



HAL
open science

Cytotoxicité de nanoparticules polymériques, vecteurs de médicaments

Housam Eidi

► **To cite this version:**

Housam Eidi. Cytotoxicité de nanoparticules polymériques, vecteurs de médicaments. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2011. Français. NNT : 2011NAN10136 . tel-01746286

HAL Id: tel-01746286

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01746286v1>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

➤ Contact SCD Nancy 1 : theses.sciences@scd.uhp-nancy.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**ECOLE DOCTORALE BIOSE « BIOLOGIE - SANTE -
ENVIRONNEMENT »**

THESE

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ

Mention: «Sciences de la Vie et de la Santé»

Par Housam EIDI

**Cytotoxicité de nanoparticules polymériques,
vecteurs de médicaments**

Le 15 décembre 2011

MEMBRES DU JURY:

Rapporteurs:

Monsieur Edmond CREPPY (Professeur, Université Victor Segalen, Bordeaux)

Madame Françoise PONS (Professeur, Faculté de Pharmacie, Strasbourg)

Examineurs:

Monsieur Olivier JOUBERT, Co-directeur de thèse (Docteur, Faculté de Pharmacie, Nancy)

Monsieur Bertrand RIHN, Directeur de thèse (Professeur, Faculté de Pharmacie, Nancy)

Invités:

Monsieur Alain LE FAOU (Professeur, CHU, Nancy)

Madame Anne SAPIN- MINET (Docteur, Faculté de Pharmacie, Nancy)

Remerciement

Professeur *Bertrand RIHN*

J'espère avoir modestement contribué à la vie du laboratoire. Merci de m'a suivi et guidé tout au long de ce travail et m'a ouvert la voie vers la recherche scientifique. Vos remarques et vos conseils ont permis l'accomplissement de ce travail.

Docteur *Olivier JOUBERT*, je te remercie d'avoir accepté de co-diriger ce travail; pour tes conseils, ton écoute et pour ta disponibilité.

Professeur *Françoise PONS*

C'est un grand honneur pour moi que vous ayez accepté de siéger dans ce jury, je vous en remercie chaleureusement.

Professeur *Edmond CREPPY*

Je vous sais gré pour votre disponibilité à juger cette thèse, soyez assuré de ma sincère gratitude.

Docteur *Anne SAPIN-MINET*

Je n'oublierai jamais ta gentillesse et ton sourire qui ne quitte pas ton visage. Merci d'avoir fait partie de mon jury de thèse.

Professeur *Alain LE FAOU*

Merci pour votre aide et vos corrections.

Jamais cette thèse n'aurait vu le jour, si dès ma plus tendre enfance mes parents ne m'avaient inculqué l'envie de savoir. Aussi, je ne cesserai jamais de rappeler toute la gratitude que je leur dois et tout l'amour et l'admiration que je leur porte.

Je tiens aussi à exprimer mon affection à mon épouse pour m'avoir accompagné et encouragé pendant cette période. Elle a su me rendre l'envie de sourire pendant les moments difficiles.

Je dédie également ce travail à ma sœur et mes frères pour leur amour, leur confiance et leur souci permanent de me fournir le meilleur d'eux même. N'oubliez pas que je serai moi aussi toujours là pour vous ...

A ma belle-mère et à mes belles sœurs.

A toutes les personnes que j'ai croisées en France, et qui m'ont aidé à passer cette thèse...

In memoriam

Mohamad-Walid ABBARA

Pour ton âme, mon beau-père, qui n'a pas eu la chance de me voir devenir ce que je suis, qui a disparu de notre vie sans rien dire, mais à qui j'ai fait la promesse solennelle de continuer ce chemin.....

Je n'oublierai jamais tes regards, tes sourires, tes mots et ton grand cœur.

Je tiens du fond du cœur à te dédier ce travail.

Professeur *Philippe MAINCENT*, le directeur de notre unité

Je n'oublierai jamais vos mots qui me donnent le courage pendant les moments difficiles.

Professeur *François Laurent*, président de l'INPL

C'est grâce à vous je suis là aujourd'hui

Docteur *Stéphanie GRANDEMANGE*

Je te remercie de l'intérêt que tu as porté à ce travail.

Docteur *Baharia MOGRABI*

Merci de m'avoir beaucoup aidé dans la partie la plus délicate de ma thèse. Merci, Baharia, je n'oublierai jamais Nice et l'autophagie.

Docteur *Christophe NEMOS*

Merci pour ton aide, ta collaboration et de m'avoir formé sur la technique de puces à ADN.

L'équipe du *Professeur Chantal FINANCE*, en particulier le Docteur *Raphaël DUVAL* pour son aide.

Docteur *Rania ATTIK*

Je ne peux pas oublier ton soutien pendant ma première année de thèse. Merci pour ta disponibilité, ta gentillesse et pour tous les moments qu'on a passés ensemble.

Madame *Marie-Claire BOTTIN*,

Merci pour ton aide dans notre premier article.

Je n'oublierai pas de remercier mes collègues, et toutes les personnes que j'ai pu côtoyer au laboratoire, pour toutes nos discussions et les bons moments passés ensemble.

Je pense tout particulièrement à Ahmed, Myriem, Faten, Julien, Lucie, Pascale, Cristina, Javier, Juliana, Christophe, Ramia, Bouchra, Fatima, Patrick et bien d'autres.....

N'arrivant pas à finir mes remerciements et face à la difficulté de la tâche (tant le nombre des gens qui me viennent à l'esprit en cet instant est grand), j'espère que tous ceux (toutes celles) qui par leur présence, leur générosité, leur patience, leur soutien, leur accueil, ont cheminé avec moi, trouveront dans ces quelques lignes toute ma gratitude et mon amitié sans que je n'ai besoin de les citer un(e) à un(e).

Enfin, j'adresse mes vifs remerciements à l'ensemble de mes amis syriens en France: Hassan, Ahmad, Riad, Safa, Abulhadi, Azad et Mahmoud.

A mon pays, la Syrie qui brûle...

Je dédie ma thèse, avec émotion, à mes amies et à mes proches ainsi qu'à toutes les personnes qui ont disparu pour que nous vivions dans une Syrie libre.

Housam

LISTE DE TRAVAUX DE M. HOUSAM EIDI

PUBLICATIONS

ACCEPTÉES

1. Eidi H, Joubert O, Némós C, Grandemange S, Mograbi B, Marocci L, Maincent P, Imad Abokhamis and Bertrand Rihn; Drug delivery by polymeric nanoparticles induces autophagy in macrophages. *Int J Pharm*, 2012 ; 422(1-2) : 495-503.
2. B. Rihn, H. Eidi, O. Joubert, C. Némós, S. Grandemange, P. Maincent, B. Mograbi, L. Marocci, Nano systems for drug delivery: Which gap in preclinical studies? *Toxicol. Lett.* 2011; 205 : S43-44.
3. Eidi H, Joubert O, Attik G, Duval RE, Bottin MC, Hamouia A, Maincent P and Rihn BH, Cytotoxicity assessment of heparin nanoparticles in NR8383 macrophages. *Int J Pharm*, 2010 ; 396(1-2) : 156-65.
4. B.Amoussou, Y.Guivarch, H. Eidi, F. Yen, L.Méjean, pollution et obésité...ou`est le risque ? *Obes.* 2008 ; 3 : 128-132.

SOUMISES

5. Eidi H, Joubert O, Maincent P LeFaou A et Rihn BH, Nanoparticules et toxicologie: évaluation en 2012. Revue pour l'*Encyclopédie Médico-Chirurgicale* (EMC).

EN COURS DE REDACTION

6. Eidi H, Roman E, Joubert O, Maincent P LeFaou A et Rihn BH, *Polymeric drugs nanovectors, toxicity and hazards*. Revue pour *Archives of Toxicology*.

COMMUNICATIONS

1) ORALES

1. Eidi H, Joubert O, Rihn BH, Toxicité de Nanovecteurs Polymérique des Médicaments: Etude *in vitro* ; Journée des Doctorants Lorrains en Sciences (DocSciLor), 23 juin 2011, Villers-lès-Nancy.

2. Eidi H, Joubert O, Rihn BH, Drug delivery nanoparticles are autophagic inducers, 37^e Forum de jeunes chercheurs, Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire (SFBBM), Strasbourg 14-17 Décembre 2010.

3. Eidi H, Attik R, Zhang L, Maincent P, Rihn BH. *Colloidal Nanoparticles for low molecular weight heparin encapsulation: cytotoxic aspect in rat alveolar*. Forum de Jeunes Chercheurs, Société Française de biochimie et biologie moléculaire (SFBBM), Nancy 25-27 août 2009.

4. Eidi H, Zhang L, Maincent P, Rihn BH, *Comparison of tow -low molecular weight heparin- encapsulation methods into Eudragit and polycaprolacton nanoparticle*. 2nd Meeting of Syrian pharmacy colleges, 29, 30 avril et 30 mai 2009, Damas – Syrie.

2) AFFICHÉES

1. Eidi H, Joubert O, Safar R, Maincent P and Rihn BH, Drug delivery nanoparticles are autophagic inducers in macrophages ; 4th International Symposium on Nutrition, Oxygen Biology and Medicine Free Radicals, Nutrition and Aging, Paris, France (15 – 17 June 2011).

2. Eidi H, Joubert O, Maincent P, Rihn BH, Nano Systems for Drug Delivery : Which Gap in Preclinical Studies? 36^e Congrès annuel de la Société Française de Toxicologie (SFT), Paris, Novembre 2010.

3. Eidi H, Joubert O, Zhang L, Maincent P, Rihn BH, Eudragit[®] RS nanoparticles : a gene expression study in NR8383 cell line. 35^e Congrès annuel de la Société Française de Toxicologie (SFT), Nancy le 19-20 octobre 2009.
4. Eidi H, Maincent P, Rihn B.H, Nanotechnologie = nanotoxicologie ? Doctoriales Lorraine, mai - 2009, St. Dié-des-Vosges.
5. Eidi H, Zhang L, Maincent P, Rihn B, *cytotoxicity and apoptosis in rat alveolar macrophages exposed to various colloidal nanoparticles. 3rd symposium: Nutrition, Oxygen Biology and Medicine*, Paris le 8 – 10 Avril 2009.
6. JC Chevin, MF Raspillera, H Eidi, RE Duvala, MC Bottin, MA Saka-Amini, L Marcocci, BH Rihn, *Button battery induced cell damage: A pathophysiological study. 3rd symposium: Nutrition, Oxygen Biology and Medicine*, Paris le 8 – 10 Avril 2009.
7. Eidi H; Attik G; Coliaux P.A; Conrard E; Ziajka. S; Marcocci L; Maincent P; Rihn B.H, *Colloidal nanoparticle drug delivery systems: cytotoxic effects on NR8383, a murin macrophage cell lines. 34^e congrès de la Société Française de Toxicologie (SFT), Paris le 20-21 octobre 2008.*
8. Raspiller M.F, Attik G, Toussaint C, Tournoud C, Eidi H, Lafontaine S, Dika H, Flesch F, Rihn B.H. Inhalation de nanomatériaux : quels tests toxicologiques ? 45^e congrès de la Société de Toxicologie Clinique (STC), Bordeaux (6-7 décembre 2007).
9. Joubert O, Gaci N, EIDI H, Dika H, Hebrant M., Gournel S, Coulon J., Hadou T., Debriel D, RIHN B, *Study of the biopersistence of mineral fibres in vitro by macrophages activated by Saccharomyces sp.* Levures, modèles et outils IX, 30 août – 2 septembre 2010, Strasbourg.

