 Jan 1;185(1):105–16.

17 25. Ng G, Sharma K, Ward SM, Desrosiers MD, Stephens LA, Schoel WM, et al.  
18 Receptor-independent, direct membrane binding leads to cell surface lipid sorting and Syk  
19 kinase activation in dendritic cells. *Immunity*. 2008 Nov;29(5):807–18.

20 26. Corr EM, Cunningham CC, Dunne A. Cholesterol crystals activate Syk and PI3 kinase  
21 in human macrophages and dendritic cells. *Atherosclerosis*. 2016 Aug;251:197–205.

22 27. Nabhan M, Legrand FX, Le-Minh V, Robin B, Bechara R, Huang N, et al. The  
23 FcγRIIa–Syk Axis Controls Human Dendritic Cell Activation and T Cell Response Induced  
24 by Infliximab Aggregates. *J Immunol*. 2020 Nov 1;205(9):2351–61.

25 28. El-Hillal O, Kurosaki T, Yamamura H, Kinet JP, Scharenberg AM. syk kinase  
26 activation by a src kinase-initiated activation loop phosphorylation chain reaction. *Proc Natl*  
27 *Acad Sci U S A*. 1997 Mar 4;94(5):1919–24.

28 29. Zhang J, Billingsley ML, Kincaid RL, Siraganian RP. Phosphorylation of Syk  
29 Activation Loop Tyrosines Is Essential for Syk Function. *J Biol Chem*. 2000  
30 Nov;275(45):35442–7.

31 30. Sedlik C, Orbach D, Veron P, Schweighoffer E, Colucci F, Gamberale R, et al. A  
32 Critical Role for Syk Protein Tyrosine Kinase in Fc Receptor-Mediated Antigen Presentation  
33 and Induction of Dendritic Cell Maturation. *J Immunol*. 2003 Jan 15;170(2):846–52.

34 31. Williams M, Bruhns P, Saeys Y, Hammad H, Lambrecht BN. The function of Fcγ  
35 receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2014 Feb;14(2):94–108.

36 32. Rosales C, Uribe-Querol E. Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity.  
37 *BioMed Res Int*. 2017;2017:1–18.

38 33. Flach TL, Ng G, Hari A, Desrosiers MD, Zhang P, Ward SM, et al. Alum interaction  
39 with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity. *Nat Med*. 2011  
40 Apr;17(4):479–87.

41 34. Jiang A, Craxton A, Kurosaki T, Clark EA. Different Protein Tyrosine Kinases Are  
42 Required for B Cell Antigen Receptor–mediated Activation of Extracellular Signal–Regulated  
43 kinase, c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal Kinase 1, and p38 Mitogen-activated Protein Kinase. *J Exp Med*.  
44 1998 Oct 5;188(7):1297–306.

45 35. Arrighi JF, Rebsamen M, Rousset F, Kindler V, Hauser C. A critical role for p38  
46 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells  
47 induced by lipopolysaccharide, TNF-α, and contact sensitizers. *J Immunol Baltim Md*  
48 1950. 2001 Mar 15;166(6):3837–45.

49 36. Nakahara T, Uchi H, Urabe K, Chen Q, Furue M, Moroi Y. Role of c-Jun N-terminal  
50 kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells.

- 1 Int Immunol. 2004 Dec;16(12):1701–9.
- 2 37. Boislève F, Kerdine-Römer S, Pallardy M. Implication of the MAPK pathways in the  
3 maturation of human dendritic cells induced by nickel and TNF-alpha. *Toxicology*. 2005 Jan  
4 15;206(2):233–44.
- 5 38. Ade N, Antonios D, Kerdine-Römer S, Boislève F, Rousset F, Pallardy M. NF-kappaB  
6 plays a major role in the maturation of human dendritic cells induced by NiSO(4) but not by  
7 DNCB. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. 2007 Oct;99(2):488–501.
- 8 39. Antonios D, Ade N, Kerdine-Römer S, Assaf-Vandecasteele H, Larangé A, Azouri H,  
9 et al. Metallic haptens induce differential phenotype of human dendritic cells through  
10 activation of mitogen-activated protein kinase and NF-κB pathways. *Toxicol In Vitro*. 2009  
11 Mar 1;23(2):227–34.
- 12 40. Magee T, Pirinen N, Adler J, Pagakis SN, Parmryd I. Lipid rafts: cell surface  
13 platforms for T cell signaling. *Biol Res*. 2002;35(2):127–31.
- 14 41. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*.  
15 2000 Oct;1(1):31–9.
- 16 42. Janes PW, Ley SC, Magee AI. Aggregation of Lipid Rafts Accompanies Signaling via  
17 the T Cell Antigen Receptor. *J Cell Biol*. 1999 Oct 18;147(2):447–61.
- 18 43. Owen DM, editor. *Methods in Membrane Lipids* [Internet]. New York, NY: Springer  
19 New York; 2015 [cited 2022 Jan 25]. (Methods in Molecular Biology; vol. 1232). Available  
20 from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-1752-5>
- 21 44. Pallardy MJ, Turbica I, Biola-Vidammet A. Why the Immune System Should Be  
22 Concerned by Nanomaterials? *Front Immunol*. 2017 May 15;8:544.
- 23 45. Yoshizumi M, Abe J ichi, Haendeler J, Huang Q, Berk BC. Src and Cas Mediate JNK  
24 Activation but Not ERK1/2 and p38 Kinases by Reactive Oxygen Species. *J Biol Chem*. 2000  
25 Apr;275(16):11706–12.
- 26 46. Kerrigan AM, Brown GD. Syk-coupled C-type lectins in immunity. *Trends Immunol*.  
27 2011 Apr;32(4):151–6.
- 28 47. Dennehy KM, Ferwerda G, Faro-Trindade I, Pyż E, Willment JA, Taylor PR, et al.  
29 Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and  
30 Toll-like receptors. *Eur J Immunol*. 2008;38(2):500–6.
- 31 48. Hanzal-Bayer MF, Hancock JF. Lipid rafts and membrane traffic. *FEBS Lett*.  
32 2007;581(11):2098–104.
- 33 49. Horejsi V, Hrdinka M. Membrane microdomains in immunoreceptor signaling. *FEBS*  
34 *Lett*. 2014;588(15):2392–7.
- 35 50. Kara S, Amon L, Lühr JJ, Nimmerjahn F, Dudziak D, Lux A. Impact of Plasma  
36 Membrane Domains on IgG Fc Receptor Function. *Front Immunol* [Internet]. 2020 [cited  
37 2022 Sep 13];11. Available from:  
38 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.01320>
- 39 51. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 1997 Jun  
40 5;387(6633):569–72.
- 41 52. Kajiwara K, Chen PK, Abe Y, Okuda S, Kon S, Adachi J, et al. Src activation in lipid  
42 rafts confers epithelial cells with invasive potential to escape from apical extrusion during cell  
43 competition. *Curr Biol CB*. 2022 Aug 22;32(16):3460-3476.e6.
- 44 53. Kurosaki T, Takata M, Yamanashi Y, Inazu T, Taniguchi T, Yamamoto T, et al. Syk  
45 activation by the Src-family tyrosine kinase in the B cell receptor signaling. *J Exp Med*. 1994  
46 May 1;179(5):1725–9.
- 47 54. Lin X, Lin X, Gu N. Optimization of hydrophobic nanoparticles to better target lipid  
48 rafts with molecular dynamics simulations. *Nanoscale*. 2020 Feb 13;12(6):4101–9.
- 49 55. Lin X, Lin X. Surface ligand rigidity modulates lipid raft affinity of ultra-small  
50 hydrophobic nanoparticles: insights from molecular dynamics simulations. *Nanoscale*. 2021

1 Jun 3;13(21):9825–33.  
2 56. Wei X, Jiang W, Yu J, Ding L, Hu J, Jiang G. Effects of SiO<sub>2</sub> nanoparticles on  
3 phospholipid membrane integrity and fluidity. *J Hazard Mater.* 2015 Apr 28;287:217–24.  
4 57. Mensch AC, Melby ES, Laudadio ED, Foreman-Ortiz IU, Zhang Y, Dohnalkova A, et  
5 al. Preferential interactions of primary amine-terminated quantum dots with membrane  
6 domain boundaries and lipid rafts revealed with nanometer resolution. *Environ Sci Nano.*  
7 2020 Jan 23;7(1):149–61.  
8 58. Pavan C, Sydor MJ, Bellomo C, Leinardi R, Cananà S, Kendall RL, et al. Molecular  
9 recognition between membrane epitopes and nearly free surface silanols explains silica  
10 membranolytic activity. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2022 Sep 1;217:112625.  
11 59. Pavan C, Santalucia R, Leinardi R, Fabbiani M, Yakoub Y, Uwambayinema F, et al.  
12 Nearly free surface silanols are the critical molecular moieties that initiate the toxicity of  
13 silica particles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Nov 10;117(45):27836–46.  
14 60. Croissant JG, Butler KS, Zink JI, Brinker CJ. Synthetic amorphous silica  
15 nanoparticles: toxicity, biomedical and environmental implications. *Nat Rev Mater.* 2020  
16 Dec;5(12):886–909.  
17 61. Pavan C, Tomatis M, Ghiazza M, Rabolli V, Bolis V, Lison D, et al. In Search of the  
18 Chemical Basis of the Hemolytic Potential of Silicas. *Chem Res Toxicol.* 2013 Aug  
19 19;26(8):1188–98.  
20 62. Pavan C, Delle Piane M, Gullo M, Filippi F, Fubini B, Hoet P, et al. The puzzling  
21 issue of silica toxicity: are silanols bridging the gaps between surface states and  
22 pathogenicity? *Part Fibre Toxicol.* 2019 Aug 16;16:32.  
23



# Résultats complémentaires

## I. Introduction

Selon le Réseau National de Surveillance Aérobiologique, près de 25% de la population souffre d'allergies pouvant se manifester sous forme de rhinites ou de crises d'asthme. Les allergènes majeurs mis en cause sont les acariens et le pollen de bouleau (RSNA 2018). S'il a été démontré que les polluants atmosphériques induisaient une inflammation des voies respiratoires et avaient un effet adjuvant sur le développement de la réponse allergique, les connaissances sur les effets des nanomatériaux et leurs interactions possibles avec les allergènes sont encore limitées. Les nanoparticules de silice amorphe (SAS-NP) sont largement utilisées dans les industries pharmaceutique, cosmétique, agro-alimentaire, du bâtiment et des travaux publics (Winkler et al. 2017; EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS) et al. 2018). Les travailleurs ainsi que la population générale sont quotidiennement exposés aux SAS-NP, que ce soit par voie digestive, cutanée mais aussi respiratoire. Les SAS-NP ont été reconnues GRAS (*Generally Recognized As Safe*) par la FDA (*Food and Drug Administration*). Cependant en raison de leur taille nanométrique et de leur large utilisation, une meilleure évaluation de leur toxicité est nécessaire.

Les allergies de type I sont causées par une réponse inappropriée des LT Th2 à des allergènes de l'environnement menant à la production d'IgE dirigées contre l'allergène, au recrutement et à l'activation de cellules pro-inflammatoires (telles que les éosinophiles et les mastocytes) dans les organes cibles (Håkansson et al. 1997; 1998; El Biaze et al. 2003). Parmi les cellules jouant un rôle clé dans l'allergie, les cellules dendritiques sont en première ligne (DC).

Les DC sont des cellules présentatrices d'antigène présentant de grandes capacités d'internalisation (Banchereau et al. 2000). Elles permettent l'échantillonnage constant de leur environnement et agissent comme des sentinelles (Banchereau and Steinman 1998). Les DC résident dans les tissus non lymphoïdes à leur état immature. Lorsqu'un signal de danger les alerte que leur microenvironnement devient dangereux, elles subissent un processus de maturation leur permettant de migrer vers les ganglions lymphatiques régionaux où elles activent la réponse lymphocytaire T (Matzinger 2012; Pradeu and Cooper 2012). Les signaux de danger peuvent être de plusieurs types : les signaux de danger exogènes ou PAMPs sont des motifs moléculaires associés à des agents pathogènes, et les signaux de danger endogènes ou DAMPs, sont libérés par les cellules ayant subi un stress non physiologique ou mortes. Plus récemment, un nouveau modèle de signal de danger a été proposé, les NAMPs exprimés par les nanoparticules et qui restent à définir.

Plusieurs études menées *in vitro* et *in vivo* ont démontré que les nanomatériaux, en particulier les SAS-NP pouvaient se comporter comme des signaux de danger (Gallucci and Matzinger 2001; Gallo and Gallucci 2013; Pallardy, Turbica, and Biola-Vidamment 2017b; Winter et al. 2011).

Des études menées *in vivo* ont montré que les SAS-NP obtenues par voie thermique induisaient une production d'IL-1 $\beta$  chez la souris (Sun et al. 2016). De plus, des travaux menés *in vitro* sur des DC murines ont également montré que la fumée de silice augmentait l'expression de marqueurs de co-stimulation, du CMH-II ainsi que la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 $\beta$  (Winter et al. 2011). Nos résultats précédents ont montré que les SAS-NP pyrolytiques se comportaient comme des signaux de danger immunogènes. Ceci se traduit par une augmentation de l'expression des marqueurs d'activation et de co-stimulation (CD83 et CD86) ainsi que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (CXCL-8 et CXCL-12) par les DC (Feraÿ et al. 2020; 2021). De plus, lors de co-cultures allogéniques, les DC traitées avec les

SAS-NP induisent une augmentation de la prolifération des LT ce qui signifie que la maturation des DC induite par les SAS-NP est fonctionnelle (Feray et al. 2021).

Du fait de leur taille à l'échelle nanométrique et de leurs propriétés physico-chimiques, d'une grande surface spécifique et de leur réactivité de surface, les nanoparticules interagissent différemment avec les systèmes biologiques en comparaison à des particules de taille plus importante du même matériau (Seydoux et al. 2014). Au contact de leur environnement, les nanoparticules interagiront avec les différentes biomolécules présentes (telles que les lipides ou les protéines). Dès qu'elles entreront en contact avec ces dernières, elles formeront alors une « corona » (Docter et al. 2015) dont la nature des composants définira en partie les réponses qui se produiront ensuite lors des interactions cellulaires. La formation de la corona est susceptible d'entraîner une modification des propriétés extrinsèques des nanomatériaux mais aussi une modification de la structure et des fonctions des biomolécules elles-mêmes (Mahon et al. 2012; Radauer-Preiml et al. 2016a). Si la corona est composée d'allergènes, la bioréactivité du complexe nanoparticules/allergène pourra avoir le potentiel de déclencher ou moduler la réponse allergique (Monopoli et al. 2012; Saptarshi, Duschl, and Lopata 2013).

Les propriétés uniques des NP peuvent être exploitées à des fins thérapeutiques mais peuvent également mener à des effets délétères lors de co-expositions environnementales (involontaires) aux allergènes et aux nanoparticules qui sont le sujet de notre étude. Plusieurs études ont évalué les possibilités d'utiliser les NP en tant que vecteurs dans l'immunothérapie allergique (Gómez et al. 2009; Licciardi et al. 2014; Salem 2014). Les NP sont alors utilisées comme système d'administration de l'allergène, ce qui permettra de réduire la dose d'allergène administrée au cours de l'immunothérapie. Les NP sont également exploitées en tant qu'adjuvant, améliorant ainsi la transmission de l'antigène chargé au sein des NP aux cellules immunitaires (Gamazo et al. 2014). L'effet adjuvant des NP peut également être délétère pour

l'organisme, induisant une exacerbation ou la mise en place de pathologies respiratoires telles que l'asthme ou les rhinites allergiques (M. Inoue et al. 2021). Ainsi, il a été montré *in vivo* que les SAS-NP pouvaient jouer le rôle d'adjuvant en induisant une augmentation de la réponse allergique à l'ovalbumine chez la souris.

Suite à l'essor de l'industrie des nanomatériaux, les co-expositions allergènes/nanomatériaux deviennent plus probables. De ce fait, il est nécessaire d'évaluer l'influence des possibles interactions entre les particules présentes dans l'environnement et les allergènes sur la réponse immunitaire à ces derniers. Du fait que la taille globale des nanoparticules n'augmente que marginalement suite à la liaison avec l'allergène, les conjugués nanoparticules/allergène seront toujours inhalés et pourront passer du poumon à la circulation sanguine. Ainsi, le contact avec les cellules immunitaires, et en particulier l'internalisation par ces cellules, sera susceptible d'induire une réponse immunitaire (Nemmar et al. 2002). La recherche sur la co-exposition aux allergènes et aux particules s'est d'abord axée sur les particules d'échappement des moteurs diesels (DEP). De précédentes études ont mis en évidence que les DEP pouvaient se lier à l'allergène majeur du pollen de graminées (Lol p 1), et que les DEP induisaient une augmentation de la production d'IgE spécifiques de l'allergène dans les LB humains transformés par le virus d'Epstein-Barr (EBV) lorsqu'ils sont exposés à différents hydrocarbures aromatiques polycycliques, composants principaux des DEP (Knox et al. 1997; Tsien et al. 1997). A ce jour, seulement peu d'études s'intéressent aux interactions entre les NP et les allergènes.

Une étude a mis en évidence que les nanoparticules d'or (AuNP) pouvaient adsorber à leur surface divers allergènes tels que Phl p 5 (allergène de la fléole des prés), Der p 1 (allergène des acariens) ou encore Bet v 1. L'intégrité et l'accessibilité des épitopes IgE ont été déterminées par le test d'activation des basophiles. Cette étude est, à notre connaissance, la seule étudiant les interactions entre NP et allergènes ainsi que les effets biologiques suite aux interactions NP/allergènes. Une grande variabilité entre les donneurs a été observée avec des réponses similaires, plus

élevées ou plus faibles des basophiles à l'allergène libre versus les mêmes quantités d'allergènes conjugués aux AuNP. Les auteurs ont conclu que :

- En cas de résultats similaires, les épitopes IgE seraient reconnus de manière identique
- En cas d'activation plus faible, la disposition des épitopes à la surface des AuNP serait modifiée, certains épitopes seraient masqués ou les anticorps IgE spécifiques des patients ne seraient pas capables de reconnaître les épitopes présentés avec cette nouvelle disposition.
- En cas d'activation plus élevée, un alignement des allergènes à la surface des AuNP se mettrait en place où les allergènes afficheraient de manière répétitive les mêmes épitopes, ce qui présenterait de manière optimale les épitopes IgE (Radauer-Preiml et al. 2016a).

Une étude plus récente, a quant à elle étudié les interactions entre des SAS-NP obtenues par voie humide et Bet v1a. Elle a mis en évidence que la conjugaison entre les SAS-NP et l'allergène mènerait à une diminution de la stabilité protéolytique de Bet v 1a, induisant une modification de l'abondance de certains épitopes (Johnson et al. 2021).

En Europe, le pollen de bouleau constitue une source majeure d'allergènes aéroportés durant la saison printanière. L'allergie au pollen de bouleau est responsable de rhinoconjonctivites, parfois associées à des conjonctivites ou une hyperréactivité bronchique. Plus de 95% des patients souffrant d'allergies au pollen de bouleau présentent des IgE dirigées contre Bet v 1a, l'allergène majeur du bouleau ou *Betula verrucosa* (Biedermann et al. 2019; Brier et al. 2018). Bet v 1a est une protéine de 17kDa. Sa principale caractéristique est la présence de 7 feuillets  $\beta$  anti-parallèles qui s'enroulent autour d'une hélice  $\alpha$ -C-terminale. L'analyse par cristallographie et RMN de la protéine Bet v 1a a montré qu'elle présentait de

nombreuses isoformes. L'isoforme majoritaire est connue sous le nom de Bet v 1.0101 ou Bet v 1a et sera le sujet de notre étude (Swoboda et al. 1995).

Dans ce contexte, notre travail vise à évaluer *in vitro* si les SAS-NP joueraient un rôle adjuvant dans les pathologies respiratoires allergiques en augmentant la réponse lymphocytaire T à l'allergène majeur du pollen de bouleau, Bet v 1a.

## II. Matériels et méthodes

### A. Nanoparticules de fumée de silice

La fumée de silice (S5505, Sigma) est fournie en poudre sous forme de particules primaires de 14 nm de diamètre formant des chapelets en forme de chainettes. La solution de fumée de silice est reconstituée dans de l'eau ultrapure filtrée à une concentration de 50 mg.mL<sup>-1</sup>. Elle est chauffée à 80°C sur la nuit pour éviter les contaminations. La solution de fumée de silice est conservée à température ambiante et est soniquée avant usage dans un bain à ultrasons pendant 15 minutes. Elle est ensuite vortexée et diluée à la concentration voulue dans le milieu RPMI 1640 complété par du Glutamax, 1mM de sodium pyruvate, 0,1 ng.mL<sup>-1</sup> de streptomycine et 100 U.mL<sup>-1</sup> de pénicilline. Les éventuelles contaminations par des endotoxines ont été analysées à l'aide du test LAL (Limulus amebocyte lysate) (GenScript, Piscataway, NJ, USA). Tous les lots ont montré des valeurs inférieures au seuil de positivité (0,05 EU.mL<sup>-1</sup>).

### B. Caractérisation des nanoparticules

Le diamètre hydrodynamique des particules a été déterminé à 25°C par diffusion dynamique de la lumière (DLS) à l'aide d'un Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Orsay, France) fonctionnant à un angle de diffusion fixe de 90° et équipé d'une source laser hélium-néon d'une longueur d'onde de 633 nm. Les mesures ont été effectuées dans des cuvettes jetables de 4 mL avec un chemin optique de 1 cm et quatre faces optiques (Sarstedt, Marnay, France) contenant un volume approprié (1 mL) de l'échantillon, préparé comme décrit ci-dessus, après une dilution à 125 µg.mL<sup>-1</sup> dans le milieu souhaité. Les valeurs du diamètre hydrodynamique ont été calculées en utilisant l'équation de Stokes-Einstein en supposant une forme

sphérique des particules. Le profil granulométrique a été obtenu à partir de la distribution pondérée en intensité et la valeur du diamètre hydrodynamique correspond au diamètre médian dérivé de la courbe de distribution cumulative. Les mesures de potentiel  $\zeta$  ont été réalisées avec le même instrument par vélocimétrie laser doppler à un angle de détection de  $17^\circ$  dans des cuvettes jetables DTS 1060 (Malvern Instruments, Orsay, France) chargées de 1 mL de chaque échantillon dilué à  $375 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  dans le milieu souhaité. En raison de la force ionique des échantillons menant à une conductivité élevée, les mesures ont été effectuées en utilisant le mode monomodal et l'approximation de Smoluchowski a été utilisée pour convertir la mobilité électrophorétique en potentiel  $\zeta$ . Les valeurs obtenues sont la résultante des valeurs moyennes de dix mesures. Nous avons effectué la caractérisation avant et après le chauffage à  $80^\circ\text{C}$ . Les résultats (DLS et potentiel  $\zeta$ ) n'ont montré aucune différence significative, confirmant que la stérilisation n'altère pas les caractéristiques physico-chimiques des SAS-NP (données non présentées).

### C. Betula verrucosa (Bet v 1a) commercial

Bet v 1a (RP-BV1-1, Indoor biotechnologies) est un allergène recombinant garanti sans endotoxines. Les cellules dendritiques sont incubées en présence de  $10 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  de Bet v 1a pendant 1 heure avant le traitement par la fumée de silice.

### D. Expression et purification de Bet v 1a recombinant (rBet v 1a)

Le plasmide pET-11a contenant le gène de l'allergène majeur du bouleau nous a été donné par le Dr. Thessa Jacob du département « Biocopolymers » de l'Université de Bayreuth. Un séquençage du plasmide a confirmé qu'il contenait la séquence codante pour Bet v 1a. L'insertion du plasmide a lieu par choc thermique (30 minutes dans la glace, 30 secondes au bain marie à  $42^\circ\text{C}$ ) dans des souches BL21(DE3) d'*Escherichia coli*. Ces dernières permettent de produire l'allergène. Le plasmide pET-11a contient

un gène sélectif de résistance à l'ampicilline. L'induction se fait à une DO de 0,6 pour des mesures faites à 600 nm en ajoutant de l'IPTG (1mM). 4 heures après l'induction, les bactéries sont centrifugées (5500g, 10 minutes, 4°C).

Les culots bactériens correspondant à 1 L de culture sont resuspendus en tampon Tris (15 mL, 20 mM, pH 8) additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche), de 1 mg de DNase (Sigma-Aldrich, DN25-100MG) et de lysozyme (Sigma-Aldrich, L-6876). La lyse est ensuite réalisée à l'aide d'un désintégrateur (2000 bars). Le lysat est centrifugé (19000 g, 30 min, 4 °C). Le surnageant est filtré à 0,22 µm. La solution obtenue est purifiée par chromatographie échangeuse d'ions. Elle est alors injectée sur une colonne échangeuse d'anions (5 mL, Q XL Sepharose) installée sur un système de chromatographie (AKTA pure) et éluée avec un gradient (10, 15, 20 et 100 %) de tampon (20 mM Tris à pH 8, 300 mM NaCl). Les fractions récoltées sont analysées par gel SDS-PAGE (Gel BioRad 4-15%, 18 puits, Stain Free). Le logiciel UNICORN nous indique la correspondance entre les fractions et le volume récupéré en sortie de colonne. Les fractions contenant rBETV1 sont rassemblées et concentrées (vivaspinn turbo 10kD, 3000 g, 10 min) jusqu'à obtenir un volume de 10 mL. Une chromatographie à exclusion de taille est réalisée. Les fractions précédentes sont filtrées (0.22 µm) puis injectées sur une colonne (SEC Superdex 75). Les fractions récoltées sont analysées par gel SDS-PAGE (Gel BioRad 4-15%, 18 puits, Stain Free). Les fractions contenant rBETV1 sont rassemblées. La concentration en rBETV1 est déterminée grâce à un spectrophotomètre (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo scientific,  $\epsilon_{280\text{nm}}=10\ 430\ \text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). La solution est ensuite aliquotée et congelée à -20 °C. Les endotoxines présentes dans la solution rBet v 1a sont éliminées grâce au kit Proteus NoEndo S (Clinisciences) permettant de réduire la concentration d'endotoxines jusqu'à des taux inférieurs à 0.05 EU.mL<sup>-1</sup>.

### E. Marquage fluorescent de rBet v 1a

Le marquage fluorescent de rBETV1 est réalisé avec un kit (Invitrogen, Alexa Fluor 488 TFP ester). Pour marquer la protéine, nous avons suivi les instructions fournies par le fabricant. 25  $\mu\text{L}$  de protéine purifiée ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) en tampon bicarbonate de sodium ( $0.1 \text{ M}$ ,  $\text{pH } 8.3$ ) sont incubés pendant 15 minutes à température ambiante avec 5  $\mu\text{L}$  d'Alexa Fluor 488 TFP ester. Les allergènes marqués et l'excès d'Alexa Fluor 488 TFP ester sont séparés avec une résine de purification présente dans le kit. rBETV1 marqué est stocké à l'abri de la lumière à  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . L'intensité de fluorescence du rBETV1 marqué est mesurée avec un lecteur de plaque (Synergy HT, Biotec) en enregistrant le spectre d'émission de 510 à 700 nm avec un pas de 2 nm et un gain de 100 après excitation à 480 nm.

### F. Isolement et différenciation des cellules dendritiques humaines dérivées de monocytes

Les moDC sont isolées à partir de prélèvement de sang de donneurs sains. Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) obtenues à partir de sang total (Etablissement Français du sang, Ile de France, Rungis) sont séparées sur gradient de Ficoll. Les monocytes sont isolés par purification magnétique positive (CD14, MicroBeads human, Milteny Biotec) et cultivés pendant 4 jours à une densité de 1 million de cellules/mL dans un milieu RPMI 1640 complémenté par du Glutamax®, 1mM de pyruvate de sodium,  $0,1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de streptomycine,  $100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  de pénicilline et 10% de sérum de veau fœtal (SVF). Le RPMI décrit à 10% de SVF est appelé milieu RPMI complet. L'ajout de GM-CSF (Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor) ( $550 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) et d'interleukine (IL)-4 ( $550 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) permet la différenciation des monocytes en cellules dendritiques immatures (moDC). La différenciation est évaluée par cytométrie en flux en quantifiant l'expression de marqueurs de surface : CD1a (CD1aPE/ Mouse IgG1PE, BD Biosciences), DC-SIGN (DC-SIGNAPC/Mouse

IgG2bAPC, BD Biosciences), CD86 (CD86FITC/ Mouse IgG1FITC, BD Biosciences) et CD83 (CD83APC/ Mouse IgG1APC, BD Biosciences).

CD1a et DC-SIGN sont des marqueurs des moDC immatures alors que CD86 et CD83 sont des marqueurs de co-stimulation et d'activation de la DC mature. Pour que les moDC puissent être utilisées pour nos expériences, les différents marqueurs devront répondre aux critères suivants : CD83 < 5%, CD86 < 35%, CD1a > 70% et DC-SIGN > 90%.

### G. Analyse du phénotype

Après une heure de traitement avec  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , les DC sont stimulées avec  $12.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de SAS-NP pendant 16 heures puis la viabilité et le phénotype sont analysés par cytométrie en flux. La viabilité cellulaire, mesurée par l'iodure de propidium (Invitrogen, Californie, USA) n'a jamais été en dessous de 70%. Pour l'analyse phénotypique, la procédure de marquage de surface se déroule comme suit :  $2 \times 10^5$  cellules.mL<sup>-1</sup> sont lavées dans du PBS froid supplémenté avec 0.5% de BSA et marqués avec les anticorps monoclonaux (mAbs) à l'abri de la lumière, à 4°C pendant 20 minutes. Les mAbs suivant ont été utilisés avec les isotypes appropriés : CD80<sup>FITC</sup> (557226, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), CD83<sup>PE</sup> (556855, BD Biosciences), CD86<sup>APC</sup> (555660, BD Biosciences). Les cellules ont été analysées par un cytomètre Attune Nxt (Invitrogen) et le logiciel FlowJo (version 10; FlowJo LLC, Oregon, USA). L'acquisition des données a été réalisé sur un minimum de  $10^4$  cellules vivantes. Les résultats sont exprimés sous forme d'intensité de fluorescence relative (RFI) en utilisant l'intensité de fluorescence moyenne corrigée (MFIc) selon la formule suivante  $\text{MFIc} = \text{MFI} - \text{MFI du contrôle isotypique}$  ;  $\text{RFI} = \text{MFIc des cellules traitées} / \text{MFIc des cellules non traitées}$ .

## H. Modèle de co-culture autologue

Le modèle de co-culture autologue est un modèle dans lequel les moDC sont issues du même donneur que les LT CD4<sup>+</sup> (figure 3). Les moDC sont isolées de la même manière que décrit précédemment. Les lymphocytes T (LT) naïfs CD4<sup>+</sup> sont isolés par purification magnétique négative (Naive CD4<sup>+</sup> T cell Isolation Kit II human, Milteny Biotec). La pureté du tri est évaluée par la mesure de l'expression des marqueurs CD4, CD45RA et CCR7 par cytométrie en flux et est supérieure à 92%. Les moDC immatures sont incubées dans du RPMI sans sérum en présence de Bet v 1a à 10 µg.mL<sup>-1</sup> pendant une heure, puis 12,5 µg.mL<sup>-1</sup> de fumée de silice ou du LPS sont ajoutés. Après une heure, le milieu est complété avec 10% de Sérum humain AB. Les moDC sont ensuite lavées et mises en culture avec les LT naïfs CD4<sup>+</sup> au ratio 1/10 en présence d'IL-6 (10000 U.mL<sup>-1</sup>, R&D Systems) et d'IL-12 (10 ng.mL<sup>-1</sup>, R&D Systems). Les moDC non chargées sont celles qui n'ont pas subi de traitement. Les moDC chargées, quant à elles, sont les moDC qui sont incubées avec les nanoparticules ou un autre traitement (Bet v 1a). Pour notre étude, les moDC sont dans un premier temps stimulées une heure avec Bet v 1a. Puis, 12.5 µg.mL<sup>-1</sup> SAS-NP sont ajoutées ou non en fonction des conditions de stimulation. Les LT CD4<sup>+</sup> naïfs sont restimulés à trois reprises à 7 jours d'intervalle avec des DC chargées comme décrit précédemment en présence d'IL-2 (60 U.mL<sup>-1</sup>, R&D Systems) et d'IL-7 (5 ng.mL<sup>-1</sup>, R&D Systems). Ainsi, la moitié des LT CD4<sup>+</sup> est restimulée avec des DC stimulées avec Bet v 1 a seul et l'autre moitié avec des DC stimulées avec Bet v 1a et 12.5 µg.mL<sup>-1</sup> de SAS-NP.

### I. ELISpot IFN-γ

Une semaine après la dernière restimulation, un ELISpot interféron (IFN)-γ est réalisé afin de détecter les lignées lymphocytaires spécifiques de Bet v 1. Des plaques de nitrocellulose (96 puits, Millipore) sont coatées avec un anticorps de capture IgG1

humain anti-IFN- $\gamma$  pendant une nuit à 4°C à 2,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Les plaques sont ensuite saturées avec du milieu de culture Iscove complet pendant une nuit à 4°C. Après 16 heures de stimulation des LT CD4+ par les DC, les cellules sont éliminées et un anticorps secondaire biotinylé IgG1 murin-anti-IFN- $\gamma$  est ajouté pendant 2 heures à 37°C qui sera, après lavage, couplé à de l'extravidine HRP (Horse Radish Peroxydase). Les spots sont ensuite révélés par ajout du substrat nitro-blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate (NBT/BCIP). Les spots sont comptés avec un lecteur de plaque ELISpot AID (Autoimmun Diagnostika). Une lignée de LT correspond à un puits où les LT sont mis en co-culture et restimulés par les moDC. Une lignée LT CD4+ est considérée spécifique lorsque le nombre de spots est supérieur au moins au double de celui des conditions contrôles (moDC non chargées) avec un minimum de 30 spots. Une fréquence d'événements rares (les lignées de LT naïves spécifiques de l'antigène) est calculée par l'intermédiaire de la loi de poisson.

$$\text{Fréquence} = \frac{-\ln(\text{nombre de puits négatifs}/\text{nombre total de puits testés})}{\text{nombre de LT par puit}}$$

#### J. Analyse par immunoblot

Après une heure de traitement avec 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de Bet v 1, les DC ont été incubées pendant 30 minutes avec les SAS-NP à 12.5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  et lavées avec du PBS froid avant d'être lysées. Les cellules ont été lysées dans un tampon de lyse (40 mM Tris HCl ; pH 7,4 ; 274 mM NaCl ; 4 mM EDTA ; 2% Triton X-100 ; 4mM Pyrophosphate de sodium ; 20% Glycérol et H<sub>2</sub>O) auquel ont été ajoutés des inhibiteurs de phosphatases et de protéases (aprotinine 1 mg.mL<sup>-1</sup> ; leupeptine 1 mg.mL<sup>-1</sup> ; phénylmethylsulfonylfluorure 0,1M ; orthovanadate de sodium 100 mM ; pepstatine 10 mg.mL<sup>-1</sup> ; 1,5%  $\beta$ -glycérophosphate). Trente microgrammes de protéines dénaturées ont été chargés sur des gels SDS-PAGE à 10% et transférés sur des membranes de nitrocellulose, celles-ci ont été incubées avec un anticorps dirigé contre Bet v 1. Les bandes immunoréactives ont été détectées par leur chimioluminescence à l'aide du système

ChemiDoc XRS+ (Laboratoires Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France). Les bandes ont été quantifiées avec le logiciel ImageLab.

#### K. Vidéomicroscopie

Les cellules ont été déposées dans des chambres à fond de verre 8 puits (Ibidi, GmbH) et ont été incubées pendant une heure avec Bet v 1-Alexa Fluor 488, puis une heure avec les SAS-NP à  $12.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dans un incubateur XL à  $37^{\circ}\text{C}$  avant observation microscopique. Les images ont été acquises avec une caméra Prime BSI sCMOS (Teledyne Photometrics) (taille des pixels  $6,5 \times 6,5 \mu\text{m}$ ) et un objectif à immersion à huile Plan-Paochromat 63x/1.4 Numerical Perture (NA) équipé d'un dispositif DIC (Differential interferential contrast) monté sur un vidéomicroscope à épifluorescence inversé AxioObserver Z1-Colibri (Carl Zeiss, Allemagne).

Une diode électroluminescente (LED) de 470 nm pour l'excitation et un filtre Band-Pass de 505-550 nm ont été utilisés pour recueillir l'émission de fluorescence et les images ont été analysées avec le logiciel ImageJ (NIH, U.S.A).

#### L. Analyses statistiques

Les comparaisons entre les données ont été réalisées par un test de Mann-Whitney, à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Pour les données de fréquence d'événements rares, la comparaison entre les groupes a été réalisée à l'aide du test de facteurs appariés de Wilcoxon. Lorsque les données étaient conformes au test de normalité (test de Shapiro Wilk), un test ANOVA apparié et paramétrique a été réalisé.

### III. Résultats

#### A. Bet v 1a seul n'active pas les DC

Afin d'évaluer l'effet des SAS-NP dans l'immunisation contre Bet v 1a, il est nécessaire que l'allergène choisi dans notre modèle n'ait pas lui-même un effet signal de danger. Cela a guidé notre choix pour cet allergène, bien décrit dans la littérature. Nous avons vérifié dans un premier temps l'absence d'effet dans notre modèle, étape préalable indispensable avant de réaliser des co-expositions avec les nanoparticules. Les cellules ont été traitées une heure avec Bet v 1a seul ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) puis les SAS-NP ont été ajoutées ou non à la concentration de  $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  pendant 16 heures. L'expression des marqueurs de surface d'activation et de co-stimulation a alors été évaluée par cytométrie en flux. Les résultats montrent (figure 26) que Bet v 1a n'augmente pas l'expression des marqueurs d'activation et de co-stimulation, contrairement aux SAS-NP ou au contrôle positif LPS (figure 26).

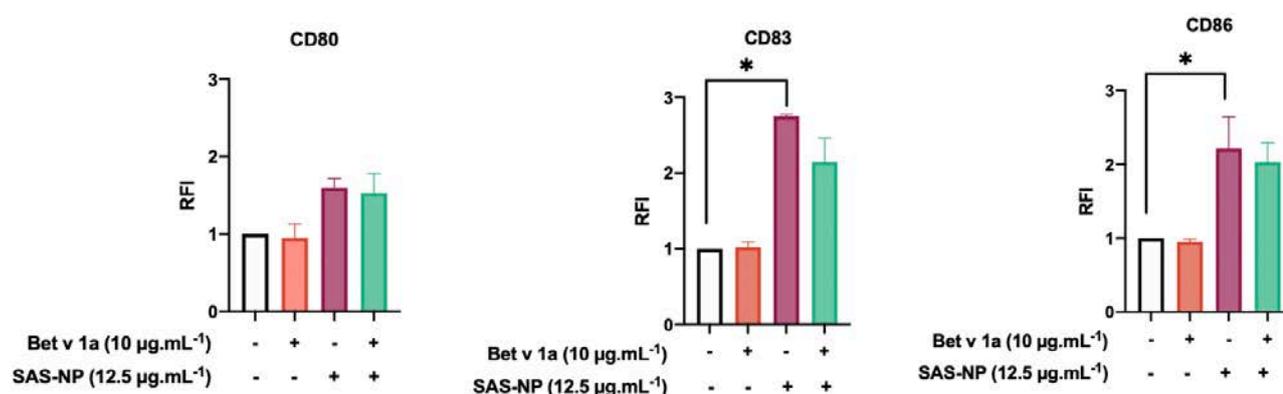
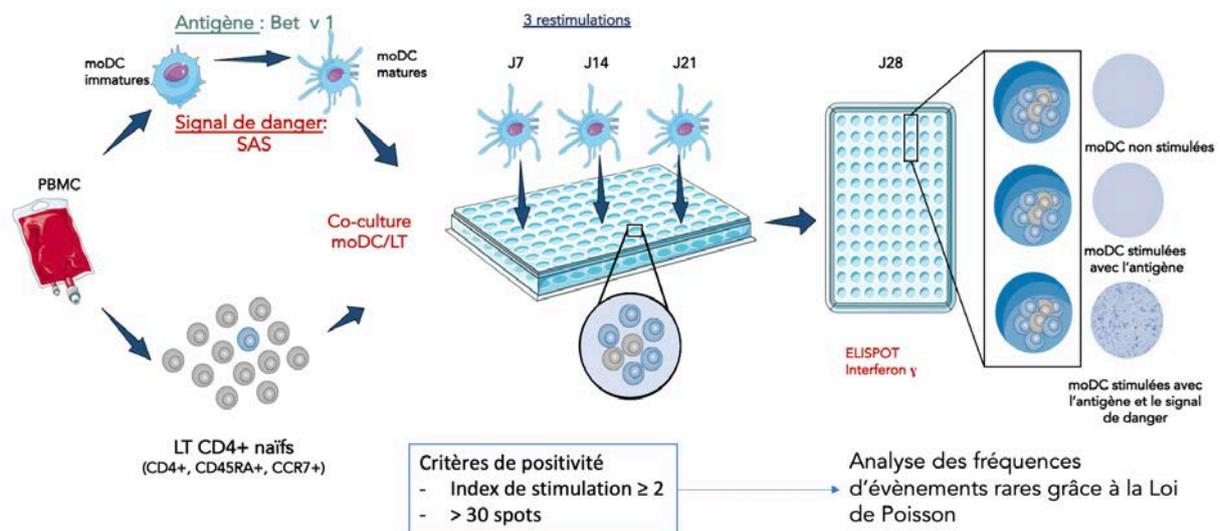


Figure 26 - Bet v 1a seul n'active pas les DC

Les moDC ont été traitées ou non pendant une heure avec  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  Bet v 1a seul puis  $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de SAS-NP ont été ajoutées. Les cellules ont été récupérées, lavées et l'expression des marqueurs de surface a été analysée par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en intensité de fluorescence relative (RFI) en comparaison aux cellules non stimulées et représentés en moyenne  $\pm$  écart-type. Les résultats de 3 expériences indépendantes sont représentés. \* :  $p < 0,05$ , one-way anova, test de Kruskal-Wallis.

B. Les SAS-NP augmentent l'activation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs reconnaissant Bet v 1a.

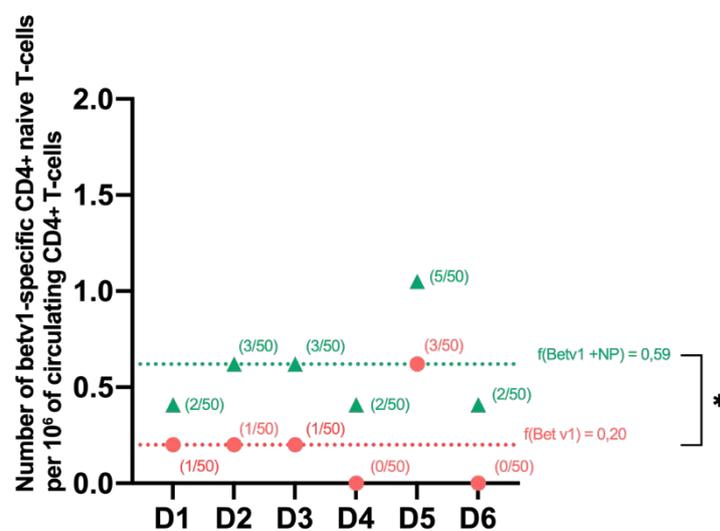
Dans un premier temps, nous avons souhaité évaluer l'effet des SAS-NP sur l'immunisation contre l'allergène Bet v 1a. Pour cela, nous avons cherché à mettre en évidence la présence d'un répertoire de LT capable de reconnaître Bet v 1a et si ce dernier était modifié lorsque les DC étaient stimulées avec les SAS-NP. Le modèle de co-culture autologue de moDC et de LT CD4<sup>+</sup> naïfs a été utilisé afin d'évaluer l'influence d'une exposition aux SAS-NP sur la fréquence de LT CD4<sup>+</sup> naïfs spécifiques de Bet v 1a. Les moDC traitées par Bet v 1a ont été exposées ou non aux SAS-NP puis mises en co-culture avec les LT CD4<sup>+</sup> naïfs. Un schéma récapitulatif du protocole global est montré dans la figure suivante (figure 27).



**Figure 27** - Schéma récapitulatif du protocole de co-culture autologue de cellules dendritiques et de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs.

Nous avons réalisé des co-cultures autologues de moDC et LT CD4<sup>+</sup> pour 6 donneurs différents. Ces co-cultures nous ont permis de détecter un répertoire de LT CD4<sup>+</sup> naïfs reconnaissant Bet v 1a chez 5 des 6 donneurs (D1, D2, D3, D5 et D6) avec une fréquence moyenne de 0,21 LT CD4<sup>+</sup> naïfs spécifiques de Bet v 1 par million de LT CD4<sup>+</sup> naïfs circulants. D'autre part, nous avons également pu détecter un plus grand

répertoire de LT CD4<sup>+</sup> naïfs reconnaissant Bet v 1a chez chacun des 6 donneurs testés en présence de SAS-NP avec une fréquence moyenne de 0,59 LT CD4<sup>+</sup> naïfs spécifiques de Bet v 1 par million de LT CD4<sup>+</sup> naïfs circulants (figure 28). Ces résultats suggèrent que la fréquence de LT CD4<sup>+</sup> reconnaissant Bet v 1 serait plus élevée en présence de SAS-NP. Les SAS-NP pourraient jouer un rôle adjuvant dans la réponse des LT CD4<sup>+</sup> naïfs dirigée contre l'allergène Bet v 1a.

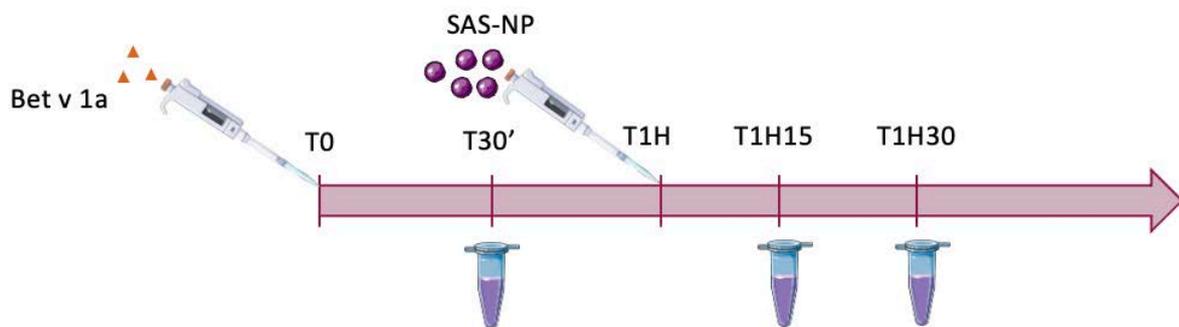


**Figure 28** - Fréquence de LT CD4<sup>+</sup> naïfs spécifiques de Bet v 1a en présence ou en absence de SAS-NP.

Les moDC sont incubées pendant 1 heure avec 10 µg.mL<sup>-1</sup> de Bet v 1a en présence ou en absence de 12.5 µg.mL<sup>-1</sup> de SAS-NP pendant 16 heures. Les moDC sont ensuite lavées puis mises en co-culture avec des LT CD4<sup>+</sup> naïfs autologues avec un rapport DC : LT de 1 : 10 en présence d'IL-12. La moitié des lignées LT CD4<sup>+</sup> naïves est restimulée avec les moDC exposées à Bet v 1 et l'autre moitié avec les moDC exposées à Bet v 1a et aux SAS-NP. L'activation des LT CD4<sup>+</sup> reconnaissant Bet v 1a est mesurée après 3 semaines de restimulation par la technique ELISpot IFN-γ. Les résultats représentent la fréquence de LT CD4<sup>+</sup> naïfs reconnaissant Bet v 1a par million de LT CD4<sup>+</sup> naïfs circulants et est calculée grâce à la loi de Poisson. Le graphique représente les données de 6 expériences indépendantes : \*p<0,05, analyse statistique par le test de facteurs appariés Wilcoxon.

### C. Les SAS-NP favorisent l'internalisation de l'allergène Bet v 1a

La suite de notre étude a consisté à comprendre quelle serait l'origine de la modification du répertoire de LT CD4<sup>+</sup> spécifiques de Bet v 1a observée précédemment. Nous avons formulé l'hypothèse que les SAS-NP jouaient un rôle dans la prise en charge de l'allergène par les moDC. En effet, il a été décrit dans la littérature que les nanoparticules se recouvraient de biomolécules présentes dans leur environnement pour former une corona (Barbero et al. 2017). Ces biomolécules peuvent également être des allergènes présents lors de l'exposition aux nanoparticules (Docter et al. 2015; Radauer-Preiml et al. 2016a). Ainsi, les molécules entrant dans la composition de la corona pourront être internalisées lorsque les NP le seront selon un effet de type cheval de Troie. Pour explorer cette hypothèse, nous avons exposé les cellules pendant 1 heure avec Bet v 1a seul puis nous avons ajouté ou non des SAS-NP selon le schéma suivant (figure 29).

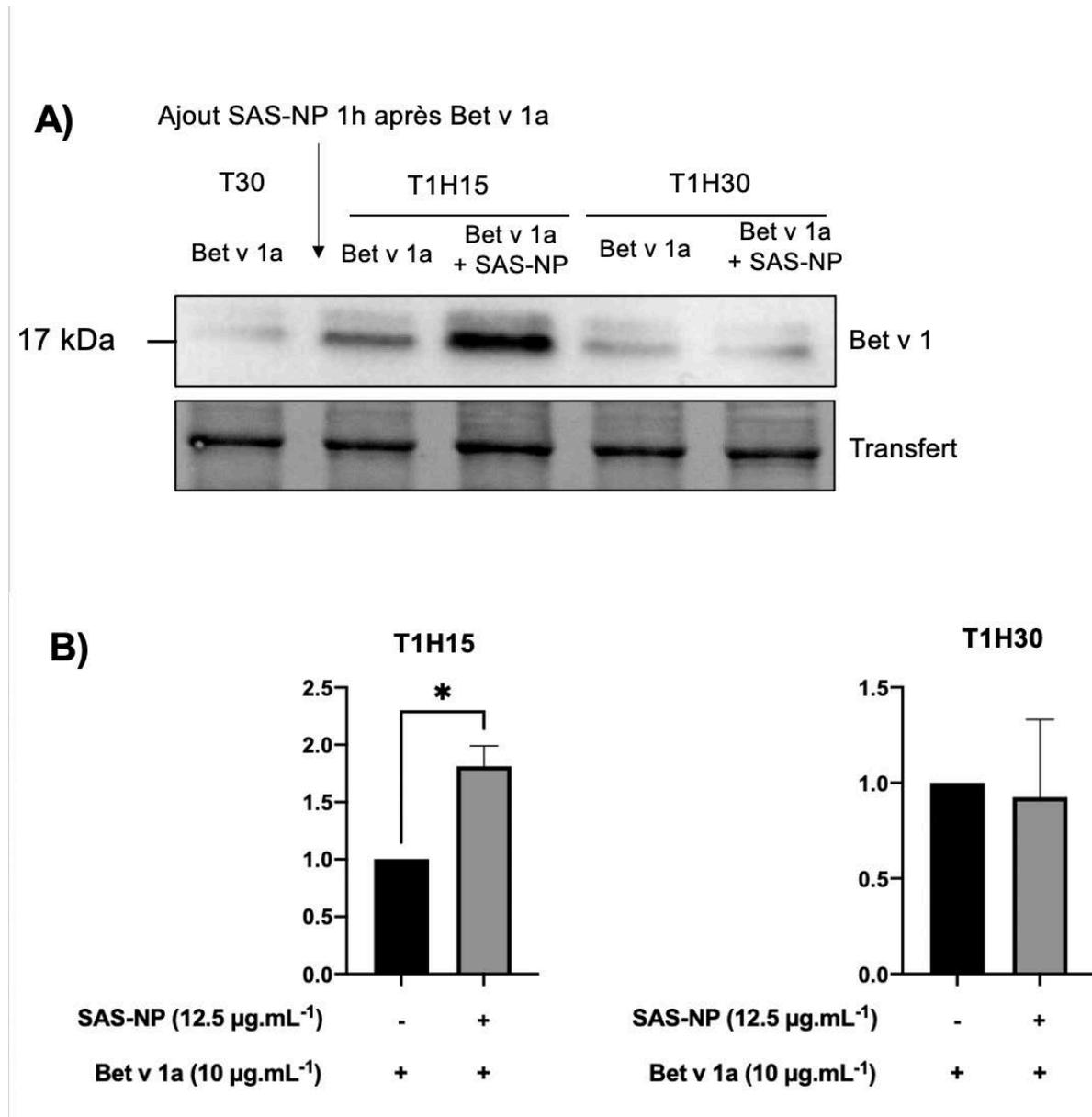


**Figure 29** - Premier scénario d'exposition des moDC à l'allergène Bet v 1a et aux SAS NP.

Les moDC ont été incubées pendant une heure avec l'allergène seul à 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  puis 12.5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de SAS NP ont été ajoutées. Après 30 minutes, 1h15 et 1h30 les cellules sont récupérées, culottées et lysées pour faire des extraits protéiques totaux.

Nous avons mesuré par Western blot la cinétique d'entrée de Bet v 1a en présence ou en absence de SAS-NP. Pour cela, les moDC traitées avec Bet v 1a pendant 1 h ont été exposées ou non aux SAS-NP pendant 15 et 30 minutes. Dès 15 minutes, dans

les moDC exposées à Bet v 1a puis aux SAS-NP nous détectons une quantité de Bet v 1 intracellulaire significativement plus importante que dans les moDC exposées à Bet v 1a seul (figure 30).

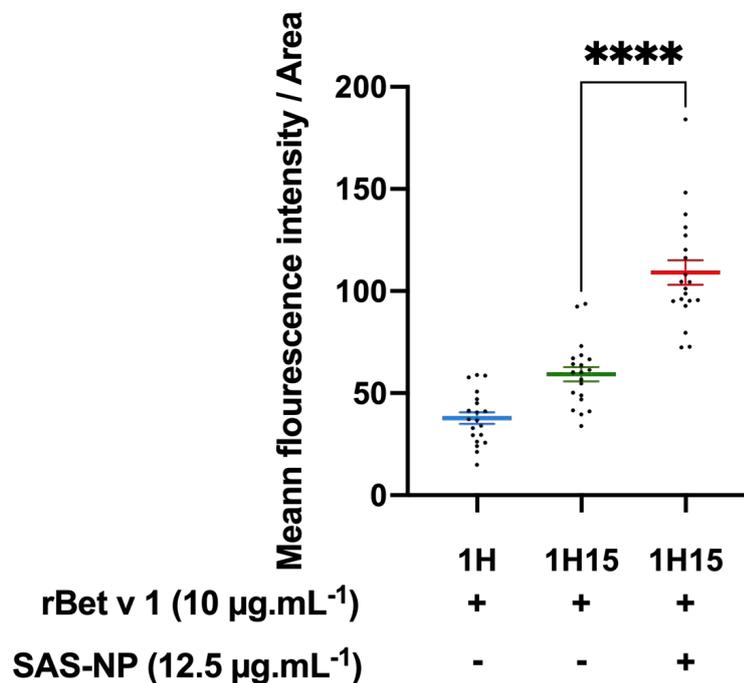


**Figure 30** - Cinétique d'entrée de Bet v 1a dans les moDC lors du premier scénario d'exposition.

Les moDC ont été traitées pendant une heure avec 10 µg.mL<sup>-1</sup> Bet v 1a seul puis 12.5 µg.mL<sup>-1</sup> de SAS-NP ont été ajoutées. Un Western-Blot des extraits protéiques totaux a été réalisé pour quantifier Bet v 1a. Les résultats de 3 expériences indépendantes sont représentés. Les bandes ont été quantifiées à l'aide du logiciel ImageLab. Les résultats sont exprimés comme

étant le rapport de l'intensité des bandes des cellules traitées divisé par l'intensité des bandes des cellules non traitées. \* :  $p < 0.05$ , one-way anova, test de Kruskal-Wallis.

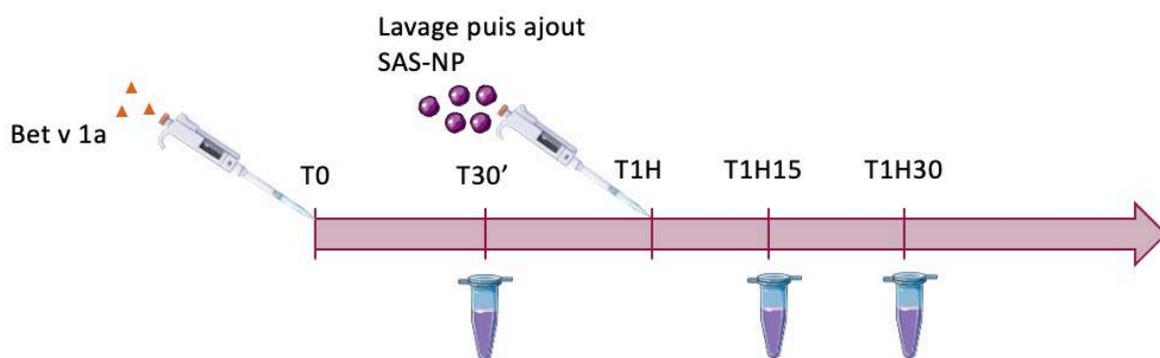
Pour compléter notre observation et effectuer une cinétique d'internalisation plus fine sur des cellules vivantes, nous avons évalué l'internalisation de rBet v 1a marqué à l'Alexa Fluor 488 par vidéomicroscopie. Nous avons comparé l'internalisation de rBet v 1a fluorescent en présence ou en absence de SAS-NP. Le scénario d'exposition est celui présenté figure X3. Pour mémoire, les moDC sont exposées pendant 1 heure à Bet v 1a seul puis  $12.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de SAS-NP sont ajoutées ou non. Nous observons qu'en présence de SAS-NP, la fluorescence moyenne de rBet v 1a retrouvée dans les moDC est plus importante qu'en absence de SAS-NP (Figure 31). Ce résultat concorde avec les résultats observés précédemment, suggérant que les SAS-NP favoriseraient l'internalisation de l'allergène par les moDC lors d'une co-exposition SAS-NP/Bet v 1.



**Figure 31** - Évaluation de l'internalisation de rBet v 1a fluorescent par les moDC.

Les moDC ont été traitées pendant une heure avec  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  rBet v 1a fluorescent seul puis  $12.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de SAS-NP ont été ajoutés. L'internalisation de rBet v 1a a été mesurée par l'intensité moyenne de fluorescence corrigée par l'aire dans 20 cellules. Test de Student apparié, \*\*\*\*  $p < 0,001$ .

Pour aller plus loin dans notre raisonnement, nous nous sommes demandé si les SAS-NP pouvaient faciliter l'entrée de Bet v 1a dans les cellules. Pour tester cette hypothèse, nous avons modifié le scénario d'exposition. Les moDC ont été incubées pendant une heure avec Bet v 1a seul puis lavées. Ensuite, les SAS-NP ont été ajoutées ou non pendant 15 et 30 minutes comme décrit dans la figure 32. Nous postulons que le lavage des cellules avant l'ajout des SAS-NP permet d'éliminer Bet v 1a présent dans le milieu extracellulaire.

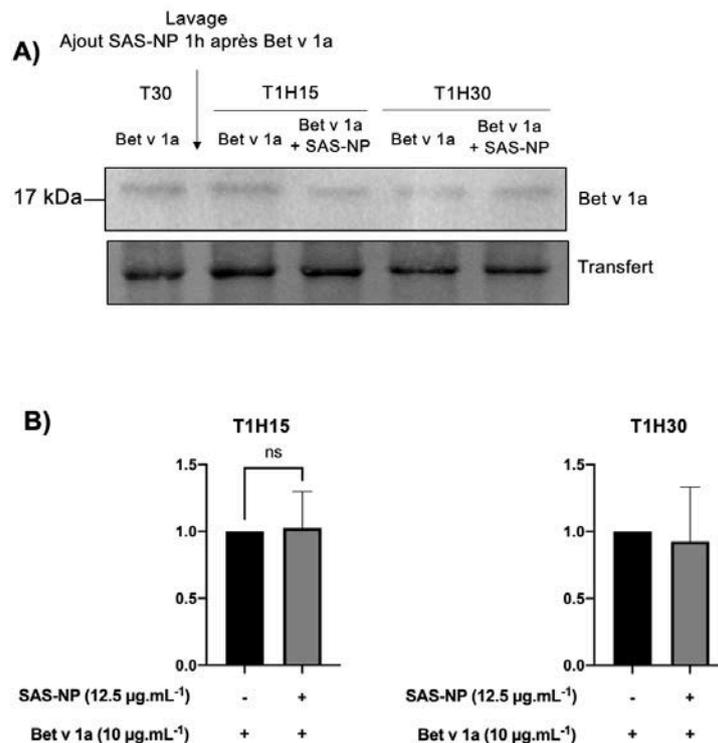


**Figure 32** - Second scénario d'exposition des moDC à l'allergène Bet v 1a et aux SAS-NP.

Les moDC sont incubées pendant une heure avec l'allergène seul à  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . A l'issue de la première heure, les cellules sont lavées avec du milieu dépourvu d'allergène. Suite au lavage,  $12.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de SAS-NP sont ajoutées. Aux temps 30 minutes, 1h15 et 1h30 les échantillons sont récupérés pour faire des extraits protéiques totaux.

Avec ce nouveau scénario d'exposition, nous avons ré-évalué par Western blot la cinétique d'entrée de Bet v 1a en présence ou en absence de SAS-NP. Les moDC pré-traitées avec Bet v 1a ont donc été exposées ou non aux SAS-NP pendant 15 et 30 minutes après lavage. Nous n'avons plus observé de différence significative entre les conditions avec et sans SAS-NP (figure 33). De plus, l'intensité de la bande Bet v 1a détectée à 30 minutes semble être comparable à celle détectée au même temps dans le scénario d'exposition n°1 (figure 29). L'étape de lavage semble bien permettre d'éliminer les quantités de Bet v 1a extracellulaire non internalisées. Nous observons

que lorsque cette étape est réalisée, il n'y a pas d'augmentation de Bet v 1a intracellulaire lors de l'ajout des SAS-NP. Ce résultat suggère que lorsque Bet v 1 n'est pas présent dans le milieu extracellulaire, les SAS-NP n'induisent plus d'augmentation significative de l'internalisation de Bet v 1. Ainsi, nous supposons que Bet v 1 se lierait aux SAS-NP, ce qui favoriserait son internalisation.

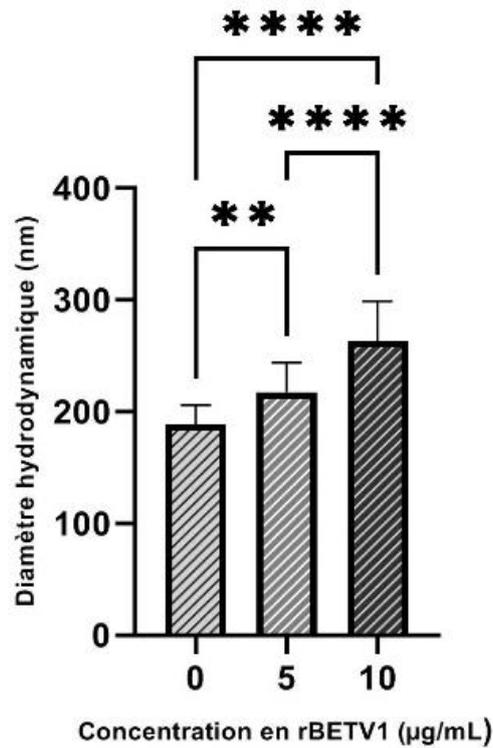


**Figure 33** - Cinétique d'entrée de Bet v 1 dans les moDC lors du second scénario d'exposition.

Les moDC sont traitées pendant une heure avec 10 µg.mL<sup>-1</sup> Bet v 1 seul, lavées, puis 12.5 µg.mL<sup>-1</sup> de SAS-NP sont ajoutées. Un Western-Blot des extraits protéiques totaux a été réalisé pour quantifier Bet v 1a. Les résultats de 4 expériences indépendantes sont représentés. Les bandes ont été quantifiées à l'aide du logiciel ImageLab. Les résultats sont exprimés comme étant le rapport de l'intensité des bandes des cellules traitées divisée par l'intensité des bandes des cellules non traitées. \* : p<0.05, one-way anova, test de Kruskal-Wallis.

#### D. L'allergène rBet v 1a se lie à la surface des SAS-NP

La littérature et les résultats précédemment obtenus suggèrent que l'allergène Bet v 1 pourrait se lier aux SAS-NP et entrer dans la composition de la corona. Sur la base de ce que l'équipe de Radauer-Preiml *et al.* a étudié sur la formation d'une corona de Bet v 1 autour d'AuNP (Radauer-Preiml *et al.* 2016), nous avons souhaité évaluer si les SAS-NP interagissaient avec Bet v 1a et si ce dernier pouvait entrer dans la composition de la corona des SAS-NP. Nous avons réalisé des mesures de DLS des SAS-NP en présence ou en absence de rBet v 1a (5 ou 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) dans le milieu de culture en absence de sérum de veau fœtal (SVF). Les mesures ont été réalisées en absence de SVF car ce dernier s'adsorbe sur les NP et pourrait interférer dans la mesure de la taille en présence de rBet v 1a. Le diamètre hydrodynamique moyen des SAS-NP seules est de  $189 \pm 16\text{nm}$ . Lorsque nous ajoutons 5 et 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de rBet v 1a, les diamètres hydrodynamiques moyens sont respectivement de  $218 \pm 18$  et  $263 \pm 35\text{ nm}$  (figure 34). Le diamètre hydrodynamique augmente de manière significative avec l'ajout de rBet v 1a et ce de manière dépendante de la concentration. Ces résultats nous permettent de confirmer les résultats précédemment observés suggérant que les SAS-NP interagiraient avec Bet v 1 en se liant à leur surface. Nous avons précédemment montré que les SAS-NP étaient internalisées par les moDC. Ainsi, lors de la liaison de rBet v 1a aux SAS-NP, l'allergène serait internalisé par les moDC en plus grande quantité en comparaison à l'allergène non lié aux SAS-NP selon un effet cheval de Troie.



**Figure 34** - Diamètre hydrodynamique des SAS-NP en fonction de la concentration de rBet v 1a.

Les SAS-NP sont incubées avec 5 ou 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de rBet v 1a, le diamètre hydrodynamique est ensuite mesuré par DLS. 5 mesures sur chaque échantillon sont réalisées. Les résultats de 4 expériences sont représentés et exprimés en moyenne  $\pm$  écarts-types. Test Anova, \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*\*  $p < 0,001$ .

# Discussion générale

La constante augmentation de l'utilisation des nanoparticules manufacturées dans de nombreuses industries soulève des interrogations sur leur toxicité et les risques liés à leur manipulation comme à leur usage. En effet, le marché des nanomatériaux manufacturés est en plein essor avec un volume mondial compris entre 150 et 200 milliards d'euros en 2018 (Laux et al. 2018). La silice amorphe quant à elle se place au deuxième rang des nanomatériaux manufacturés produits et/ou importés en France par année (ANSES 2020). Elle est reconnue comme GRAS par la FDA et comme ne présentant pas d'effet majeur sur la santé dans le cadre du règlement REACH. Cependant, elle représente un des plus gros volumes de nanomatériaux manufacturés dans le monde avec plus de 155 000 tonnes produites et/ou importées par an en France. Nous avons fait le choix d'étudier plus particulièrement la fumée de silice, une silice amorphe synthétique obtenue par voie thermique utilisée dans l'alimentation en tant qu'additif alimentaire mais également dans l'industrie du bâtiment et des travaux publics afin d'améliorer les propriétés rhéologiques du béton. Du fait de ces utilisations, de nombreux travailleurs y sont exposés quotidiennement par voie respiratoire.

Notre travail a permis d'étudier les effets pro-allergisants des SAS-NP en évaluant leurs interactions avec les DC mais également les conséquences sur la réponse lymphocytaire T dirigée contre l'allergène majeur de pollen de bouleau Bet v 1a. Dans un premier temps, nous avons étudié l'impact de l'exposition aux SAS-NP sur les DC et les conséquences fonctionnelles sur la réponse lymphocytaire T, puis nous avons souhaité comprendre plus en détail le mécanisme de reconnaissance des SAS-NP en tant que signal de danger. Dans un second temps, nous avons évalué dans quelle mesure les SAS-NP pouvaient augmenter l'immunisation à l'allergène majeur du pollen de bouleau, Bet v 1a.

L'ensemble de ces résultats devrait donner lieu à quatre publications : un premier article a été publié dans *Nanomaterials* en 2020, un deuxième article dans *Toxicological Sciences* en 2021, le troisième vient d'être soumis à *Particle and Fibre Toxicology*, et un quatrième article est en préparation. Une revue est également en cours d'écriture sur les NAMPs.

## I. Évaluation des mécanismes cellulaires impliqués dans la réponse des cellules dendritiques humaines et des lymphocytes T aux nanoparticules de silice amorphe.