PRIX

1. Prix de la Société Française de Recherche sur les Radicaux Libres (SFRR), Paris, juin 2011.

TABLE DE MATIERS

TABLE DE MATIERS	1
LISTE DES TABLEAUX.....	4
LISTE DES FIGURES.....	5
LISTE DES ABREVIATIONS	7
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	9
I. LES NANOPARTICULES ET LA TOXICOLOGIE.....	9
[Extrait d'un article pour l'Encyclopédie Médico-Chirurgicale (EMC)].....	9
I.1. Introduction :	9
I.2. Définitions	10
I.3. Utilisations non médicales actuelles ou futures de NPs	11
I.3.1. Application médicales et pharmaceutiques des nanotechnologies	13
I.4. NPs et toxicologie.....	15
I.4.1. Principales caractéristiques des NPs affectant leur toxicité.....	17
I.4.1.1. La taille.....	17
I.4.1.2. La structure chimique.....	18
I.4.1.2.1 Hydrophilie et charge	19
I.4.1.3. Agglomération-agrégation	20
I.4.2.1. Caractérisation physico-chimique des NPs	21

I.4.2.2. Les modèles cellulaires : sélection et utilisation	22
I.4.2.3 Les déterminants moléculaires de la cytotoxicité des NPs.....	24
II. LES NANOVECTEURS POLYMERIQUES DE PRINCIPES ACTIFS.....	26
II.1. La vectorisation des médicaments.....	26
II.2. Les trois générations de nanovecteurs.....	27
II.3. Les NPs à vocation thérapeutique	29
II.4. Nanoparticules polymériques	29
II.5. Les polymères pharmaceutiques	32
- Protéger le noyau des agressions extérieures (ex. pH, activité enzymatique...)	33
- Protéger les noyaux hygroscopiques de l'humidité	33
- Moduler la libération du principe actif.	33
II.5.1. Les polymères biodégradables.....	34
N.R. : non renseigné	37
II.5.2. Poly- ε -caprolactone	37
II.5.3. Les dérivés poly(méth)acryliques (les Eudragit®).....	39
II.6. Toxicité des nanovecteurs polymériques	42
II.6.1. La toxicité des vecteurs nanométrique de l'Eudragit® et de PCL	48
OBJECTIFS DU TRAVAIL	52
ÉTUDES EXPERIMENTALES ET PUBLICATIONS.....	53
1. Article I : <i>Cytotoxicity assessment of heparin nanoparticles in NR8383 macrophages</i> ..	53
2. Article II: <i>Nano systems for drug delivery: Which gap in preclinical studies?</i>	65

4. Travaux complémentaires, non publiées	80
4.1. Les contrôles utilisés dans les tests de toxicité des NPs	80
4.2. Influence de la masse molaire du polymère sur la cytotoxicité des NPs	80
4.2.1. Matériel et méthodes	80
4.2.2. Résultats	80
4.3. Les effets de doses subtoxiques de NPs du PCL sur la prolifération des macrophages	82
4.3.1. Matériels et méthodes.....	82
4.3.2. Résultats	84
4.4. Internalisation des NP/ERS ⁻ par les macrophages NR8383.....	85
DISCUSSION GENERALE, PERSPECTIVES ET CONCLUSION	87
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	97

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : importance des caractéristiques des NPs étudiées avant toute étude <i>in vitro</i>	22
Tableau 2 : Les trois générations de nanovecteurs d'agents thérapeutiques.....	28
Tableau 3 : Modes de préparation des différents complexes polymères/ principes actifs.....	34
Tableau 4 : Les polymères biodégradables naturels ou synthétiques, les plus utilisés comme « porteurs » de médicaments.	36
Tableau 5 : Les trois mécanismes principaux de dégradation des polymères.....	37
Tableau 6 : Caractéristiques physicochimiques de polymères d'Eudragit® RS et RL.....	40
Tableau 7 : Composition chimique des Eudragit® RL et RS	41
Tableau 8 : Données expérimentales, <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> , concernant la toxicité des nanoparticules polymériques.....	43
Tableau 9 : Toxicité des NPs de PCL et Eudragit	49

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Impact économique des nanotechnologies en 2010.....	13
Figure 2 : NPs de CdSe (tailles différentes) sous lumière UV.....	14
Figure 3 : Toxicocinétique et toxicodynamiques des NPs	16
Figure 4 : De la particule à l'agglomérat.....	21
Figure 5 : Mécanisme hypothétique d'interactions cellule-NPs.	25
Figure 6 : Les différents moyens de modifier les propriétés de NPs.	27
Figure 7 : Les 3 types de nanovecteurs (exemple des liposomes)..	28
Figure 8 : Différents modèles des dendrimères.....	31
Figure 9 : Notion de Nanogel.....	32
Figure 10 : Les différents types de polymères biodégradables et leurs utilisations que recouvre application écologique polymères.....	35
Figure 11 : Réaction de polymérisation d' ϵ -caprolactone en présence d'acide laurique.	38
Figure 12 : Les différents types de polymères d'Eudragit [®]	40
Figure 13 : Structure chimique générale des dérivés acryliques (Eudragit [®]).....	41
Figure 14 : Poster présenté au 47 ^{ème} Congrès des Sociétés Européennes de Toxicologie (EUROTOX), août 2011 à Paris.	66
Figure 15 : Effet de la masse moléculaire du polymère sur la viabilité mesurée par le test au MTT.....	81
Figure 16 : Effet de la masse molaire du polymère sur la viabilité mesurée par le test de BT.....	82
Figure 17 : Principe du test du BrdU (<i>Cell Proliferation ELISA, BrdU</i>)	83
Figure 18 : La viabilité cellulaire mesurée par le test au MTT.	84

Figure 19 : Effet de NPs de PCL sur la prolifération des NR8383.	85
Figure 20 : Endocytose clathrine-dépendante des NP/ERS- par les macrophages NR8383... ..	86
Figure 21 : Aspect au MEB des macrophages	86
Figure 22 : Topologie des protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale chez les Mammifères.	90
Figure 23 : La morphologie mitochondriale dépend en partie d'un équilibre entre les processus de fusion et de fragmentation contrôlé par les protéines mitochondriales	91
Figure 24 : La balance fusion/fragmentation mitochondriale et le rôle de la sous-expression de l' <i>opa-1</i> favorisant cette balance vers la fragmentation et induisant l'autophagie.	92
Figure 25 : Mécanisme hypothétique de l'activité cytotoxique des NPs.	93
Figure 26 : Rôle de l'autophagie dans la suppression et la progression tumorale.	94
Figure 27 : Mécanisme hypothétique de l'interaction NPs / macrophages	96

LISTE DES ABREVIATIONS

AFFSET	Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail. A partir de juillet 2010 elle a été regroupée avec l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) et a été créée l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail)
A_{spec}	Surface spécifique
BT	Test de bleu Trypan
CBUF	Carbon Black Ultrafine ou Nanoparticule de noir de carbone
DE	Double émulsion
DEP	Débit Expiratoire de Pointe
DPPC	Di-Palmitoyl-Phosphatidyl-Choline
EBH	Cellules Epithéliales Bronchiques Humaines
EGF	facteur de croissance épidermique (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
EGFR	récepteur de l'EGF (<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
ERS	Eudragit [®] RS
GI	Gastrointestinal
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
GSH	Glutathion (forme réduite)
HBPM	Héparine Bas Poids Moléculaire
IC ₅₀	Concentration provoquant 50 % d'inhibition
IARC	International Agency for Research on Cancer
INERIS	Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques
INRS	Institut National de Recherche et de Sécurité
IRSST	Institut de Recherche en Santé et en Sécurité du Travail (Montréal, Canada)
i.T	intratrachéale
LBA	Lavage Broncho-Alvéolaire
LD ₅₀	Dose Létale 50
LDH	Lactate DésHydrogénase
MEB ou SEM	Microscopie électronique à balayage
MET ou TEM	Microscopie électronique à transmission
mtDNA	ADN mitochondrial

MWCNT	nanotube de carbone multi-paroi (<i>Multi Wall Carbon NanoTubes</i>)
NF-κB	Nuclear Factor-kappa (κ) B
DE/ERS ⁺ ou DE/ERS ⁻	Nanoparticules d'Eudragit [®] RS préparées par double émulsion chargées ou non de l'héparine bas poids moléculaire.
DE/PCL ⁺ ou DE/PCL ⁻	Nanoparticules de poly-ε-caprolactone préparées par double émulsion chargées ou non de l'héparine bas poids moléculaire.
NP/ERS ⁺ ou NP/ERS ⁻	Nanoparticules d'Eudragit [®] RS préparées par nanoprécipitation chargées ou non de l'héparine bas poids moléculaire.
NP/PCL ⁺ ou NP/PCL ⁻	Nanoparticules de poly-ε-caprolactone préparées par nanoprécipitation chargées ou pas avec l'héparine bas poids moléculaire.
N.R.	Non Renseigné
NP	Nanoprécipitation
NPs	Nanoparticules
NTC	NanoTubes de Carbone
PARP	poly (ADP-ribose) polymérase
PCL	Poly caprolactone
PUF	Particule ultraFine
PVA	<i>polyvinyl alcohol</i>
QDs	<i>Quantum dots</i> (les points quantiques)
ROS ou ERO	Espèces réactives de l'oxygène
SWCNT	Nanotube de carbone mono-paroi (<i>Single Wall Carbon NanoTubes</i>)
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LES NANOPARTICULES ET LA TOXICOLOGIE.

[Extrait d'un article pour l'Encyclopédie Médico-Chirurgicale (EMC)]

I.1. Introduction :

En 1959, Richard Feynman, Prix Nobel de Physique 1965, a émis l'hypothèse qu'il devrait être possible de travailler au niveau atomique et il a décrit un monde dans lequel on pourrait manipuler les atomes un à un et construire ainsi des structures cohérentes de très petites tailles. Cette vision d'avant-garde s'est concrétisée avec l'apparition des **nanotechnologies** qui peuvent être définies comme l'ensemble des techniques permettant la manipulation de la matière au niveau atomique et moléculaire. Elles consistent à concevoir et manipuler des structures qui ne dépassent pas 500 nm dans au moins une de leurs dimensions auxquelles a été donné le nom générique de « nanoparticules » (NPs).

Les éléments nanométriques sont utilisés de manière empirique depuis très longtemps et sont également présents dans le monde vivant. De nombreuses structures naturelles, telles que les protéines ou les molécules d'ADN (dont le diamètre est de 2 nm) répondent à la définition de nanoparticules. A titre de comparaison, le diamètre d'un atome de silicium est de 0,2 nm, celui d'un globule rouge de 7000 nm et celui d'un cheveu humain de 10000 à 50000 nm. Les petits virus comme les *Picornaviridae* sont des structures fonctionnelles de 30 à 40 nm de diamètre. Les feuilles de lotus sont recouvertes de NPs de cire qui la rendent hydrophobe, les gouttes d'eau à leur surface gardent leur forme sphérique sans s'étaler du fait d'une absence complète de mouillage. Les propriétés d'auto-assemblage d'atomes sont utilisées depuis l'antiquité. A l'époque romaine tardive, des particules métalliques de dimensions nanométriques étaient introduites lors de la fabrication du verre. Une coupe, actuellement au British muséum de Londres, décrivant la mort du roi Lycurgus, contient des particules

nanométriques d'or et d'argent. Elle est de couleur vert-jade en réflexion, mais devient rubis lorsqu'une source lumineuse est introduite à l'intérieur (en transmission). Le bleu des peintures mayas, tout comme le lustre de poteries de la Renaissance italienne sont dus à l'introduction de nanoparticules métalliques dans la préparation de la pâte. Il en est de même dans la fabrication des vitraux des grandes cathédrales de l'époque médiévale (cobalt pour la couleur bleue, argent pour le jaune...). La photographie argentique repose sur le dépôt de particules nanométriques d'argent. Enfin les résidus de combustions industrielles ou automobiles (diesel) sont composés de particules nanométriques résultant de la combustion incomplète du carburant [1-3].

I.2. Définitions

Il n'existe pas jusqu'au moment une définition standard de la nanoparticule, ni au niveau national ni international. De plus, dans la littérature plusieurs définitions contradictoires de NPs basées souvent sur la taille, ont été proposées. On parle de **nanosciences** pour les études théoriques de ces structures nanométriques. En effet, à cette échelle, la matière présente des particularités qui ne sont plus décrites par la physique classique, mais qui répondent aux lois de la mécanique quantique. Les termes **nanstructures**, ou, plus couramment, **nanoparticules** (NPs) regroupent l'ensemble des constructions nanométriques : **nano-objets**, et **nanomatériaux**. Les **nano-objets** sont les structures élémentaires, de forme et de taille bien définies, soit produits industriellement, soit formés spontanément de façon naturelle ou en tant que sous-produits de l'activité humaine. Les **nanomatériaux** sont composés de nano-objets ou renferment des nano-objets. Les **nanoparticules** ont été définies comme des particules solides ou des systèmes dispersés à une échelle de taille de 10 à 1000 nm [4, 5]. Elles ont également été définies comme des matériaux qui ont au moins une dimension inférieure à 100 nm [6-8]. Ces deux définitions contradictoires de NPs reflètent les difficultés d'obtenir une définition standard, reconnue sur le plan réglementaire, alors que les

nanomatériaux sont déjà fabriqués, commercialisés et utilisés. Pourtant une telle définition est nécessaire étant donné le risque toxique potentiel, pour le moment non pris en compte, que fait courir ces nanostructures tant dans le monde du travail que dans la vie de tous les jours (environnement, alimentation, cosmétiques...). Cette définition devra être validée par les gouvernements et *in fine* par le Parlement Européen à la suite de consultations organisées avec les organisations non gouvernementales (ONG) ainsi que les industries développant des nanotechnologies. Le Parlement Européen a d'ailleurs demandé à la Commission Européenne de fournir une définition précise du terme « nanomatériaux » pour l'inclure dans la législation communautaire [9].

Les experts se positionnent clairement en faveur d'une définition limitée à la taille en excluant de fait tout critère lié à leurs propriétés physico-chimiques. Si le seuil plancher d'1 nanomètre est largement accepté, la limite maximale reste à définir. Cependant il pourrait être nécessaire d'adapter la définition générale à des applications spécifiques [10]. De plus, une éventuelle toxicité des nanoparticules doit être prise en compte et celle-ci devra également faire l'objet de réglementations spécifiques. En effet, il n'est pas possible de se limiter à la taille et à la dose pour ces structures qui possèdent des propriétés physico-chimiques particulières. Ainsi devraient être pris en compte la composition, et la réactivité des NPs qui varient d'un type de particule l'autre et qui pourraient être liées à leur toxicité. Il apparaît donc nécessaire de développer des études de toxicité de ces composés nanoparticulaires celles-ci étant menées pour toute structure originale. En plus de la définition, une réglementation devra être mise en place pour encadrer l'utilisation de ces nouvelles technologies. Dans ce but, a émergé le concept de "**nanotoxicologie**", champ scientifique qui étudie les risques environnementaux et sanitaires liés aux nanotechnologies.

I.3. Utilisations non médicales actuelles ou futures de NPs

La définition très large des nanoparticules fait entrer dans ce cadre des structures très diverses allant de particules formées spontanément ou par auto-assemblage à la conception de nouveau matériel par contrôle direct de la matière au niveau atomique ou moléculaire. Aussi les applications sont-elles variées et les NPs trouvent des utilisations en médecine, en électronique, dans la science des biomatériaux et la production d'énergie (liste non limitative) [11].