La première partie de notre travail a consisté à évaluer si les SAS-NP se comportaient comme un signal de danger et à en rechercher les mécanismes.

Comme évoqué précédemment, très peu de données sont disponibles sur l'effet des SAS-NP sur le système immunitaire humain. Pour pallier ce manque de données, nous avons évalué *in vitro* l'effet des SAS-NP sur la réponse de DC et LT humains. Nous avons d'abord accordé une attention particulière à la mise au point des conditions expérimentales.

### A. Mise au point des conditions expérimentales

#### 1. Choix des nanoparticules

Nous avons sélectionné une silice pyrogénée (SIGMA S5505) et une silice colloïdale Ludox TMA® comme silices modèles d'origine industrielle, initialement dans le cadre d'un projet financé par l'ANSES appelé "Silimmun". Ces nanoparticules ont fait l'objet de plusieurs publications récentes de notre part (Feray et al. 2020) et de nos collaborateurs (Dalzon et al. 2017; Dussert et al. 2020; Anaëlle Torres et al. 2020; Anaëlle Torres et al. 2020). Nous avons également travaillé sur les nanomatériaux de référence NM-202 du Joint Research Center (JRC) afin de disposer d'une silice pyrogénique de référence entièrement caractérisée. Les silices SIGMA S5505 et NM-

202 sont issues de la même voie de synthèse : la voie thermique. La silice colloïdale, quant à elle, est issue de la synthèse par voie humide. Nous avons mis en évidence que les trois silices testées ont un profil similaire d'activation phénotypique et de sécrétion de cytokines par les DC. Sur la base de ces résultats, et pour des raisons liées aux conditions expérimentales, nous avons fait le choix d'effectuer nos études mécanistiques sur un seul type de SAS-NP, les SIGMA S5505.

## 2. Préparation des NP

Nous avons effectué une « stérilisation » des nanoparticules pendant 8 h à 80 °C. Le test LAL a été réalisé avant et après ce processus de stérilisation. Avant stérilisation, les résultats étaient de 0,20415 EU.mL<sup>-1</sup> et après stérilisation 0,008771 EU.mL<sup>-1</sup>, bien en dessous du seuil de positivité des endotoxines (0,05 EU.mL<sup>-1</sup>). Ces résultats confirment la nécessité de stériliser les préparations de nanoparticules de silice pyrogénée pour éliminer les endotoxines et s'assurer que les effets observés sur les DC sont ceux des SAS-NP et non ceux des endotoxines. Nous avons par ailleurs réalisé la caractérisation avant et après chauffage à 80°C. Les résultats (DLS et potentiel zêta) n'ont pas montré de différence significative. Cette méthode n'altère donc pas les caractéristiques des SAS-NP.

## 3. Modèle cellulaire

L'originalité de nos travaux repose sur l'utilisation d'un modèle de cellules dendritiques issues de monocytes humains de donneurs sains. Dans la littérature, plusieurs études rapportent les effets des SAS-NP sur les macrophages, humains ou murins, car leurs capacités phagocytaires les exposent préférentiellement aux agents exogènes (Fedeli et al. 2013; Tsugita et al. 2017). De plus, ils font partie des cellules clés du système immunitaire capables de participer à l'immunité innée en tant que défense non spécifique et à l'immunité adaptative grâce au phénomène d'opsonisation. Nos collaborateurs dans le projet Silimmun, puis Allergosil financés

par l'ANSES, s'intéressent particulièrement aux effets des SAS-NP sur ces cellules, notamment dans un contexte d'expositions répétées à faible dose représentatives d'une exposition professionnelle. Nous avons choisi de travailler sur d'autres cellules phagocytaires professionnelles, les DC, en nous focalisant sur les cellules humaines, ce qui est très rare dans la littérature. En effet, jusqu'à présent une seule équipe avait évalué l'effet des SAS-NP sur les DC humaines, et ce travail concernait la silice mésoporeuse (Vallhov et al. 2007). Nous en reparlerons plus loin dans ce chapitre. Les autres études menées sur les SAS-NP utilisent majoritairement des cellules dendritiques murines (Winter et al. 2011; Winkler et al. 2017). Ce modèle permet une première évaluation des effets des SAS-NP sur la réponse immunitaire. Cependant, la distinction entre les différentes sous-populations de DC et leurs équivalences entre l'homme et la souris reste sujet à discussion. L'extrapolation à l'Homme des données obtenues sur des DC murines reste donc hasardeuse (Hargadon 2016). Dans ce contexte, il nous a semblé bien plus pertinent d'évaluer les effets toxiques des SAS-NP sur un modèle de DC humaines, malgré les difficultés inhérentes à l'approvisionnement et à la variabilité interindividuelle.

Notre modèle de cellules dendritiques est issu de monocytes, isolés à partir de donneurs humains sains, et différenciés en présence de facteurs de croissance et de cytokines (GM-CSF et IL-4). Ceci nous permet d'obtenir des DC présentant des similarités physiologiques, morphologiques et fonctionnelles avec les stades immatures des DC humaines (Hargadon 2016; Wen et al. 2021; Hardonnière et al. 2022). De plus, elles peuvent être activées en DC matures lors de l'exposition à des signaux de danger, ce qui en fait un modèle de choix pour évaluer l'impact des SAS-NP.

La plupart des articles qui décrivent l'effet des SAS-NP sur les DC s'intéressent à l'internalisation, l'activation et la réaction inflammatoire (Winter et al. 2011; Kang and Lim 2012; Winkler et al. 2017). Les études citées ici ont notamment mis en évidence

que les SAS-NP produites par voie thermique induisaient dans les DC murines une production d'IL-1 $\beta$ . L'équipe de Winkler *et al.* a aussi proposé que les DC immatures répondaient à l'exposition aux SAS-NP par une induction *de novo* de la pro-IL-1 $\beta$  résultant en une augmentation de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  mature. Leur approche n'est cependant pas suffisante pour vraiment caractériser l'impact des SAS-NP sur la réponse immunitaire. Il est nécessaire d'étudier les conséquences fonctionnelles des modifications phénotypiques des DC sur la réponse lymphocytaire T. En effet, la réponse immunitaire adaptative ne sera complète que si les DC activées sont capables d'induire la prolifération de LT. Afin d'évaluer les effets des SAS-NP sur la réponse immunitaire adaptative, il convient donc d'évaluer leurs effets sur le phénotype des DC mais aussi sur la prolifération des LT.

#### 4. Temps d'exposition

Les temps d'exposition utilisés dans la littérature pour évaluer les effets des SAS-NP sont généralement compris entre 16 et 24 heures (Winter *et al.* 2011; Winkler *et al.* 2017). Du fait de la cytotoxicité des SAS-NP et de la courte durée de vie des DC humaines *in vitro*, les temps d'incubation ne doivent pas excéder 24 heures. Pour mener notre étude, nous avons choisi d'exposer les DC aux SAS-NP pendant 16 heures car ce temps permet d'observer sans ambiguïté les changements phénotypiques dans nos expériences tout en restant en dessous d'un seuil de toxicité acceptable.

#### 5. Évaluation de la cytotoxicité

Nous avons précédemment examiné très attentivement l'interférence des nanoparticules sur les tests de cytotoxicité et la cytométrie de flux. A cette fin, et en suivant la SOP ('SOP V.I.G.O' 2022), sur les conseils de Cordula Hirsch, nous avons mis au point les conditions des tests pour éviter ce biais expérimental.

La cytotoxicité a été examinée après coloration à l'iodure de propidium (IP) par cytométrie en flux. Les SAS-NP pourraient interagir elles-mêmes avec l'IP en raison de leur forte réactivité de surface et ainsi fausser les résultats de viabilité cellulaire (Vallhov et al. 2007). Après le traitement des cellules avec des concentrations croissantes de SAS-NP, le marquage a été réalisé avant ou après lavage des cellules. Nos résultats montrent qu'en l'absence de l'étape de lavage, une forte fluorescence peut être mesurée (ce qui correspondrait à environ 80% de mortalité cellulaire), indépendamment de la concentration en nanoparticules (données non présentées). Cependant, lorsque les cellules ont été lavées avant la coloration par l'IP, une augmentation dose-dépendante de la fluorescence a été observée (données non présentées). Pour confirmer la validité de ces résultats, nous avons également étudié la viabilité cellulaire par exclusion au bleu trypan comme méthode complémentaire. Les DC ont été incubées avec 0, 12.5, 25 ou 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de SAS-NP pendant 16 heures (dont une heure sans SVF). Les résultats nous ont permis de confirmer ceux obtenus avec le marquage par l'IP (données non présentées). En conclusion, les SAS-NP interagissent effectivement avec l'IP, mais l'étape de lavage du protocole permet d'éviter cette interférence.

Nous avons retenu un seuil de cytotoxicité de 30%. Même si ce seuil peut sembler arbitraire, il a été fixé sur la base de nombreux résultats expérimentaux obtenus au laboratoire. Il est sensiblement le même que celui (25%) retenu pour le test de sensibilisation cutanée hCLAT (OECD 2022) réalisé sur la lignée THP-1. Si nous dépassons un certain seuil de cytotoxicité, nous ne mesurons plus l'effet des NP mais l'effet des DAMPs libérés au cours de la mort cellulaire. Notre expérience au laboratoire a permis d'établir que ce seuil assure le maintien de la fonctionnalité des DC (Feray et al. 2020).

Enfin, nous avons choisi de tester les nanoparticules au même niveau de cytotoxicité plutôt qu'à la même concentration, ce qui permet d'aborder la comparaison de nanoparticules de propriétés différentes sur la base de critères biologiques.

#### 6. Conditions d'exposition

Une originalité de notre protocole expérimental est que les DC sont exposées aux SAS-NP en absence de sérum au cours de la première heure d'exposition. Cette étape a été pensée afin de limiter l'agrégation des nanoparticules au début de l'incubation ainsi que la formation de corona, en particulier avec les protéines sériques. Puis le milieu de culture est supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal afin de permettre la survie des cellules exposées. Si ce schéma expérimental ne semble pas représentatif de la réalité des expositions aux SAS-NP *in vivo*, il nous a permis d'améliorer la sensibilité de nos expériences. Contrairement aux produits chimiques, l'évaluation *in vitro* de la toxicité des NP est fortement impactée par la présence de SVF, par la formation d'une corona de protéines. Nous avons trouvé nécessaire de minimiser l'impact de ces protéines sériques en effectuant une courte incubation d'une heure dans un milieu sans sérum.

Nous avons également étudié l'impact du sérum humain AB décomplémenté (SAB) en comparaison au SVF sur les modifications phénotypiques des DC induites par les SAS-NP. Les résultats nous permettent d'émettre l'hypothèse que les composants du milieu en présence de SAB n'induisent pas de modification significative des de la réponse des SAS-NP en comparaison à un milieu en présence de SVF (données non présentées).

## B. Les SAS-NPs induisent une maturation fonctionnelle des cellules dendritiques humaines

### 1. Modifications phénotypiques des DCs humaines

L'activation des DC par les SAS-NP est marquée par l'augmentation des marqueurs CD83, CD86 et CXCR4. Le marqueur CD83 est décrit dans la littérature comme le marqueur de surface caractéristique des DC matures (Lechmann et al. 2002; Prechtel and Steinkasserer 2007). De plus, les marqueurs de co-stimulation tels que CD40, CD80 et CD83 sont fréquemment utilisés dans la littérature en tant que marqueurs d'une maturation complète de DC (Banchereau et al. 2000). Le récepteur CXCR4 lie quant à lui la chimiokine CXCL12 qui joue un rôle dans la migration des DC matures des vaisseaux lymphatiques vers les ganglions lymphatiques régionaux (Kabashima et al. 2007; Pozzobon et al. 2016). Le marqueur HLA-DR peut également être utilisé comme un indicateur du processus de maturation des DC immatures. Cependant, le modèle de DC humaines utilisé au cours de notre étude présente une forte expression basale du HLA-DR. De ce fait, il est nécessaire d'exprimer les résultats en *Relative Fluorescence Intensity* (RFI) et non en pourcentages de cellules positives pour quantifier les modifications de son expression suite à la stimulation des DC par les SAS-NP (Feray et al. 2020). Nous observons également une augmentation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires telles que CXCL-8 et CXCL-12. La capacité des SAS-NP à induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et CXCL-8 a été précédemment démontrée dans des lignées de cellules épithéliales humaines (Hetland et al. 2001; Gualtieri et al. 2012). De plus, il a été montré dans la lignée de macrophages RAW647.7 que les SAS-NP augmentaient l'expression des gènes de l'IL-1, de l'IL-6 et du TNF- $\alpha$  (E.-J. Park and Park 2009).

Les résultats obtenus dans l'article n°1 mettent en évidence un profil d'activation des DC ainsi qu'une sécrétion de cytokines très comparables avec les trois SAS-NP testées, issues de deux voies de synthèse différentes. Ceci suggère qu'il existerait un déterminant commun aux trois SAS-NP responsable de la maturation des DC. Pour

explorer ces aspects, nous projetons, dans le cadre du projet Allergosil soutenu par l'ANSES, de mettre en place des expériences afin de comparer les effets de plusieurs silices pyrogénées et précipitées commerciales, de surfaces spécifiques identiques ou différentes, ayant subi ou non un traitement de surface afin de réduire la densité de silanols. Nous avons déjà mené des expérimentations préliminaires sur les cellules THP-1 qui ont montré que des silices précipitées comme pyrogénées pouvaient induire des changements phénotypiques alors que la densité de silanols des silices pyrogénées est de moins de  $1/\text{nm}^2$ . Les silices précipitées et pyrogénées qui présentaient des propriétés physicochimiques très proches en termes de taille des particules primaires (14nm) et de surface spécifique ( $200 \text{ m}^2/\text{g}$ ) ont donné des résultats très comparables. Cependant et de manière très intéressante, en ce qui concerne une silice précipitée de plus faible surface spécifique ( $36 \text{ m}^2/\text{g}$ ) ayant reçu un traitement de surface, la réduction de la densité de silanols de 60 à moins de  $10/\text{nm}^2$  semble diminuer la capacité d'activation des cellules (données non présentées). Ces observations, même préliminaires, montrent qu'un travail plus approfondi est nécessaire pour mieux comprendre le rôle des différentes caractéristiques physicochimiques sur l'activation des DC.

Une autre équipe s'était intéressée à l'effet de SAS-NP sur le phénotype des cellules dendritiques humaines. Cependant, l'étude menée par l'équipe de Valhov *et al.* a été réalisée sur des particules de silice mésoporeuse qui présentent une structure de pores unique et une surface spécifique extrêmement importante (respectivement 520 et  $547 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$  pour l'AMS-6 et l'AMS-8). De plus, la taille des particules de l'AMS-6 est de 270 nm alors que celle de l'AMS-8 est de 2,5  $\mu\text{m}$ . Les seules particules qui modifient significativement l'expression de CD86 sont les AMS-8 (Vallhov *et al.* 2007). Avec la taille des pores à l'échelle nanométrique (3,9 et 2,8 nm pour AMS-6 et AMS-8 respectivement), et en accord avec la définition ISO des matériaux nanostructurés comme ayant une structure interne ou de surface de l'ordre du nanomètre (ISO, 2008), ces particules peuvent probablement être considérées comme des nanomatériaux

(Fruijtier-Pöllöth 2012). Néanmoins, l'effet sur la fonction des DC a été décrit dans de nombreux rapports comme dépendant de la taille, et pourrait affecter la viabilité, l'absorption et les marqueurs de régulation immunitaire. En raison de ces propriétés physico-chimiques inhabituelles, la silice mésoporeuse est développée pour l'administration de médicaments et comme adjuvant dans les vaccins. C'est dans cette perspective que s'inscrit le travail de l'équipe de Vallhov alors que notre travail relève d'une démarche d'évaluation des effets immunotoxiques d'une exposition involontaire et passive à des nanoparticules de silice amorphe utilisées dans des produits de consommation ou dans l'industrie, comme la fumée de silic ou la silice colloïdale. A cette fin, nos expériences ont été conçues pour proposer un modèle *in vitro* robuste de la réponse immunitaire innée humaine basé sur l'utilisation de cellules dendritiques primaires.

## 2. Évaluation de la fonctionnalité de la maturation

Les DC phénotypiquement matures ne favorisent pas toujours la mise en place de la réponse T. La conséquence fonctionnelle de la maturation des DC est l'activation des LT et leur prolifération, qui ne sont possibles qu'après une interaction avec les DC activées. Nous avons souhaité évaluer la conséquence des modifications phénotypiques des DC sur la réponse lymphocytaire T. A notre connaissance, seulement peu d'études ont évalué la réponse des LT en plus de l'étude phénotypique. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle de co-culture allogénique dans lequel l'antigène reconnu par les LT est le CMH allogénique. Nos résultats ont montré une augmentation statistique de la prolifération des LT. Ce résultat suggère que la maturation des DC induite par les SAS-NP est fonctionnelle. Elle est accompagnée d'une augmentation de la sécrétion de cytokines telles que l'IL-17A/F et IL-9. L'IL-5 est également augmentée mais de façon non significative. Ces résultats sont cohérents avec le phénotype pro-inflammatoire observé dans nos résultats précédents. La production de ces cytokines suggère une orientation des LT en

phénotype Th2 et Th17. Certains auteurs ont étudié cette polarisation. Schanen *et al.* ont montré que les modifications phénotypiques de moDC induites par les NP de TiO<sub>2</sub> pouvaient orienter la réponse des LT vers une réponse pro-inflammatoire de type Th1 (Schanen *et al.* 2013). Il a aussi été montré que les SAS-NP mésoporeuses dans un modèle de moDC induisaient une polarisation des LT via la production d'IFN- $\gamma$ , d'IL-4 et d'IL-13. Dans cette étude, la polarisation a été évaluée dans un modèle de co-cultures autologues de moDC et LT CD4<sup>+</sup> naïfs à l'aide d'un essai ELISpot spécifiques de chaque cytokine testée (IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, ou IFN- $\gamma$ ). (Vallhov *et al.* 2012). Afin d'évaluer la polarisation induite par les SAS-NP dans notre modèle, une perspective de notre travail est de mettre au point une co-culture autologue non polarisée permettant d'identifier les cytokines sécrétées en réponse aux SAS-NP par un dosage de cytokines présentes dans le surnageant de culture.

Dans la littérature, seules quelques études ont eu recours au modèle de co-culture DC :LT allogénique afin d'évaluer si la maturation des DC liée à l'exposition aux NP était fonctionnelle (D. Yang *et al.* 2010; Vallhov *et al.* 2012; Schanen *et al.* 2013; Barillet *et al.* 2019). Cependant les résultats de la plupart des études sont majoritairement orientés sur les études de modification phénotypique. Certaines études se sont intéressées également à la réponse lymphocytaire consécutive à l'exposition des DC à des NP. Ainsi, des NP de Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) ont induit une maturation des DC sans effet sur la prolifération des LT dans un modèle de co-culture allogénique (Barillet *et al.* 2019). Une différence de la puissance du signal de danger utilisé mais aussi les cytokines sécrétées pourraient expliquer le fait que certaines NP sont capables d'induire une maturation fonctionnelle des DC et d'autres non.

### 3. Les SAS-NPs : signal de danger ?

Les résultats obtenus au cours de cette étude suggèrent que les SAS-NP joueraient le rôle de signal de danger. Cela semble corroborer l'hypothèse des NAMPs (Fadeel

2012; Pallardy, Turbica, and Biola-Vidamment 2017). Cependant, cette notion reste abstraite, car contrairement aux PAMPs, les NAMPs ne sont probablement pas des motifs conservés, mais polymorphes. La littérature ne décrit pas encore la manière dont les NP se comportent en tant que NAMPs. A la différence des PAMPs et DAMPs (Pradeu and Cooper 2012) qui sont reconnus par des PRR exprimés dans plusieurs compartiments cellulaires tels que les TLR ou les NLR (Athman and Philpott 2004; Delneste, Beauvillain, and Jeannin 2007), à notre connaissance de tels récepteurs ne sont pas décrits pour les NAMPs. Cependant, les récepteurs scavenger ont été décrits dans les macrophages comme reconnaissant les silices cristalline et amorphe (Orr et al. 2011; Tsugita et al. 2017).

Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées. Les SAS-NP déclencheraient la reconnaissance et la signalisation endosomale associée à la protéine MyD88. Les SAS-NP seraient internalisées puis reconnues par les TLR endosomaux associés à MyD88. Ceci induirait une production *de novo* d'IL-1 $\beta$  ainsi que l'activation des DC (Winkler et al. 2017). Plus récemment, une autre hypothèse a été proposée.

Les SAS-NP induiraient la production de DAMPs tels que HMGB1, une protéine constitutive de la chromatine libérée dans le milieu extracellulaire en situation de stress. Comme évoqué dans la partie introductive du travail (Chap.3, I,C,1), les DAMPs sont libérés par des tissus ou cellules endommagés ou ayant subi un stress. Dans les cellules HUVEC, des SAS-NP, dont le procédé d'obtention n'est pas précisé, favoriseraient le relargage de ROS et activeraient l'inflammasome NLRP3. Ceci mènerait à une augmentation de l'expression d'HMGB1. De plus, les SAS-NP favoriseraient la translocation d'HMGB1 vers le cytoplasme ainsi que sa sécrétion. HMGB1 extracellulaire se lierait au TLR2 puis activerait la voie MyD88 et NF- $\kappa$ B (X. Liu et al. 2021b).

Aussi, comme décrit dans l'introduction, au contact de leur environnement, les NP se recouvrent de certains de ses composants. La nature de ces derniers définira en partie les réactions qui se produiront par la suite. En fonction des procédés de synthèse, les

NP peuvent être recouvertes d'endotoxines bactériennes ou de lipopolysaccharides (Vallhov et al. 2006). Certaines NP peuvent aussi se recouvrir de DAMPs ou de PAMPs (Hubbell, Thomas, and Swartz 2009). Enfin, une dernière hypothèse serait que la réactivité de surface des SAS-NP serait essentielle pour qu'elles exercent leur effet signal de danger. En effet, l'équipe de Sun *et al.* a montré que la modification de la surface de SAS-NP pyrogénées par la présence de groupements titane mène à une réduction de la densité des groupements OH à leur surface, induisant ainsi une diminution de la production d'ERO dans des cellules THP-1 *in vitro* et une amélioration de l'inflammation pulmonaire aiguë chez des souris C57BL/6. Ceci se traduit par une diminution des neutrophiles et de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  dans le liquide de lavage broncho alvéolaire (Sun et al. 2016). Les hypothèses pouvant s'appliquer à nos travaux seraient notamment la reconnaissance des NAMPs par un mécanisme dépendant d'un récepteur ou non menant à l'activation des DC par l'intermédiaire des groupements présents à la surface des SAS-NP.

### C. Mécanismes de l'effet signal de danger

Dans ce contexte, l'objectif suivant a été de comprendre par quels mécanismes les SAS-NP induisent l'effet signal de danger observé dans la première partie de notre travail et quelles sont les voies de signalisation impliquées.

#### 1. Voies de signalisation impliquées

Nos résultats ont montré que les SAS-NP utilisées induisent une maturation complète et fonctionnelle des DC qui se traduit également par une phosphorylation tardive des MAPK JNK et p38 respectivement à 90 et 120 minutes. Les MAPK ont largement été décrites comme étant impliquées dans la maturation des DC en réponse à divers stimuli tels que des molécules sensibilisantes (Boislève, Kerdine-Römer, and Pallardy 2005; Antonios et al. 2009) mais aussi des particules de silice Sigma « ultrafines » (Kang and Lim 2012). Dans la littérature, les MAPK sont décrites comme des signaux

précoces de l'activation de DC. A titre d'exemple, il a été montré au laboratoire que les molécules sensibilisantes induisaient une activation des MAPK dès 15 minutes (Antonios et al. 2009).

Peu d'études s'intéressent aux voies de signalisation en amont des MAPK. Celles-ci sont nombreuses. Cependant, la voie de signalisation impliquant la protéine tyrosine kinase Syk a retenu notre attention en raison de son rôle dans la maturation des DC et la signalisation cellulaire initiée dans les DC en réponse aux cristaux de MSU, signal de danger endogène, et aux agrégats de protéines thérapeutiques (Ng et al. 2008; Nabhan et al. 2020). L'originalité de nos travaux réside dans la description de l'implication de Syk dans la réponse des DC aux SAS-NP, ce qui n'a à notre connaissance jamais été décrit dans la littérature.

Comme présenté en introduction, Syk est connue pour être activée suite à l'engagement de récepteurs tels que FcγR, Dectin-1 ou Mincle (Kerrigan and Brown 2011). Dans le cas de l'engagement d'un récepteur, la phosphorylation de Syk est observée seulement quelques minutes après l'interaction entre le ligand et son récepteur. Cependant, dans notre étude, nous observons une phosphorylation tardive de Syk 30 minutes après l'exposition des DC aux SAS-NP. Des temps plus précoces ont été évalués, et malgré la variabilité inter-donneurs, aucune phosphorylation n'a été observée avant 30 minutes. Cette observation suggère un mécanisme indépendant des récepteurs. A notre connaissance, seules deux études menées par la même équipe documentent l'activation de Syk par des mécanismes indépendants des récepteurs. Leur démonstration repose sur l'utilisation de la pronase, une protéase permettant l'élimination des récepteurs de surface. Ils ont montré que l'effet des cristaux de MSU était toujours présent après traitement des cellules par cette protéase (Ng et al. 2008; Flach et al. 2011). Nous avons souhaité reproduire cette expérience sur notre modèle d'étude, cependant l'effet de la

pronase s'est révélé trop cytotoxique et ne nous permettait pas d'effectuer les observations souhaitées en présence des SAS-NP.

## 2. Les interactions membranaires à l'origine de la signalisation ?

### Les NP pourraient promouvoir la formation de rafts lipidiques

La littérature décrit que la formation de rafts lipidiques facilite de nombreux évènements cellulaires tels que la transduction de signaux, l'endocytose, le transport vésiculaire ainsi que l'adhésion cellulaire (Hanzal-Bayer and Hancock 2007; Horejsi and Hrdinka 2014).

Le réarrangement lipidique puis la réorganisation des rafts sont nécessaires pour l'ancrage de récepteurs. Ils pourraient se produire lors d'une interaction directe entre les particules et la membrane. L'équipe de Ng *et al.* a proposé un mécanisme d'action dans lequel les particules de MSU et d'aluminium interagissent directement avec la membrane. Les lipides membranaires des DC serviraient de récepteurs de substitution pour ces particules induisant une modification de la fluidité membranaire et ainsi la formation de rafts lipidiques (Ng *et al.* 2008; Flach *et al.* 2011). L'équipe de Hu *et al.* a montré dans des BMDC que des bionanoparticules issues de bactériophages Q $\beta$  et utilisées en tant que vecteurs de vaccins, pouvaient promouvoir l'agrégation de rafts par des interactions membranaires modifiant la courbure de la membrane plasmique (Hu *et al.* 2020).

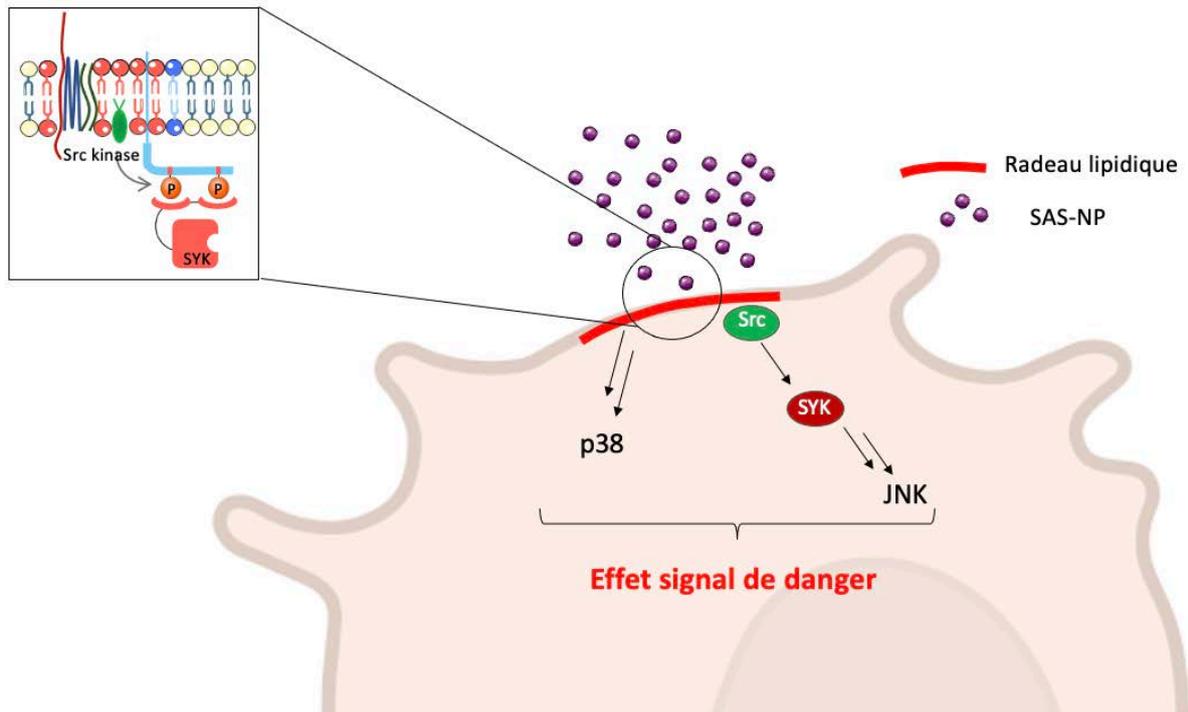
### Les rafts sont des plateformes de signalisation

Les radeaux lipidiques permettent l'ancrage de récepteurs contenant des motifs ITAM, mais aussi des kinases de la famille Src (Simons and Ikonen 1997; Vidalain *et al.* 2000). En effet, les Src kinases sont recrutées sous leur forme activée lors de la formation de rafts lipidiques (figure 23) et jouent un rôle dans l'induction de la phosphorylation de la protéine Syk dans les cellules présentatrices d'antigène telles

que les LB (Kurosaki et al. 1994; Gupta and DeFranco 2007). Une hypothèse serait que les Src kinases seraient activées par les intégrines présentes dans les radeaux lipidiques (Mitra and Schlaepfer 2006; Lietha and Izard 2020). L'équipe de Ng et al. a montré que les cristaux de MSU induisaient l'activation de Syk par le biais d'une interaction menant à une réorganisation lipidique et à la formation de rafts (Ng et al. 2008). Bien que les cristaux de MSU soient majoritairement de taille micrométrique, certains peuvent être à l'échelle nanométrique (S. Park et al. 2021). Nous avons émis l'hypothèse que les SAS-NP utilisées dans notre étude pouvaient adopter un comportement similaire.

L'activation de Syk aurait lieu dans une boucle d'autophosphorylation initiée par les Src kinases. Ces dernières phosphorylent le domaine SH2 de la protéine Syk, ce qui met en place la boucle d'autophosphorylation de Syk (figure 25b) (El-Hillal et al. 1997; Mansueto et al. 2019). En résumé, nos résultats suggèrent que les SAS-NP induiraient la formation de rafts lipidiques, ce qui serait à l'origine de la phosphorylation de Syk par les Src kinases (figure 35).

La phosphorylation de Syk est nécessaire à la phosphorylation de JNK mais pas de celle p38. Il a été décrit dans des cellules musculaires lisses de rats que les MAPK JNK et p38 pouvaient être activées de façon indépendante en réponse à une stimulation par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Yoshizumi et al. 2000). Il nous reste à évaluer si p38 jouerait un rôle dans l'activation des DC induite par les SAS-NP, au moyen d'un inhibiteur pharmacologique, et par quels mécanismes elle serait activée. Nous pouvons émettre l'hypothèse que les SAS-NP activeraient JNK par un mécanisme dépendant de Syk et p38 par un mécanisme indépendant de Syk et des rafts lipidiques, éventuellement dépendant de récepteurs qui restent à identifier.



**Figure 35** - Schéma du mécanisme d'action des SAS-NP sur les cellules dendritiques

### Mécanisme de formation des rafts par les NP

Pour aller plus loin, il est nécessaire de comprendre la première étape d'interaction entre les NP et les DC, conduisant à la formation de radeaux lipidiques. Cependant, très peu d'études dans la littérature se sont penchées sur de tels mécanismes.

Comme précédemment évoqué, les NP présentent une grande réactivité de surface. L'équipe de Pavan *et al* a suggéré que les groupements présents à la surface des SAS-NP régularaient les échanges entre ces dernières et les cellules. Dans cette étude, les globules rouges (GR) sont utilisés *in vitro* car leur membrane représente un modèle simple et adéquat pour évaluer les interactions entre les NP et les membranes cellulaires. C'est la raison pour laquelle le test de l'hémolyse est un test de référence d'étude de la réactivité de surface de particules inorganiques et plus particulièrement de la silice au niveau membranaire. C'est ainsi que Pavan *et al.* ont mis en évidence que plus d'une caractéristique régissait les interactions membranaires des silices, les principales étant la taille, la forme et la réactivité de surface des particules. La

distribution de surface des groupements silanols et siloxanes serait le principal facteur induisant l'hémolyse (Pavan et al. 2013b; 2014).

La toxicité des silices pourrait donc être liée à la répartition de ces groupements silanols et siloxanes (figure 15) à la surface des SAS-NP (Pavan et al. 2019). Zhang et al ont montré que le potentiel membranolytique et cytotoxique des silices obtenues par voie thermique pouvait être attribué à la formation de cycles siloxanes et à la densité de silanols présents à la surface (H. Zhang et al. 2012). Cette observation a été supportée par Sun et al. qui démontrent que lorsque l'on ajuste la répartition des silanols par un procédé de calcination, il est possible de réduire l'inflammation aiguë induite par la silice pyrogénée chez la souris C57BL/6 (Sun et al. 2015). Des résultats préliminaires visant à évaluer le rôle de la chimie de surface dans la toxicité des SAS-NP sur la lignée cellulaire THP-1 nous ont permis de comparer les effets de SAS-NP obtenues par voie humide présentant différentes densités de silanols. Nous avons pu observer une moindre activation des cellules THP-1 lorsque la densité de silanols d'une silice précipitée était réduite. Ces résultats semblent cohérents avec ceux de Sun et al (Sun et al. 2015). Cependant, cela ne permet pas d'expliquer les effets importants des silices pyrogénées (S5505 et NM202) dont la densité de silanols est inférieure à  $1/\text{nm}^2$ .