- **Automobile, aéronautique** : revêtements anticorrosion et antisalissure, additifs moteurs, pneumatiques plus résistants, pots catalytiques. Une réduction des coûts énergétiques est obtenue par un meilleur rendement des moteurs du fait de l'utilisation de micro-capteurs ;
- **Électronique, communication et informatique** : miniaturisation, développement de mémoires à haute densité, micro-ordinateurs, écrans plats plus lumineux ;
- **Chimie et matériaux** : céramiques, poudres, pigments, catalyseurs, nouvelles techniques de soudage ;
- **Industrie textile** : fibres plus résistantes, hydrophobes ou encore ignifuges, antibactériennes, anti-odeurs ;
- **Industrie du verre** : vitres autonettoyantes, développement de propriétés optiques particulières (fonction réfléchissante, coloration, absorption des UV...) ;
- **Cosmétique et produits d'hygiène** : crèmes solaires pour filtrer les UV avec une tenue à l'eau améliorée (TiO_2), maquillages, pâtes dentifrice ;
- **Énergie** : cellules photovoltaïques, batterie à hydrogène, isolants ;
- **Environnement** : diminution des rejets de dioxyde de carbone, production d'eau douce, pesticides/fertilisants plus efficaces et moins toxiques ;
- **Sécurité des procédés** : réacteurs zéolithes compacts, prévention des copies criminelles des cartes de crédit ou de débit, protection contre la falsification de billets de banque et des documents officiels, procédés auto-organisés permettant des contrôles de qualité,

incorporation de nano-senseurs dans les chaînes de production :

Ainsi, aucun secteur de l'industrie n'échappe aux NPs et les nanotechnologies ont de plus en plus un rôle économique et social très important. En effet, elles généreraient déjà un revenu de 40 milliards d'euros en 2001 selon la Commission Européenne qui devrait dépasser le seuil de 1.700 milliards d'euros en 2014, représenter 15 % de la production manufacturière mondiale [12] et concerneraient directement l'emploi de 2 millions de personnes dans le monde (Figure 1). Le domaine de la santé (« nanomédecine »), quant à lui, représentait 126 millions d'euros en 2006 [13].

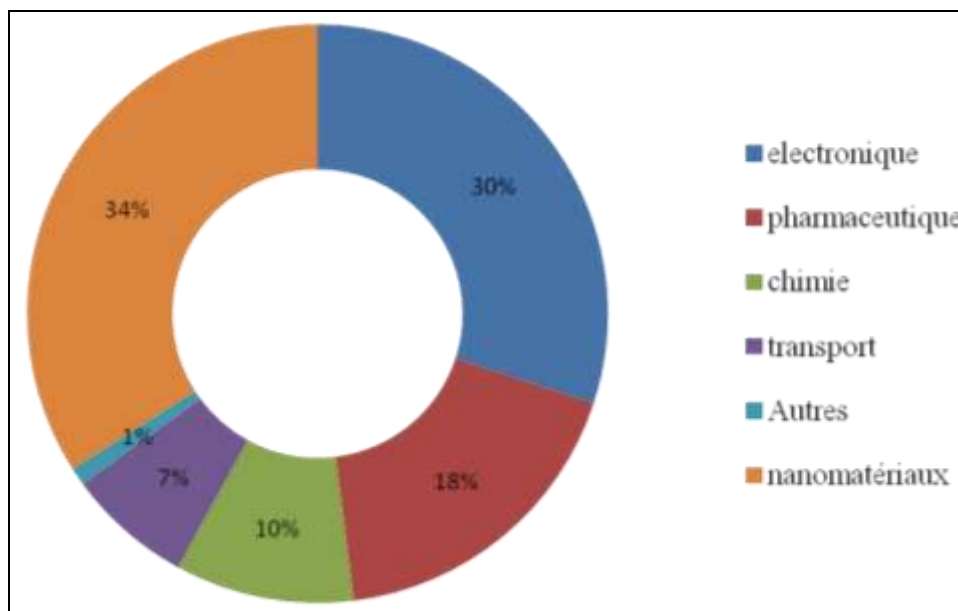


Figure 1 : Impact économique des nanotechnologies en 2010. (d'après l'AFSSET [13]).

I.3.1. Application médicales et pharmaceutiques des nanotechnologies

- **Diagnostic** : analyses biomédicales sur des échantillons biologiques de faible volume dits « précieux » tels que les cellules fœtales ou les cellules du cordon ombilical, biopsies de très petite taille, manipulation de cellules isolées. Les biopuces (*microarrays*) utilisées pour identifier les gènes exprimés et en mesurer le niveau d'expression en comparant par exemple des tissus humains normaux et cancéreux, peuvent être encore miniaturisées. Elles sont

également utilisées pour la recherche ou l'identification de virus ou de bactéries à partir de prélèvements et pourraient constituer des laboratoires de diagnostic complets en microfluidique.

Imagerie : La nanotechnologie est également utilisée dans le diagnostic *in vivo* ; par exemple, les nanocristaux de CdSe (Cadmium Sélénium) de tailles différentes correspondant, sous lumière UV, à des longueurs d'ondes d'émission différentes, sont utilisés en imagerie par fluorescence (Figure 2). La faible pénétration de la fluorescence restreint son utilisation aux petits animaux, notamment les souris. Des études récentes ont essayé d'appliquer cette imagerie chez l'homme, notamment pour la détection des tumeurs dans le cancer de la prostate et du colon, mais les résultats restent préliminaires. L'imagerie moléculaire préclinique permet d'observer les molécules biologiques chez le petit animal, pendant une période relativement longue (plusieurs mois), sans avoir à le sacrifier, pour le développement des nouveaux médicaments : ex. biodistribution, thérapie génique et étude pharmacodynamique et pharmacocinétique. L'imagerie moléculaire, surtout l'imagerie par fluorescence, pourrait permettre la détection précoce des tumeurs ainsi que le guidage des biopsies et des gestes chirurgicaux.

Le stade suivant consisterait à effectuer une délivrance sur site d'agents anticancéreux permettant ainsi une association favorable entre le diagnostic et la thérapie [14].



Figure 2 : NPs de CdSe (tailles différentes) sous lumière UV. Ces NPs (Artechniaue[®]/CEA) sont utilisées en imagerie optique chez les petits animaux (d'après [14]).

- **Chirurgie** : L'utilisation de NPs en chirurgie réparatrice pourrait faire appel à des prothèses en matériaux biocompatibles (par ex. osseux).

- **Thérapie cellulaire** : La complexité chimique et structurelle des NPs permet d'envisager leur utilisation pour stimuler la régénération tissulaire. Cette thérapie vise à remplacer des cellules malades par des greffes de cellules. Par exemple, le traitement des infarctus du myocarde par cette stratégie consiste à injecter des cellules directement dans le myocarde. Cependant, la détection et le suivi non invasif des cellules implantées restent problématiques. Ainsi, un programme mené par trois laboratoires du CNRS, deux laboratoires INSERM et deux services hospitaliers d'imagerie médicale a pour l'objectif d'améliorer le suivi des cellules implantées après marquage avec les NPs superparamagnétiques de fer chez des rats présentant un infarctus. Les cœurs sont ensuite étudiés par l'IRM et le marquage fournit un signal en IRM proportionnel au nombre de cellules ainsi qu'à la masse de fer incorporé par cellule [15].

- **Médicaments** : la pharmacie galénique a développé récemment des systèmes de nanovecteurs (polymériques, métalliques, des liposomes...) susceptibles de promouvoir le passage transmembranaire tout en protégeant les médicaments de la dégradation par les enzymes avec un transport des molécules actives jusqu'à leur cible (cf. le chapitre II). Cependant, avant toute utilisation médicale ou pharmaceutique, la toxicité des NPs utilisées devra être étudiée.

I.4. NPs et toxicologie

L'utilisation universelle des NPs nécessite comme pour toute technologie nouvelle, des études d'impact sur la santé de l'homme et de l'animal. Pourtant, il est actuellement difficile de mettre en place la définition d'une dose toxique permettant de tenir compte des propriétés des NPs. La dose pondérale n'est pas suffisante et il faut tenir compte du nombre, de la forme, de

la surface ainsi que de la structure chimique, tous ces paramètres étant intriqués. La pénétration et la toxicité des NPs sont très étudiées dans leurs interactions avec les voies aériennes, surtout du fait de la présence de résidus de combustion potentiellement toxiques dans l'air ambiant. Cependant, les multiples utilisations des NPs rendent nécessaire la prise en compte des autres voies de pénétration dans l'organisme comme la peau et les muqueuses avec les produits cosmétiques ou d'hygiène et les médicaments topiques ainsi que la voie digestive pour les médicaments et les additifs alimentaires.

En toxicologie classique, selon Paracelse "*tout est toxique, rien n'est toxique, tout est question de dose*", les effets sont directement liés à la quantité de produit absorbé, exprimée en unité de masse. Plus celle-ci est élevée, plus l'effet toxique sera important. Dans le cas des NPs, ce n'est pas le cas. En effet, à masse équivalente, les NPs sont bien plus toxiques que les microparticules [3]. Donc ce "paradigme masse" ne peut être l'unique paramètre retenu pour les NPs et il faut en définir d'autres pour déterminer les seuils de toxicité [10]. Les différents paramètres liés à la nanotoxicité (Figure 3) qui dérivent directement de la très grande diversité des NPs proposées, rend souhaitable la définition d'« indices de toxicité » qui prennent en compte l'ensemble des paramètres physico-chimiques, chacun étant affecté d'une variable fonction de leur impact potentiel.

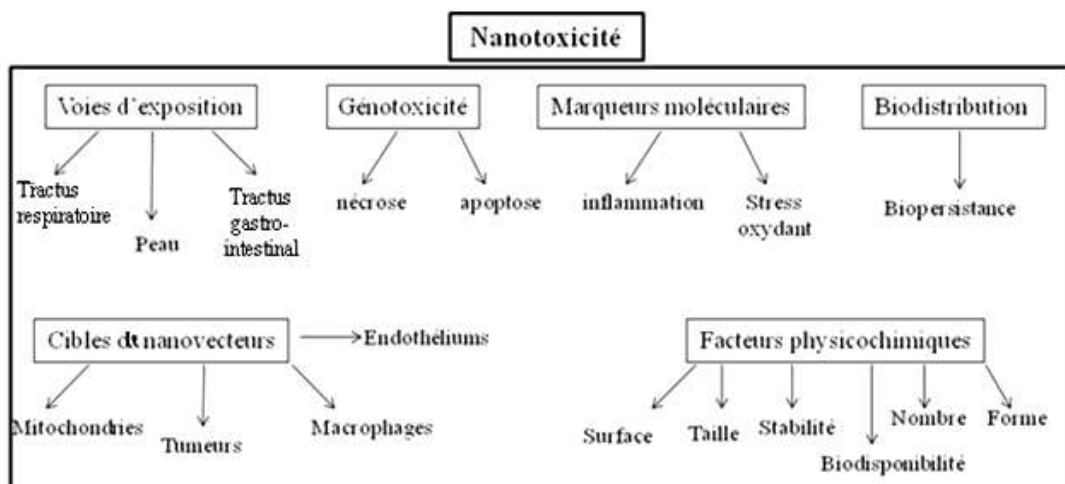


Figure 3 : Toxicocinétique et toxicodynamiques des NPs (modifié d'après [16])

I.4.1. Principales caractéristiques des NPs affectant leur toxicité

I.4.1.1. La taille

Le comportement des NPs dans l'organisme est fonction non seulement de la voie de pénétration mais aussi de leurs interactions avec les cellules avec lesquelles elles rentrent en contact. La principale exposition aux NPs à l'heure actuelle est au niveau de l'arbre respiratoire. Les NPs peuvent se déposer à tous les niveaux des voies aériennes, et leur petite taille favorise leur pénétration jusqu'aux alvéoles dans la mesure où elles ne sont pas en agrégats. En effet, dans ce cas, le dépôt à la surface de la trachée et des bronches, entraîne une remontée par le processus ciliaire et le passage dans les voies digestives. Un passage des NPs inhalées vers le système nerveux central, en utilisant les branches du nerf olfactif serait possible [17]. Véhiculées par les macrophages alvéolaires elles pourraient gagner différents organes et tissus par voie sanguine ou lymphatique.

La taille régit l'efficacité de la pénétration intracellulaire : la phagocytose impossible pour les particules trop grosses (supérieures à 20 μm), ne joue pas pour les particules très petites (inférieures à 200 nm). Ces dernières peuvent cependant pénétrer dans les cellules par endocytose [18]. Mais le fait que les NPs d'or de 50 nm de diamètre pénètrent mieux dans les cellules que celles de 14 ou 74 nm tend à montrer qu'il pourrait exister une taille optimale pour l'internalisation [19]. La cinétique d'internalisation de NPs dépend également de la taille [19-21].

Les interactions des NPs avec les protéines du milieu sont à considérer [18] : plus les particules sont grosses, plus les protéines du milieu de culture sont susceptibles d'avoir de points de fixation à leur surface, ce qui engendre des modifications des propriétés de la surface de NPs (notamment la charge) affectant leurs propriétés toxicologiques.