Plus récemment, l'équipe de Cristina Pavan a identifié une nouvelle « sous-famille » de silanols comme étant un déterminant moléculaire majeur de la toxicité des SAS-NP : les *nearly free silanols* (NFS) (Figure 16). Leurs résultats mettent en évidence que les NFS favorisent l'activité membranolytique des SAS-NP sur des modèles membranaires, induisent la libération de la cytokine IL-1 $\beta$  par les macrophages et déclenchent une inflammation pulmonaire chez le rat (Pavan et al. 2020). Dans leur article le plus récent, des échantillons de silice avec différentes quantités de NFS ont été testés sur des systèmes membranaires de complexité moléculaire décroissante et de charge différente. Les résultats démontrent que la teneur en NFS est le principal

déterminant de la perturbation de la membrane causant la lyse des globules rouges. La silice riche en NFS adsorbe fortement et irréversiblement les structures phospholipidiques auto-assemblées zwitterioniques suggérant que les NFS reconnaissent les épitopes membranaires qui présentent un groupe amino quaternaire positif et un groupe phosphate négatif (Pavan et al. 2022)

De nombreux constituants membranaires peuvent effectivement être envisagés comme interagissant avec les SAS-NP tels que les protéines membranaires via des liaisons hydrogènes, les groupements phosphate ester des phospholipides membranaires. Les SAS-NP interagiraient par le biais de liaisons hydrogène avec les composants de la membrane plasmique. Grâce aux silanols, les SAS-NP peuvent agir en tant que donneurs d'hydrogène et interagir avec les groupements accepteurs d'hydrogène tels que les groupements phosphates esters des phospholipides membranaires ou les groupements amides secondaires des protéines (Nash, Allison, and Harington 1966). Plus récemment, une étude basée sur des méthodes de modélisation biophysique a permis de montrer que les SAS-NP mésoporeuses interagissaient par des interactions électrostatiques entre les phospholipides et les groupements silanols présents sur les SAS-NP induisant ainsi une déstabilisation membranaire pouvant mener à la réorganisation des radeaux lipidiques (Kettiger et al. 2016). Nos résultats fournissent de nouveaux éléments sur le mécanisme par lequel les SAS-NP jouent leur rôle de signal de danger. Nous postulons que la chimie de surface est au cœur des interactions entre les SAS-NP et les DC. Une étude plus précise des groupements chimiques de surface responsables des interactions des SAS-NP avec les composants membranaires nous permettrait d'identifier l'origine de la toxicité des SAS-NP. Ainsi, ce travail contribuerait à développer des SAS-NP plus sûres par une approche *safer-by-design*.

## II. Étude de l'implication des nanoparticules de silice amorphe dans l'immunisation contre l'allergène majeur du pollen de bouleau, Bet v 1a.

Selon le réseau national de surveillance aérobiologique, près de 25% de la population française souffre d'allergies respiratoires se manifestant sous forme de rhinites ou de crises d'asthme. Les allergènes en cause peuvent être, à titre d'exemple, les acariens (Der p 1) ou le pollen de bouleau (Bet v 1a). Il est nécessaire de comprendre comment les patients s'immunisent contre ces aéro-allergènes. L'hypothèse que nous explorons est que cela pourrait être lié à une exposition environnementale *via* la pollution atmosphérique aux nanoparticules de diesel (Acciani et al. 2013) ou encore à des nanomatériaux comme cela a été décrit pour les nanotubes de carbone (Ronzani, Casset, and Pons 2014). Du fait de leur exposition polymorphe, et de nos résultats précédents démontrant leur effet signal de danger, nous avons souhaité évaluer le rôle des SAS-NP dans l'immunisation contre un allergène très répandu, Bet v 1a. Cette question n'avait jusqu'à présent été évaluée que dans des modèles murins de sensibilisation à l'ovalbumine (Branderberger et al, 2013). Nous avons souhaité l'explorer plus finement *in vitro* en mettant au point un modèle innovant que nous allons présenter dans le paragraphe suivant.

### A. Présentation du modèle de co-culture autologue.

L'originalité de notre travail a été d'utiliser un modèle de co-culture autologue dans lequel les DC et les LT CD4<sup>+</sup> naïfs sont issus du même donneur humain sain. Initialement développé pour prédire l'immunogénicité des protéines thérapeutiques, ce modèle permet de s'affranchir de la barrière d'espèce, les animaux étant peu prédictifs de la réponse immunitaire chez l'homme. Ici, l'intention est de reproduire

*in vitro* l'activation du système immunitaire qui peut survenir lors de l'exposition simultanée à un allergène et à des nanoparticules.

Un LT est dit naïf tant qu'il n'a pas rencontré son antigène spécifique. Par définition, les LT naïfs spécifiques d'un antigène sont peu nombreux (autour de 1 cellule T spécifique d'un épitope T donné pour 1 à 10 millions de cellules). Après stimulation par l'antigène, le LT naïf spécifique de l'antigène subit une expansion clonale et forme un répertoire de LT mémoires. La fréquence de LT naïfs spécifiques d'un antigène donné peut varier selon le donneur et l'immunogénicité de l'antigène (Maillère, Delluc, and Ravot 2012). Dans le modèle utilisé, les deux types cellulaires autologues n'induisent pas de réaction immunitaire basale contrairement au modèle de co-culture allogénique utilisé précédemment dans lequel les DC et LT sont issus de deux donneurs différents et l'antigène reconnu par les LT est le CMH allogénique. Le modèle autologue nous donne la possibilité d'ajouter un antigène extérieur ainsi que le signal que nous souhaitons évaluer comme signal de danger. L'antigène que nous avons intégré dans notre modèle est l'allergène majeur du pollen de bouleau Bet v 1a. Nous avons choisi cet allergène car les allergies au pollen représentent 30% des allergies respiratoires en France et le bouleau est le principal arbre producteur de pollen responsable d'allergies (Lavaud 2019). Comme précédemment mentionné, le modèle utilisé a été conçu pour évaluer l'immunogénicité des protéines thérapeutiques (Maillère, Delluc, and Ravot 2012). Pour cela le signal de danger utilisé était le LPS, signal de danger bien décrit. Nous avons choisi d'adapter ce test afin d'évaluer l'effet signal de danger des SAS-NP. Sur le postulat que la taille du répertoire contrôle au moins en partie l'amplitude de la réponse T lors du processus de sensibilisation, nous avons trouvé pertinent d'évaluer l'influence des SAS-NP sur le répertoire de LT CD4<sup>+</sup> naïfs spécifiques de Bet v 1a.

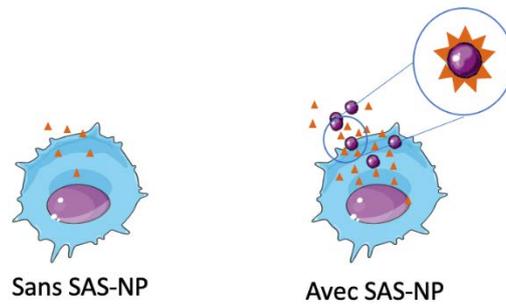
Nos résultats obtenus sur des cellules issues de donneurs sains montrent l'existence d'un répertoire de LT CD4<sup>+</sup> naïfs spécifiques de Bet v 1a pré-existant. En effet, nous avons déterminé que la fréquence moyenne de LT naïfs spécifiques de Bet v 1a chez 4 donneurs exposés à l'allergène en présence de LPS était de 1,33 LT naïfs spécifiques par million de LT circulants. A titre de comparaison, pour des protéines immunogènes comme la KLH, la fréquence de LT spécifiques est de l'ordre de 30 LT naïfs spécifiques par million de LT circulants. Pour certains anticorps thérapeutiques, le répertoire est compris entre 0,1 et 1 LT spécifique par million de LT circulants (Maillère, Delluc, and Ravot 2012). Nous avons ensuite souhaité comparer la fréquence de LT CD4<sup>+</sup> naïfs spécifiques de Bet v 1a obtenue en absence de signal de danger à celle obtenue lors de l'exposition à Bet v 1a en présence de SAS-NP. Les résultats obtenus indiquent une fréquence plus élevée en présence de SAS-NP chez les 6 donneurs testés (0,59 LT CD4<sup>+</sup> spécifiques de Bet v 1a par million de LT circulants) en comparaison à une stimulation avec Bet v 1a seul (0,20 LT CD4<sup>+</sup> spécifiques de Bet v 1a par million de LT circulants). Notre hypothèse est que l'exposition aux SAS-NP augmenterait le nombre et/ou modifierait la nature des épitopes de Bet v 1a reconnus par les cellules T. Comme présenté dans les résultats complémentaires, le stimulus de Bet v 1a seul n'est pas suffisant pour induire la maturation des DC contrairement à d'autres allergènes tels que Der p 1 (Bellinghausen et al. 2003; Gerstmayr et al. 2007). De ce fait, l'augmentation de la fréquence de LT CD4<sup>+</sup> naïfs spécifiques de Bet v 1a en présence de SAS-NP serait liée à l'effet signal de danger des SAS-NP, ce qui confirme les résultats obtenus précédemment (phénotype et co-culture allogénique).

### B. Effet des SAS-NPs sur l'internalisation de Bet v 1a

Pour tenter de comprendre l'origine de la modification de répertoire de LT CD4<sup>+</sup> naïfs spécifiques de Bet v 1a, nous avons évalué son internalisation par Western-blot. Nous avons utilisé deux scénarios d'exposition des DC à Bet v 1a.

Dans le premier, nous exposons les DC à Bet v 1a pendant une heure, puis nous ajoutons les SAS-NP. Ce scénario correspond à celui utilisé lors des co-cultures autologues. De manière très intéressante, dès 15 minutes après l'ajout des SAS-NP nous avons pu détecter une quantité de Bet v 1a intracellulaire significativement augmentée en comparaison à la condition où les cellules n'ont été exposées qu'à Bet v 1a.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce résultat, notamment une augmentation de l'internalisation ou une inhibition du *processing* (ou apprêtement) de l'antigène. L'augmentation de l'internalisation de Bet v 1a par les DC reposerait sur un mécanisme « Cheval de Troie » exercé par les SAS-NP. Ce mécanisme est connu et exploité en thérapeutique, notamment en oncologie où il est utilisé intentionnellement. Ainsi, des NP présentant des motifs de reconnaissance pour les cellules cancéreuses à leur surface sont chargées avec des principes actifs (PA) toxiques ciblant les cellules cancéreuses (Stenzel 2021). Une fois internalisées par ces dernières, les NP libèreront les PA qu'elles contiennent. Ce mécanisme est également utilisé pour le traitement des allergies, où les NP seront utilisées pour véhiculer et délivrer les allergènes afin de désensibiliser les patients allergiques (Smarr et al. 2016). Dans nos expériences, il ne s'agit pas d'un effet bénéfique et intentionnel. Du fait de leur réactivité de surface, les SAS-NP auraient la capacité de se recouvrir de l'allergène Bet v 1a et ainsi d'augmenter les quantités internalisées (figure 36). Pour mieux explorer cette hypothèse, nous avons entrepris de caractériser les interactions NP-Bet v 1a mais également de modifier le scénario d'exposition.



**Figure 36** - Schéma représentant l'internalisation de Bet v 1a en absence et en présence de SAS-NP, illustrant l'effet cheval de Troie.

Les sphères modélisent les SAS-NP et les triangles modélisent l'allergène Bet v 1a.

Il existe plusieurs méthodes dans la littérature pour caractériser l'interaction entre des protéines et des NP. Grotz *et al.* ont séparé Bet v 1a et des SAS-NP obtenues par la méthode de Stöber, par simple centrifugation. Le culot contenant les nanoparticules et leur corona a été analysé par SDS-PAGE et les protéines du surnageant ont été quantifiées par un test de Bradford (Grotz *et al.* 2018b). Sur des AuNP, Radauer-Preiml *et al.* ont montré que Bet v 1a se liait à la surface des NP. La formation de la corona a été vérifiée par MET et par DLS. Les données de DLS ont montré une augmentation du rayon hydrodynamique des NP en présence de Bet v 1a (Radauer-Preiml *et al.* 2016a). Pour notre étude, nous avons évalué par DLS le rayon hydrodynamique des SAS-NP en présence ou en absence de Bet v 1a. Nous avons mis en évidence que le diamètre hydrodynamique moyen des SAS-NP en présence de l'allergène était significativement plus élevé, indiquant que Bet v 1a interagissait bien avec les SAS-NP. Les études de centrifugation afin de caractériser la quantité d'allergène se fixant aux SAS-NP par électrophorèse sont en cours mais nécessitent une mise au point plus approfondie.

Dans un second temps, nous avons modifié le scénario d'exposition des DC à Bet v 1a et aux SAS-NP. Nous avons exposé les DC à Bet v 1a pendant une heure, puis après un lavage destiné à éliminer Bet v 1a extracellulaire, nous avons ajouté les SAS-NP. Ce scénario d'exposition a été conçu afin d'adresser la question de l'effet cheval

de Troie des SAS-NP. En effet, en éliminant Bet v 1a restant dans le milieu extracellulaire après une heure de stimulation, et avant l'ajout des nanoparticules, nous pensons que nous empêchons le processus de recouvrement de celles-ci par Bet v 1a. Nos résultats montrent que nous ne détectons plus de différence significative entre la condition Bet v 1a seul et la condition Bet v 1a et SAS-NP. Ces résultats semblent donc appuyer l'hypothèse cheval de Troie décrite ci-dessus. Cependant, nous ne pouvons exclure d'autres hypothèses sur la modification de la fréquence par les SAS-NP.

Au-delà du rôle potentiel de l'internalisation accrue, quels mécanismes pourraient expliquer l'augmentation de la fréquence de LT CD4+ naïfs spécifiques de Bet v 1a en présence de SAS-NP ? La liaison de Bet v 1a aux SAS-NP pourrait modifier la conformation de l'allergène et ainsi démasquer de nouveaux épitopes. Ainsi, il a été montré dans des cellules THP-1 qu'en se liant à la surface de NP d'or conjuguées à de l'acide poly(acrylique), le fibrinogène changeait de conformation, ce qui favorisait son interaction avec le récepteur aux intégrines Mac-1. Ceci mène à l'activation de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B, et à la libération de cytokines pro-inflammatoires (Deng et al. 2012). De plus, l'équipe de Radauer-Preiml et al a suggéré que la liaison des allergènes aux NP pouvait affecter l'accessibilité des épitopes et ainsi modifier la réponse contre ceux-ci. La même équipe a montré également que l'activité enzymatique de Der p 1 était considérablement modifiée par la liaison ce dernier aux AuNP (Radauer-Preiml et al. 2016a). L'interaction de Bet v 1a avec les SAS-NP modifierait son devenir cellulaire. Bet v 1a pourrait se lier à diverses molécules aux fonctions immunomodulatrices, tels que des polysaccharides végétaux (Ligacheva et al. 2014), ou stabilisant indirectement la conformation de Bet v 1a. Ceci pourrait modifier son immunogénicité et son allergénicité en influençant son traitement dans les compartiments endolysosomaux (Freier, Dall, and Brandstetter 2015; Machado et al. 2016). Soh et al. ont montré que Bet v 1a se liait aux phytoprostanes E1 (PPE1), dérivés lipidiques oxydés issus de la peroxydation non enzymatique de l'acide  $\alpha$ -

linoléique biosynthétisés dans la plupart des végétaux, fonctionnellement apparentés aux prostaglandines de mammifère et possédant une fonction de régulation des LT Th2. Les résultats de ces travaux mettent en évidence que PPE1 lié à Bet v 1a induit une augmentation de la résistance de l'allergène à la protéolyse endosomale ainsi qu'une diminution des activités endolysosomales (Soh et al. 2019). Nous émettons l'hypothèse que l'interaction entre Bet v 1a et les SAS-NP modifierait la stabilité ou la conformation de l'allergène. Cette hypothèse est soutenue par les récents travaux de Johnson *et al.* indiquant que l'interaction de nature électrostatique de NP de silice, dont le procédé d'obtention n'est pas précisé, de taille similaire à celles utilisées dans notre étude, avec Bet v 1a diminue sa stabilité protéolytique (Johnson et al. 2021).



# Conclusions et perspectives

Ce projet de recherche a permis une meilleure évaluation de la toxicité des SAS-NP sur la réponse immunitaire adaptative.

Après avoir mis au point un outil méthodologique d'évaluation de l'immunotoxicité des NP, nous avons pu montrer pour la première fois que des SAS-NP produites par les voies de synthèse principales, à savoir par pyrolyse et par voie humide, déclenchent la mise en place de la réponse immunitaire adaptative. Cet outil pourrait être transposé à d'autres nanomatériaux tels que les nanoplastiques afin d'évaluer leur immunotoxicité. Comme mentionné précédemment, le règlement REACH impose aux industriels d'évaluer l'immunotoxicité des NP. Ainsi, nous pouvons imaginer que l'outil développé au cours de ce travail soit proposé afin de répondre aux exigences de ce règlement.

Ces travaux ont mené à la publication de deux articles (**Annexe** et **Article n°1**) respectivement dans les journaux *Nanomaterials* (2020) et *Toxicological Sciences* (2021).

Nous avons ensuite proposé un mécanisme d'action de la toxicité des SAS-NP dans les DC. Les perspectives de ces travaux de recherche seraient d'approfondir le mécanisme par lequel les SAS-NP seraient reconnues en tant que signal de danger par les DC. Nous avons, en effet, montré que les SAS-NP induisaient la formation de rafts lipidiques. Il nous semble intéressant à présent de mieux comprendre quels sont les mécanismes déclenchant la formation de ces rafts lipidiques. Pour cela, il est nécessaire d'améliorer la compréhension du rôle de la chimie de surface dans les interactions membranaires. Nous envisageons de comparer les effets de SAS-NP obtenues par différentes voies de synthèses mais aussi de SAS-NP dont la chimie de surface est modifiée. Comme le suggèrent Sun *et al.*, nous pourrions évaluer l'effet de la calcination, ou du dopage des SAS-NP étudiées afin de comprendre l'importance des groupements de surface, notamment des silanols, sur l'effet signal de danger

observé dans ce travail (Sun et al. 2015). Une caractérisation des NFS est en cours pour compléter notre approche.

Nous avons également montré que l'activation de la voie de la MAPK JNK lors de l'interaction avec les SAS-NP est dépendante de la protéine SYK, ce qui n'est pas le cas de la MAPK p38. Sur la base de nos observations, nous postulons que le mécanisme d'activation des DC en réponse aux SAS-NP est indépendant de récepteurs. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que l'effet des SAS-NP sur les DC soit multifactoriel. Nous envisageons alors d'évaluer le rôle des MAPK activées dans notre études dans l'activation fonctionnelle des DC.

Nos résultats portent sur des SAS-NP obtenues par pyrolyse à flamme autrement appelées pyrogénées. Une autre perspective de notre travail de recherche est d'évaluer les effets immunotoxiques des SAS-NP précipitées, du fait de leur large utilisation dans l'agro-alimentaire et de leurs propriétés de surface différentes des SAS-NP pyrogénées, afin de comprendre le rôle de la chimie de surface et ainsi contribuer à développer des SAS-NP plus sûres par une approche *safer-by-design*. Nous pourrions identifier les motifs présents à la surface des SAS-NP responsables de leur toxicité. Ainsi, il serait possible de contrôler les voies de synthèse des SAS-NP afin de limiter la présence de ces motifs à leur surface.

La seconde partie de ce projet a consisté en l'évaluation de l'immunisation contre un pneumallergène, l'allergène majeur du pollen de bouleau, Bet v 1a. Nos travaux ont permis de mettre en évidence, au moyen d'un système de co-culture autologue, que les SAS-NP induisent une augmentation du répertoire de lymphocytes T CD4+ naïfs spécifiques de Bet v 1a. De plus, nous avons montré que les SAS-NP permettent une meilleure internalisation de Bet v 1a par les DC, jouant alors le rôle de cheval de Troie. Ceci serait lié à une interaction entre les SAS-NP et l'allergène.

Les perspectives de cette partie du travail de recherche sont d'identifier les épitopes présentés par les DC en présence et en absence de SAS-NP afin de comprendre si la

co-exposition avec les SAS-NP augmente le nombre ou modifie la nature des épitopes présentés par les DC. Pour cela, nous envisageons d'effectuer un *peptide mapping* qui nous informera sur la nature et la quantité de peptides présentés par les DC aux LT. Cette méthode comprend une étape de digestion enzymatique suivie d'une séparation des peptides résultants et d'une analyse par détection UV ou spectrométrie de masse. Ceci sera utilisé pour examiner la structure primaire des peptides présentés par les DC aux LT.

Nous pourrions également évaluer le *processing* ou l'apprêtement de l'allergène dans les DC en présence des SAS-NP. La présence de ces dernières pourrait modifier les voies de dégradation de Bet v 1a une fois internalisé et ainsi être responsable de la modification du répertoire observée. Une autre perspective de ce travail est d'évaluer la nature des interactions entre les SAS-NP et Bet v 1a afin de comprendre par quels mécanismes l'allergène se fixe aux SAS-NP et est internalisé. Nous envisageons pour cela d'avoir recours dans un premier temps à la modélisation moléculaire afin d'évaluer si les interactions entre les SAS-NP et Bet v 1a pourraient, par exemple, modifier la conformation de Bet v 1a.

Enfin, les SAS-NP étant largement présentes dans les produits agro-alimentaires en tant qu'additif alimentaire (E551), nous envisageons également d'évaluer leur rôle dans l'immunisation contre un allergène alimentaire tel que les allergènes d'arachides (Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 et Ara h 6).

A l'issue de ce travail, nous proposons un outil robuste d'évaluation de l'immunotoxicité des SAS-NP. Une meilleure compréhension mécanistique de l'effet des SAS-NP sur les DC devrait contribuer à la conception de nanoparticules plus sûres. D'autre part nous mettons en évidence que les SAS-NP jouent un rôle dans l'immunisation contre l'allergène Bet v 1a, possiblement par leur effet « Cheval de Troie ».

# Bibliographie

## A

Abram, Clare L., and Clifford A. Lowell. 2007. 'The Expanding Role for ITAM-Based Signaling Pathways in Immune Cells'. *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment* 2007 (377): re2. <https://doi.org/10.1126/stke.3772007re2>.

Acciani, T. H., E. B. Brandt, G. K. Khurana Hershey, and T. D. Le Cras. 2013. 'Diesel Exhaust Particle Exposure Increases Severity of Allergic Asthma in Young Mice'. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 43 (12): 1406–18. <https://doi.org/10.1111/cea.12200>.

Ade, Nadège, Diane Antonios, Saadia Kerdine-Romer, Fanny Boisleve, Françoise Rousset, and Marc Pallardy. 2007. 'NF-KappaB Plays a Major Role in the Maturation of Human Dendritic Cells Induced by NiSO(4) but Not by DNCB'. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 99 (2): 488–501. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm178>.

AFFSET. 2006. 'Les nanomatériaux. Effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement'. *Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail*. <https://www.anses.fr/fr/search>.

Agarwal, S., O. Avni, and A. Rao. 2000. 'Cell-Type-Restricted Binding of the Transcription Factor NFAT to a Distal IL-4 Enhancer in Vivo'. *Immunity* 12 (6): 643–52. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80215-0](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80215-0).

Amigorena, S. 1999. 'Présentation antigénique par les cellules dendritiques.' *médecine/sciences* 15 (8–9): 931. <https://doi.org/10.4267/10608/1462>.

ANSES. 2020. 'Evaluation des risques liés aux nanomatériaux'. *Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail*. <https://www.anses.fr/fr/content/les-nanomat%C3%A9riaux>.

Antonios, Diane, Nadège Ade, Saadia Kerdine-Römer, Hind Assaf-Vandecasteele, Alexandre Larangé, Hayat Azouri, and Marc Pallardy. 2009. 'Metallic Haptens Induce Differential Phenotype of Human Dendritic Cells through Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase and NF- $\kappa$ B Pathways'. *Toxicology in Vitro* 23 (2): 227–34. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.11.009>.

Antonios, Diane, Philippe Rousseau, Alexandre Larangé, Saadia Kerdine-Römer, and Marc Pallardy. 2010. 'Mechanisms of IL-12 Synthesis by Human Dendritic Cells Treated with the Chemical Sensitizer NiSO<sub>4</sub>'. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185 (1): 89–98. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901992>.

Athman, Rafika, and Dana Philpott. 2004. 'Innate Immunity via Toll-like Receptors and Nod Proteins'. *Current Opinion in Microbiology* 7 (1): 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.12.013>.

AVICENN. 2022. 'VeilleNanos - Risques associés aux nanoparticules de silice'. *VeilleNanos* (blog). June 2022. <https://veillenanos.fr/dossier/risques/risques-specifiques/risques-silice/>.

## B

- Babin, K., D. M. Goncalves, and D. Girard. 2015. 'Nanoparticles Enhance the Ability of Human Neutrophils to Exert Phagocytosis by a Syk-Dependent Mechanism'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1850 (11): 2276–82. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.08.006>.
- Baisch, Brittany L., Nancy M. Corson, Pamela Wade-Mercer, Robert Gelein, Andrea J. Kennell, Günter Oberdörster, and Alison Elder. 2014. 'Equivalent Titanium Dioxide Nanoparticle Deposition by Intratracheal Instillation and Whole Body Inhalation: The Effect of Dose Rate on Acute Respiratory Tract Inflammation'. *Particle and Fibre Toxicology* 11 (January): 5. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-11-5>.
- Bakdash, Ghaith, Simone Sittig, Tjeerd van Dijk, Carl Figdor, and I. Jolanda de Vries. 2013. 'The Nature of Activatory and Tolerogenic Dendritic Cell-Derived Signal II'. *Frontiers in Immunology* 4. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2013.00053>.
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. 'Immunobiology of Dendritic Cells'. *Annual Review of Immunology* 18: 767–811. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.767>.
- Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. 'Dendritic Cells and the Control of Immunity'. *Nature* 392 (6673): 245–52. <https://doi.org/10.1038/32588>.
- Bannunah, Azzah M., Driton Vllasaliu, Jennie Lord, and Snjezana Stolnik. 2014. 'Mechanisms of Nanoparticle Internalization and Transport Across an Intestinal Epithelial Cell Model: Effect of Size and Surface Charge'. *Molecular Pharmaceutics* 11 (12): 4363–73. <https://doi.org/10.1021/mp500439c>.
- Barbero, Francesco, Lorenzo Russo, Michele Vitali, Jordi Piella, Ignacio Salvo, Mireya L. Borrajo, Marti Busquets-Fité, et al. 2017. 'Formation of the Protein Corona: The Interface between Nanoparticles and the Immune System'. *Seminars in Immunology* 34: 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.10.001>.
- Barillet, S., E. Fattal, S. Mura, N. Tsapis, M. Pallardy, H. Hillaireau, and S. Kerdine-Römer. 2019. 'Immunotoxicity of Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanoparticles: Influence of Surface Properties on Dendritic Cell Activation'. *Nanotoxicology* 13 (5): 606–22. <https://doi.org/10.1080/17435390.2018.1564078>.
- Bellinghausen, Iris, Pia Brand, Ingo Böttcher, Bettina Klostermann, Jürgen Knop, and Joachim Saloga. 2003. 'Production of Interleukin-13 by Human Dendritic Cells after Stimulation with Protein Allergens Is a Key Factor for Induction of T Helper 2 Cytokines and Is Associated with Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription-6'. *Immunology* 108 (2): 167–76. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2003.01576.x>.
- Benamor, Taissire. 2011. 'Synthèse et caractérisation de silices mésoporeuses hydrophobes à porosité contrôlée'.

- Biedermann, T., L. Winther, S. J. Till, P. Panzner, A. Knulst, and E. Valovirta. 2019. 'Birch Pollen Allergy in Europe'. *Allergy* 74 (7): 1237–48. <https://doi.org/10.1111/all.13758>.
- Blanco, Patrick, A. Karolina Palucka, Virginia Pascual, and Jacques Banchereau. 2008. 'Dendritic Cells and Cytokines in Human Inflammatory and Autoimmune Diseases'. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 19 (1): 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.10.004>.
- Boislève, Fanny, Saadia Kerdine-Römer, and Marc Pallardy. 2005. 'Implication of the MAPK Pathways in the Maturation of Human Dendritic Cells Induced by Nickel and TNF-Alpha'. *Toxicology* 206 (2): 233–44. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.08.015>.
- Bonnerot, C, V Briken, V Brachet, D Lankar, S Cassard, B Jabri, and S Amigorena. 1998. 'Syk Protein Tyrosine Kinase Regulates Fc Receptor Gamma-Chain-Mediated Transport to Lysosomes.' *The EMBO Journal* 17 (16): 4606–16. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.16.4606>.
- Brandenberger, Christina, Nicole L Rowley, Daven N Jackson-Humbles, Quanxuan Zhang, Lori A Bramble, Ryan P Lewandowski, James G Wagner, et al. 2013. 'Engineered Silica Nanoparticles Act as Adjuvants to Enhance Allergic Airway Disease in Mice'. *Particle and Fibre Toxicology* 10 (July): 26. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-26>.
- Bredy Tuffe, Patricia, Aurélie Fay, Patrick Guiraud, Elodie Infanti, and Alain Picot. 2011. 'La fumée de silice : l'addition incontournable pour des bétons durables'. *Infociments*. <https://www.infociments.fr/travaux-maritimes-et-fluviaux/la-fumee-de-silice-laddition-incontournable-pour-des-betons-durables>.
- Brennan, Joseph J, and Thomas D Gilmore. 2018. 'Evolutionary Origins of Toll-like Receptor Signaling'. *Molecular Biology and Evolution* 35 (7): 1576–87. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy050>.
- Brier, S., M. Le Mignon, K. Jain, C. Lebrun, F. Peurois, C. Kellenberger, V. Bordas-Le Floch, L. Mascarell, E. Nony, and P. Moingeon. 2018. 'Characterization of Epitope Specificities of Reference Antibodies Used for the Quantification of the Birch Pollen Allergen Bet v 1'. *Allergy* 73 (5): 1032–40. <https://doi.org/10.1111/all.13364>.
- Brown, D. M., I. A. Kinloch, U. Bangert, A. H. Windle, D. M. Walter, G. S. Walker, C. A. Scotchford, K. Donaldson, and V. Stone. 2007. 'An in Vitro Study of the Potential of Carbon Nanotubes and Nanofibres to Induce Inflammatory Mediators and Frustrated Phagocytosis'. *Carbon* 45 (9): 1743–56. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2007.05.011>.
- Brun, Emilie, and Cécile Sicard – Roselli. 2014. 'Could Nanoparticle Corona Characterization Help for Biological Consequence Prediction?' *Cancer Nanotechnology* 5 (1): 7. <https://doi.org/10.1186/s12645-014-0007-5>.
- Buzea, Cristina, Ivan I. Pacheco, and Kevin Robbie. 2008. 'Nanomaterials and Nanoparticles: Sources and Toxicity'. *ArXiv:0801.3280 [Physics]*, January. <http://arxiv.org/abs/0801.3280>.

## C

Cao, Xiaoqiong, Yanhui Han, Min Gu, Hengjun Du, Mingyue Song, Xiaoi Zhu, Gaoxing Ma, et al. 2020. 'Foodborne Titanium Dioxide Nanoparticles Induce Stronger Adverse Effects in Obese Mice than Non-Obese Mice: Gut Microbiota Dysbiosis, Colonic Inflammation, and Proteome Alterations'. *Small* 16 (36): 2001858. <https://doi.org/10.1002/sml.202001858>.  
Carrière, Marie. 2012. 'Nanoparticules et risque humain', 8.

Carvalho, Thiago C., Jay I. Peters, and Robert O. Williams. 2011. 'Influence of Particle Size on Regional Lung Deposition – What Evidence Is There?' *International Journal of Pharmaceutics* 406 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.12.040>.

Castillo, Aida Maria Ponce Del. 2010. 'La réglementation européenne en matière de nanotechnologies'. *Courrier hebdomadaire du CRISP* 2065 (20): 5–40.

Cedervall, Tommy, Iseult Lynch, Stina Lindman, Tord Berggård, Eva Thulin, Hanna Nilsson, Kenneth A. Dawson, and Sara Linse. 2007. 'Understanding the Nanoparticle-Protein Corona Using Methods to Quantify Exchange Rates and Affinities of Proteins for Nanoparticles'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (7): 2050–55. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608582104>.

Chalmin, Fanny, Etienne Humblin, François Ghiringhelli, and Frédérique Végran. 2018. 'Chapter One - Transcriptional Programs Underlying Cd4 T Cell Differentiation and Functions'. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, edited by Lorenzo Galluzzi and Nils-Petter Rudqvist, 341:1–61. *Biology of T Cells - Part A*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.07.002>.

Champion, Julie A., and Samir Mitragotri. 2006. 'Role of Target Geometry in Phagocytosis'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (13): 4930–34. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600997103>.

Chao, Ying, Priya P. Karmali, Rajesh Mukthavaram, Santosh Kesari, Valentina L. Kouznetsova, Igor F. Tsigelny, and Dmitri Simberg. 2013. 'Direct Recognition of Superparamagnetic Nanocrystals by Macrophage Scavenger Receptor SR-AI'. *ACS Nano* 7 (5): 4289–98. <https://doi.org/10.1021/nn400769e>.

Chao, Ying, Milan Makale, Priya Prakash Karmali, Yuriy Sharikov, Igor Tsigelny, Sergei Merkulov, Santosh Kesari, Wolf Wrasidlo, Erkki Ruoslahti, and Dmitri Simberg. 2012. 'Recognition of Dextran-Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle Conjugates (Feridex) via Macrophage Scavenger Receptor Charged Domains'. *Bioconjugate Chemistry* 23 (5): 1003–9. <https://doi.org/10.1021/bc200685a>.

Chen, Hui, Alisha Dorrigan, Sonia Saad, Dominic J. Hare, Michael B. Cortie, and Stella M. Valenzuela. 2013. 'In Vivo Study of Spherical Gold Nanoparticles: Inflammatory Effects and Distribution in Mice'. *PLoS ONE* 8 (2): e58208. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058208>.

Chen, Lieping, and Dallas B. Flies. 2013. 'Molecular Mechanisms of T Cell Co-Stimulation and Co-Inhibition'. *Nature Reviews. Immunology* 13 (4): 227–42. <https://doi.org/10.1038/nri3405>.

Chen, Peng, Koki Kanehira, and Akiyoshi Taniguchi. 2013. 'Role of Toll-like Receptors 3, 4 and 7 in Cellular Uptake and Response to Titanium Dioxide Nanoparticles'. *Science and Technology of Advanced Materials* 14 (1): 015008. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/14/1/015008>.

Chen, Weihsu Claire, Jonathan P. May, and Shyh-Dar Li. 2013. 'Immune Responses of Therapeutic Lipid Nanoparticles'. *Nanotechnology Reviews* 2 (2): 201–13. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2012-0040>.

Cho, Kuk, Hankwon Chang, Dae Sup Kil, Jinho Park, Hee Dong Jang, and Hong Yong Sohn. 2009. 'Mechanisms of the Formation of Silica Particles from Precursors with Different Volatilities by Flame Spray Pyrolysis'. *Aerosol Science and Technology* 43 (9): 911–20. <https://doi.org/10.1080/02786820903025986>.

Choudat, D, C Frisch, G Barrat, A el Kholti, and F Conso. 1990. 'Occupational Exposure to Amorphous Silica Dust and Pulmonary Function.' *British Journal of Industrial Medicine* 47 (11): 763–66.

Comission européenne, Publications Office of the European. 2011. 'Commission Recommendation of 18 October 2011 on the Definition of Nanomaterial Text with EEA Relevance, CELEX1'. Website. Publications Office of the European Union. 18 October 2011. <http://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/17af73d9-da70-4a46-a421-c62e3d1df6ce/language-en>.

'Compte Rendu NanoResp 2017'. n.d. Accessed 29 April 2022. <https://www.nanoresp.fr/wp-content/uploads/2017/11/CR-4oct17-NanoRESP-FIN2.pdf>.

'Compte Rendu NanoResp 2018'. n.d. Accessed 29 April 2022. [https://www.nanoresp.fr/wp-content/uploads/2018/09/CR-NanoRESP-190618\\_FIN.pdf](https://www.nanoresp.fr/wp-content/uploads/2018/09/CR-NanoRESP-190618_FIN.pdf).

Corr, Emma M., Clare C. Cunningham, and Aisling Dunne. 2016. 'Cholesterol Crystals Activate Syk and PI3 Kinase in Human Macrophages and Dendritic Cells'. *Atherosclerosis* 251 (August): 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.06.035>.

Courtois, BrunoVE, Denis Bémer, and Stéphane Binet. 2021. 'Annexe – Quelques rapports sur les nanoparticules'. In *Annexe – Quelques rapports sur les nanoparticules*, 683–85. EDP Sciences. <https://doi.org/10.1051/978-2-7598-0319-4.c016>.

Croissant, Jonas G., Kimberly S. Butler, Jeffrey I. Zink, and C. Jeffrey Brinker. 2020. 'Synthetic Amorphous Silica Nanoparticles: Toxicity, Biomedical and Environmental Implications'. *Nature Reviews Materials* 5 (12): 886–909. <https://doi.org/10.1038/s41578->

## D

Dalzon, Bastien, Catherine Aude-Garcia, Véronique Collin-Faure, Hélène Diemer, David Béal, Fanny Dussert, Daphna Fenel, et al. 2017. 'Differential Proteomics Highlights Macrophage-Specific Responses to Amorphous Silica Nanoparticles'. *Nanoscale* 9 (27): 9641–58. <https://doi.org/10.1039/c7nr02140b>.

Deenick, Elissa K, Cindy S Ma, Robert Brink, and Stuart G Tangye. 2011. 'Regulation of T Follicular Helper Cell Formation and Function by Antigen Presenting Cells'. *Current Opinion in Immunology* 23 (1): 111–18. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.10.007>.

Delneste, Yves, Céline Beauvillain, and Pascale Jeannin. 2007. '[Innate immunity: structure and function of TLRs]'. *Medecine Sciences: M/S* 23 (1): 67–73. <https://doi.org/10.1051/medsci/200723167>.

Deng, Zhou J., Mingtao Liang, Michael Monteiro, Istvan Toth, and Rodney F. Minchin. 2011. 'Nanoparticle-Induced Unfolding of Fibrinogen Promotes Mac-1 Receptor Activation and Inflammation'. *Nature Nanotechnology* 6 (1): 39–44. <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.250>.

Deng, Zhou J., Mingtao Liang, Istvan Toth, Michael J. Monteiro, and Rodney F. Minchin. 2012. 'Molecular Interaction of Poly(Acrylic Acid) Gold Nanoparticles with Human Fibrinogen'. *ACS Nano* 6 (10): 8962–69. <https://doi.org/10.1021/nn3029953>.

Detwiler, Rachel J., Tony Kojundic, and Per Fidjestøl. 1997. 'Silica Fume Association - Reprints & Related Technical Documents'. <https://www.silicafume.org/reprints.html>.

Di Cristo, Luisana, Dania Movia, Massimiliano G. Bianchi, Manfredi Allegri, Bashir M. Mohamed, Alan P. Bell, Caroline Moore, et al. 2016. 'Proinflammatory Effects of Pyrogenic and Precipitated Amorphous Silica Nanoparticles in Innate Immunity Cells'. *Toxicological Sciences* 150 (1): 40–53. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv258>.

Docter, D., D. Westmeier, M. Markiewicz, S. Stolte, S. K. Knauer, and R. H. Stauber. 2015. 'The Nanoparticle Biomolecule Corona: Lessons Learned - Challenge Accepted?' *Chemical Society Reviews* 44 (17): 6094–6121. <https://doi.org/10.1039/c5cs00217f>.

Du, Zhongjun, Dali Zhao, Li Jing, Guanqun Cui, Minghua Jin, Yang Li, Xiaomei Liu, et al. 2013. 'Cardiovascular Toxicity of Different Sizes Amorphous Silica Nanoparticles in Rats after Intratracheal Instillation'. *Cardiovascular Toxicology* 13 (3): 194–207. <https://doi.org/10.1007/s12012-013-9198-y>.

Dussert, Fanny, Pierre-Adrien Arthaud, Marie-Edith Arnal, Bastien Dalzon, Anaëlle Torres, Thierry Douki, Nathalie Herlin, Thierry Rabilloud, and Marie Carriere. 2020. 'Toxicity to RAW264.7 Macrophages of Silica Nanoparticles and the E551 Food Additive, in

Combination with Genotoxic Agents'. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* 10 (7): E1418. <https://doi.org/10.3390/nano10071418>.

## E

EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), Maged Younes, Peter Aggett, Fernando Aguilar, Riccardo Crebelli, Birgit Dusemund, Metka Filipič, et al. 2018. 'Re-Evaluation of Silicon Dioxide (E 551) as a Food Additive'. *EFSA Journal* 16 (1): e05088. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5088>.

Eggersdorfer, Maximilian L., and Sotiris E. Pratsinis. 2014. 'Agglomerates and Aggregates of Nanoparticles Made in the Gas Phase'. *Advanced Powder Technology* 25 (1): 71–90. <https://doi.org/10.1016/j.appt.2013.10.010>.

Eisen, Ellen A., Sadie Costello, Jonathan Chevrier, and Sally Picciotto. 2011. 'Epidemiologic Challenges for Studies of Occupational Exposure to Engineered Nanoparticles; a Commentary'. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 53 (6 Suppl): S57-61. <https://doi.org/10.1097/JOM.0b013e31821bde98>.

Eisenbarth, S. C. 2019. 'Dendritic Cell Subsets in T Cell Programming: Location Dictates Function'. *Nature Reviews. Immunology* 19 (2): 89–103. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0088-1>.

El Biaze, M., S. Boniface, V. Koscher, E. Mamessier, P. Dupuy, F. Milhe, M. Ramadour, D. Vervloet, and A. Magnan. 2003. 'T Cell Activation, from Atopy to Asthma: More a Paradox than a Paradigm'. *Allergy* 58 (9): 844–53. <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2003.00282.x>.

El-Hillal, O., T. Kurosaki, H. Yamamura, J.-P. Kinet, and A. M. Scharenberg. 1997. 'Syk Kinase Activation by a Src Kinase-Initiated Activation Loop Phosphorylation Chain Reaction'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (5): 1919–24.

'Essentials of Geology, 13th Edition'. n.d. Accessed 14 April 2022. <https://www.pearson.com/content/one-dot-com/one-dot-com/us/en/higher-education/program.html>.

Etchart-Salas, R. 2008. 'L'enjeu des nanomatériaux – The stake in nanomaterials', 6. Fadeel, Bengt. 2012. 'Clear and Present Danger? Engineered Nanoparticles and the Immune System'. *Swiss Medical Weekly*, no. 25 (June). <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13609>.

## F

Faraday. 1857. 'X. The Bakerian Lecture. —Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light'. <https://doi.org/10.1098/rstl.1857.0011>.

Farrera, Consol, and Bengt Fadeel. 2015a. 'It Takes Two to Tango: Understanding the Interactions between Engineered Nanomaterials and the Immune System'. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 95 (September): 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.03.007>.

———. 2015b. 'It Takes Two to Tango: Understanding the Interactions between Engineered Nanomaterials and the Immune System'. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Biological Barriers*, 95 (September): 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.03.007>.

Fedeli, Chiara, Francesco Selvestrel, Regina Tavano, Daniela Segat, Fabrizio Mancin, and Emanuele Papini. 2013. 'Catastrophic Inflammatory Death of Monocytes and Macrophages by Overtaking of a Critical Dose of Endocytosed Synthetic Amorphous Silica Nanoparticles/Serum Protein Complexes'. *Nanomedicine (London, England)* 8 (7): 1101–26. <https://doi.org/10.2217/nnm.12.136>.

Feray, Alexia, Éléonore Guillet, Natacha Szely, Marie Hullo, François-Xavier Legrand, Emilie Brun, Thierry Rabilloud, Marc Pallardy, and Armelle Biola-Vidamment. 2021. 'Synthetic Amorphous Silica Nanoparticles Promote Human Dendritic Cell Maturation and CD4+ T-Lymphocyte Activation'. *Toxicological Sciences* 185 (1): 105–16. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfab120>.

Feray, Alexia, Natacha Szely, Eléonore Guillet, Marie Hullo, François-Xavier Legrand, Emilie Brun, Marc Pallardy, and Armelle Biola-Vidamment. 2020. 'How to Address the Adjuvant Effects of Nanoparticles on the Immune System'. *Nanomaterials* 10 (3): 425. <https://doi.org/10.3390/nano10030425>.

Feynman, Richard. 1959. 'There's Plenty of Room at the Bottom'. <http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.html>.

Fichtner-Feigl, Stefan, Warren Strober, Koji Kawakami, Raj K. Puri, and Atsushi Kitani. 2006. 'IL-13 Signaling through the IL-13alpha2 Receptor Is Involved in Induction of TGF-Beta1 Production and Fibrosis'. *Nature Medicine* 12 (1): 99–106. <https://doi.org/10.1038/nm1332>.

Flach, Tracy L., Gilbert Ng, Aswin Hari, Melanie D. Desrosiers, Ping Zhang, Sandra M. Ward, Mark E. Seamone, et al. 2011. 'Alum Interaction with Dendritic Cell Membrane Lipids Is Essential for Its Adjuvanticity'. *Nature Medicine* 17 (4): 479–87. <https://doi.org/10.1038/nm.2306>.

Fooksman, David R., Santosh Vardhana, Gaia Vasiliver-Shamis, Jan Liese, David Blair, Janelle Waite, Catarina Sacristán, Gabriel Victora, Alexandra Zanin-Zhorov, and Michael L. Dustin. 2010. 'Functional Anatomy of T Cell Activation and Synapse Formation'. *Annual Review of Immunology* 28 (March): 79–105. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101308>.

Frampton, Mark W., Judith C. Stewart, Günter Oberdörster, Paul E. Morrow, David Chalupa,

Anthony P. Pietropaoli, Lauren M. Frasier, et al. 2006. 'Inhalation of Ultrafine Particles Alters Blood Leukocyte Expression of Adhesion Molecules in Humans'. *Environmental Health Perspectives* 114 (1): 51–58. <https://doi.org/10.1289/ehp.7962>.

Freier, Regina, Elfriede Dall, and Hans Brandstetter. 2015. 'Protease Recognition Sites in Bet v 1a Are Cryptic, Explaining Its Slow Processing Relevant to Its Allergenicity'. *Scientific Reports* 5 (August): 12707. <https://doi.org/10.1038/srep12707>.

Fruijtier-Pöllöth, Claudia. 2012. 'The Toxicological Mode of Action and the Safety of Synthetic Amorphous Silica-a Nanostructured Material'. *Toxicology* 294 (2–3): 61–79. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.02.001>.

Fu, Peter P., Qingsu Xia, Huey-Min Hwang, Paresh C. Ray, and Hongtao Yu. 2014. 'Mechanisms of Nanotoxicity: Generation of Reactive Oxygen Species'. *Journal of Food and Drug Analysis* 22 (1): 64–75. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.005>.

Gallo, Paul M., and Stefania Gallucci. 2013. 'The Dendritic Cell Response to Classic, Emerging, and Homeostatic Danger Signals. Implications for Autoimmunity'. *Frontiers in Immunology* 4 (June). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00138>.

Gallucci, S., and P. Matzinger. 2001. 'Danger Signals: SOS to the Immune System'. *Current Opinion in Immunology* 13 (1): 114–19. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(00\)00191-6](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(00)00191-6).

Gamazo, Carlos, Gabriel Gastaminza, Marta Ferrer, María L. Sanz, and Juan M. Irache. 2014. 'Nanoparticle Based-Immunotherapy against Allergy'. *Immunotherapy* 6 (7): 885–97. <https://doi.org/10.2217/imt.14.63>.

Garcia, Emilien. 2016. 'Rôle de la tyrosine kinase SYK dans la régulation du processus métastatique du mélanome'. Phdthesis, Université Côte d'Azur. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01984709>.

García-Álvarez, Rafaela, and María Vallet-Regí. 2021. 'Hard and Soft Protein Corona of Nanomaterials: Analysis and Relevance'. *Nanomaterials* 11 (4): 888. <https://doi.org/10.3390/nano11040888>.

Gasser, Michael, Peter Wick, Martin JD Clift, Fabian Blank, Liliane Diener, Bing Yan, Peter Gehr, Harald F Krug, and Barbara Rothen-Rutishauser. 2012. 'Pulmonary Surfactant Coating of Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNTs) Influences Their Oxidative and pro-Inflammatory Potential in Vitro'. *Particle and Fibre Toxicology* 9 (May): 17. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-9-17>.

Gatoo, Manzoor Ahmad, Sufia Naseem, Mir Yasir Arfat, Ayaz Mahmood Dar, Khusro Qasim, and Swaleha Zubair. 2014. 'Physicochemical Properties of Nanomaterials: Implication in Associated Toxic Manifestations'. *BioMed Research International* 2014: 498420. <https://doi.org/10.1155/2014/498420>.

Gerstmayr, Marianne, Nicola Ilk, Irma Schabussova, Beatrice Jahn-Schmid, Eva M. Egelseer,

Uwe B. Sleytr, Christof Ebner, and Barbara Bohle. 2007. 'A Novel Approach to Specific Allergy Treatment: The Recombinant Allergen-S-Layer Fusion Protein RSbsC-Bet v 1 Matures Dendritic Cells That Prime Th0/Th1 and IL-10-Producing Regulatory T Cells'. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179 (11): 7270–75. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.11.7270>.

Gharagozloo, Marjan, Slawomir Majewski, and Marianna Foldvari. 2015. 'Therapeutic Applications of Nanomedicine in Autoimmune Diseases: From Immunosuppression to Tolerance Induction'. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 11 (4): 1003–18. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.12.003>.

Gómez, Sara, Carlos Gamazo, Beatriz San Roman, Alicia Grau, Socorro Espuelas, Marta Ferrer, Maria L. Sanz, and Juan M. Irache. 2009. 'A Novel Nanoparticulate Adjuvant for Immunotherapy with *Lolium Perenne*'. *Journal of Immunological Methods* 348 (1–2): 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2009.06.005>.

Grotz, Bettina, Mark Geppert, Robert Mills-Goodlet, Sabine Hofer, Norbert Hofstätter, Claudia Asam, Andrea Feinle, et al. 2018a. 'Biologic Effects of Nanoparticle-Allergen Conjugates: Time-Resolved Uptake Using an in Vitro Lung Epithelial Co-Culture Model of A549 and THP-1 Cells'. *Environmental Science: Nano* 5 (9): 2184–97. <https://doi.org/10.1039/C8EN00243F>.

———. 2018b. 'Biologic Effects of Nanoparticle-Allergen Conjugates: Time-Resolved Uptake Using an in Vitro Lung Epithelial Co-Culture Model of A549 and THP-1 Cells'. *Environmental Science: Nano* 5 (9): 2184–97. <https://doi.org/10.1039/C8EN00243F>.

Gualtieri, Maurizio, Tonje Skuland, Tore-Geir Iversen, Marit Låg, Per Schwarze, Dagmar Bilaničová, Giulio Pojana, and Magne Refsnes. 2012. 'Importance of Agglomeration State and Exposure Conditions for Uptake and Pro-Inflammatory Responses to Amorphous Silica Nanoparticles in Bronchial Epithelial Cells'. *Nanotoxicology* 6 (7): 700–712. <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.604441>.

Guichard, Yves, Marie-Aline Maire, Sylvie Sébillaud, Caroline Fontana, Cristina Langlais, Jean-Claude Micillino, Christian Darne, et al. 2015. 'Genotoxicity of Synthetic Amorphous Silica Nanoparticles in Rats Following Short-Term Exposure, Part 2: Intratracheal Instillation and Intravenous Injection'. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 56 (2): 228–44. <https://doi.org/10.1002/em.21928>.

Guilliams, Martin, Pierre Bruhns, Yvan Saeys, Hamida Hammad, and Bart N. Lambrecht. 2014. 'The Function of Fcγ Receptors in Dendritic Cells and Macrophages'. *Nature Reviews Immunology* 14 (2): 94–108. <https://doi.org/10.1038/nri3582>.

Guo, Caixia, Yufan Liu, and Yanbo Li. 2021. 'Adverse Effects of Amorphous Silica Nanoparticles: Focus on Human Cardiovascular Health'. *Journal of Hazardous Materials* 406 (March): 124626. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124626>.

Gupta, Neetu, and Anthony L. DeFranco. 2007. 'Lipid Rafts and B Cell Signaling'. *Seminars*

in *Cell & Developmental Biology* 18 (5): 616–26.  
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.07.009>.

## H

Håkansson, L., C. Heinrich, S. Rak, and P. Venge. 1997. 'Priming of Eosinophil Adhesion in Patients with Birch Pollen Allergy during Pollen Season: Effect of Immunotherapy'. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 99 (4): 551–62. [https://doi.org/10.1016/s0091-6749\(97\)70084-8](https://doi.org/10.1016/s0091-6749(97)70084-8).

———. 1998. 'Activation of B-Lymphocytes during Pollen Season. Effect of Immunotherapy'. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 28 (7): 791–98. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.1998.00295.x>.

Hamilton, Raymond F., Sheetal A. Thakur, Jolene K. Mayfair, and Andrij Holian. 2006. 'MARCO Mediates Silica Uptake and Toxicity in Alveolar Macrophages from C57BL/6 Mice\*'. *Journal of Biological Chemistry* 281 (45): 34218–26.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M605229200>.

Hamilton, Raymond F., Nianqiang Wu, Dale Porter, Mary Buford, Michael Wolfarth, and Andrij Holian. 2009. 'Particle Length-Dependent Titanium Dioxide Nanomaterials Toxicity and Bioactivity'. *Particle and Fibre Toxicology* 6 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-6-35>.

Haniffa, Muzlifah, Matthew Collin, and Florent Ginhoux. 2013. 'Ontogeny and Functional Specialization of Dendritic Cells in Human and Mouse'. In *Advances in Immunology*, 120:1–49. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417028-5.00001-6>.

Hanzal-Bayer, Michael F., and John F. Hancock. 2007. 'Lipid Rafts and Membrane Traffic'. *FEBS Letters* 581 (11): 2098–2104. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.019>.

Hardonnière, Kévin, Natacha Szely, Zeina El Ali, Marc Pallardy, and Saadia Kerdine-Römer. 2022. 'Models of Dendritic Cells to Assess Skin Sensitization'. *Frontiers in Toxicology* 4 (March): 851017. <https://doi.org/10.3389/ftox.2022.851017>.

Hargadon, Kristian M. 2016. 'Murine and Human Model Systems for the Study of Dendritic Cell Immunobiology'. *International Reviews of Immunology* 35 (2): 85–115.  
<https://doi.org/10.3109/08830185.2014.952413>.

Heiligtag, Florian J., and Markus Niederberger. 2013. 'The Fascinating World of Nanoparticle Research'. *Materials Today* 16 (7): 262–71.  
<https://doi.org/10.1016/j.mattod.2013.07.004>.

Hetland, R. B., P. E. Schwarze, B. V. Johansen, T. Myran, N. Uthus, and M. Refsnes. 2001. 'Silica-Induced Cytokine Release from A549 Cells: Importance of Surface Area versus Size'.

*Human & Experimental Toxicology* 20 (1): 46–55.  
<https://doi.org/10.1191/096032701676225130>.

Hirai, Toshiro, Tomoaki Yoshikawa, Hiromi Nabeshi, Tokuyuki Yoshida, Saeko Tochigi, Ko-ichi Ichihashi, Miyuki Uji, et al. 2012. 'Amorphous Silica Nanoparticles Size-Dependently Aggravate Atopic Dermatitis-like Skin Lesions Following an Intradermal Injection'. *Particle and Fibre Toxicology* 9 (February): 3. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-9-3>.

Hirai, Toshiro, Yasuo Yoshioka, Hideki Takahashi, Ko-ichi Ichihashi, Asako Udaka, Takahide Mori, Nobuo Nishijima, et al. 2015. 'Cutaneous Exposure to Agglomerates of Silica Nanoparticles and Allergen Results in IgE-Biased Immune Response and Increased Sensitivity to Anaphylaxis in Mice'. *Particle and Fibre Toxicology* 12 (June): 16. <https://doi.org/10.1186/s12989-015-0095-3>.

Hirano, Seishiro, Yuji Fujitani, Akiko Furuyama, and Sanae Kanno. 2012. 'Macrophage Receptor with Collagenous Structure (MARCO) Is a Dynamic Adhesive Molecule That Enhances Uptake of Carbon Nanotubes by CHO-K1 Cells'. *Toxicology and Applied Pharmacology* 259 (1): 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.12.012>.

Hoang Thi, Thai Thanh, Van Du Cao, Thi Nhu Quynh Nguyen, Duc Thuan Hoang, Van Cuong Ngo, and Dai Hai Nguyen. 2019. 'Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles and Biomedical Applications'. *Materials Science and Engineering: C* 99 (June): 631–56. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.129>.

Hoet, Peter HM, Irene Brüske-Hohlfeld, and Oleg V Salata. 2004. 'Nanoparticles – Known and Unknown Health Risks'. *Journal of Nanobiotechnology* 2 (December): 12. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-2-12>.

Horejsi, Vaclav, and Matous Hrdinka. 2014. 'Membrane Microdomains in Immunoreceptor Signaling'. *FEBS Letters* 588 (15): 2392–97. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.047>.  
Houdeau, Eric. 2012. 'Nanoparticules et barrière intestinale: comprendre les mécanismes de franchissement', 9.

———. 2018. 'Le devenir des nanoparticules dans l'intestin', 4.

Hsiao, I-Lun, and Yuh-Jeen Huang. 2011. 'Effects of Various Physicochemical Characteristics on the Toxicities of ZnO and TiO<sub>2</sub> Nanoparticles toward Human Lung Epithelial Cells'. *Science of The Total Environment* 409 (7): 1219–28. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.12.033>.

Hu, Xiajun, Xiao Chen, Xiaoli Shi, Jingwei Gao, Zhuo Ao, Nan Li, Jinghe Yuan, et al. 2020. 'Bionanoparticle-Based Delivery in Antihypertensive Vaccine Mediates DC Activation through Lipid-Raft Reorganization'. *Advanced Functional Materials* 30 (19): 2000346. <https://doi.org/10.1002/adfm.202000346>.

Huang, Ching-Tai, Creg J. Workman, Dallas Flies, Xiaoyu Pan, Aimee L. Marson, Gang Zhou, Edward L. Hipkiss, et al. 2004. 'Role of LAG-3 in Regulatory T Cells'. *Immunity* 21 (4): 503–

13. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.08.010>.

Huang, Keyang, Huili Ma, Juan Liu, Shuaidong Huo, Arunandan Kumar, Tuo Wei, Xu Zhang, et al. 2012. 'Size-Dependent Localization and Penetration of Ultrasmall Gold Nanoparticles in Cancer Cells, Multicellular Spheroids, and Tumors *in Vivo*.' *ACS Nano*. <https://doi.org/10.1021/nn301282m>.

Huang, Xinglu, Linlin Li, Tianlong Liu, Nanjing Hao, Huiyu Liu, Dong Chen, and Fangqiong Tang. 2011. 'The Shape Effect of Mesoporous Silica Nanoparticles on Biodistribution, Clearance, and Biocompatibility *in Vivo*'. *ACS Nano* 5 (7): 5390–99. <https://doi.org/10.1021/nn200365a>.

Huang, Xinglu, Xu Teng, Dong Chen, Fangqiong Tang, and Junqi He. 2010. 'The Effect of the Shape of Mesoporous Silica Nanoparticles on Cellular Uptake and Cell Function'. *Biomaterials* 31 (3): 438–48. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.060>.

Hubbell, Jeffrey A., Susan N. Thomas, and Melody A. Swartz. 2009. 'Materials Engineering for Immunomodulation'. *Nature* 462 (7272): 449–60. <https://doi.org/10.1038/nature08604>.  
Inoue, Ken-Ichiro, and Hirohisa Takano. 2011. 'Aggravating Impact of Nanoparticles on Immune-Mediated Pulmonary Inflammation'. *TheScientificWorldJournal* 11 (February): 382–90. <https://doi.org/10.1100/tsw.2011.44>.

## I

Inoue, Masahide, Koji Sakamoto, Atsushi Suzuki, Shinya Nakai, Akira Ando, Yukihiro Shiraki, Yoshio Nakahara, et al. 2021. 'Size and Surface Modification of Silica Nanoparticles Affect the Severity of Lung Toxicity by Modulating Endosomal ROS Generation in Macrophages'. *Particle and Fibre Toxicology* 18 (June): 21. <https://doi.org/10.1186/s12989-021-00415-0>.  
Jakubzick, Claudia, Steven L. Kunkel, Raj K. Puri, and Cory M. Hogaboam. 2004. 'Therapeutic Targeting of IL-4- and IL-13-Responsive Cells in Pulmonary Fibrosis'. *Immunologic Research* 30 (3): 339–49. <https://doi.org/10.1385/IR:30:3:339>.

## J

Jani, P., G. W. Halbert, J. Langridge, and A. T. Florence. 1990. 'Nanoparticle Uptake by the Rat Gastrointestinal Mucosa: Quantitation and Particle Size Dependency'. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 42 (12): 821–26. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1990.tb07033.x>.

Jani, Praful U., David E. McCarthy, and Alexander T. Florence. 1994. 'Titanium Dioxide (Rutile) Particle Uptake from the Rat GI Tract and Translocation to Systemic Organs after Oral Administration'. *International Journal of Pharmaceutics* 105 (2): 157–68. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(94\)90461-8](https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)90461-8).

Jiang, Wen, Betty Y. S. Kim, James T. Rutka, and Warren C. W. Chan. 2008. 'Nanoparticle-Mediated Cellular Response Is Size-Dependent'. *Nature Nanotechnology* 3 (3): 145–50. <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.30>.

Johnson, Litty, Lorenz Aglas, Wai Tuck Soh, Mark Geppert, Sabine Hofer, Norbert Hofstätter, Peter Briza, et al. 2021. 'Structural Alterations of Antigens at the Material Interface: An Early Decision Toolbox Facilitating Safe-by-Design Nanovaccine Development'. *International Journal of Molecular Sciences* 22 (19): 10895. <https://doi.org/10.3390/ijms221910895>.

Józefowski, Szczepan. 2012. '[The role of the class A scavenger receptors, SR-A and MARCO, in the immune system. Part 2. Contribution to recognition and phagocytosis of pathogens as well as induction of immune response]'. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej (Online)* 66 (February): 120–31. <https://doi.org/10.5604/17322693.984080>.

## K

Kabashima, Kenji, Kazunari Sugita, Noriko Shiraishi, Hirokazu Tamamura, Nobutaka Fujii, and Yoshiki Tokura. 2007. 'CXCR4 Engagement Promotes Dendritic Cell Survival and Maturation'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 361 (4): 1012–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.07.128>.

Kambayashi, Taku, and Terri M. Laufer. 2014. 'Atypical MHC Class II-Expressing Antigen-Presenting Cells: Can Anything Replace a Dendritic Cell?' *Nature Reviews Immunology* 14 (11): 719–30. <https://doi.org/10.1038/nri3754>.

Kang, Kyeongah, and Jong-Seok Lim. 2012. 'Induction of Functional Changes of Dendritic Cells by Silica Nanoparticles'. *Immune Network* 12 (3): 104–12. <https://doi.org/10.4110/in.2012.12.3.104>.

Kanno, Sanae, Akiko Furuyama, and Seishiro Hirano. 2007. 'A Murine Scavenger Receptor MARCO Recognizes Polystyrene Nanoparticles'. *Toxicological Sciences* 97 (2): 398–406. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm050>.

Kaplan, Daniel H., Botond Z. Igyártó, and Anthony A. Gaspari. 2012. 'Early Events in the Induction of Allergic Contact Dermatitis'. *Nature Reviews Immunology* 12 (2): 114–24. <https://doi.org/10.1038/nri3150>.

Ke, Pu Chun, Sijie Lin, Wolfgang J. Parak, Thomas P. Davis, and Frank Caruso. 2017. 'A Decade of the Protein Corona'. *ACS Nano* 11 (12): 11773–76. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b08008>.

Kerrigan, Ann M., and Gordon D. Brown. 2011. 'Syk-Coupled C-Type Lectins in Immunity'. *Trends in Immunology* 32 (4): 151–56. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.01.002>.

- Kettiger, Helene, Gabriela Québatte, Barbara Perrone, and Jörg Huwyler. 2016. 'Interactions between Silica Nanoparticles and Phospholipid Membranes'. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1858 (9): 2163–70. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.06.023>.
- Kim, Jae-Hyun, Cheol-Su Kim, Rosa Mistica Coles Ignacio, Dong-Heui Kim, Ma Easter Joy Sajo, Eun Ho Maeng, Xu-Feng Qi, et al. 2014. 'Immunotoxicity of Silicon Dioxide Nanoparticles with Different Sizes and Electrostatic Charge'. *International Journal of Nanomedicine* 9 Suppl 2: 183–93. <https://doi.org/10.2147/IJN.S57934>.
- Knox, R. B., C. Suphioglu, P. Taylor, R. Desai, H. C. Watson, J. L. Peng, and L. A. Bursill. 1997. 'Major Grass Pollen Allergen Lol p 1 Binds to Diesel Exhaust Particles: Implications for Asthma and Air Pollution'. *Clinical & Experimental Allergy* 27 (3): 246–51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.1997.tb00702.x>.
- Koike, Eiko, Hirohisa Takano, Ken-ichiro Inoue, Rie Yanagisawa, and Takahiro Kobayashi. 2008. 'Carbon Black Nanoparticles Promote the Maturation and Function of Mouse Bone Marrow-Derived Dendritic Cells'. *Chemosphere* 73 (3): 371–76. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.05.054>.
- Kong, Bokyung, Ji Hyun Seog, Lauren M Graham, and Sang Bok Lee. 2011. 'Experimental Considerations on the Cytotoxicity of Nanoparticles'. *Nanomedicine (London, England)* 6 (5): 929–41. <https://doi.org/10.2217/nnm.11.77>.
- Kool, Mirjam, Monique A. M. Willart, Menno van Nimwegen, Ingrid Bergen, Philippe Pouliot, J. Christian Virchow, Neil Rogers, et al. 2011. 'An Unexpected Role for Uric Acid as an Inducer of T Helper 2 Cell Immunity to Inhaled Antigens and Inflammatory Mediator of Allergic Asthma'. *Immunity* 34 (4): 527–40. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.015>.
- Kumar, Rajiv, Indrajit Roy, Tymish Y. Ohulchanskyy, Lalit N. Goswami, Adela C. Bonoiu, Earl J. Bergey, Kenneth M. Trampusch, Anirban Maitra, and Paras N. Prasad. 2008. 'Covalently Dye-Linked, Surface-Controlled, and Bioconjugated Organically Modified Silica Nanoparticles as Targeted Probes for Optical Imaging'. *ACS Nano* 2 (3): 449–56. <https://doi.org/10.1021/nn700370b>.
- Kurosaki, T, M Takata, Y Yamanashi, T Inazu, T Taniguchi, T Yamamoto, and H Yamamura. 1994. 'Syk Activation by the Src-Family Tyrosine Kinase in the B Cell Receptor Signaling.' *Journal of Experimental Medicine* 179 (5): 1725–29. <https://doi.org/10.1084/jem.179.5.1725>.
- Kuschner, and Wright. 1976. 'The Effects of Intratracheal Instillation of Glass Fiber of Varying Size in Guinea Pigs. In "Occupational Exposure to Fibrous Glass'. *Environmental Research* 44 (1): 103–16.

## L

Land, Walter Gottlieb. 2018. *Damage-Associated Molecular Patterns in Human Diseases: Volume 1: Injury-Induced Innate Immune Responses*. Springer.

Laux, Peter, Jutta Tentschert, Christian Riebeling, Albert Braeuning, Otto Creutzenberg, Astrid Epp, Valérie Fessard, et al. 2018. 'Nanomaterials: Certain Aspects of Application, Risk Assessment and Risk Communication'. *Archives of Toxicology* 92 (1): 121–41. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2144-1>.

Lavaud, F. 2019. 'L'allergie aux pollens reste d'actualité'. *Revue Française d'Allergologie* 59 (8): 511–13. <https://doi.org/10.1016/j.reval.2019.10.002>.

Lechmann, Matthias, Susanne Berchtold, Alexander Steinkasserer, and Joachim Hauber. 2002. 'CD83 on Dendritic Cells: More than Just a Marker for Maturation'. *Trends in Immunology* 23 (6): 273–75. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(02\)02214-7](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(02)02214-7).

Lee, Jae-Hyun, Eun Sook Kim, Mi Hyeon Cho, Mina Son, Soo-In Yeon, Jeon-Soo Shin, and Jinwoo Cheon. 2010. 'Artificial Control of Cell Signaling and Growth by Magnetic Nanoparticles'. *Angewandte Chemie* 122 (33): 5834–38. <https://doi.org/10.1002/ange.201001149>.

Leung, Chi Chiu, Ignatius Tak Sun Yu, and Weihong Chen. 2012a. 'Silicosis'. *The Lancet* 379 (9830): 2008–18. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60235-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60235-9).

———. 2012b. 'Silicosis'. *Lancet (London, England)* 379 (9830): 2008–18. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60235-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60235-9).

———. 2012c. 'Silicosis'. *The Lancet* 379 (9830): 2008–18. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60235-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60235-9).