La fixation des NPs sur les récepteurs membranaires est fonction de leur taille et sans doute aussi de leur structure. Cette fixation peut déclencher des phénomènes d'internalisation (ex. le récepteur déclenchant l'endocytose chlatrine-dépendante), mais pourrait aussi induire une activation des cascades de signalisation cellulaire ou des synthèses protéiques.(ex. chlatrine) [22].

La taille des NPs n'est pas le seul facteur critique déterminant leur toxicité. Leur nombre pour une masse donnée et leur forme, qui déterminent la surface spécifique (m^2/g), interviennent dans les interactions avec les tissus. En effet, une diminution de la taille de NPs, une forme complexe, une structure poreuse, se traduisent par une augmentation de la surface pour une masse donnée, et augmentent la réactivité biologique

La forme des NPs est très variée mais son influence sur la toxicité n'est pas bien connue. Celle-ci peut jouer sur la cinétique de dépôt et les interactions NPs / cellules ainsi que sur leur pénétration dans les cellules [20]. Par exemple, les nanotubes à mono-paroi sont plus toxiques que les nanotubes multi-paroi *in vitro* et les NPs sphériques sont internalisées 5 fois plus que celles en forme de bâton de diamètre identique [20].

Les études épidémiologiques ont montré que le nombre de NPs serait corrélé à la morbi-mortalité respiratoire lors d'épisodes de pollutions urbaines ou d'expositions professionnelles. Le nombre total serait un des facteurs de la translocation vers l'interstitium pulmonaire [23, 24]. Néanmoins, l'interprétation des données épidémiologiques est rendue difficile de par la variabilité physico-chimique des NPs l'aérosol ou la présence de polluants tels le monoxyde de carbone, l'oxyde d'azote ou l'ozone [25].

I.4.1.2. La structure chimique

La composition des NPs est très variée et pratiquement toutes les classes de substance sont représentées. Aussi, selon les groupes réactifs présents à la surface, les effets biologiques des

NPs peuvent-ils considérablement varier mais ce paramètre est important et la réactivité de surface est un facteur clé dans la toxicité des nano-objets [26].

I.4.1.2.1 Hydrophilie et charge

Les NPs hydrophiles sont les plus toxiques et elles pourraient également induire la production de médiateurs pro-inflammatoires ou réduire l'efficacité de la phagocytose. En effet, l'opsonisation dépend du degré d'hydrophilie [27]. Les NPs hydrophobes sont rapidement recouvertes d'opsonines (anticorps, système du complément...) et par conséquent les plus rapidement phagocytées par les macrophages.

La présence de charges électriques superficielles pourrait contribuer à l'adsorption de protéines ou encore à des interactions avec les membranes cellulaires [27]. Bien que ce paramètre présente un intérêt, il reste peu étudié. Les NPs anioniques ou neutres sont internalisées malgré une faible interaction avec la membrane cellulaire [28], mais plus faiblement que les nanoparticules chargées positivement [29]. En effet les NPs cationiques se lient aux groupements négatifs à la surface de la cellule (par exemple, les acides sialiques) [30] favorisant le contact et leur internalisation. Puisque les NPs chargées positivement sont internalisées rapidement par une voie clathrine-dépendante [31] elles peuvent être utilisées comme vecteurs de médicaments et de gènes [32, 33]. Après blocage de cette voie d'endocytose par un des inhibiteurs spécifiques (ex. chlorpromazine) [34], l'internalisation des particules cationiques est quand même possible par des voies alternatives, surtout l'endocytose compensatoire [31]. Cependant certaines NPs cationiques comme celles à base de silice sont mal internalisées [35]. Des modifications des fonctions à la surface des NPs, telles que le nombre de groupements hydrophobes ou leur structure peut altérer le degré d'internalisation cellulaire. Donc, les interactions entre les nanoparticules et la surface

cellulaire ne se limitent pas à des phénomènes de charge par unité de surface [36] et restent des phénomènes complexes.

I.4.1.3. Agglomération-agrégation

Un agrégat est un groupe de particules dont la cohésion relève de forces de *Van der Waal*, de forces électrostatiques ou des force développées par les tensions de surface, par opposition à un agglomérat où les particules sont plus fortement liées et ne peuvent donc plus se séparer. Une liaison forte se formant entre les particules primaires d'un agglomérat est suffisamment solide pour résister aux actions du fluide utilisé (Figure 4) [37]. La formation d'agrégats/agglomérats est un facteur important qui peut transformer les NPs en structures micrométriques, donc en modifier considérablement le comportement : sédimentation, dépôts dans les voies aériennes et phagocytose par les macrophages. Ce phénomène diminue la surface de contact et modifie les interactions avec l'environnement ainsi que la toxicité. Ceci peut être liée à la disparition de groupements réactifs tel que cela a été observé avec des NPs de TiO_2 [38]. Les mécanismes d'internalisation des NPs sont également altérés du fait de la modification de la surface et de la charge [13]. Pour éviter cette agrégation, les NPs peuvent être stabilisées par recouvrement d'agents tensioactifs.

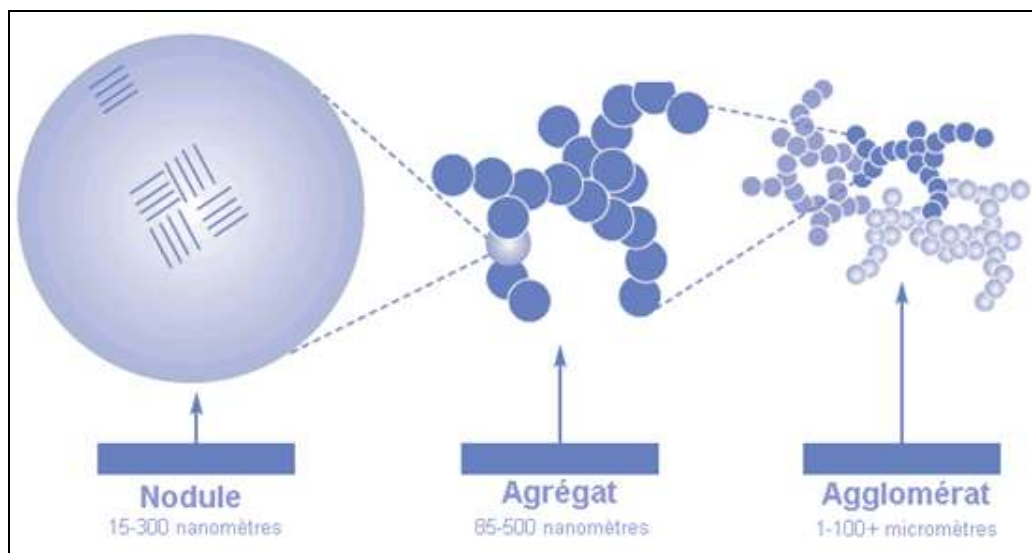


Figure 4 : De la particule à l'agglomérat. (Service du répertoire toxicologique du Commission de la Santé et de la Sécurité du travail [39] ; adapté de l'*International Carbon Black Association*)

I.4.2. Evaluation de la cytotoxicité des NPs

I.4.2.1. Caractérisation physico-chimique des NPs

Avant d'évaluer les interactions *in vitro* des NPs avec les produits biologiques ou les cellules, les procédures de purification, des propriétés telles que la stabilité en suspension, la solubilité, l'agrégation intrinsèque, la floculation, la stabilité chimique, la conductivité ou le potentiel redox et le degré de contamination doivent être déterminées. (Tableau 1).

Tableau 1 : importance des caractéristiques des NPs étudiées avant toute étude *in vitro*

(d'après Jones et coll. [8]).

Propriétés des NPs étudiées	Importance selon l'utilisation		
	Matériau fourni	Utilisations acellulaires	En culture cellulaire
- Taille	E	D	D
- Forme	E	O	O
- Composition	E	O	O
- Chimie de surface	E	D	D/O
- Contamination de surface	N	D	N
- Charge de surface	E	E	O
- Structure cristalline	E	O	O
- État d'agglomération	N	N	D
- Porosité	D	N	N
- Méthode de préparation	E	--	--
- Hétérogénéité	E	E	D
- Conditions du stockage	E	E	--
- Concentration (masse & nombre)	--	E	D

* Combiné avec l'état d'agglomération

E : Caractère considéré comme essentiel ; D : Caractère important mais non essentiel, en raison de contraintes liées à la complexité, au coût et à la disponibilité ; O : Caractère considéré comme utile, mais non essentiel ; N: Caractère considéré comme non important.

I.4.2.2. Les modèles cellulaires : sélection et utilisation

Les lignées cellulaires continues, diploïdes ou les cellules de primo-explantation cultivées en plaque ou en flacons de polystyrène, avec ou sans sérum, constituent le modèle standard d'évaluation de la toxicité *in vitro* des NPs [40]. De nombreux modèles de cellules ont été utilisés comme des phagocytes, des cellules nerveuses, hépatiques, sanguines, épithéliales, endothéliales, différentes lignées de cellules cancéreuses [8]. Le choix du modèle est fonction des particules utilisées et de leur potentielle utilisation *in vivo* [8]. Les lignées cellulaires continues diffèrent des cellules dont elles sont issues (altérations génomiques et phénotypiques) et les résultats obtenus *in vitro* ne sont pas obligatoirement extrapolables *in vivo* [41]. De plus les résultats obtenus peuvent être très différents d'une lignée à l'autre.

Aussi, l'utilisation de cellules de primo-explantation est-elle recommandée, mais pose des problèmes de mise en culture (milieu utilisé, établissement *in vitro*), d'adaptation aux conditions *in vitro*, durée de survie, avec un risque d'immortalisation [42].

La cytotoxicité des NPs est liée à leur internalisation. Comme les macrophages alvéolaires sont les premières cellules qui entrent en contact avec les particules étrangères après pénétration par voie aérienne, ils jouent un rôle clé dans les maladies pulmonaires [23]. Aussi ces cellules sont-elles souvent été utilisées comme modèle. L'activation des macrophages après phagocytose de particules étrangères, se traduit par une production de cytokines, la mise en jeu de cascades de signalisation et la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et a un rôle important dans l'inflammation. La phagocytose de particules non biodégradables donne un rôle essentiel au macrophage dans la biopersistence. Du fait de leur capacité à franchir les barrières anatomiques, ils peuvent également assurer la dissémination de particules dans l'organisme.

Les principales lignées monocytaires /macrophagiques utilisées sont RAW264.7, J774.1, IC-21, THP-1, Jurkat, Mono Mac-6, U937 et NR8383 [8]. Par exemple, les risques d'exposition aux nanomatériaux par inhalation sont évalués *in vitro* en utilisant les lignées immortalisées THP-1, RAW264-7, J7, Mono Mac 6 cellules ou IC-21 [43, 44] ou des macrophages alvéolaires de rats [45-47]. Long et coll. ont utilisé une lignée de microglie de souris en co-culture afin d'étudier les effets des ROS libérées, lors du contact avec des NP, sur l'ADN, les protéines et les lipides de neurones dopaminergiques de rat (N27) [48].

L'utilisation de lignées macrophagiques permet de comparer la cytotoxicité de différentes formulations de NPs selon la taille, l'activité de surface et le taux de dissolution et ces cellules sont actuellement un modèle cellulaire de choix pour les études de nanotoxicologie [21, 26, 49].

I.4.2.3 Les déterminants moléculaires de la cytotoxicité des NPs

Les études de cytotoxicité de NPs ont mis en évidence, principalement, leur rôle dans la formation de molécules oxydantes par les cellules. De fait elles modifient les potentiels redox cellulaires. Les NPs favorisent la formation de pro-oxydants déstabilisant l'équilibre entre la production de ROS dans la membrane (*in vitro* et *in vivo*) et mécanismes de réparation de cette perturbation [50, 51]. Par exemple, les fullerènes hydrosolubles (C60) induisent la formation du radical superoxyde (O_2^-), la peroxydation lipidique et sont très cytotoxiques. Les kératinocytes traitées avec des nanotubes de carbone présentent une augmentation de la génération de ROS, une peroxydation des lipides, une souffrance mitochondriale et des modifications morphologiques [51].

Le stress oxydant induit par des NPs renforce l'inflammation par la régulation positive gènes impliqués dans le stress oxydant comme *gclc* (*glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit*) [52], *ncf1* (*neutrophil cytosolic factor 1*) [53], *nf- κ b* (*nuclear factor of kappa light polypeptide*), *ap-1* (activateur de la protéine 1), *erk* (kinases de signaux extracellulaires) *c-Jun*, *jnk* (N-terminal de kinases), et *p38 MAPK kinases* [50, 51]. Selon l'hypothèse de Donaldson et coll. [54], les NPs induiraient un stress oxydant au sein des cellules et provoqueraient une acétylation des histones entraînant le décompactage de l'ADN permettant l'accès des complexes de transcription aux régions promotrices en affectant ainsi l'expression des gènes impliqués dans les processus inflammatoires et la mort cellulaire (apoptose, autophagie). Les ROS induiraient, directement ou via l'augmentation de la concentration cytosolique du Ca^{2+} , l'expression de *nf- κ b* qui stimulerait la transcription des gènes codant des médiateurs inflammatoires tels les TNF- α , IL-8, IL-2, IL-6 ou GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*) (Figure 5).