Li, Ning, Jack R. Harkema, Ryan P. Lewandowski, Meiyang Wang, Lori A. Bramble, Glenn R. Gookin, Zhi Ning, Michael T. Kleinman, Constantinos Sioutas, and Andre E. Nel. 2010. 'Ambient Ultrafine Particles Provide a Strong Adjuvant Effect in the Secondary Immune Response: Implication for Traffic-Related Asthma Flares'. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 299 (3): L374–383. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00115.2010>.

Li, Ning, Meiyang Wang, Lori A. Bramble, Debra A. Schmitz, James J. Schauer, Constantinos Sioutas, Jack R. Harkema, and Andre E. Nel. 2009. 'The Adjuvant Effect of Ambient Particulate Matter Is Closely Reflected by the Particulate Oxidant Potential'. *Environmental Health Perspectives* 117 (7): 1116–23. <https://doi.org/10.1289/ehp.0800319>.

Li, Xueyan, Yan Li, Songqing Lv, Hailin Xu, Ru Ma, Zhiwei Sun, Yanbo Li, and Caixia Guo. 2022. 'Long-Term Respiratory Exposure to Amorphous Silica Nanoparticles Promoted Systemic Inflammation and Progression of Fibrosis in a Susceptible Mouse Model'. *Chemosphere* 300 (August): 134633. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134633>.

Li, Yanbo, Ru Ma, Xiaoying Liu, Yi Qi, Alimire Abulikemu, Xinying Zhao, Huawei Duan, Xianqing Zhou, Caixia Guo, and Zhiwei Sun. 2019. 'Endoplasmic Reticulum Stress-Dependent Oxidative Stress Mediated Vascular Injury Induced by Silica Nanoparticles in Vivo and in Vitro'. *NanoImpact* 14 (February): 100169. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2019.100169>.

Li, Zhenhu, Yuan Zhang, and Bing Sun. 2011. 'Current Understanding of Th2 Cell Differentiation and Function'. *Protein & Cell* 2 (8): 604–11. <https://doi.org/10.1007/s13238-011-1083-5>.

Licciardi, Mariano, Giovanna Montana, Maria Luisa Bondi, Angela Bonura, Cinzia Scialabba, Mario Melis, Calogero Fiorica, Gaetano Giammona, and Paolo Colombo. 2014. 'An Allergen-Polymeric Nanoaggregate as a New Tool for Allergy Vaccination'. *International Journal of Pharmaceutics* 465 (1–2): 275–83. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.01.031>.

Lietha, Daniel, and Tina Izard. 2020. 'Roles of Membrane Domains in Integrin-Mediated Cell Adhesion'. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (15): 5531. <https://doi.org/10.3390/ijms21155531>.

Ligacheva, A. A., M. G. Danilets, E. S. Trofimova, Y. P. Belsky, N. V. Belska, G. N. Zyuz'kov, V. V. Zhdanov, et al. 2014. 'Signaling Events during Macrophage Activation with Betula Pendula Roth Pectic Polysaccharides'. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 156 (4): 465–69. <https://doi.org/10.1007/s10517-014-2375-6>.

Liu, Xuting, Bin Lu, Juanli Fu, Xiaokang Zhu, Erqun Song, and Yang Song. 2021a. 'Amorphous Silica Nanoparticles Induce Inflammation via Activation of NLRP3 Inflammasome and HMGB1/TLR4/MYD88/NF-Kb Signaling Pathway in HUVEC Cells'. *Journal of Hazardous Materials* 404 (February): 124050. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124050>.

———. 2021b. 'Amorphous Silica Nanoparticles Induce Inflammation via Activation of NLRP3 Inflammasome and HMGB1/TLR4/MYD88/NF-Kb Signaling Pathway in HUVEC Cells'. *Journal of Hazardous Materials* 404 (February): 124050. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124050>.

Liu, Zhenzhen, and Paul A. Roche. 2015. 'Macropinocytosis in Phagocytes: Regulation of MHC Class-II-Restricted Antigen Presentation in Dendritic Cells'. *Frontiers in Physiology* 6 (January): 1. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00001>.

Lu, L., M. L. Sui, and K. Lu. 2000. 'Superplastic Extensibility of Nanocrystalline Copper at Room Temperature'. *Science* 287 (5457): 1463–66. <https://doi.org/10.1126/science.287.5457.1463>.

Lu, Meng-Meng, Jing Bai, Dan Shao, Jing Qiu, Ming Li, Xiao Zheng, Yun Xiao, et al. 2018. 'Antibacterial and Biodegradable Tissue Nano-Adhesives for Rapid Wound Closure'. *International Journal of Nanomedicine* 13: 5849–63. <https://doi.org/10.2147/IJN.S177109>.

## M

Machado, Yoan, Regina Freier, Sandra Scheiblhofer, Theresa Thalhamer, Melissa Mayr, Peter Briza, Sarina Grutsch, et al. 2016. 'Fold Stability during Endolysosomal Acidification Is a Key Factor for Allergenicity and Immunogenicity of the Major Birch Pollen Allergen'. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 137 (5): 1525–34. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.09.026>.

Mahon, Eugene, Anna Salvati, Francesca Baldelli Bombelli, Iseult Lynch, and Kenneth A. Dawson. 2012. 'Designing the Nanoparticle–Biomolecule Interface for "Targeting and Therapeutic Delivery"'. *Journal of Controlled Release, Drug Delivery Research in Europe*, 161 (2): 164–74. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.009>.

Maillère, Bernard, Stéphanie Delluc, and Gilles Ravot. 2012. 'The prediction of immunogenicity of therapeutic proteins'. *Medecine Sciences: M/S* 28 (1): 82–88. <https://doi.org/10.1051/medsci/2012281021>.

Maldonado, Roberto A., Robert A. LaMothe, Joseph D. Ferrari, Ai-Hong Zhang, Robert J. Rossi, Pallavi N. Kolte, Aaron P. Griset, et al. 2015. 'Polymeric Synthetic Nanoparticles for the Induction of Antigen-Specific Immunological Tolerance'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (2): E156-165. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408686111>.

Mann, Elizabeth R, and Xuhang Li. 2014. 'Intestinal Antigen-Presenting Cells in Mucosal Immune Homeostasis: Crosstalk between Dendritic Cells, Macrophages and B-Cells'. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 20 (29): 9653–64. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i29.9653>.

Mansueto, My S., Abigail Reens, Larissa Rakhilina, An Chi, Bo-Sheng Pan, and J. Richard Miller. 2019. 'A Reevaluation of the Spleen Tyrosine Kinase (SYK) Activation Mechanism'. *Journal of Biological Chemistry* 294 (19): 7658–68. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008045>.

Matsuo, Kazuhiko, Sachiko Hirobe, Naoki Okada, and Shinsaku Nakagawa. 2016. 'Analysis of Skin Permeability and Toxicological Properties of Amorphous Silica Particles'. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 39 (7): 1201–5. <https://doi.org/10.1248/bpb.b16-00258>.

Matzinger, P. 1994. 'Tolerance, Danger, and the Extended Family'. *Annual Review of Immunology* 12: 991–1045. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.005015>.

Matzinger, Polly. 2012. 'The Evolution of the Danger Theory'. *Expert Review of Clinical Immunology* 8 (4): 311–17. <https://doi.org/10.1586/eci.12.21>.

Merad, Miriam, Priyanka Sathe, Julie Helft, Jennifer Miller, and Arthur Mortha. 2013. 'The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting'. *Annual Review of Immunology* 31: 563–604. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074950>.

Mitra, Satyajit K, and David D Schlaepfer. 2006. 'Integrin-Regulated FAK–Src Signaling in Normal and Cancer Cells'. *Current Opinion in Cell Biology*, Cell-to-cell contact and extracellular matrix, 18 (5): 516–23. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.08.011>.

Mócsai, Attila, Jürgen Ruland, and Victor L. J. Tybulewicz. 2010. 'The SYK Tyrosine Kinase: A Crucial Player in Diverse Biological Functions'. *Nature Reviews Immunology* 10 (6): 387–402. <https://doi.org/10.1038/nri2765>.

Monopoli, Marco P., Christoffer Aberg, Anna Salvati, and Kenneth A. Dawson. 2012. 'Biomolecular Coronas Provide the Biological Identity of Nanosized Materials'. *Nature Nanotechnology* 7 (12): 779–86. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.207>.

Monteiro-Riviere, N. A., K. Wiench, R. Landsiedel, S. Schulte, A. O. Inman, and J. E. Riviere. 2011. 'Safety Evaluation of Sunscreen Formulations Containing Titanium Dioxide and Zinc Oxide Nanoparticles in UVB Sunburned Skin: An In Vitro and In Vivo Study'. *Toxicological Sciences* 123 (1): 264–80. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr148>.

Moon, Changsuk, Hyun-Jeong Park, Youn-Hee Choi, Eun-Mi Park, Vincent Castranova, and Jihee Lee Kang. 2010. 'Pulmonary Inflammation after Intraperitoneal Administration of Ultrafine Titanium Dioxide (TiO<sub>2</sub>) at Rest or in Lungs Primed with Lipopolysaccharide'. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* 73 (5): 396–409. <https://doi.org/10.1080/15287390903486543>.

Mousseau, Fanny. 2017. 'Le Surfactant Pulmonaire, Une Barrière Déterminante de La Réponse Des Cellules à l'exposition Aux Nanoparticules'. These de doctorat, Sorbonne Paris Cité. <https://www.theses.fr/2017USPCC125>.

Murugadoss, Sivakumar, Sybille van den Brule, Frederic Brassinne, Noham Sebaihi, Jorge Mejia, Stéphane Lucas, Jasmine Petry, et al. 2020a. 'Is Aggregated Synthetic Amorphous Silica Toxicologically Relevant?' *Particle and Fibre Toxicology* 17 (1): 1. <https://doi.org/10.1186/s12989-019-0331-3>.

———. 2020b. 'Is Aggregated Synthetic Amorphous Silica Toxicologically Relevant?' *Particle and Fibre Toxicology* 17 (1): 1. <https://doi.org/10.1186/s12989-019-0331-3>.

## N

Nabeshi, Hiromi, Tomoaki Yoshikawa, Keigo Matsuyama, Yasutaro Nakazato, Kazuhiko Matsuo, Akihiro Arimori, Masaaki Isobe, et al. 2011. 'Systemic Distribution, Nuclear Entry and Cytotoxicity of Amorphous Nanosilica Following Topical Application'. *Biomaterials* 32 (11): 2713–24. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.12.042>.

Nabhan, Myriam, François-Xavier Legrand, Victor Le-Minh, Baptiste Robin, Rami Bechara, Nicolas Huang, Claire Smadja, Marc Pallardy, and Isabelle Turbica. 2020. 'The FcγRIIIa–Syk

Axis Controls Human Dendritic Cell Activation and T Cell Response Induced by Infliximab Aggregates'. *The Journal of Immunology* 205 (9): 2351–61. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901381>.

Nagorsen, Dirk, Francesco M Marincola, and Monica C Panelli. 2004. 'Cytokine and Chemokine Expression Profiles of Maturing Dendritic Cells Using Multiprotein Platform Arrays'. *Cytokine* 25 (1): 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2003.08.012>.

Nakanishi, Kana, Mitsutoshi Tsukimoto, Sei-ichi Tanuma, Ken Takeda, and Shuji Kojima. 2016. 'Silica Nanoparticles Activate Purinergic Signaling via P2X7 Receptor in Dendritic Cells, Leading to Production of pro-Inflammatory Cytokines'. *Toxicology in Vitro* 35 (September): 202–11. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.06.003>.

Napierska, Dorota, Leen C. J. Thomassen, Virginie Rabolli, Dominique Lison, Laetitia Gonzalez, Micheline Kirsch-Volders, Johan A. Martens, and Peter H. Hoet. 2009. 'Size-Dependent Cytotoxicity of Monodisperse Silica Nanoparticles in Human Endothelial Cells'. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* 5 (7): 846–53. <https://doi.org/10.1002/sml.200800461>.

Napierska, Dorota, Leen CJ Thomassen, Dominique Lison, Johan A Martens, and Peter H Hoet. 2010. 'The Nanosilica Hazard: Another Variable Entity'. *Particle and Fibre Toxicology* 7 (December): 39. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-39>.

Nash, T., A. C. Allison, and J. S. Harington. 1966. 'Physico-Chemical Properties of Silica in Relation to Its Toxicity'. *Nature* 210 (5033): 259–61. <https://doi.org/10.1038/210259a0>.  
Neefjes, Jacques, Marlieke L. M. Jongma, Petra Paul, and Oddmund Bakke. 2011. 'Towards a Systems Understanding of MHC Class I and MHC Class II Antigen Presentation'. *Nature Reviews. Immunology* 11 (12): 823–36. <https://doi.org/10.1038/nri3084>.

Nemmar, A., P. H. M. Hoet, B. Vanquickenborne, D. Dinsdale, M. Thomeer, M. F. Hoylaerts, H. Vanbilloen, L. Mortelmans, and B. Nemery. 2002. 'Passage of Inhaled Particles into the Blood Circulation in Humans'. *Circulation* 105 (4): 411–14. <https://doi.org/10.1161/hc0402.104118>.

Ng, Gilbert, Karan Sharma, Sandra M. Ward, Melanie D. Desrosiers, Leslie A. Stephens, W. Michael Schoel, Tonglei Li, et al. 2008. 'Receptor-Independent, Direct Membrane Binding Leads to Cell Surface Lipid Sorting and Syk Kinase Activation in Dendritic Cells'. *Immunity* 29 (5): 807–18. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.09.013>.

Noirey, N., N. Rougier, C. André, D. Schmitt, and C. Vincent. 2000. 'Langerhans-like Dendritic Cells Generated from Cord Blood Progenitors Internalize Pollen Allergens by Macropinocytosis, and Part of the Molecules Are Processed and Can Activate Autologous Naive T Lymphocytes'. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 105 (6 Pt 1): 1194–1201. <https://doi.org/10.1067/mai.2000.106545>.

## O

Oberdörster, Gunter. 2001. 'Pulmonary Effects of Inhaled Ultrafine Particles'. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 74 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1007/s004200000185>.

Oberdörster, Günter, Eva Oberdörster, and Jan Oberdörster. 2005a. 'Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles'. *Environmental Health Perspectives* 113 (7): 823–39. <https://doi.org/10.1289/ehp.7339>.

———. 2005b. 'Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles'. *Environmental Health Perspectives* 113 (7): 823–39. <https://doi.org/10.1289/ehp.7339>.

OECD. 2022. *Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: In Vitro Skin Sensitisation Assays Addressing the Key Event on Activation of Dendritic Cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation*. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development. [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442e-in-vitro-skin-sensitisation\\_9789264264359-en;jsessionid=kqo9YTh0RCFvkgB5u0DAO4\\_5tDf0xsxVwzUhaHwe.ip-10-240-5-154](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442e-in-vitro-skin-sensitisation_9789264264359-en;jsessionid=kqo9YTh0RCFvkgB5u0DAO4_5tDf0xsxVwzUhaHwe.ip-10-240-5-154).

Ogawa, Takao, Ryu Okumura, Kazuya Nagano, Tomomi Minemura, Masahiro Izumi, Daisuke Motooka, Shota Nakamura, et al. 2021. 'Oral Intake of Silica Nanoparticles Exacerbates Intestinal Inflammation'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 534 (January): 540–46. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.047>.

Orr, Galya A., William B. Chrisler, Kaylyn J. Cassens, Ruimin Tan, Barbara J. Tarasevich, Lye Meng Markillie, Richard C. Zangar, and Brian D. Thrall. 2011. 'Cellular Recognition and Trafficking of Amorphous Silica Nanoparticles by Macrophage Scavenger Receptor A'. *Nanotoxicology* 5 (3): 296–311. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.513836>.

Ouyang, Weiming, Will Liao, Chong T. Luo, Na Yin, Morgan Huse, Myoungjoo V. Kim, Min Peng, et al. 2012. 'Novel Foxo1-Dependent Transcriptional Programs Control Treg Cell Function'. *Nature* 491 (7425): 554–59. <https://doi.org/10.1038/nature11581>.

## P

Pallardy, Marc J., Isabelle Turbica, and Armelle Biola-Vidamment. 2017a. 'Why the Immune System Should Be Concerned by Nanomaterials?' *Frontiers in Immunology* 8: 544. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00544>.

———. 2017b. 'Why the Immune System Should Be Concerned by Nanomaterials?' *Frontiers in Immunology* 8 (May): 544. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00544>.

Park, Eun-Jung, and Kwangsik Park. 2009a. 'Oxidative Stress and Pro-Inflammatory

Responses Induced by Silica Nanoparticles in Vivo and in Vitro'. *Toxicology Letters* 184 (1): 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.10.012>.

———. 2009b. 'Oxidative Stress and Pro-Inflammatory Responses Induced by Silica Nanoparticles in Vivo and in Vitro'. *Toxicology Letters* 184 (1): 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.10.012>.

Park, Sangwoo, Lucy Eunju Lee, Hanna Kim, Ji Eun Kim, Seung Jun Lee, Sunggyu Yoon, Seungwoo Shin, et al. 2021. 'Detection of Intracellular Monosodium Urate Crystals in Gout Synovial Fluid Using Optical Diffraction Tomography'. *Scientific Reports* 11 (1): 10019. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89337-7>.

Pavan, Cristina, Massimo Delle Piane, Maria Gullo, Francesca Filippi, Bice Fubini, Peter Hoet, Claire J. Horwell, et al. 2019. 'The Puzzling Issue of Silica Toxicity: Are Silanols Bridging the Gaps between Surface States and Pathogenicity?' *Particle and Fibre Toxicology* 16 (August): 32. <https://doi.org/10.1186/s12989-019-0315-3>.

Pavan, Cristina, Virginie Rabolli, Maura Tomatis, Bice Fubini, and Dominique Lison. 2014. 'Why Does the Hemolytic Activity of Silica Predict Its Pro-Inflammatory Activity?' *Particle and Fibre Toxicology* 11 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12989-014-0076-y>.

Pavan, Cristina, Rosangela Santalucia, Riccardo Leinardi, Marco Fabbiani, Yousof Yakoub, Francine Uwambayinema, Piero Ugliengo, et al. 2020. 'Nearly Free Surface Silanols Are the Critical Molecular Moieties That Initiate the Toxicity of Silica Particles'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (45): 27836–46. <https://doi.org/10.1073/pnas.2008006117>.

Pavan, Cristina, Matthew J. Sydor, Chiara Bellomo, Riccardo Leinardi, Stefania Cananà, Rebekah L. Kendall, Erica Rebba, et al. 2022. 'Molecular Recognition between Membrane Epitopes and Nearly Free Surface Silanols Explains Silica Membranolytic Activity'. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 217 (September): 112625. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112625>.

Pavan, Cristina, Maura Tomatis, Mara Ghiazza, Virginie Rabolli, Vera Bolis, Dominique Lison, and Bice Fubini. 2013a. 'In Search of the Chemical Basis of the Hemolytic Potential of Silicas'. *Chemical Research in Toxicology* 26 (8): 1188–98. <https://doi.org/10.1021/tx400105f>.

———. 2013b. 'In Search of the Chemical Basis of the Hemolytic Potential of Silicas'. *Chemical Research in Toxicology* 26 (8): 1188–98. <https://doi.org/10.1021/tx400105f>. Pavel, Ilarion, Alain Brun, Alexandre Moatti, Jean-Louis Pautrat, and Jean-Louis Robert. 2008. 'À la découverte du nanomonde'. [enseignementsup-recherche.gouv.fr](http://enseignementsup-recherche.gouv.fr). <https://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/fr/la-decouverte-du-nanomonde-47260>.

Peeters, Paul M., Irene M. J. Eurlings, Timothy N. Perkins, Emiel F. Wouters, Roel P. F. Schins, Paul J. A. Borm, Wolfgang Drommer, Niki L. Reynaert, and Catrin Albrecht. 2014.

'Silica-Induced NLRP3 Inflammasome Activation in Vitro and in Rat Lungs'. *Particle and Fibre Toxicology* 11 (November): 58. <https://doi.org/10.1186/s12989-014-0058-0>.

Peeters, Paul M., Timothy N. Perkins, Emiel F. M. Wouters, Brooke T. Mossman, and Niki L. Reynaert. 2013. 'Silica Induces NLRP3 Inflammasome Activation in Human Lung Epithelial Cells'. *Particle and Fibre Toxicology* 10 (February): 3. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-3>.

Pekkanen, Juha, Annette Peters, Gerard Hoek, Pekka Tiittanen, Bert Brunekreef, Jeroen de Hartog, Joachim Heinrich, et al. 2002. 'Particulate Air Pollution and Risk of ST-Segment Depression during Repeated Submaximal Exercise Tests among Subjects with Coronary Heart Disease: The Exposure and Risk Assessment for Fine and Ultrafine Particles in Ambient Air (ULTRA) Study'. *Circulation* 106 (8): 933–38. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000027561.41736.3c>.

Peters, Ruud, Evelien Kramer, Agnes G. Oomen, Zahira E. Herrera Rivera, Gerlof Oegema, Peter C. Tromp, Remco Fokkink, et al. 2012. 'Presence of Nano-Sized Silica during *In Vitro* Digestion of Foods Containing Silica as a Food Additive'. *ACS Nano* 6 (3): 2441–51. <https://doi.org/10.1021/nn204728k>.

Petros, Robby A., and Joseph M. DeSimone. 2010. 'Strategies in the Design of Nanoparticles for Therapeutic Applications'. *Nature Reviews Drug Discovery* 9 (8): 615–27. <https://doi.org/10.1038/nrd2591>.

Porter, Dale W., Nianqiang Wu, Ann F. Hubbs, Robert R. Mercer, Kathleen Funk, Fanke Meng, Jiangtian Li, et al. 2013. 'Differential Mouse Pulmonary Dose and Time Course Responses to Titanium Dioxide Nanospheres and Nanobelts'. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 131 (1): 179–93. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs261>.

Pozzobon, Tommaso, Giacomo Goldoni, Antonella Viola, and Barbara Molon. 2016. 'CXCR4 Signaling in Health and Disease'. *Immunology Letters* 177 (September): 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.06.006>.

Pradeu, Thomas, and Edwin L. Cooper. 2012. 'The Danger Theory: 20 Years Later'. *Frontiers in Immunology* 3: 287. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00287>.

Pratsinis, Sotiris E. 1998. 'Flame Aerosol Synthesis of Ceramic Powders'. *Progress in Energy and Combustion Science* 24 (3): 197–219. [https://doi.org/10.1016/S0360-1285\(97\)00028-2](https://doi.org/10.1016/S0360-1285(97)00028-2).  
Prechtel, Alexander T., and Alexander Steinkasserer. 2007. 'CD83: An Update on Functions and Prospects of the Maturation Marker of Dendritic Cells'. *Archives of Dermatological Research* 299 (2): 59–69. <https://doi.org/10.1007/s00403-007-0743-z>.

Prosie, Florin, François-Xavier Lesage, and Frédéric Deschamps. 2008. 'Nanoparticules : structures, utilisations et effets sur la santé'. *La Presse Médicale* 37 (10): 1431–37. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2008.04.003>.

## R

Radauer-Preiml, Isabella, Ancuela Andosch, Thomas Hawranek, Ursula Luetz-Meindl, Markus Wiederstein, Jutta Horejs-Hoeck, Martin Himly, Matthew Boyles, and Albert Duschl. 2016a. 'Nanoparticle-Allergen Interactions Mediate Human Allergic Responses: Protein Corona Characterization and Cellular Responses'. *Particle and Fibre Toxicology* 13 (January): 3. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0113-0>.

———. 2016b. 'Nanoparticle-Allergen Interactions Mediate Human Allergic Responses: Protein Corona Characterization and Cellular Responses'. *Particle and Fibre Toxicology* 13 (January): 3. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0113-0>.

Ragueh, Deka Moussa. 2012. 'Filtration de silices précipitées: mise en évidence des relations entre propriétés macroscopiques et échelles locales dans les dépôts', 218.

Ramussen, Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS), Institut pour la santé et la protection des consommateurs (Centre commun de recherche), Institute of Mineralogy and Crystallography (IMC-BAS), L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation de l'environnement et du travail (ANSES), National Research Centre for the Working Environment (NRCWE), and Veterinary and Agrochemical Research Centre (CODA-CERVA). 2013. *Synthetic Amorphous Silicon Dioxide (NM-200, NM-201, NM-202, NM-203, NM-204) : Characterisation and Physico-Chemical Properties: JRC Repository : NM Series of Representative Manufactured Nanomaterials*. LU: Office des publications de l'Union européenne. <https://data.europa.eu/doi/10.2788/57989>.

Rancan, Fiorenza, Qi Gao, Christina Graf, Stefan Troppens, Sabrina Hadam, Steffen Hackbarth, Cynthia Kembuan, et al. 2012. 'Skin Penetration and Cellular Uptake of Amorphous Silica Nanoparticles with Variable Size, Surface Functionalization, and Colloidal Stability'. *ACS Nano* 6 (8): 6829–42. <https://doi.org/10.1021/nn301622h>.

Ricaud. 2012. 'Les nanomatériaux. Définitions, risques toxicologiques, caractérisation de l'exposition professionnelle et mesures de prévention', 52.

Rijt, S. H. van, T. Bein, and S. Meiners. 2014. 'Medical Nanoparticles for next Generation Drug Delivery to the Lungs'. *European Respiratory Journal* 44 (3): 765–74. <https://doi.org/10.1183/09031936.00212813>.

Roche, Paul A., and Kazuyuki Furuta. 2015. 'The Ins and Outs of MHC Class II-Mediated Antigen Processing and Presentation'. *Nature Reviews Immunology* 15 (4): 203–16. <https://doi.org/10.1038/nri3818>.

Ronzani, Carole, Anne Casset, and Françoise Pons. 2014. 'Exposure to Multi-Walled Carbon Nanotubes Results in Aggravation of Airway Inflammation and Remodeling and in Increased Production of Epithelium-Derived Innate Cytokines in a Mouse Model of Asthma'. *Archives of Toxicology* 88 (2): 489–99. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1116-3>.

Rothen-Rutishauser, Barbara M., Stephen G. Kiama, and Peter Gehr. 2005. 'A Three-Dimensional Cellular Model of the Human Respiratory Tract to Study the Interaction with Particles'. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 32 (4): 281–89. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2004-0187OC>.

RSNA. 2018. 'L'allergie — Le Réseau National de Surveillance Aérobiologique — RNSA'. <https://www.pollens.fr/le-reseau/allergie>.

Ruau, Nathalie. 2017. 'Nanomatériaux et santé', 59.

———. 2019. 'Nanomatériaux, Nanoparticules. Ce Qu'il Faut Retenir - Risques - INRS'. 2019. <http://www.inrs.fr/risques/nanomateriaux/ce-qu-il-faut-retenir.html>.

Ryu, Hwa Jung, Nak-won Seong, Byoung Joon So, Heung-sik Seo, Jun-ho Kim, Jeong-Sup Hong, Myeong-kyu Park, et al. 2014. 'Evaluation of Silica Nanoparticle Toxicity after Topical Exposure for 90 Days'. *International Journal of Nanomedicine* 9 Suppl 2: 127–36. <https://doi.org/10.2147/IJN.S57929>.

## S

Sada, Kiyonao, Tomoko Takano, Shigeru Yanagi, and Hirohei Yamamura. 2001. 'Structure and Function of Syk Protein-Tyrosine Kinase1'. *The Journal of Biochemistry* 130 (2): 177–86. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a002970>.

Salem, Aliasger K. 2014. 'A Promising CpG Adjuvant-Loaded Nanoparticle-Based Vaccine for Treatment of Dust Mite Allergies'. *Immunotherapy* 6 (11): 1161–63. <https://doi.org/10.2217/imt.14.97>.

Saptarshi, Shruti R., Albert Duschl, and Andreas L. Lopata. 2013. 'Interaction of Nanoparticles with Proteins: Relation to Bio-Reactivity of the Nanoparticle'. *Journal of Nanobiotechnology* 11 (July): 26. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-11-26>.

Sarkar, Srijata, Lin Zhang, Prasad Subramaniam, Ki-Bum Lee, Eric Garfunkel, Pamela A. Ohman Strickland, Gediminas Mainelis, et al. 2014. 'Variability in Bioreactivity Linked to Changes in Size and Zeta Potential of Diesel Exhaust Particles in Human Immune Cells'. *PloS One* 9 (5): e97304. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097304>.

Sato, Katsuaki, and Shigeharu Fujita. 2007. 'Dendritic Cells-Nature and Classification'. *Allergology International* 56 (3): 183–91. <https://doi.org/10.2332/allergolint.R-06-139>.

Satpathy, Ansuman T., Xiaodi Wu, Jörn C. Albring, and Kenneth M. Murphy. 2012. 'Re(de)Fining the Dendritic Cell Lineage'. *Nature Immunology* 13 (12): 1145–54. <https://doi.org/10.1038/ni.2467>.

Sauer, Ursula G., Carsten Kneuer, Jutta Tentschert, Thomas Wächter, Michael Schroeder, Daniel Butzke, Andreas Luch, Manfred Liebsch, Barbara Grune, and Mario E. Götz. 2011. 'A Knowledge-Based Search Engine to Navigate the Information Thicket of Nanotoxicology'.

*Regulatory Toxicology and Pharmacology* 59 (1): 47–52.  
<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2010.09.005>.

Schanen, Brian C., Soumen Das, Christopher M. Reilly, William L. Warren, William T. Self, Sudipta Seal, and Donald R. Drake. 2013. 'Immunomodulation and T Helper TH1/TH2 Response Polarization by CeO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> Nanoparticles'. *PLoS ONE* 8 (5): e62816.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062816>.

Schinwald, Anja, Tanya Chernova, and Ken Donaldson. 2012. 'Use of Silver Nanowires to Determine Thresholds for Fibre Length-Dependent Pulmonary Inflammation and Inhibition of Macrophage Migration in Vitro'. *Particle and Fibre Toxicology* 9 (1): 47.  
<https://doi.org/10.1186/1743-8977-9-47>.

Schleh, Carsten, Barbara M Rothen-Rutishauser, Fabian Blank, Hans D Lauenstein, Matthias Nassimi, Norbert Krug, Armin Braun, Veit J Erpenbeck, Peter Gehr, and Jens M Hohlfeld. 2012. 'Surfactant Protein D Modulates Allergen Particle Uptake and Inflammatory Response in a Human Epithelial Airway Model'. *Respiratory Research* 13 (1): 8.  
<https://doi.org/10.1186/1465-9921-13-8>.

Sciau. 2012. 'Nanoparticles in Ancient Materials: The Metallic Lustre Decorations of Medieval Ceramics. In The Delivery of Nanoparticles'.  
<https://www.intechopen.com/books/2259>.

Segura, Élodie, and Sebastian Amigorena. 2014. 'Les cellules dendritiques inflammatoires'. *médecine/sciences* 30 (1): 64–68. <https://doi.org/10.1051/medsci/20143001015>.

Sepehri, Mitra, Tobias Sejersen, Klaus Qvortrup, Catharina M. Lerche, and Jørgen Serup. 2017. 'Tattoo Pigments Are Observed in the Kupffer Cells of the Liver Indicating Blood-Borne Distribution of Tattoo Ink'. *Dermatology (Basel, Switzerland)* 233 (1): 86–93.  
<https://doi.org/10.1159/000468149>.

Seydoux, Emilie, Barbara Rothen-Rutishauser, Izabela M. Nita, Sandor Balog, Amiq Gazdhar, Philip A. Stumbles, Alke Petri- Fink, Fabian Blank, and Christophe von Garnier. 2014. 'Size-Dependent Accumulation of Particles in Lysosomes Modulates Dendritic Cell Function through Impaired Antigen Degradation'. *International Journal of Nanomedicine*, 3885.  
<https://doi.org/10.2147/IJN.S64353>.

Shannahan, Jonathan H., Wei Bai, and Jared M. Brown. 2015. 'Implications of Scavenger Receptors in the Safe Development of Nanotherapeutics'. *Receptors & Clinical Investigation* 2 (3): e811. <https://doi.org/10.14800/rci.811>.

Shaw, Catherine A., Gysell M. Mortimer, Zhou J. Deng, Edwin S. Carter, Shea P. Connell, Mark R. Miller, Rodger Duffin, David E. Newby, Patrick W.F. Hadoke, and Rodney F. Minchin. 2016. 'Protein Corona Formation in Bronchoalveolar Fluid Enhances Diesel Exhaust Nanoparticle Uptake and Pro-Inflammatory Responses in Macrophages'. *Nanotoxicology* 10 (7): 981–91. <https://doi.org/10.3109/17435390.2016.1155672>.

Shi, Yupeng. 2019. 'Functionalized Silica Nanostructures: Degradation Pathways and Biomedical Application from 2D to 3D', 179.

'Silices synthétiques'. n.d. *L'Élémentarium*. Accessed 25 April 2022.

<https://lelementarium.fr/product/silices-synthetiques/>.

Simons, K., and E. Ikonen. 1997. 'Functional Rafts in Cell Membranes'. *Nature* 387 (6633): 569–72. <https://doi.org/10.1038/42408>.

Singh, Lok P., Sriman K. Bhattacharyya, Rahul Kumar, Geetika Mishra, Usha Sharma, Garima Singh, and Saurabh Ahalawat. 2014. 'Sol-Gel Processing of Silica Nanoparticles and Their Applications'. *Advances in Colloid and Interface Science* 214 (December): 17–37. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.10.007>.

Smarr, Charles B., Woon Teck Yap, Tobias P. Neef, Ryan M. Pearson, Zoe N. Hunter, Igal Ifergan, Daniel R. Getts, Paul J. Bryce, Lonnie D. Shea, and Stephen D. Miller. 2016. 'Biodegradable Antigen-Associated PLG Nanoparticles Tolerize Th2-Mediated Allergic Airway Inflammation Pre- and Postsensitization'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (18): 5059–64. <https://doi.org/10.1073/pnas.1505782113>.

Soh, Wai Tuck, Lorenz Aglas, Geoffrey A. Mueller, Stefanie Gilles, Richard Weiss, Sandra Scheibelhofer, Sara Huber, et al. 2019. 'Multiple Roles of Bet v 1 Ligands in Allergen Stabilization and Modulation of Endosomal Protease Activity'. *Allergy* 74 (12): 2382–93. <https://doi.org/10.1111/all.13948>.

'SOP V.I.G.O.'. 2022. <https://nanopartikel.info/en/knowledge/operating-instructions/>.

Steenland, Kyle, and Elizabeth Ward. 2014. 'Silica: A Lung Carcinogen'. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 64 (1): 63–69. <https://doi.org/10.3322/caac.21214>.

Steinman, R. M., M. Pack, and K. Inaba. 1997. 'Dendritic Cell Development and Maturation'. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 417: 1–6. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9966-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9966-8_1).

Stenzel, Martina H. 2021. 'The Trojan Horse Goes Wild: The Effect of Drug Loading on the Behavior of Nanoparticles'. *Angewandte Chemie International Edition* 60 (5): 2202–6. <https://doi.org/10.1002/anie.202010934>.

Sukhanova, Alyona, Svetlana Bozrova, Pavel Sokolov, Mikhail Berestovoy, Alexander Karaulov, and Igor Nabiev. 2018. 'Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties'. *Nanoscale Research Letters* 13 (February): 44. <https://doi.org/10.1186/s11671-018-2457-x>.

Sumbayev, Vadim V., Inna M. Yasinska, Cesar Pascual Garcia, Douglas Gilliland, Gurprit S. Lall, Bernhard F. Gibbs, David R. Bonsall, Luca Varani, François Rossi, and Luigi Calzolari. 2013. 'Gold Nanoparticles Downregulate Interleukin-1 $\beta$ -Induced Pro-Inflammatory Responses'. *Small* 9 (3): 472–77. <https://doi.org/10.1002/smll.201201528>.

Sun, Bingbing, Suman Pokhrel, Darren R. Dunphy, Haiyuan Zhang, Zhaoxia Ji, Xiang Wang,

Meiying Wang, et al. 2015. 'Reduction of Acute Inflammatory Effects of Fumed Silica Nanoparticles in the Lung by Adjusting Silanol Display through Calcination and Metal Doping'. *ACS Nano* 9 (9): 9357–72. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b03443>.

Sun, Bingbing, Xiang Wang, Yu-Pei Liao, Zhaoxia Ji, Chong Hyun Chang, Suman Pokhrel, Justine Ku, et al. 2016. 'Repetitive Dosing of Fumed Silica Leads to Pro-Fibrogenic Effects Through Unique Structure-Activity Relationships and Biopersistence in the Lung'. *ACS Nano* 10 (8): 8054–66. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b04143>.

Swoboda, Ines, Alexander Jilek, Fátima Ferreira, Edwin Engel, Karin Hoffmann-Sommergruber, Otto Scheiner, Dietrich Kraft, et al. 1995. 'Isoforms of Bet v 1, the Major Birch Pollen Allergen, Analyzed by Liquid Chromatography, Mass Spectrometry, and cDNA Cloning'. *Journal of Biological Chemistry* 270 (6): 2607–13. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.6.2607>.

## T

Taeger, Dirk, Robert McCunney, Ursula Bailer, Kai Barthel, Ulrich Küpper, Thomas Brüning, Peter Morfeld, and Rolf Merget. 2016. 'Cross-Sectional Study on Nonmalignant Respiratory Morbidity Due to Exposure to Synthetic Amorphous Silica'. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 58 (4): 376–84. <https://doi.org/10.1097/JOM.0000000000000666>.

Toda, Tsuguto, and Shin Yoshino. 2016. 'Enhancement of Ovalbumin-Specific Th1, Th2, and Th17 Immune Responses by Amorphous Silica Nanoparticles'. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 29 (3): 408–20. <https://doi.org/10.1177/0394632016656192>.

Torres, Anaëlle, Bastien Dalzon, Véronique Collin-Faure, Hélène Diemer, Daphna Fenel, Guy Schoehn, Sarah Cianféroni, Marie Carrière, and Thierry Rabilloud. 2020. 'How Reversible Are the Effects of Fumed Silica on Macrophages? A Proteomics-Informed View'. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* 10 (10): E1939. <https://doi.org/10.3390/nano10101939>.

Torres, Anaëlle, Bastien Dalzon, Véronique Collin-Faure, and Thierry Rabilloud. 2020. 'Repeated vs. Acute Exposure of RAW264.7 Mouse Macrophages to Silica Nanoparticles: A Bioaccumulation and Functional Change Study'. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* 10 (2): E215. <https://doi.org/10.3390/nano10020215>.

Tsien, A., D. Diaz-Sanchez, J. Ma, and A. Saxon. 1997. 'The Organic Component of Diesel Exhaust Particles and Phenanthrene, a Major Polyaromatic Hydrocarbon Constituent, Enhances IgE Production by IgE-Secreting EBV-Transformed Human B Cells in Vitro'. *Toxicology and Applied Pharmacology* 142 (2): 256–63. <https://doi.org/10.1006/taap.1996.8063>.

Tsugita, Misato, Nobuyuki Morimoto, Manabu Tashiro, Kengo Kinoshita, and Masafumi Nakayama. 2017. 'SR-B1 Is a Silica Receptor That Mediates Canonical Inflammasome

Activation'. *Cell Reports* 18 (5): 1298–1311. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.004>.

Turabekova, M., B. Rasulev, M. Theodore, J. Jackman, D. Leszczynska, and J. Leszczynski. 2014. 'Immunotoxicity of Nanoparticles: A Computational Study Suggests That CNTs and C60 Fullerenes Might Be Recognized as Pathogens by Toll-like Receptors'. *Nanoscale* 6 (7): 3488–95. <https://doi.org/10.1039/C3NR05772K>.

Turner, Jerrold R. 2006. 'Molecular Basis of Epithelial Barrier Regulation: From Basic Mechanisms to Clinical Application'. *The American Journal of Pathology* 169 (6): 1901–9. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.060681>.

## V

Vallhov, Helen, Susanne Gabrielsson, Maria Strømme, Annika Scheynius, and Alfonso E. Garcia-Bennett. 2007. 'Mesoporous Silica Particles Induce Size Dependent Effects on Human Dendritic Cells'. *Nano Letters* 7 (12): 3576–82. <https://doi.org/10.1021/nl0714785>.

Vallhov, Helen, Natalia Kupferschmidt, Susanne Gabrielsson, Staffan Paulie, Maria Strømme, Alfonso E. Garcia-Bennett, and Annika Scheynius. 2012. 'Adjuvant Properties of Mesoporous Silica Particles Tune the Development of Effector T Cells'. *Small* 8 (13): 2116–24. <https://doi.org/10.1002/smll.201102620>.

Vallhov, Helen, Jian Qin, Sara M. Johansson, Niklas Ahlborg, Mamoun A. Muhammed, Annika Scheynius, and Susanne Gabrielsson. 2006. 'The Importance of an Endotoxin-Free Environment during the Production of Nanoparticles Used in Medical Applications'. *Nano Letters* 6 (8): 1682–86. <https://doi.org/10.1021/nl060860z>.

Vandebriel, Rob J., Jolanda P. Vermeulen, Laurens B. van Engelen, Britt de Jong, Lisa M. Verhagen, Liset J. de la Fonteyne-Blankestijn, Marieke E. Hoonakker, and Wim H. de Jong. 2018. 'The Crystal Structure of Titanium Dioxide Nanoparticles Influences Immune Activity in Vitro and in Vivo'. *Particle and Fibre Toxicology* 15 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12989-018-0245-5>.

Verdijk, Pauline, Peter A. van Veelen, Arnoud H. de Ru, Paul J. Hensbergen, Kensaku Mizuno, Henk K. Koerten, Frits Koning, Cornelis P. Tensen, and A. Mieke Mommaas. 2004. 'Morphological Changes during Dendritic Cell Maturation Correlate with Cofilin Activation and Translocation to the Cell Membrane'. *European Journal of Immunology* 34 (1): 156–64. <https://doi.org/10.1002/eji.200324241>.

Vidalain, Pierre-Olivier, Olga Azocar, Christine Servet-Delprat, Chantal Roubourdin-Combe, Denis Gerlier, and Serge Manié. 2000. 'CD40 Signaling in Human Dendritic Cells Is Initiated within Membrane Rafts'. *The EMBO Journal* 19 (13): 3304–13. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.13.3304>.

Vranic, Sandra, Ignacio Garcia-Verdugo, Cécile Darnis, Jean-Michel Sallenave, Nicole

Boggetto, Francelyne Marano, Sonja Boland, and Armelle Baeza-Squiban. 2013. 'Internalization of SiO<sub>2</sub> Nanoparticles by Alveolar Macrophages and Lung Epithelial Cells and Its Modulation by the Lung Surfactant Substitute Curosurf'. *Environmental Science and Pollution Research International* 20 (5): 2761–70. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1436-5>.

Vroman, L. 1962. 'Effect of Adsorbed Proteins on the Wettability of Hydrophilic and Hydrophobic Solids'. *Nature* 196 (4853): 476–77. <https://doi.org/10.1038/196476a0>.

## W

Wagner, J. C., C. A. Sleggs, and P. Marchand. 1960. 'Diffuse Pleural Mesothelioma and Asbestos Exposure in the North Western Cape Province'. *British Journal of Industrial Medicine* 17 (October): 260–71. <https://doi.org/10.1136/oem.17.4.260>.

Walczyk, Dorota, Francesca Baldelli Bombelli, Marco P. Monopoli, Iseult Lynch, and Kenneth A. Dawson. 2010. 'What the Cell "Sees" in Bionanoscience'. *Journal of the American Chemical Society* 132 (16): 5761–68. <https://doi.org/10.1021/ja910675v>.

Walsh, Kevin P., and Kingston H. G. Mills. 2013. 'Dendritic Cells and Other Innate Determinants of T Helper Cell Polarisation'. *Trends in Immunology* 34 (11): 521–30. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.07.006>.

Wang, Ying, Qinfu Zhao, Ning Han, Ling Bai, Jia Li, Jia Liu, Erxi Che, et al. 2015. 'Mesoporous Silica Nanoparticles in Drug Delivery and Biomedical Applications'. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 11 (2): 313–27. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.09.014>.

Wang, Yuying Zhang, Zhengwei Mao, Dahai Yu, and Changyou Gao. 2014. 'Toxicity of ZnO Nanoparticles to Macrophages Due to Cell Uptake and Intracellular Release of Zinc Ions'. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 14 (8): 5688–96. <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.8876>.

Warheit, David B., Thomas R. Webb, Kenneth L. Reed, Scott Frerichs, and Christie M. Sayes. 2007. 'Pulmonary Toxicity Study in Rats with Three Forms of Ultrafine-TiO<sub>2</sub> Particles: Differential Responses Related to Surface Properties'. *Toxicology* 230 (1): 90–104. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.11.002>.

Wen, Yi, Xiaoli Wang, Suntara Cahya, Paul Anderson, Candyd Velasquez, Carina Torres, Andrea Ferrante, and Arunan Kaliyaperumal. 2021. 'Comparability Study of Monocyte Derived Dendritic Cells, Primary Monocytes, and THP1 Cells for Innate Immune Responses'. *Journal of Immunological Methods* 498 (November): 113147. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2021.113147>.

Wick, Peter, Pius Manser, Ludwig K. Limbach, Ursula Dettlaff-Weglikowska, Frank Krumeich,

Siegmar Roth, Wendelin J. Stark, and Arie Bruinink. 2007. 'The Degree and Kind of Agglomeration Affect Carbon Nanotube Cytotoxicity'. *Toxicology Letters* 168 (2): 121–31. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.08.019>.

Wilson, R. K., P. M. Stevens, H. B. Lovejoy, Z. G. Bell, and R. C. Richie. 1979. 'Effects of Chronic Amorphous Silica Exposure on Sequential Pulmonary Function'. *Journal of Occupational Medicine.: Official Publication of the Industrial Medical Association* 21 (6): 399–402.

Winkler, Hans Christian, Julian Kornprobst, Peter Wick, Lea Maria von Moos, Ioannis Trantakis, Elisabeth Maria Schraner, Barbara Bathke, Hubertus Hochrein, Mark Suter, and Hanspeter Naegeli. 2017. 'MyD88-Dependent pro-Interleukin-1 $\beta$  Induction in Dendritic Cells Exposed to Food-Grade Synthetic Amorphous Silica'. *Particle and Fibre Toxicology* 14 (June). <https://doi.org/10.1186/s12989-017-0202-8>.

Winter, Meike, Hans-Dietmar Beer, Veit Hornung, Ursula Krämer, Roel P. F. Schins, and Irmgard Förster. 2011. 'Activation of the Inflammasome by Amorphous Silica and TiO<sub>2</sub> Nanoparticles in Murine Dendritic Cells'. *Nanotoxicology* 5 (3): 326–40. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.506957>.

## X

Xu, Leyuan, Diana Sharkey, and Lloyd G. Cantley. 2019. 'Tubular GM-CSF Promotes Late MCP-1/CCR2-Mediated Fibrosis and Inflammation after Ischemia/Reperfusion Injury'. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 30 (10): 1825–40. <https://doi.org/10.1681/ASN.2019010068>.

## Y

Yan, Mina, Chanzhen Yang, Binyao Huang, Zeqian Huang, Liangfeng Huang, Xuefei Zhang, and Chunshun Zhao. 2017. 'Systemic Toxicity Induced by Aggregated Layered Double Hydroxide Nanoparticles'. *International Journal of Nanomedicine* 12 (October): 7183–95. <https://doi.org/10.2147/IJN.S146414>.

Yang, De, Yuliang Zhao, Hua Guo, Yana Li, Poonam Tewary, Gengmei Xing, Wei Hou, Joost J. Oppenheim, and Ning Zhang. 2010. 'Nanoparticles, [Gd@C82(OH)22]n, Induces Dendritic Cell Maturation and Activates Th1 Immune Responses'. *ACS Nano* 4 (2): 1178–86. <https://doi.org/10.1021/nn901478z>.

Yang, Hong, Qiuyun Wu, Meng Tang, Lu Kong, and Zuhong Lu. 2009. 'Cell Membrane Injury Induced by Silica Nanoparticles in Mouse Macrophage'. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 5 (5): 528–35. <https://doi.org/10.1166/jbn.2009.1061>.

Yang, Xiang Wang, Guang Jia, Yiqun Gu, Tiancheng Wang, Haiyu Nie, Cuicui Ge, Haifang

Wang, and Yuanfang Liu. 2008. 'Long-Term Accumulation and Low Toxicity of Single-Walled Carbon Nanotubes in Intravenously Exposed Mice'. *Toxicology Letters* 181 (3): 182–89. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.07.020>.

Yazdi, Amir S., Greta Guarda, Nicolas Riteau, Stefan K. Drexler, Aubry Tardivel, Isabelle Couillin, and Jürg Tschopp. 2010. 'Nanoparticles Activate the NLR Pyrin Domain Containing 3 (Nlrp3) Inflammasome and Cause Pulmonary Inflammation through Release of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ '. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (45): 19449–54. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008155107>.

Yoshida, Tokuyuki, Yasuo Yoshioka, Hideki Takahashi, Kazuki Misato, Takahide Mori, Toshiro Hirai, Kazuya Nagano, et al. 2014. 'Intestinal Absorption and Biological Effects of Orally Administered Amorphous Silica Particles'. *Nanoscale Research Letters* 9 (1): 532. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-532>.

Yoshida, Tokuyuki, Yasuo Yoshioka, Saeko Tochigi, Toshiro Hirai, Miyuki Uji, Ko-ichi Ichihashi, Kazuya Nagano, et al. 2013. 'Intranasal Exposure to Amorphous Nanosilica Particles Could Activate Intrinsic Coagulation Cascade and Platelets in Mice'. *Particle and Fibre Toxicology* 10 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-41>.

Yoshizumi, Masanori, Jun-ichi Abe, Judith Haendeler, Qunhua Huang, and Bradford C. Berk. 2000. 'Src and Cas Mediate JNK Activation but Not ERK1/2 and P38 Kinases by Reactive Oxygen Species'. *Journal of Biological Chemistry* 275 (16): 11706–12. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.16.11706>.

You, Ran, Yuen-Shan Ho, Clara Hiu-Ling Hung, Yan Liu, Chun-Xia Huang, Hei-Nga Chan, See-Lok Ho, Sheung-Yeung Lui, Hung-Wing Li, and Raymond Chuen-Chung Chang. 2018. 'Silica Nanoparticles Induce Neurodegeneration-like Changes in Behavior, Neuropathology, and Affect Synapse through MAPK Activation'. *Particle and Fibre Toxicology* 15 (1): 28. <https://doi.org/10.1186/s12989-018-0263-3>.

## Z

Zhang, Haiyuan, Darren R. Dunphy, Xingmao Jiang, Huan Meng, Bingbing Sun, Derrick Tarn, Min Xue, et al. 2012. 'Processing Pathway Dependence of Amorphous Silica Nanoparticle Toxicity: Colloidal vs Pyrolytic'. *Journal of the American Chemical Society* 134 (38): 15790–804. <https://doi.org/10.1021/ja304907c>.

Zhang, Juan, Melvin L. Billingsley, Randall L. Kincaid, and Reuben P. Siraganian. 2000. 'Phosphorylation of Syk Activation Loop Tyrosines Is Essential for Syk Function'. *Journal of Biological Chemistry* 275 (45): 35442–47. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004549200>.

Zhao, Xinxin, SuXiu Ng, Boon Chin Heng, Jun Guo, LwinLwin Ma, Timothy Thatt Yang Tan, Kee Woei Ng, and Say Chye Joachim Loo. 2013. 'Cytotoxicity of Hydroxyapatite Nanoparticles Is Shape and Cell Dependent'. *Archives of Toxicology* 87 (6): 1037–52.

<https://doi.org/10.1007/s00204-012-0827-1>.

Zhu, Jinfang. 2018. 'T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity'. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10 (10): a030338.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030338>.

Zhu, Jinfang, Hidehiro Yamane, and William E. Paul. 2010. 'Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations'. *Annual Review of Immunology* 28: 445–89.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101212>.

Zhu, Meilin, Hanqing Chen, Shuang Zhou, Lingna Zheng, Xue Li, Runxuan Chu, Wei Chen, et al. 2021. 'Iron Oxide Nanoparticles Aggravate Hepatic Steatosis and Liver Injury in Nonalcoholic Fatty Liver Disease through BMP-SMAD-Mediated Hepatic Iron Overload'. *Nanotoxicology* 15 (6): 761–78. <https://doi.org/10.1080/17435390.2021.1919329>.

Zhu, Rongrong, Yanjing Zhu, Min Zhang, Yu Xiao, Xiling Du, Hui Liu, and Shilong Wang. 2014. 'The Induction of Maturation on Dendritic Cells by TiO<sub>2</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TiO<sub>2</sub> Nanoparticles via NF- $\kappa$ B Signaling Pathway'. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications* 39 (June): 305–14. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.03.005>.

Zvyagin, Andrei V., Xin Zhao, Audrey Gierden, Washington Sanchez, Justin A. Ross, and Michael S. Roberts. 2008. 'Imaging of Zinc Oxide Nanoparticle Penetration in Human Skin in Vitro and in Vivo'. *Journal of Biomedical Optics* 13 (6): 064031.  
<https://doi.org/10.1117/1.3041492>.

# Annexes



Article

# How to Address the Adjuvant Effects of Nanoparticles on the Immune System

Alexia Feray<sup>1</sup>, Natacha Szely<sup>1</sup>, Eléonore Guillet<sup>1</sup>, Marie Hullo<sup>1</sup>, François-Xavier Legrand<sup>2</sup>, Emilie Brun<sup>3</sup>, Marc Pallardy<sup>1</sup> and Armelle Biola-Vidamment<sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Université Paris-Saclay, Inserm, Inflammation, Microbiome and Immunosurveillance, 92290 Châtenay-Malabry, France; alexia.feray@universite-paris-saclay.fr (A.F.); natacha.szely@universite-paris-saclay.fr (N.S.); eleonore.guillet@universite-paris-saclay.fr (E.G.); marie.hullo@gmail.com (M.H.); marc.pallardy@universite-paris-saclay.fr (M.P.)

<sup>2</sup> Université Paris-Saclay, CNRS, Institut Galien Paris Sud, 92296 Châtenay-Malabry, France; francois-xavier.legrand@universite-paris-saclay.fr

<sup>3</sup> Université Paris-Saclay, CNRS, Institut de Chimie Physique, 91405 Orsay, France; emilie.brun@universite-paris-saclay.fr

\* Correspondence: armelle.biola-vidamment@universite-paris-saclay.fr

Received: 31 January 2020; Accepted: 25 February 2020; Published: 28 February 2020



**Abstract:** As the nanotechnology market expands and the prevalence of allergic diseases keeps increasing, the knowledge gap on the capacity of nanomaterials to cause or exacerbate allergic outcomes needs more than ever to be filled. Engineered nanoparticles (NP) could have an adjuvant effect on the immune system as previously demonstrated for particulate air pollution. This effect would be the consequence of the recognition of NP as immune danger signals by dendritic cells (DCs). The aim of this work was to set up an *in vitro* method to functionally assess this effect using amorphous silica NP as a prototype. Most studies in this field are restricted to the evaluation of DCs maturation, generally of murine origin, through a limited phenotypic analysis. As it is essential to also consider the functional consequences of NP-induced DC altered phenotype on T-cells biology, we developed an allogeneic co-culture model of human monocyte-derived DCs (MoDCs) and CD4+ T-cells. We demonstrated that DC: T-cell ratios were a critical parameter to correctly measure the influence of NP danger signals through allogeneic co-culture. Moreover, to better visualize the effect of NP while minimizing the basal proliferation inherent to the model, we recommend testing three different ratios, preferably after five days of co-culture.

**Keywords:** amorphous silica nanoparticles; monocyte-derived dendritic cells; MoDCs; maturation; danger signal; DC:T-cell co-culture; *in vitro* models and methods; nanotoxicology

## 1. Introduction

With the widespread production and use of nanomaterials, the growing exposure of workers but also of consumers in everyday life raises concerns about potential health risks [1], strengthening the need for relevant methods to evaluate their immunosafety [2]. Assessing how engineered nanoparticles (NP) could interact with the immune system [3,4] and more specifically could promote the development of allergic diseases or exacerbate the severity of established allergic conditions is still a matter of concern. Experimental *in vitro* models must be developed to address and to monitor these effects [5]. The challenge is to select the most relevant cells and endpoints using a simple, robust and representative model.

Most of the work regarding NP-induced immunomodulation has been focused on the activation of key immune cells [6–8]. Innate immune cells such as macrophages and dendritic cells (DCs) are

predominantly exposed to nanomaterials due to their phagocytic properties and to their relative abundance at the entry sites such as skin, airways or the gastrointestinal tract [9]. Indeed, DCs patrolling the blood or residing in peripheral tissues actively capture NP [10].

Two main differentiation stages are currently described for DCs, namely “immature” and “mature” [11]. As sentinel cells of the innate immune system, immature DCs encounter and internalize invading pathogens, but are also tissue scavengers, capturing apoptotic or necrotic cells. Their functional maturation is a process, initiated by signals from the microenvironment and characterized by the acquisition of fundamental properties: antigen processing and presentation, migration and ability to activate antigen-specific naïve T-cells in secondary lymphoid organs. Indeed, upon maturation, DCs increase the expression of major histocompatibility complex-II (MHC-II) and co-stimulatory molecules, express higher levels of chemokine receptors and secrete cytokines, working in concert to stimulate specific immune responses. DCs maturation can be triggered by the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMP) or endogenous “danger” signals called damage-associated molecular patterns (DAMP) through a battery of pattern-recognition receptors (PRRs) expressed both outside and inside of the cells [12]. The “danger theory” was proposed by Polly Matzinger twenty-five years ago [13] to explain how the immune system could inappropriately “see” innocuous antigens such as allergens or food antigens as dangerous, even though they are not. The “danger signals” would act on DCs, in aseptic conditions, in a similar manner to the microbial molecular patterns. Therefore, the question to be addressed is whether engineered NP could act as danger signals, as previously suggested for ultrafine or diesel exhaust particles [14] and could be considered as NAMPs (nanoparticle-associated molecular patterns) [15–17].

As terminally differentiated post-mitotic cells, primary DCs isolated from blood are available in limited amounts. Because no stable cell line fully recapitulates the immunological features of primary DCs [18], studies on NP interactions with DCs use either murine bone marrow-derived DCs (BMDCs) [6,19,20] or more rarely human blood monocyte-derived DCs (MoDCs) [21–23], which can both be differentiated *in vitro* in a DC-like phenotype [24]. Extrapolation from animal to human remains challenging due to poor species overlap notably concerning toll-like receptors (TLR) expression [25]. The aim of this work was to set up a method to assess the adjuvant or “danger like” effect of NP on human DCs.

We selected amorphous silica nanoparticles (aSNP) which have been poorly studied despite a large exposure of the population through drugs, food [26] or cosmetic products. *In vitro* studies showed that airway exposure to aSNP could enhance allergen sensitization, suggesting an adjuvant potential for these NP [27,28]. So far, most of the *in vitro* studies dedicated to aSNP remained limited to the phenotype analysis of DCs [6,23,29,30]. We showed that aSNP ( $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and  $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) increased the expression of CD83, CD86 and CXCR4 markers on human DCs in a concentration-dependent manner, suggesting that these aSNP significantly affected MoDCs maturation (Feraf et al, *in preparation*). It is essential to consider the global adjuvant effect on the two first steps of the immune response, namely DCs activation leading to T-cell proliferation. Thus, we propose to complete these studies by developing an allogeneic co-culture model of human MoDCs and CD4+ T-cells.

This work describes the process to be followed in order to develop an *in vitro* model properly assessing the potential adjuvant effect of NP. We showed that the DC:T-cell ratios and the duration of the co-culture are critical parameters to correctly measure the influence of danger signals induced by NP in an allogeneic co-culture. To better visualize the effect of NP while keeping the basal proliferation inherent to the model as low as possible, we suggest testing at least three different ratios, preferably after five days of co-culture. We also recommend a careful selection of test concentrations based on realistic exposures and limiting cytotoxicity to maintain MoDCs function.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Reagents and Materials

According to the manufacturer, the specific surface of the fumed silica NP (S5505, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), determined by BET (Brunauer-Emmett-Teller), is  $196 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  (batch SLBR6988V). The NP suspension was prepared from fumed silica dry powder dispersed in filtered ultrapure water at a final concentration of  $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . The suspension was then left for 8 h in a water bath at  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  to remove contaminations. Before each experiment, an intermediate dilution at a concentration of  $500 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  was prepared in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640 medium (supplemented with Glutamax, 1 mM sodium pyruvate,  $0.1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  streptomycin and  $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  penicillin). The suspension was sonicated for 15 min prior to MoDCs treatment.

### 2.2. Characterization of aSNP

The hydrodynamic diameter of particles was determined at  $25^\circ\text{C}$  by Dynamic Light Scattering using a Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Malvern, UK) operating at a fixed scattering angle at  $90^\circ$  and equipped with a Helium-Neon laser source with a wavelength of 633 nm. Measurements were performed in disposable 4 mL cuvettes with a 1 cm optical pathway and four optical faces (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) containing an appropriate volume (1 mL) of the sample, prepared as described above, after dilution to  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  in the desired medium. The hydrodynamic diameter values were calculated using the Stokes-Einstein equation assuming a spherical shape of the particles. The particle size profile was obtained from the intensity-weighted distribution and the hydrodynamic diameter value corresponds to the median diameter derived from the cumulative distribution curve. The  $\zeta$ -potential measurements were carried out with the same instrument at  $25^\circ\text{C}$  by laser doppler velocimetry at a detection angle of  $17^\circ$  in DTS 1060 disposable cells (Malvern Instruments, Malvern, UK). Due to the ionic strength of the samples leading to high conductivity, measurements were performed using the monomodal mode and the Smoluchowski approximation was used to convert the electrophoretic mobility to  $\zeta$ -potential. Values are given as mean values of ten measurements.

For transmission electron microscopy experiments,  $2 \text{ } \mu\text{L}$  of  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  aqueous suspension of NP was deposited onto a formvar/carbon coated copper grid and observed using a JEOL 1400 transmission electron microscopy (TEM) instrument (JEOL Ltd, Tokyo, Japan) operating at 120 kV. Analysis of recorded images was performed using the ImageJ software (1.52 version, National Institute for Health, Bethesda, MD, USA).

### 2.3. Endotoxin Detection

Possible endotoxin contamination (endotoxins  $> 0.05 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) was analyzed with the limulus amoebocyte lysate (LAL) assay (GenScript, Piscataway, NJ, USA).

### 2.4. Generation of Primary Cultures of Human Dendritic Cells

Human DCs were derived from monocytes isolated from human peripheral blood supplied by the French Blood Bank (EFS, Rungis, France). Healthy donors gave their written consent for the use of blood donation for research purposes. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were sorted from buffy coats by density centrifugation on a Ficoll gradient. Monocytes were then isolated through positive magnetic selection using MidiMacs separation columns and anti-CD14+ antibodies coated on magnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Finally, CD14 cells were differentiated in immature MoDCs for 4 days in RPMI 1640 supplemented with GlutaMAX (Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France), 10 % heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France),  $550 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rh-GM-CSF, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany),  $550 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  interleukin-4 (rh-IL4, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), 1 mM sodium pyruvate (Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France),  $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  streptomycin and  $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  penicillin (Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France).

## 2.5. Phenotypic Analysis

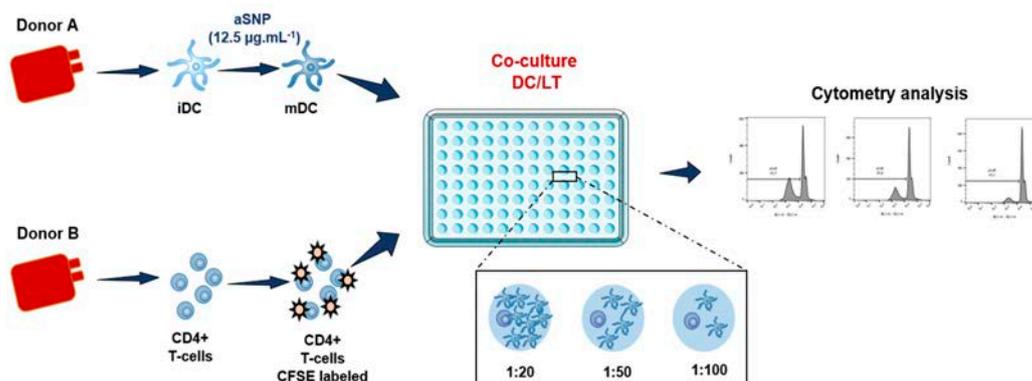
After 16 h of exposure to either 0, 12.5 or 25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  aSNP, MoDCs were collected, washed with phosphate-buffered saline (PBS, Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France) and incubated for 20 min at 4 °C with APC-conjugated HLA-DR monoclonal antibody (mAbs) or with appropriate isotype control antibody (IgG1-APC) (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). After incubation, MoDCs were washed with PBS and then analyzed on a FACS Attune NxT<sup>®</sup> acoustic focusing cytometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Results were expressed as the relative fluorescence intensities (RFI) using the corrected mean fluorescence intensity (cMFI) as follows:

$$cMFI = MFI - MFI_{control\ isotype} \quad (1)$$

$$RFI = \frac{cMFI_{treated\ cells}}{cMFI_{untreated\ cells}} \quad (2)$$

## 2.6. Co-Culture of MoDCs and CD4+ T-Cells

CD4+ T cells were isolated from PBMC by positive selection using midi-MACS separation columns and anti-CD4 antibodies coated on magnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) (Figure 1). These T-cells were confirmed to have a purity greater than 95%, based on CD4 expression evaluated by flow cytometry (561841, RPA-T4, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). CD4+ T lymphocytes were labeled with 0,5 mM carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (Invitrogen, Saint Aubin, France), following the manufacturer's instructions. MoDCs were stimulated by 0 or 12.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of aSNP for 16 h and then washed and co-cultured with allogeneic CD4+ T-cells at different DC:T-cell ratios for 5 or 6 days, in RPMI 1640 Glutamax supplemented with 10% FCS in round-bottom 96 well plates (Cellstar, Greiner bio-one, Courtaboeuf, France) (Figure 1). The number of T-cells ( $10^5$  T-cells/well) remained unchanged while the number of DCs evolved for each ratio tested: 1:5 (1 DCs for 5 T-cells i.e., 20 000 MoDCs/well), 1:10 (10 000 MoDCs/well), 1:20 (5000 MoDCs/well), 1:50 (2000 MoDC/well) and 1:100 (1000 MoDC/well). Analysis of T-cell proliferation was assessed by flow cytometry, on a FACS Attune NxT<sup>®</sup> acoustic focusing cytometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

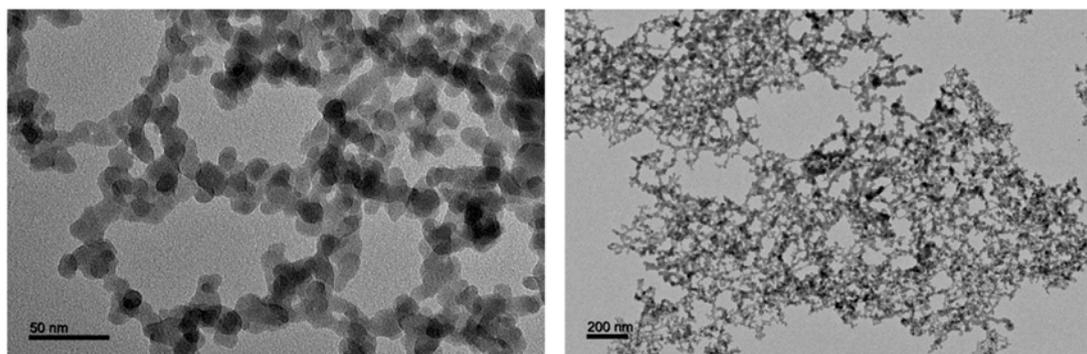


**Figure 1.** Allogeneic model of DCs and CD4 + T-cells co-culture with the different ratios tested. Cells are incubated in presence or absence of 12.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of aSNP for 16 h. Treated MoDCs are co-cultured with allogeneic CD4+ T-cells labeled with CFSE at a ratio of 1:20 (1 MoDC for 20 CD4+ T-cells), 1:50 and 1:100). Proliferation is quantified after 5 or 6 days of co-culture as the percentage of CFSE<sup>low</sup> CD4+ T-cells.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Characterization of Amorphous Silica Nanoparticles

We used commercial amorphous silica NP supplied by Sigma–Aldrich (S5505). This fumed silica nanopowder is presented by the manufacturer as having an average primary particle size of 14 nm and a surface area of  $200 \pm 25 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ . A precise characterization of the size, spherical shape and homogeneity of the fumed silica in water was carried out by transmission electron microscopy (TEM). The particles form branched, three-dimensional chain-like aggregates of variable lengths (Figure 2). The main characteristics of aSNP used in this study are summarized in Table 1.



**Figure 2.** Typical TEM images of unstained fumed silica nanoparticles suspended in water. Aqueous suspension of nanoparticles was deposited onto a formvar/carbon coated copper grid and observed using a JEOL 1400 TEM instrument operating at 120 kV. Analysis of recorded images was performed using ImageJ 1.52 software.