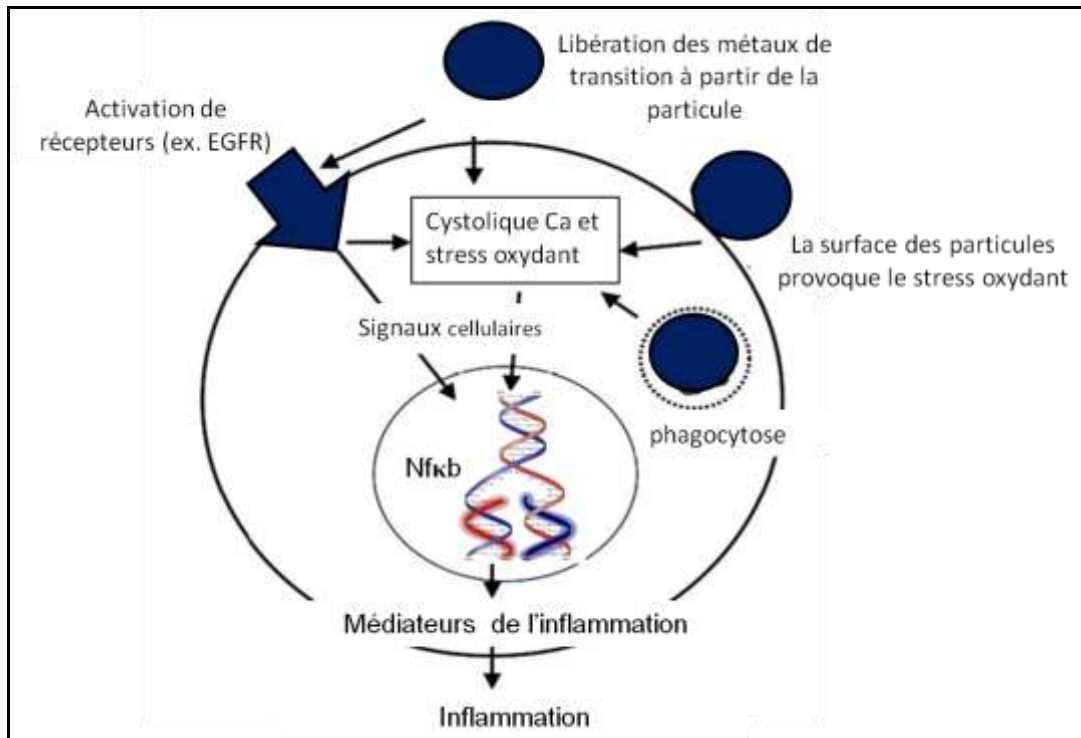


Figure 5 : Mécanisme hypothétique d'interactions cellule-NPs. Selon Oberdörster et coll. [55] adapté de Donaldson et coll. [56]. EGFR : récepteurs du facteur de croissance épithélial (*Epithelial Growth Factor Receptor*).

II. LES NANOVECTEURS POLYMERIQUES DE PRINCIPES ACTIFS

II.1. La vectorisation des médicaments

La vectorisation des médicaments consiste à apporter les médicaments spécifiquement vers les cellules cibles en utilisant des vecteurs biocompatibles. Elle est actuellement en plein développement, mais reste cependant embryonnaire. Elle fait partie des nouvelles stratégies de prévention et du traitement de différentes maladies, en particulier le cancer [57]. En effet, la grande majorité de nouveaux principes actifs a des propriétés pharmacocinétiques médiocres avec des caractéristiques physico-chimiques peu favorables au passage des nombreuses barrières dans l'organisme et sont souvent toxiques [58]. Si le transport de molécules thérapeutiques est déjà une réalité, la vectorisation vraie reste pour le moment l'objet de recherches précliniques et cliniques. En effet, l'usage assimile de simples transporteurs à des vecteurs et les deux termes sont utilisés indifféremment La vectorisation de substances actives protège ces dernières de la dégradation chimique ou enzymatique facilite la traversée des barrières anatomiques (épithéliums par exemple) [57].

Les nanoparticules ont été employées en médecine avant que le domaine des nanosciences ne soit individualisé. Les liposomes sont utilisés depuis 1965 [57] et des NPs ont été utilisées dès 1977 dans la pharmacie galénique. Les médicaments vectorisés peuvent être des protéines, des peptides des molécules organiques ou minérales ou des plasmides pour la thérapie génique. Les NPs peuvent également être utilisées en radiothérapie (ex. la société Nanobiotix a développé l'approche dite « NanoXray » : NPs porteuses d'« oxyde d'hafnium, NBTXR3 » l'activation de celui-ci par des rayons X libérant une quantité d'énergie dans les tissus ; la formation de radicaux libres, entraîne la destruction de la tumeur) [59] ; en thermothérapie (NPs) [60, 61] ou en thérapie photodynamique (ex. dendrimères polyamidoamine et des

Quantum dots CdTe adressés par l'acide folique vers les cellules cancéreuses) [61]. Dans ces applications, il faut que les agents thérapeutiques vectorisés s'accumulent dans les tissus cibles pour éviter toute lésion des tissus sains. Pour améliorer les propriétés pharmacodynamiques des NPs complexées à des composés actifs, des agents fonctionnels sont incorporés dans la structure : agent de furtivité, de ciblage, de perméation et de contraste (Figure 6) en fonction des propriétés désirées [57].

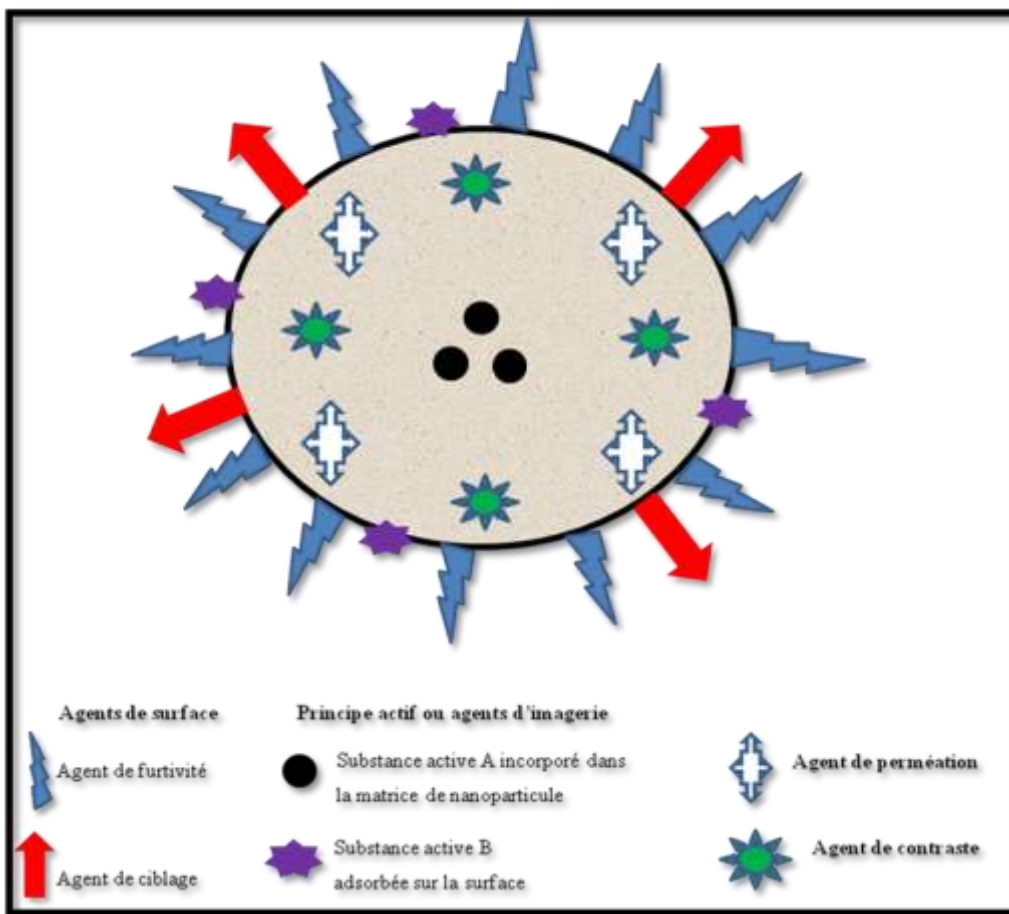


Figure 6 : Les différents moyens de modifier les propriétés de NPs.

Les NPs peuvent transporter un ou plusieurs principes actifs (thérapeutiques), ainsi que des agents de contraste pour l'imagerie médicale. La présence d'agents de furtivité en surface prévient leur internalisation et facilite leur diffusion par la circulation générale. Les agents de perméation permettent la traversée de différentes barrières biologiques (exemple : barrière hémato-encéphalique). Les agents de ciblage permettent de diriger la particule vers un tissu ou un organe spécifique (modifié d'après Ferrari [62] et Goutayer [57]).

II.2. Les trois générations de nanovecteurs

Trois générations successives de nanovecteurs sont décrites (Tableau 2) en fonction de leurs propriétés de surface (Figure 7) [63].

Tableau 2 : Les trois générations de nanovecteurs d'agents thérapeutiques

Nanovecteur	Principe général	Caractéristiques	Référence
Génération I : NPs "nues"	- La surface n'est pas modifiée	- Considérées comme particules étrangères - Facilement opsonisées	[63]
Génération II : NPs furtives	- Ajout d'un agent de furtivité → augmentation de la demi-vie de l'agent véhiculé dans la circulation sanguine	- NPs recouvertes de PolyEthylèneGlycol ou polyoxyéthylène → prévient l'opsonisation - ne traversent pas l'endothélium vasculaire sain.	[64]
Génération III : Nanovecteurs vrais (ciblées)	Ajout d'un agent de ciblage, ex. ligand d'un récepteur, anticorps, peptide ou saccharide.	- Vectorisation de principes actifs : ex : siRNAs (<i>small interfering RNA</i>)	[63,65-72].

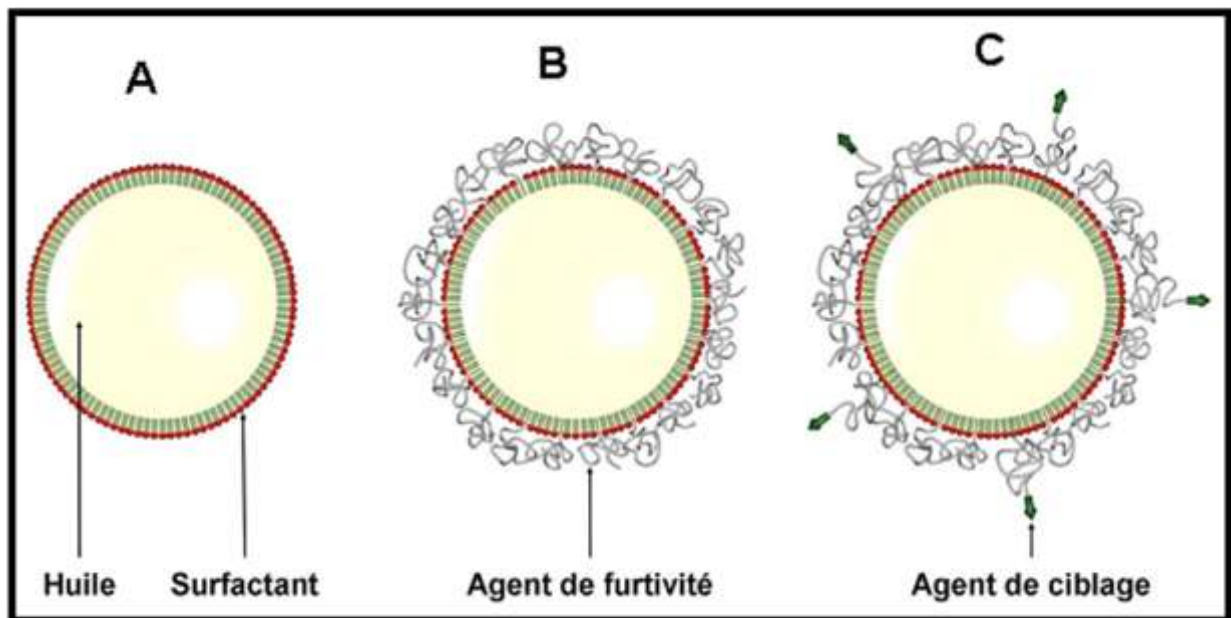


Figure 7 : Les 3 types de nanovecteurs (exemple des liposomes). A) Première génération : NPs « nue ». B) Deuxième génération : NPs furtives. C) Troisième génération: nanovecteurs « vrais » (d'après Andrieux et coll. [73] modifié par Goutayer [57]).

II.3. Les NPs à vocation thérapeutique

Les premiers nanovecteurs ont été utilisés dans le domaine clinique depuis la dernière décennie du XX^{ème} siècle. Les liposomes chargés de molécules anticancéreuses sont commercialisés depuis l'année 2000 pour traiter le cancer du sein ou de l'ovaire tel la daunorubicine (DaunoXome[®] ; NeXstar Pharmaceuticals, Inc.) ou la doxorubicine (Myocet[®], Elan Europe ; Doxil[®] aux USA) et Caelyx[®] en Europe). En 2005, l'Abraxane[®] (Baxter Healthcare), paclitaxel encapsulé dans des nanoparticules protéiques de 130 nm de diamètre) [63], a été autorisée par la FDA pour injection IV dans le traitement du cancer du sein. Depuis 1999, l'AmBisome[®] (Gilead Sciences et Fujisawa Healthcare), composé de liposomes chargés avec l'amphotéricine B, remplace le produit actif seul afin d'en réduire la néphrotoxicité. Actuellement, plusieurs NPs, vecteurs de principes actifs, sont en cours d'évaluation au niveau préclinique et clinique. De composition variées elles sont composées de lipides (ex. liposomes), de protéines (ex. NPs d'albumine) ou de polymères de composition variée (ex. NPs de chitosan).