**Table 1.** Characteristics of aSNP.

Reference	Specific Surface Area <sup>1</sup>	Nominal Primary Particle Diameter <sup>1</sup>	Primary Particle Diameter <sup>2</sup>	DLS Distribution <sup>3</sup>	$\zeta$ -Potential Value <sup>3</sup>
S5505, Sigma-Aldrich (batch SLBR6988V)	$196 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$	14 nm	$14.4 \pm 4.3 \text{ nm}$	$201 \pm 22 \text{ nm}$ $9.0 \pm 0.3 \mu\text{m}$	$-26.5 \pm 2.1 \text{ mV}$

<sup>1</sup> Data provided by the supplier, <sup>2</sup> Analyzed by TEM, <sup>3</sup> in RPMI 1640

Endotoxin levels were systematically measured for each particle preparation with the limulus amoebocyte lysate (LAL) assay to ensure that the effects measured were not attributable to this contaminant [31]. All the batches tested ( $n = 8$ ) showed values below the threshold of positivity ( $0.05 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).

#### 3.2. Assessing the Effects of Amorphous Silica Nanoparticles on the Expression of Major Histocompatibility Complex Class II and co-stimulatory Molecules in Human Dendritic Cells

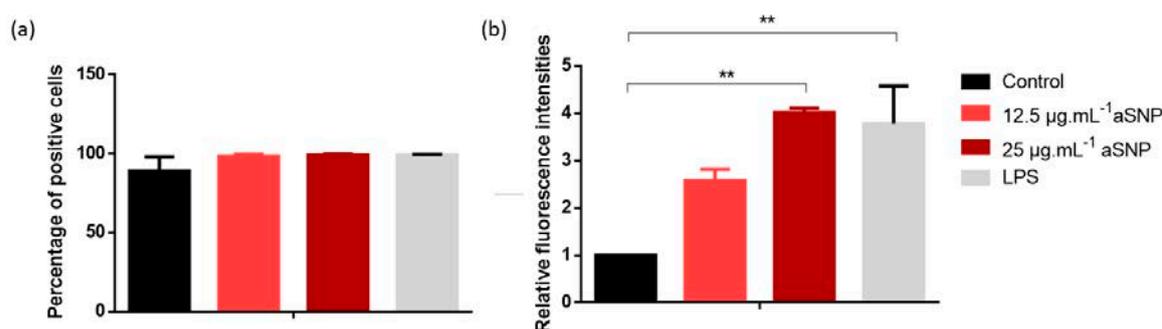
We conducted this study using human DCs, which represent the most efficient antigen presenting cells in capturing, processing and presenting antigens for lymphocyte activation. To avoid interspecies variability, we chose human MoDCs, which can be differentiated *in vitro* in a DC-like phenotype in the presence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and IL-4 [24]. The GM-CSF *in vitro* cultured DCs is the most common and recognized DCs type used in studies of human DCs biology. These cells show similarities in physiology, morphology, and function to conventional myeloid DCs.

Immature DCs (iDCs) display a phenotype characterized by low surface expression of MHC-II molecules and co-stimulatory molecules such as CD80, CD86 and CD40 [32]. When detecting molecular patterns identified as danger signals, DCs undergo a program of maturation resulting in morphological and phenotypical changes. *In vitro* immature DCs exhibit a round shape and a smooth membrane, mature DCs gain a rough surface with multiple dendrites and pseudopodia [33], as shown in Figure S1

in presence of aSNP. Moreover, scattering of light can be used to measure volume (by forward scatter) and morphological complexity (by side scatter) of cells by flow cytometry. These parameters are conventionally abbreviated as FSC and SSC respectively. Representative FSC and SSC density plots are presented on Figure S1b and illustrate a slight increase in SSC in presence of aSNP or with LPS, consistent with MoDCs activation. MHC-II and co-stimulatory molecules are upregulated at the cell surface. New interleukin and chemokine receptors are also expressed allowing T-cell stimulation and improving their ability to migrate to secondary lymphoid tissues [11].

Our goal was first to define the appropriate readouts and settings to evaluate MoDCs maturation. In a preliminary work, we selected the incubation time and concentrations to be tested based on cytotoxicity assays. Considering that NP could have the potential to alter immune cell responses at concentrations far below those inducing cytotoxicity, and that functional assays need to be conducted on viable cells, we defined a threshold of 30% cytotoxicity not to be exceeded. Given the cytotoxicity of aSNP and the short moDCs lifespan *in vitro*, incubation times longer than 24 h wouldn't be achievable. Indeed, following their activation, DCs are known to progress toward apoptotic cell death. Typical incubation times to assess DCs phenotype range from overnight (approximately 16 h) to 24 h [6,29]. We chose a 16-h incubation time which allowed to evidence a significant effect of NP on DCs phenotype while complying with the 30% cytotoxicity threshold limit, in order to maintain their ability to activate an effective immune response.

According to the literature, the expression of co-stimulatory molecules such as CD40, CD80 and CD86 is frequently used as a marker of successful MoDCs maturation [7,20–23]. These markers have also emerged as the most relevant in our experiences. CD83 is recognized as a surface marker that distinguishes immature and mature human DCs populations and is considered as one of the best markers for identifying mature dendritic cells [34]. HLA-DR can also be used as an indicator of the iDC maturation process. Interestingly, the expression of the results as a percentage of positive cells (Figure 3a) may not allow to evidence the increase in HLA-DR expression, as also observed by Vallhov et al [21]. A high expression of MHC-II molecules is inherent to the MoDCs model [11]. Hence, it appears necessary to present the results as RFIs instead of the percentage of positive cells (Figure 3b). Indeed, RFIs allowed us to show that aSNP induced a significant increase in MHC-II molecules expression at  $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Figure 3b).



**Figure 3.** Nanoparticles induced HLA-DR expression. Cells were incubated in the presence or absence of LPS as a positive control, or  $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and  $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of aSNP for 16 h. Cells were then collected, washed and the surface expression of HLA-DR was assessed by FACS analysis. Untreated DCs were used as negative control. Results are expressed as percentage of positive cells (a) or relative fluorescence intensities (b) and represented the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. Tukey's honest significance test was employed in conjunction with One-Way ANOVA \*\*:  $p < 0.01$ .

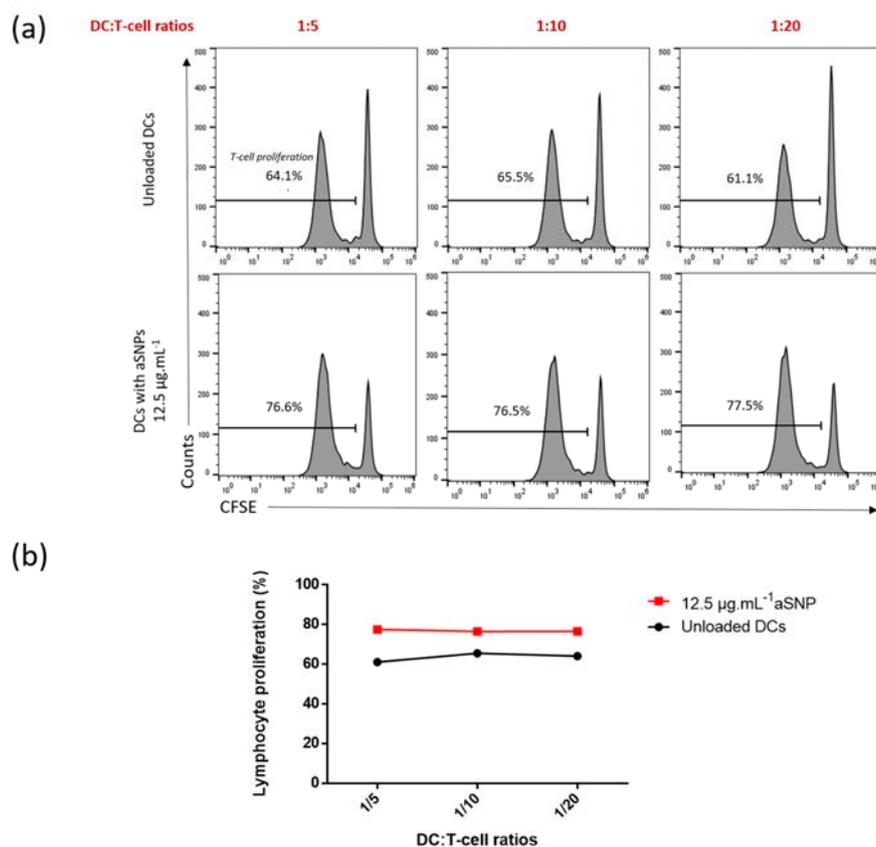
We established, using the panel presented above, that aSNP ( $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and  $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) dose-dependently increased the expression of CD83, CD86 and CXCR4 markers on human MoDCs (Feraý et al., in preparation), suggesting that cells could be in a relatively mature state after the incubation with NP.

### 3.3. Assessing the Effect of Dendritic Cells Treated with Amorphous Silica Nanoparticles on Allogeneic T-Cell Proliferation

#### 3.3.1. Influence of DC:T-Cell Ratios on T-Cell Proliferation

Due to their phenotypic modifications, mature MoDCs can become immunogenic and promote the proliferation of CD4+ T-cells. To evaluate the impact of MoDCs maturation on the lymphocyte response, we developed a human mixed lymphocyte reaction (MLR) assay consisting in co-culturing CD4+ T-cells with allogeneic MoDCs. The MLR provides a simple and efficient *in vitro* model in the area of cellular immunology for the study of T-cell activation and proliferation. Specifically, we tested several DC:T-cell ratios in order to optimize the sensitivity of the method. Indeed, although co-stimulatory molecules and cytokines are known to be a prerequisite for productive DC-T-cell interactions, the ratio of stimulating DCs and responding T-cells is also known to influence T-cell responses *in vitro* [35].

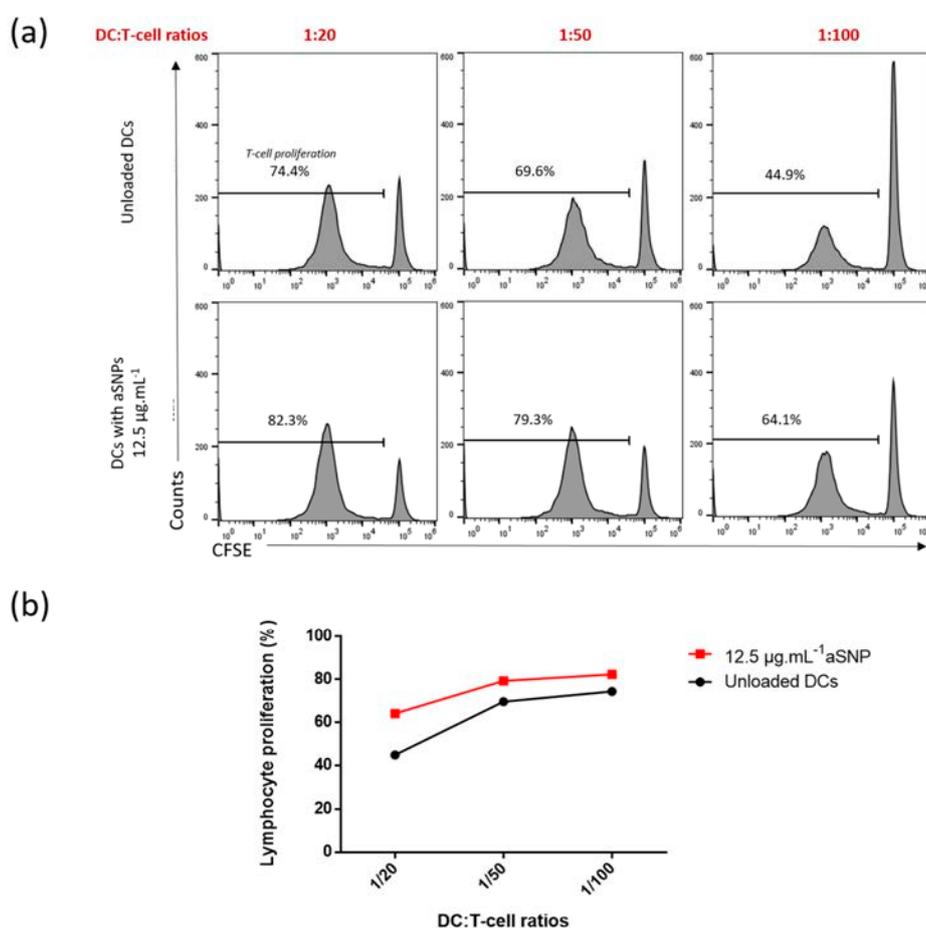
To avoid excessive cytotoxicity, MoDCs were stimulated or not with the lowest concentration of aSNP ( $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) for 16 h and then washed and co-cultured with allogeneic CD4+ T-cells labeled with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) at various DC:T-cell ratios. Proliferation was assessed after six days of co-culture as the percentage of CFSE<sup>low</sup> CD4+ T-cells (Figure 4). We first evaluated the influence of the following DC:T-cell ratios: 1:5 (corresponding to 1 MoDC per 5 T-cells), 1:10 (1 MoDC per 10 T-cells) and 1:20 (1 MoDC per 20 T-cells) (Figure 4).



**Figure 4.** Lymphocyte proliferation reached a plateau at high ratios after 6 days of co-culture. Cells were incubated in the presence or absence of  $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of aSNP for 16 h. Treated MoDCs were co-cultured with allogeneic CD4+ T-cells labeled with CFSE at the ratios of 1:5 (1 MoDC per 5 CD4+ T-cells), 1:10 and 1:20). Proliferation was quantified after 6 days of co-culture as the percentage of CFSE<sup>low</sup> CD4+ T-cells. Untreated DCs were used as negative control. Results are shown as percentage of lymphocyte proliferation using FACS histogram (a) or curve (b) for a representative experiment.

Allogeneic MoDCs induced basal T-cell proliferation ranging from 61.1% to 64.1% at the highest ratio of 1:5 (Figure 4a). In presence of aSNP, the T-lymphocyte proliferation slightly increased, reaching a maximal value around 77%, regardless of the ratio tested (Figure 4). We could clearly visualize (Figure 4b) that at the high ratios of 1:5 and 1:10, T-cell proliferation reached a plateau. These results suggest that, considering the nature of the DCs stimulation, a high stimulator/responder ratio leads to a saturation in T-cell proliferation masking the NP effect, as also observed with carbon black NP [19]. In the following experiments, we decided to decrease DC:T-cell ratios, to reduce T-cell proliferation below this saturation threshold and increase the sensitivity of the method.

To tackle this issue, we kept the 1:20 ratio that emerged as the most appropriate in the previous experience and added the 1:50 (1 MoDC per 50 T-cells) and 1:100 (1 MoDC per 100 T-cells) ratios (Figure 5). First, we observed that reducing the DC:T-cell ratios from 1:20 to 1:100 decreased the basal proliferation from 74.4% to 44.9% (Figure 5a). With the latter value being far below the saturation threshold, the effect of NP on T-cell proliferation was better assessed. Indeed, at the ratio of 1:20 the NP-induced proliferation increase was about 7.9% whereas it reached 19.2% for the 1:100 ratio (Figure 5a). With this latter ratio, the sensitivity noticeably increased (Figure 5b).



**Figure 5.** Low ratios allowed a better visualization of the increase in lymphocyte proliferation after 6 days of co-culture. Cells were incubated in the presence or absence of 12.5 µg.mL<sup>-1</sup> of aSNP for 16 h. Treated MoDCs were co-cultured with allogeneic CD4<sup>+</sup> T-cells labeled with CFSE at a ratio of 1:20 (1 moDC for 20 CD4<sup>+</sup> T-cells), 1 :50 and 1 :100). Proliferation was quantified after 6 days of co-culture as the percentage of CFSE<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup> T-cells. Untreated DCs were used as negative control. Results are shown as percentage of lymphocytes proliferation using FACS histogram (a) or curve (b) for a representative experiment.

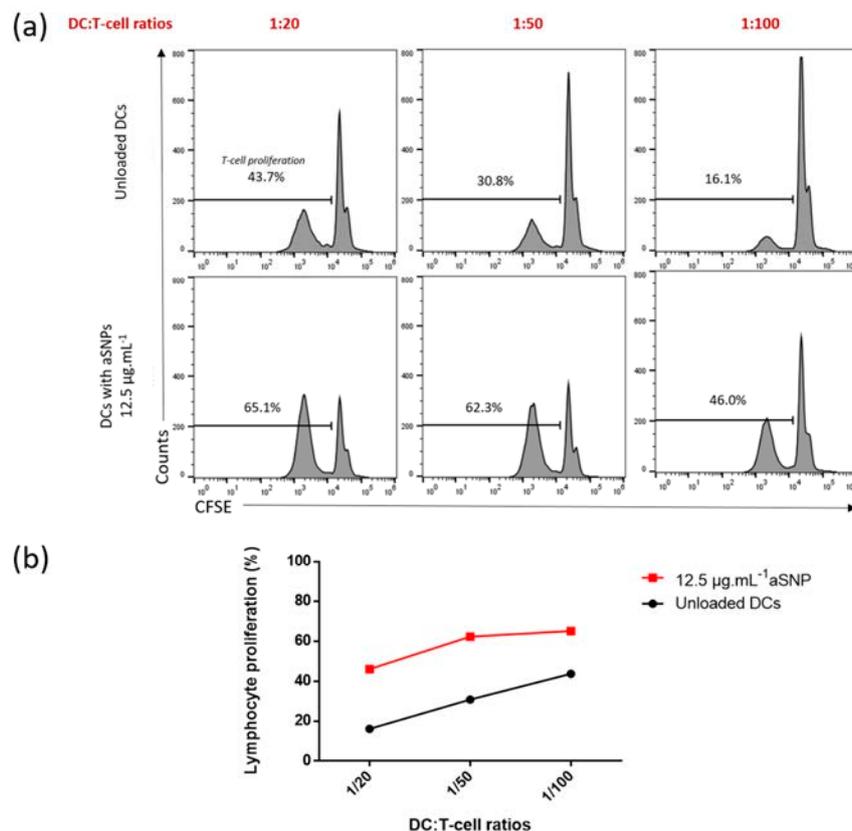
Altogether, these results underline the importance of systematically testing at least three ratios for each experiment. These observations also demonstrate the interest of low ratios. There are only few studies using the co-culture of T-cells and DCs to assess the functional DCs maturation in presence of NP, concerning carbon black [19] and CeO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> [23] NP. Koike et al. [19] demonstrated that murine BM-DC treated with carbon black NP could enhance T-cell proliferation in a MLR-test. The authors used two ratios: 1.25% ( $2.5 \times 10^3$  DC for  $2 \times 10^5$  T cells) and 2.5% ( $5 \times 10^3$  DC for  $2 \times 10^5$  T cells) which reached a saturation threshold, especially for 56 nm carbon black NP [19]. A third ratio, for example 5%, would have probably increased the sensitivity of the method. Schanen et al. [23] used human DCs and naïve T-cells with a single optimized ratio of 1:400. They observed that TiO<sub>2</sub> NP had a modest immunostimulatory effect on T-cells, leading them to the co-administration of the mitogens PHA and PMA, to increase the proliferative response. This low response to the NP alone, which could be attributed to the use of naïve T-cell, would have warranted, as suggested above, to test more ratios including a higher relative amount of stimulator cells.

### 3.3.2. Influence of the co-Culture Duration on T-Cell Proliferation and Assessment of Nanoparticles Effects

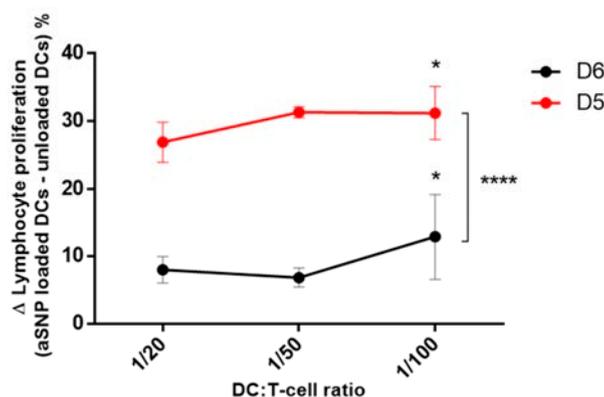
Although the interaction between DCs and T-cells under physiological conditions is unlikely to be as static and long lasting as in cell culture plates, the in-depth review of the literature led us to test 2 different co-culture durations which are commonly used to study T cell activation by the mixed-leukocyte-reaction [22,23,36]. As suggested above, reducing the basal T-cell proliferation improved the sensitivity of the model. To further decrease this proliferation, we decided to reduce the co-culture duration from six to five days (Figure 6). We retained the three ratios selected above which proved to be effective in detecting NP-induced T-cell proliferation (1:100, 1:50 and 1:20). Interestingly, in comparison to what was observed at day 6 (D6), allogeneic MoDCs induced a lower basal proliferation at day 5 (D5), ranging from 16.1 to 43.7% (Figure 6a). The ratio 1:100 allowed to substantially reduce the proliferation to 16.1% after five days of co-culture compared to 44.9% after six days. Consequently, T-cells showed a strong proliferative response when MoDCs were stimulated with aSNP (Figures 6a and 5b). If the NP-induced proliferation increase was already observable after 6 days of co-culture (Figure 5), it seemed clearly more pronounced after five days (Figure 6b), reaching a value of about 30% for both ratios 1:50 and 1:100. The five days co-culture setting allowed to significantly increase the sensitivity for detecting NP effects using this co-culture model.

To better visualize the effect of NP in our experiments, we calculated the differences between proliferations obtained with unloaded DCs and with aSNP-loaded DCs, after five (D5) or six days (D6) of co-culture. The results obtained in three independent experiments are shown in Figure 7. We observed that the differences in proliferation were evidenced in both culture conditions, albeit at a higher level at D5 than at D6, confirming the results showed previously in a representative experiment (Figure 6). This way of representing the results is particularly illustrative of the improvement brought by the reduction in co-culture time. Moreover, these results emphasize once again the importance of considering a range of ratios. To conclude, we recommend selecting the five-days co-culture conditions, and to test at least three different ratios to assess the adjuvant effect of NP.

The present study demonstrates that the MLR-induced T-cell proliferation assay is suitable for the evaluation of the immunomodulatory potential of NP. Nevertheless, the main drawback when using *ex vivo* differentiated human primary DCs is the donor-to-donor variability [8]. The heterogeneity of haplotypes between DCs and T-cells donors may lead to elevated basal proliferation that can even mask the adjuvant effect of NP. Moreover, in addition to unavoidable variations in cell yield, we clearly observed a donor-dependent fluctuation in MoDCs activation, depending on the donor's health, quality of life and even seasons. For all these reasons, it was essential to optimize the experimental conditions to minimize this variability, particularly by reducing the co-culture time and the DC:T-cell ratios. It appears also essential to carry out the experiments on at least three to five different donors.



**Figure 6.** aSNP induced an increase in lymphocyte proliferation after 5 days of co-culture. Cells were incubated in the presence or absence of  $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of aSNP for 16 h. Treated MoDCs were co-cultured with allogeneic CD4+ T-cells labeled with CFSE at ratios of 1:20 (1 moDC for 20 CD4+ T-cells), 1:50 and 1:100). Proliferation was quantified after 5 days of co-culture as the percentage of CFSE<sup>low</sup> CD4+ T-cells. Untreated DCs were used as negative control. Results are shown as percentage of lymphocyte proliferation using FACS histogram (a) or curve (b) for a representative experiment.



**Figure 7.** The 5-days incubation period is optimal to highlight lymphocyte proliferation augmentation induced by aSNP. Cells were incubated in the presence or absence of  $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of aSNP for 16 h. Treated MoDCs were co-cultured with allogeneic CD4+ T-cells labeled with CFSE at ratios of 1:20 (1 moDC for 20 CD4+ T-cells), 1 :50 and 1 :100). Proliferation was quantified after 5 or 6 days of co-culture as the percentage of CFSE<sup>low</sup> CD4+ T-cells. Untreated DCs were used as negative control. Results are showed as the  $\Delta$  (aSNP loaded DC-unloaded DCs), corresponding to the proliferation of NP-treated DCs-proliferation of untreated DCs, and represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. Tukey's honest significance test was employed in conjunction with Two-way ANOVA \*: statistically significant compared to 1:20 ratio with  $p < 0.05$ , \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ .

#### 4. Conclusions

Our human allogeneic model of co-culture allows to show the pro-adjuvant effect of aSNP at the two first steps of the immune response: DCs activation and T-cell proliferation. These findings highlight the importance of assessing NP effects on immune cell function beyond the standard endpoints such as oxidative stress or cytotoxicity. As a result, it seems essential to complete the phenotypic characterization of DCs maturation by a functional test exploring their ability to promote the proliferation of CD4+ T-cells. We propose a five-days co-culture including a wide range of ratios, from 1:5 to 1:100, in order to minimize basal proliferation values and to avoid the proliferation saturation that would prevent the effect of NP from being detected.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2079-4991/10/3/425/s1>, Figure S1. Morphological and dimensional modifications of dendritic cells in presence of amorphous silica nanoparticles.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.P. and A.B.-V.; Formal analysis, A.F.; Funding acquisition, M.P.; Investigation, A.F., E.G., M.H., F.-X.L. and E.B.; Methodology, N.S.; Supervision, M.P. and A.B.-V.; Writing—original draft, A.F. and A.B.-V.; Writing—review & editing, N.S. and M.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by INSERM institutional grants and the French National Research Program for Environmental and Occupational Health of ANSES (PNREST 2015/032, Silimmun Grant).

**Acknowledgments:** Alexia Feray and Eléonore Guillet were fellows of DIM Qi2 (Réseau de recherche Qualité de l'air en Ile-de-France). This work was supported by Paris Region in the framework of DIM Qi2. The authors thank Myriam Nabhan for her valuable help in the microscopy experiments.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### References

1. Shannahan, J.H.; Brown, J.M. Engineered nanomaterial exposure and the risk of allergic disease. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **2014**, *14*, 95–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Oostingh, G.J.; Casals, E.; Italiani, P.; Colognato, R.; Stritzinger, R.; Ponti, J.; Pfaller, T.; Kohl, Y.; Ooms, D.; Favilli, F.; et al. Problems and challenges in the development and validation of human cell-based assays to determine nanoparticle-induced immunomodulatory effects. *Part Fibre Toxicol.* **2011**, *8*, 8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Boraschi, D.; Italiani, P.; Palomba, R.; Decuzzi, P.; Duschl, A.; Fadeel, B.; Moghimi, S.M. Nanoparticles and innate immunity: New perspectives on host defence. *Semin. Immunol.* **2017**, *34*, 33–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Drasler, B.; Sayre, P.; Steinhäuser, K.G.; Petri-Fink, A.; Rothen-Rutishauser, B. In vitro approaches to assess the hazard of nanomaterials. *NanoImpact* **2017**, *8*, 99–116. [[CrossRef](#)]
5. Najafi-Hajivar, S.; Zakeri-Milani, P.; Mohammadi, H.; Niazi, M.; Soleymani-Goloujeh, M.; Baradaran, B.; Valizadeh, H. Overview on experimental models of interactions between nanoparticles and the immune system. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *83*, 1365–1378. [[CrossRef](#)]
6. Winter, M.; Beer, H.D.; Hornung, V.; Kramer, U.; Schins, R.P.; Forster, I. Activation of the inflammasome by amorphous silica and TiO<sub>2</sub> nanoparticles in murine dendritic cells. *Nanotoxicology* **2011**, *5*, 326–340. [[CrossRef](#)]
7. Deville, S.; Bare, B.; Piella, J.; Tirez, K.; Hoet, P.; Monopoli, M.P.; Dawson, K.A.; Puentes, V.F.; Nelissen, I. Interaction of gold nanoparticles and nickel(II) sulfate affects dendritic cell maturation. *Nanotoxicology* **2016**, *10*, 1395–1403. [[CrossRef](#)]
8. Pfaller, T.; Colognato, R.; Nelissen, I.; Favilli, F.; Casals, E.; Ooms, D.; Leppens, H.; Ponti, J.; Stritzinger, R.; Puentes, V.; et al. The suitability of different cellular in vitro immunotoxicity and genotoxicity methods for the analysis of nanoparticle-induced events. *Nanotoxicology* **2010**, *4*, 52–72. [[CrossRef](#)]
9. Lambrecht, B.N. Dendritic cells and the regulation of the allergic immune response. *Allergy* **2005**, *60*, 271–282. [[CrossRef](#)]
10. Oberdorster, G.; Oberdorster, E.; Oberdorster, J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* **2005**, *113*, 823–839. [[CrossRef](#)]

11. Lutz, M.B.; Schuler, G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: Which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* **2002**, *23*, 445–449. [[CrossRef](#)]
12. Gallo, P.M.; Gallucci, S. The dendritic cell response to classic, emerging, and homeostatic danger signals. Implications for autoimmunity. *Front. Immunol.* **2013**, *4*, 138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Matzinger, P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* **1994**, *12*, 991–1045. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. de Haar, C.; Kool, M.; Hassing, I.; Bol, M.; Lambrecht, B.N.; Pieters, R. Lung dendritic cells are stimulated by ultrafine particles and play a key role in particle adjuvant activity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2008**, *121*, 1246–1254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Fadeel, B. Clear and present danger? Engineered nanoparticles and the immune system. *Swiss Med. Wkly.* **2012**, *142*, w13609. [[CrossRef](#)]
16. Pallardy, M.J.; Turbica, I.; Biola-Vidamment, A. Why the Immune System Should Be Concerned by Nanomaterials? *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 544. [[CrossRef](#)]
17. Vita, A.A.; Royse, E.A.; Pullen, N.A. Nanoparticles and danger signals: Oral delivery vehicles as potential disruptors of intestinal barrier homeostasis. *J. Leukoc. Biol.* **2019**, *106*, 95–103. [[CrossRef](#)]
18. van Helden, S.F.; van Leeuwen, F.N.; Figdor, C.G. Human and murine model cell lines for dendritic cell biology evaluated. *Immunol. Lett.* **2008**, *117*, 191–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Koike, E.; Takano, H.; Inoue, K.; Yanagisawa, R.; Kobayashi, T. Carbon black nanoparticles promote the maturation and function of mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Chemosphere* **2008**, *73*, 371–376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Zhu, R.; Zhu, Y.; Zhang, M.; Xiao, Y.; Du, X.; Liu, H.; Wang, S. The induction of maturation on dendritic cells by TiO<sub>2</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TiO<sub>2</sub> nanoparticles via NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2014**, *39*, 305–314. [[CrossRef](#)]
21. Vallhov, H.; Gabrielsson, S.; Stromme, M.; Scheynius, A.; Garcia-Bennett, A.E. Mesoporous silica particles induce size dependent effects on human dendritic cells. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3576–3582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Barillet, S.; Fattal, E.; Mura, S.; Tsapis, N.; Pallardy, M.; Hillaireau, H.; Kerdine-Romer, S. Immunotoxicity of poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: Influence of surface properties on dendritic cell activation. *Nanotoxicology* **2019**, 1–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Hargadon, K.M. Murine and Human Model Systems for the Study of Dendritic Cell Immunobiology. *Int. Rev. Immunol.* **2016**, *35*, 85–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Perkins, D.J.; Vogel, S.N. Inflammation: Species-specific TLR signalling—Insight into human disease. *Nat. Rev.* **2016**, *12*, 198–200. [[CrossRef](#)]
25. Younes, M.; Aggett, P.; Aguilar, F.; Crebelli, R.; Dusemund, B.; Filipič, M.; Frutos, M.J.; Galtier, P.; Gott, D.; Gundert-Remy, U.; et al. Re-evaluation of silicon dioxide (E 551) as a food additive. *EFSA J.* **2018**, *16*. [[CrossRef](#)]
26. Brandenberger, C.; Rowley, N.L.; Jackson-Humbles, D.N.; Zhang, Q.; Bramble, L.A.; Lewandowski, R.P.; Wagner, J.G.; Chen, W.; Kaplan, B.L.; Kaminski, N.E.; et al. Engineered silica nanoparticles act as adjuvants to enhance allergic airway disease in mice. *Part Fibre Toxicol.* **2013**, *10*, 26. [[CrossRef](#)]
27. Han, H.; Park, Y.H.; Park, H.J.; Lee, K.; Um, K.; Park, J.W.; Lee, J.H. Toxic and adjuvant effects of silica nanoparticles on ovalbumin-induced allergic airway inflammation in mice. *Respir. Res.* **2016**, *17*, 60. [[CrossRef](#)]
28. Kang, K.; Lim, J.S. Induction of functional changes of dendritic cells by silica nanoparticles. *Immune Netw.* **2012**, *12*, 104–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Winkler, H.C.; Kornprobst, J.; Wick, P.; von Moos, L.M.; Trantakis, I.; Schraner, E.M.; Bathke, B.; Hochrein, H.; Suter, M.; Naegeli, H. MyD88-dependent pro-interleukin-1 $\beta$  induction in dendritic cells exposed to food-grade synthetic amorphous silica. *Part Fibre Toxicol.* **2017**, *14*, 21. [[CrossRef](#)]
30. Schanen, B.C.; Das, S.; Reilly, C.M.; Warren, W.L.; Self, W.T.; Seal, S.; Drake, D.R., 3rd. Immunomodulation and T helper TH<sub>1</sub>/TH<sub>2</sub> response polarization by CeO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *PLoS ONE* **2013**, *3*, e62816. [[CrossRef](#)]
31. Li, Y.; Fujita, M.; Boraschi, D. Endotoxin Contamination in Nanomaterials Leads to the Misinterpretation of Immunosafety Results. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 472. [[CrossRef](#)]
32. Tan, J.K.; O'Neill, H.C. Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. *J. Leukoc. Biol.* **2005**, *78*, 319–324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Kim, M.K.; Kim, J. Properties of immature and mature dendritic cells: Phenotype, morphology, phagocytosis, and migration. *Rsc Adv.* **2019**, *9*, 11230–11238. [[CrossRef](#)]
34. Aerts-Toegaert, C.; Heirman, C.; Tuyaearts, S.; Corthals, J.; Aerts, J.L.; Bonehill, A.; Thielemans, K.; Breckpot, K. CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *Eur. J. Immunol.* **2007**, *37*, 686–695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Hopken, U.E.; Lehmann, I.; Droese, J.; Lipp, M.; Schuler, T.; Rehm, A. The ratio between dendritic cells and T cells determines the outcome of their encounter: proliferation versus deletion. *Eur. J. Immunol.* **2005**, *35*, 2851–2863. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Gallais, Y.; Szely, N.; Legrand, F.X.; Leroy, A.; Pallardy, M.; Turbica, I. Effect of growth hormone and IgG aggregates on dendritic cells activation and T-cells polarization. *Immunol Cell Biol* **2017**, *95*, 306–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).