II.4. Nanoparticules polymériques

Dans les années 1980, Couvreur et coll. ont développé les premières NPs polymériques à base de polyalkylcyanoacrylates [74]. Depuis, d'autres polymères biocompatibles et biodégradables ont été utilisés, en particulier le polylactate, le polyglycolate et leur copolymère (PLA, PGA et PLGA, respectivement) et le poly-caprolactone (Figure 8). Ces polymères sont utilisés pour la fabrication de dispositifs médicaux et d'implants sous-cutanés. Ils permettent de produire des NPs plus stables que les liposomes [57]. Cependant, leur biocompatibilité ne signifie pas qu'ils sont dénués de cytotoxicité et celle-ci doit être évaluée. En effet, l'utilisation de solvants organiques, comme l'acétone, dans la formulation de ces NPs ajoute un facteur de cytotoxicité du fait des concentrations résiduelles des solvants

utilisés. Mais la production de ces NPs polymériques est difficilement industrialisable car leur préparation se traduit par des suspensions peu concentrées en nanoparticules (~ 2 %) [57].

Les nanovecteurs à base de polymères non biodégradables sont aussi utilisés dans la vectorisation des médicaments, comme l'Eudragit[®] RS et RL. En effet, les NPs d'Eudragit[®] sont étudiées pour vectoriser différents principes actifs comme : [32, 75-78]

- l'ADN en utilisant des nanoparticules polymériques méthacryliques (Eudragit[®] RS et RL) préparées par deux méthodes : nanoprécipitation et double émulsion [32].
- L'héparine avec une formulation orale d'héparine de bas poids moléculaire (HBPM) à base de nanoparticules d'Eudragit[®] RS et RL développées dans l'EA3452 [79, 80] possédant une bonne biodisponibilité chez le lapin [78].
- diverses molécules (ibuprofène, mélatonine, indométhacine) avec des nanoparticules d'Eudragit[®] RS. Cependant, dans la majorité des études, les NPs d'Eudragit[®] RS sont préparées par la technique de double émulsion plutôt que par nanoprécipitation.

Les dendrimères et les nanogels font aussi partie de nanovecteurs polymériques. Les dendrimères, complexes (1 et 10 nm de diamètre) " sophistiqués ", ont une structure ramifiée et possèdent un large éventail d'applications dans le domaine médical, surtout pour la vectorisation de principes actifs (Figure 8) [81]. Leur synthèse est délicate et leur structure peut être divisée en trois parties :

- La surface multivalente, avec différents sites réactifs.
- L'« enveloppe externe » qui se trouve juste sous la surface ayant un objectif bien défini
- Le noyau qui forme le cœur de la nanoparticule [82].

Les nanogels, sont des longues chaînes polymériques solubles, branchées, hydrophiles (Figure 9). Leur grande surface spécifique permet un taux élevé d'encapsulation des principes actifs. Les nanogels (ex. les theranostiques) ont été inclus récemment dans la longue liste de nanovecteurs des médicaments. Les agents biologiques et les médicaments chargés dans les

nanogels par un processus spontané, pouvant comprendre des interactions entre l'agent et la matrice polymérique, formant des particules hydrophiles avec une bonne stabilité de dispersion (Figure 9).

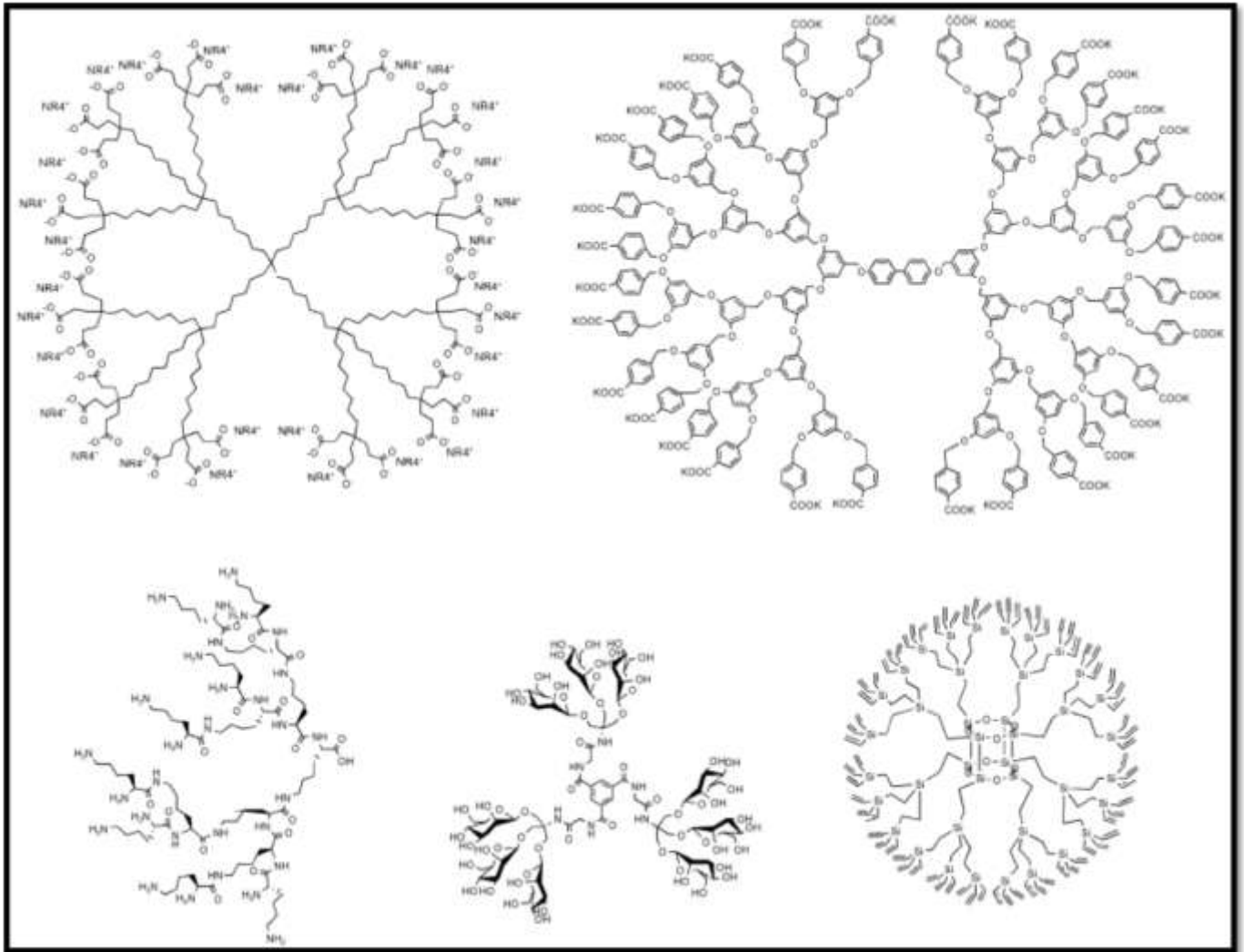


Figure 8 : Différents modèles des dendrimères (d'après Boas et coll., 2004 [82]).

De gauche à droite et de haut en bas : micelles unimoléculaires ; dendrimère de polyéther d'aryle ; polylysine ; dendrimère à base de glucides ; dendrimère à base de silicone

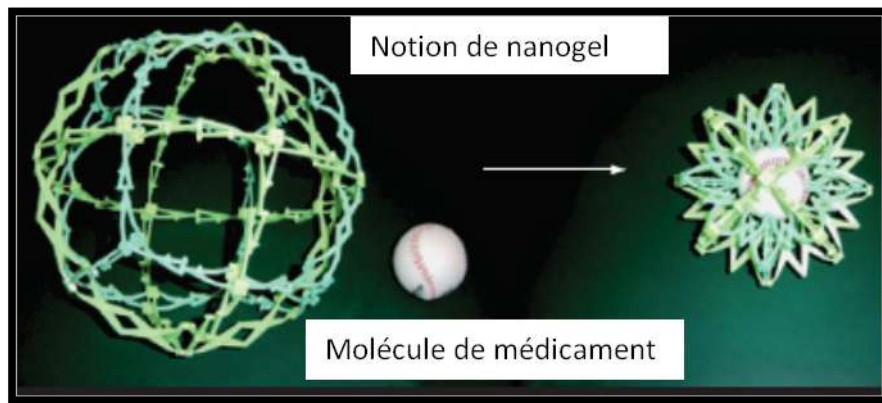


Figure 9 : Notion de Nanogel.

Figure créé à la suite d'une idée d'Alexandre Kabanov, *University of Nebraska Medical Center*, Etats-Unis [83]. D'après [84].

Beaucoup de nouvelles applications de nanogels dans la vectorisation de médicaments ont été proposées et évaluées expérimentalement au cours des dernières années. La libération contrôlée d'un médicament dépend des propriétés du médicament et du design de nanogel.

- **nanogels muco-adhésifs** : composés de polymères muco-adhésifs (ex. l'acide méthacrylique et l'éthylène glycol) peuvent être utilisés comme des nouveaux types de transporteurs des médicaments (ex. la bléomycine), en particulier ceux administrés *per os*.

- **Nanogels contenant des métaux** : ils ont été récemment développé et testés dans une large gamme d'applications thérapeutiques et diagnostiques (ex. les nanogels magnétiques et photoactifs ainsi que les nanogels de *quantum dots* [85]).

II.5. Les polymères pharmaceutiques

L'étude des polymères a pris son essor dans les années 40. Un polymère est une macromolécule formée de l'enchaînement covalent d'un très grand nombre d'unités de répétition qui dérivent d'un ou de plusieurs monomères (qui sont également appelés motifs) et préparée à partir de monomère. Il existe deux types de polymères, les homopolymères et les copolymères :

- les homopolymères sont des polymères qui ne possèdent qu'une seule unité de base tel le polyéthylène.

- les copolymères sont des polymères composés de plusieurs sous-unités (ex. copolyéthylène-styrène).

Les domaines d'utilisation des polymères sont très diverses: ex. le secteur de l'emballage, le bâtiment, les travaux publics, les transports ainsi que l'industrie pharmaceutique. De nombreux excipients ont été utilisés pour contrôler la libération de principes actifs (insuline, héparine, l'Amphotéricine B...) en fonction des conditions externes. Les polymères sont également utiles comme liants de granulation et comme filmogènes pour améliorer l'intégrité des comprimés ainsi que pour masquer le goût des médicaments amers. Ils peuvent également être utilisés pour la microencapsulation des principes actifs. On distingue 4 applications à l'enrobage en utilisant les polymères:

- Ajouter de la coloration ou un arôme pour faciliter l'observance d'un traitement et pour masquer les caractéristiques intrinsèques du principe actif.
- Protéger le noyau des agressions extérieures (ex. pH, activité enzymatique...)
- Protéger les noyaux hygroscopiques de l'humidité
- Moduler la libération du principe actif.

Des polymères naturels comme la gélatine, l'amidon, les gommés arabiques et la cellulose, et synthétiques comme les polyvinylpyrrolidone, polyoxyéthylène-glycols sont largement employés dans les industries pharmaceutiques (Tableau 3) [86].

Tableau 3 : Modes de préparation des différents complexes polymères/ principes actifs (d'après Couvreur et coll.[87], modifié par Fluckiger [86]).

Polymère	Mode d'encapsulation	Propriétés de la molécule encapsulée
Hydrophile		
Albumine, gélatine	Dénaturation par chauffage et réticulation en émulsion Hydrophile/Lipophile	Hydrophilie
	Désolvatation et réticulation en milieu aqueux	Hydrophilie et affinité pour les protéines
Alginate, chitosan	Réticulation en milieu aqueux	Hydrophilie et affinité pour les protéines
Dextrane	Précipitation en milieu organique	Hydrophilie et solubilité dans les solvants polaires
Hydrophobe		
Poly(alkylcyanoacrylates)	Polymérisation interfaciale	Hydrophilie
	Polymérisation en émulsion	Hydrophobie
Polypptères	Emulsion/évaporation de solvant	Hydrophilie ou Hydrophobie
	Nanoprécipitation	Solubilité dans les solvants polaires
	Relargage (<i>salting out</i>)	Solubilité dans les solvants polaires

II.5.1. Les polymères biodégradables

Les concepts de biodégradation et de biodégradabilité sont anciens et ont été appliqués d'abord à divers produits chimiques en raison de leur impact sur l'environnement [88]. La biodégradation des polymères utilisables en thérapeutique (Tableau 4 et Figure 10) peut avoir lieu par des mécanismes chimique, physique et biologique, mais elle est le plus souvent réalisée par une combinaison des trois. Trois mécanismes de dégradation des polymères sont décrits. Ils sont principalement fonction du type de solubilisation du polymère (Tableau 5). Dans l'organisme, les polymères biodégradables (Figure 10) doivent être «résorbables» puis

éliminés du corps par les différentes voies. Le terme de polymères «biodégradables» est utilisé pour ceux subissant seulement une perte de masse mais qui restent inéliminables par l'organisme [86]. Cependant, un polymère peut être *(i)* : non dégradé mais éliminable sous sa forme première ; *(ii)* : dégradé partiellement et les résidus obtenus sont alors soit éliminés soit persistants ; *(iii)* : dégradé complètement, il sera totalement éliminé. *In vivo*, la biopersistence est mesurée par l'inverse de la clairance où la demi-vie des NPs [un terme qui se réfère au devenir des fibres d'amiante]. Plus elle est longue, plus le risque de réaction adverse est important (inflammation chronique, fibrose ou dégénérescence des tissus, cancer...).

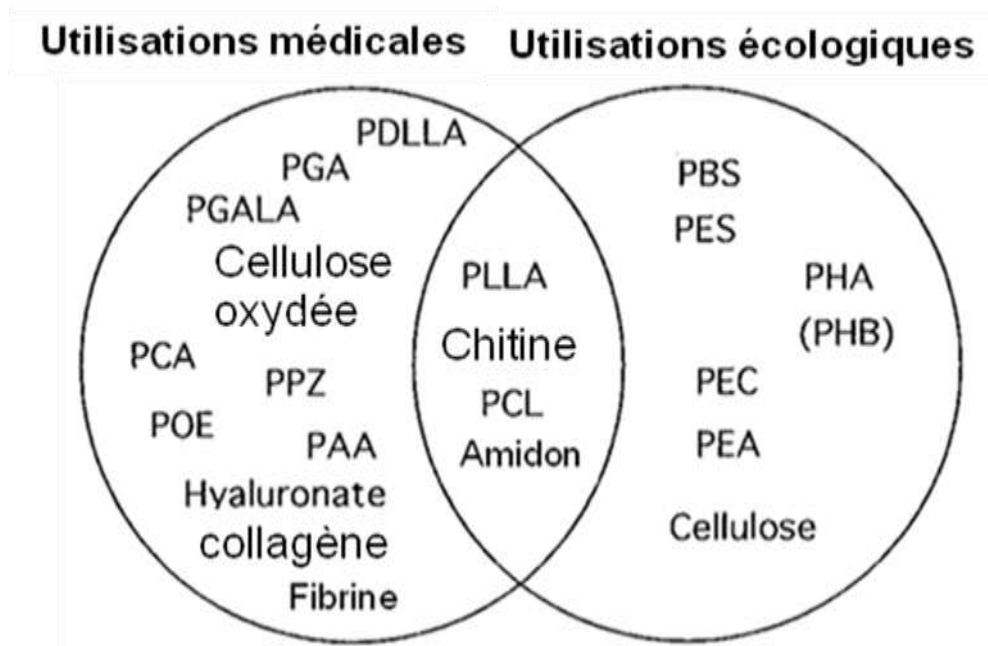


Figure 10 : Les différents types de polymères biodégradables et leurs utilisations que recouvre application écologique polymères.

AAP: Poly-(anhydride d'acide); PBS: Poly (butylène succinate); PCA: Poly (acyanoacrylate); PCL: Poly (ϵ -caprolactone); PDLLA: Poly (DLlactate), Poly (DL-acide lactate); PEA: poly (amide ester); PEC: poly (ester de carbonate); PSE: Poly (succinate d'éthylène); PGA: Poly (glycolate); PGALA : le poly (acide glycolique acide lactique) ; PHA : Poly (hydroxyalcanoate); PHB: Poly (3-hydroxybutyrate); PLLA: poly (L-lactate), le poly (acide L-lactate); POE: poly (orthoester). (D'après Ikada et Tsuji [89])

Tableau 4 : Les polymères biodégradables naturels ou synthétiques, les plus utilisés comme « porteurs » de médicaments. (d'après Gombotz et coll. [90] modifié par Fluckiger [86]).

Polymères biodégradable utilisés dans la pharmacie galénique	
Naturels	
Albumine	
Alginate	
Dérivés de la cellulose	
Chitosan	
collagène	
Fibrine	
gélatine	
Synthétiques	
Acide hyaluronique	
Poly (acrylates)	
Poly (cyanoacrylates)	
Polyesters: Polylactate, Poly(lactate/glycolate), Poly(beta-hydroxybutyrate), Polycaprolactone, poly(dioxanone)	
Poly (éthylèneglycols)	
Poly (hydroxypropylmethacrylamide)	
Poly (organophosphazènes)	
Poly (ortho-esters)	
Alcool Polyvinylique et Polyvinylpyrrolidone	

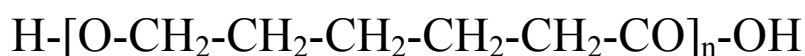
Tableau 5 : Les trois mécanismes principaux de dégradation des polymères [86]

Mécanismes de dégradation	Les polymères concernés	Informations complémentaires
Type I : Solubilisation par hydrolyse des ponts intermoléculaires	Tous les polymères hydrophiles réticulés comme par exemple la poly-N-vinylpyrrolidone, le polyacrylamide, l'alcool polyvinylique, la gélatine, le collagène.	- Dégradation très lente - Libération de principes actifs peu solubles ou qui resteraient piégés physiquement dans les mailles du réseau polymérique
Type II : Solubilisation par hydrolyse, ionisation (protonation) des groupements latéraux	Les polymères hydrophobes	Aucune perte de masse moléculaire du polymère dans l'ionisation
Type III : Solubilisation par clivage des chaînes polymériques en petites molécules	Les polymères avec des liaisons instables tels les acides polylactiques, les copolymères avec l'acide glycolique, le polycaprolactone, les polypeptides et les poly(ortho-esters)	N.R.

N.R. : non renseigné

II.5.2. Poly- ϵ -caprolactone

Le Poly- ϵ -caprolactone (PCL) est un polyester aliphatique, de la famille des poly- α -hydroxy acides de formule [86, 91] :



Il est peu hydrophile semi-cristallin, relativement rigide et son point de fusion est de +63°C [86]. Sa masse moléculaire ainsi que son degré de cristallinité détermine ses propriétés physiques, thermiques et mécaniques (Figure 11). Le PCL est généralement soluble dans la plupart des solvants organiques comme le chloroforme, le dichlorométhane, le tétrachlorure de carbone, le benzène, le toluène, le cyclohexane et le 2-nitropropane, légèrement soluble

dans l'acétone, le 2-butanone, l'acétate d'éthyle, le diméthylformamide et l'acétonitrile ; mais insoluble dans les alcools, l'éther de pétrole et l'eau [86].

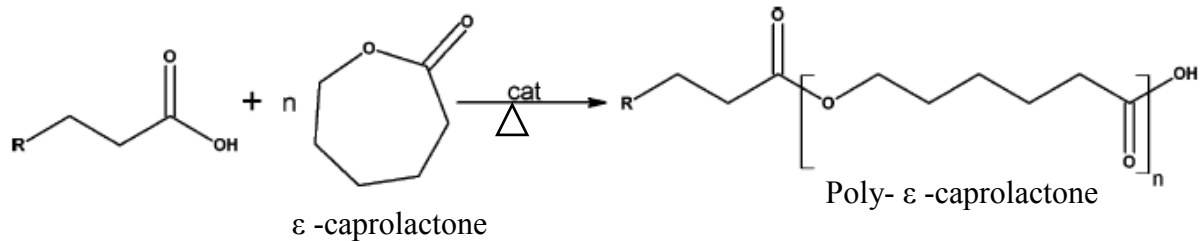


Figure 11 : Réaction de polymérisation d' ϵ -caprolactone en présence d'acide laurique. Cat : catalyseur (modifiée d'après Blanco et coll.][29[)

Le PCL se dégrade lentement en quelques mois voire plusieurs années en fonction de sa masse molaire ou de son degré de cristallinité. Au cours du processus de dégradation du PCL les acides carboxyliques libérés ont une activité catalytique ; le PCL n'est pas dégradé dans l'organisme mais il peut être dégradé complètement par des micro-organismes.

L'étude de la bio-absorption du PCL a montré une présence intracellulaire au site d'implantation sous-cutanée, de particules de polymère démontrant le rôle de la phagocytose par les macrophages dans la phase finale de dégradation de ce polymère [93]. Ce polymère est complètement dégradé chez le rat en 60 jours [94].

En raison de sa lente dégradation, le PCL est largement utilisé dans la vectorisation des principes actifs à long terme. Cela a conduit à l'utiliser dans la préparation de formulations de microsphères, nanosphères et d'implants. Différentes catégories de médicaments ont été encapsulées dans les formulations de PCL aux fins de vectorisation ainsi que de libérations prolongées et contrôlées de molécules comme les antihypertenseurs, le taxol, la gentamicine, le kétoprofène, la colchicine, la chlorpromazine, la cyclosporine, le cisplatine, l'indométacine, la nitrofurantoïne, l'insuline et l'héparine [93].

II.5.3. Les dérivés poly(méth)acryliques (les Eudragit®)

Les dérivés poly(méth)acrylates utilisés en pharmacie sont plus connus sous leur dénomination commerciale d'Eudragit®. Les Eudragit® appartiennent à la famille des polymères acryliques tout comme le Plexiglas® ou les Carbopol® [86]. Les Eudragit sont principalement utilisés pour l'enrobage des formes pharmaceutiques classiques comme les comprimés. Les premiers copolymères d'acide méthacrylique étudiés étaient gastro-résistants (solubilité intestinale pH-dépendante afin de protéger la muqueuse gastrique). Par la suite, la gamme de produits a été élargie en introduisant sur le marché des dérivés poly(aminoalkyl)méthacrylate pour la libération prolongée [95]. Il existe deux grandes catégories d'Eudragit® (Tableau 6), **(i)** : les poly(méth)acrylates solubles dans les fluides digestifs, à savoir les polymères d'Eudragit® L, S, FS et E avec des groupements acides ou alcalins qui permettent une libération pH-dépendante du principe actif et dont les applications vont du simple masquage de goût à la résistance gastrique et à la libération contrôlée de médicaments dans l'intestin (Enovik®). ; **(ii)** : les poly(méth)-acrylates insolubles comme l'Eudragit® RL, RS NE et NM, ce dernier, avec ses groupes neutres permet une libération contrôlée du principe actif indépendamment du pH (Figure 12).

Les Eudragit® RS et RL sont des copolymères d'éthyle d'acrylate et de méthyle de méthacrylate, avec une faible teneur en acide d'ester méthacrylique, et possédant des groupes ammonium quaternaire (Figure 12 et 13). La différence entre ces deux formulations est la proportion des différents composés (Tableau 6). Les Eudragit® NE et NM sont des dispersions aqueuses d'un copolymère neutre composé d'éthyle d'acrylate et de méthyle de méthacrylate (Figure 13).

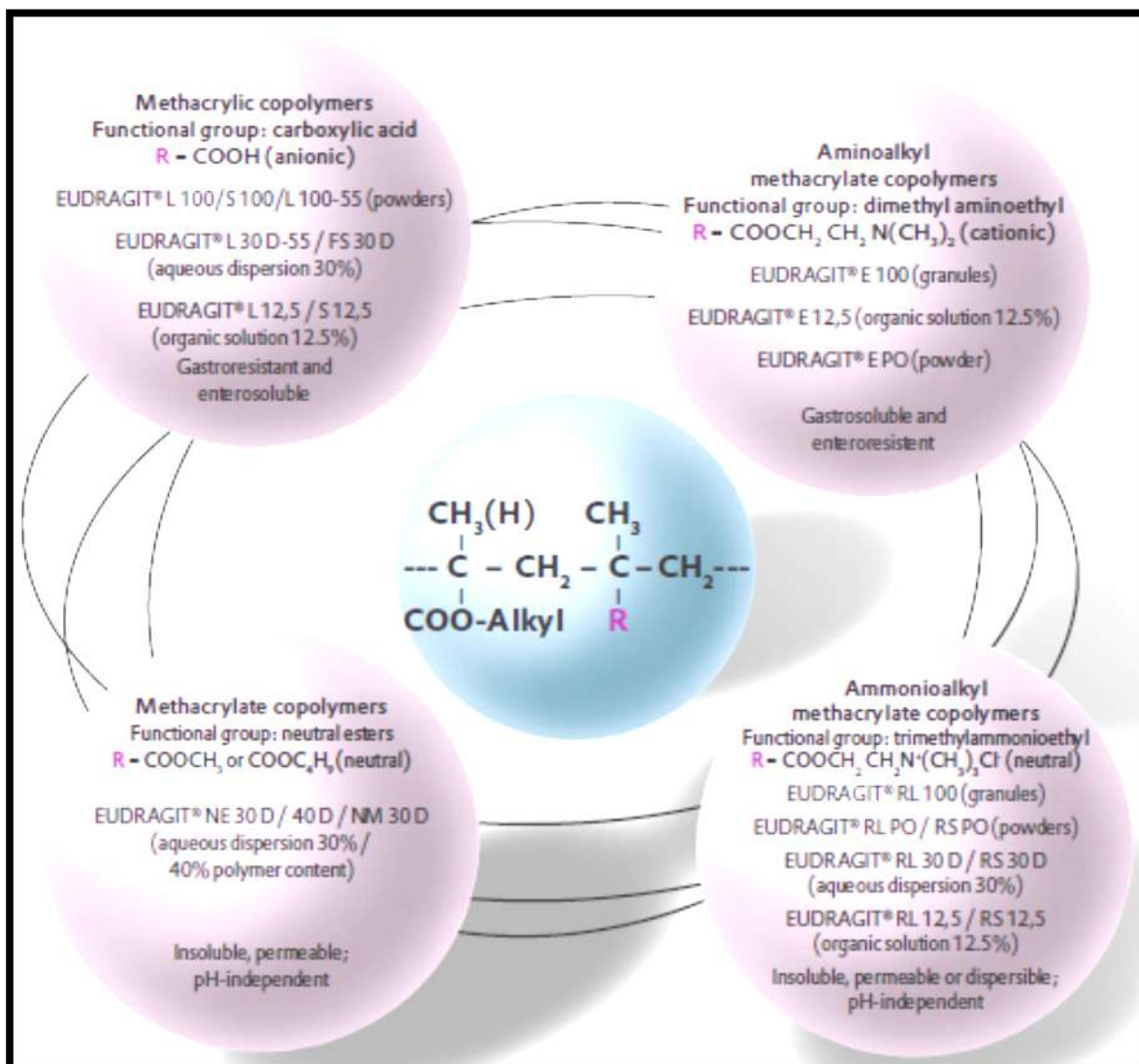


Figure 12 : Les différents types de polymères d'Eudragit® (d'après Evonik)

Tableau 6 : Caractéristiques physicochimiques de polymères d'Eudragit® RS et RL [86]

Propriétés	Origine de propriétés
1. Stabilité physiques et chimique	Squelette de base formé d'atomes de carbone Branchements estérifiés
2. Rigidité	Les unités méthacryliques
3. Souplesse flexibilité	Les unités acryliques
4. Perméabilité	La nature hydrophile des groupements ammonium quaternaires

En raison d'une proportion plus élevée de groupements ammonium, les Eudragit[®] de type A ou RL sont plus perméables aux petites molécules de médicaments que ceux de type B ou RS (Tableau 7). Puisqu'ils ne sont ni absorbés ni métabolisés dans l'organisme mais éliminés sans biotransformation, ils ne sont pas considérés comme des polymères biodégradables [86, 96].

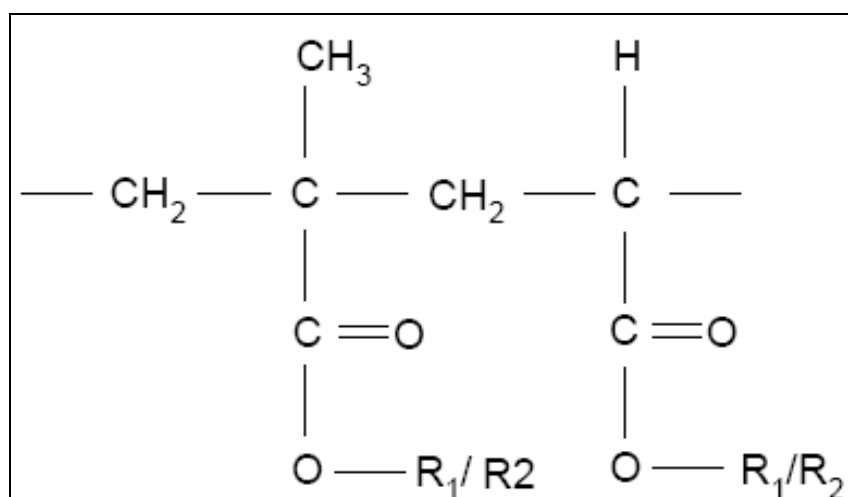


Figure 13 : Structure chimique générale des dérivés acryliques (Eudragit[®])[86].

Les polymères sont obtenus à partir de monomères de type :

- Eudragit[®] NE et NM : R₁ = -CH₃ et R₂ = -C₂H₅.
- Eudragit[®] RS et RL : R₁ = -H, -CH₃ et R₂ = -CH₂-CH₂-N⁺-(CH₃)₃ Cl⁻
- Eudragit[®] L, S et FS : R₁ = -C₂H₅ et R₂ = -H
- Eudragit[®] E : R₁ = -CH₃, C₄H₉ R₂ = -CH₂-CH₂-N(CH₃)₂

Tableau 7 : Composition chimique des Eudragit[®] RL et RS [86].

Eudragit [®]	Type	A / B / C *	Masse moléculaire
RL	I	1 / 2 / 0.2	150000
RS	II	1 / 2 / 0.1	150000

* Proportion de (A) éthylacrylate, (B) méthylméthacrylate et (C) triméthylammonio-éthylméthacrylate.

Plusieurs facteurs comme le pH, la température et la masse moléculaire influent sur la dégradation des polymères *in vitro* et *in vivo*, donc, modulent la libération des agents thérapeutiques incorporés [86], mais modifient aussi sur leur toxicité.

Les deux polymères, PCL et Eudragit[®], sont acceptés par les autorités de santé dans les principaux pays en Europe, au Japon et aux USA comme des polymères pharmaceutiques [79].

II.6. Toxicité des nanovecteurs polymériques

En septembre 2011, les mots clés de «*polymeric nanoparticles, drug delivery*», ont fourni 5540 entrées sur «*Pubmed*»; et seulement 707 en rajoutant «*toxicity*». Ceci permet de penser que les impacts environnementaux ou sur la santé des NPs sont peu abordés. Les travaux se limitent le plus souvent à une étude de viabilité cellulaire *in vitro* avec un test simple, le plus souvent le test de MTT, alors que l'utilisation de deux tests différents est recommandée [28]. Les données disponibles dans le domaine de la vectorisation de médicaments sont résumées dans le Tableau 8.

Les études *in vitro* utilisent des cellules en lignées continues le plus souvent résistantes aux toxiques et s'intéressent surtout à la diminution de toxicités des molécules anticancéreuses du fait de leur encapsulation sans s'intéresser à la toxicité intrinsèque des NPs. En effet, celle-ci, si elle existe, est beaucoup plus faible que celle des molécules étudiées. Mais les NPs vierges sont parfois plus toxiques que celles chargées avec le principe actif [28]. De plus, la possible toxicité, du fait d'une utilisation à long terme à des faibles doses, n'est que très rarement prise en compte. [97]. De même, la toxicité des NPs est rarement étudiée au niveau intracellulaire et moléculaire : cible intracellulaire, altération des métabolismes cellulaires, en particulier des voies de signalisation...

Tableau 8 : Données expérimentales, *in vivo* et *in vitro*, concernant la toxicité des nanoparticules polymériques.

NPs polymérique	Caractéristiques (taille, charge, préparation)	Principe actif encapsulé	Modèle cellulaires & dose des NPs	Toxicité (test utilisé) Observations	Références
<i>In vitro</i>					
1. Micelles de chitosan	100-200 nm -20 à -10 mV. <i>1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide-coupling</i>	ADN plasmidique	SKOV3 , A549 200 – 1200 µg/mL/ 24h	Peu toxique (MTT) par comparaison avec la Lipofectamine (TM) 2000	[98]
2. Poly (2-diméthylaminoéthyl acrylate)	28 – 648 nm	Oligomère d'ADN	HeLa 10, 100, and 200 µg/mL contact 30 min et 4h	Cytotoxicité (<i>Cell Titer Glo</i> [®]) fonction de la composition et de la masse moléculaire du polymère	[99]
3. Chitosan-g-poly (N-vinylcaprolactame)	220 nm <i>simple ionic cross-linking</i>	Curcumine	L929, MCF7, PC3, KB 0.1 – 1 mg/mL/ 24h	- Effets Cytoxiques (MTT, apoptose par cytométrie en flux, hémolyse).	[100, 101]
4. PLGA	174 nm	Itraconazole	6.25 ug/mL/ 24h	faible cytotoxicité (MTT) par comparaison à l'Itraconazole seul	[102]
5. Chitosan	50-100 nm	Epidermal et Fibroblastes growth factor	3T3, J774, A-1 2 – 6 mg/mL / 1 – 8 j	Absence de cytoxicité (MTT)	[103]

NPs polymérique	Caractéristiques (taille, charge, préparation)	Principe actif encapsulé	Modèle cellulaires & dose des NPs	Toxicité (test utilisé) Observations	Références
6. PLGA	390 - 640 nm	Vert indocyanine	Co-cultures (cellules de carcinome hépatocellulaire humain et les cellules de rein de singe) WST-1	Aucun effet cytotoxique (test au BrdU, LDH)	[104]
7. Chitosan	75 - 637 nm, 37.2 - 53.8 mV. gélification ionique/ homogénéisation.	Lomustine	L132 20 - 100 mg/mL/ 12 -48h	Inhibition de la croissance (MTT) par comparaison avec le lomustine non encapsulée	[105]
8. Chitosan modifié par le poly(DL-lactate/glycolate)	- Avec ADN : 204 – 475 nm, +3.2 à +42 mV; - Sans ADN: 286 – 354 nm, -28 à +4 mV - Emulsion - diffusion	ADN plasmidique	A549 1 µg d'ADN/ 200 µL/ 4 -24 h	Absence de cytotoxicité (MTS)	[106]
9. Poly lactate/PEG	205 nm -24.17 mV Volatilisation	N.R.	HepG2, A549 et B16 HL-7702.	Faible cytotoxicité uniquement sur cellules HL-7702 (MTT, apoptose par AnnexinV-FITC)	[107]
10. Micelles de <i>Tween 80-free Pluronic P123 (P123)</i>	22 - 84 nm, -12,45 mV - 'hydratation à film f	Docetaxel [®]	HepG2, A549 et B16. 0.01–20 µM/ 96 h	Cytotoxicité pour HepG2 (MTT)	[108]

NPs polymérique	Caractéristiques (taille, charge, préparation)	Principe actif encapsulé	Modèle cellulaires & dose des NPs	Toxicité (test utilisé) Observations	Références
11. Copolymères de N-isopropyl et vinylpyrrolidone	58 nm, -15 mV	5-fluorouracile-hexyl-carbamoyle	- Mia-Paca 3,	- Cytotoxicité dose-dépendante (MTT)	[109]
12. Dendrimères de polypropylène imine	N.R.		- Globules rouges humains	Faible hémolyse, charge et dose-dépendantes.	[110, 111]
13. Chitosan PEGylé	100 - 150 nm gélification ionique	siRNA	- cellules de neuroblastome murin (Neuro2a)	Absence de cytotoxicité (MTS)	[112]
14. copolymère tribloc ABA (PEG5K-b-oligo (désaminotyrosyl-tyrosine subérate ester octyle)-b-PEG5K)	40 nm		- Fibroblastes, kératinocytes	Absence de cytotoxicité (MTS).	[113]
15. Chitosan	18 nm, 7,5 mV	-	- Cellules hépatiques humaines (BHAL) Doses : 0.001 – 1 % (W/V) à 4 et 24h.	- Altération de la membrane cellulaire, nécrose (microscopique confocale) - Augmentation dose-dépendante de l'activité de CYP3A4.	[114]
16. Dendrimères de polyamidoamine	N.R.	Anticorps-anti CD14 (60bca) et anti- antigène membranaire spécifique de la prostate (J591)	Jurkat HL-60. 5 – 35 nM / 20 – 60 min.	Apoptose par cytométrie en flux & microscopie confocale	[115]

NPs polymérique	Caractéristiques (taille, charge, préparation)	Principe actif encapsulé	Modèle cellulaires & dose des NPs	Toxicité (test utilisé) Observations	Références
17. Dendrimères polycationiques polymérique de poly-L-lysine, polyéthylèneimine et diéthylaminoéthyl-dextrane	N.R.	ADN plasmidique	KB, Rat2, COS-1, NIH 3T3. 1 – 1000 µg/mL / 4 et 5 h.	- formation de trous dans la membrane ; augmentation de la perméabilité (Microscopie à force atomique, microscopie confocale à balayage, FACS, LDH, enzymes cytosoliques	[116-119]
18. Dendrimères de polyamidoamine	- Cationiques - Sphériques		-V79 0.2 – 20 µM/ 120 h	Cytotoxicité (MTT)	[120, 121]
<u>In vivo</u>					
1. PCL / bromure de didodécyltriméthylammonium	300 nm	Meloxicam	Rats	Absence d'ulcération par rapport au Meloxicam non encapsulé.	[122]
2. Chitosan , Poly (méthyl méthacrylate) et éthyl Cellulose	N.R.	Glipizide	- Rats. - 1:2 à 1:5 / 30 j	- Absence d'altération des paramètres hématologiques et biochimiques et d'hémolyse	[123]
3. Poly(méthyl)méthacrylate)	108 nm, sphériques - évaporation	Repaglinide	- Rats Albinos - Doses : 1 -5 mg/kg	Absence de toxicité (paramètres biochimiques, histopathologique, absence de mortalité	[124]
4. Polylactate/ PEG	- 100 nm, -20 mV Emulsion/évaporation	agglutinine de germe de blé (WGA)	- Rats Sprague-Dawley - Administration intranasale 20 µL pendant 7 jour (d'une suspension de 25 mg/ml dans PBS)	Légère toxicité cérébrale (Dosage des neurotransmetteurs d'acide aminé , LDH, GSH, acétylcholine, TNF-α et IL-8, activité acétylcholinestérase	[125]

NPs polymérique	Caractéristiques (taille, charge, préparation)	Principe actif encapsulé	Modèle cellulaires & dose des NPs	Toxicité (test utilisé) Observations	Références
5. Copolymère tribloc ABA (PEG5K-b-oligo (désaminotyrosyl-tyrosine subérate ester octyle)-b- PEG5K)	40 nm	- Diclofenac Sodique	- Peau de cadavre humain - Peau de porc Doses : 0.1 – 20 mg/mL/24h	- changements morphologiques dans la couche cornée (MEB). - Augmentation de la perméabilité cutanée	[126]

N.R. : non renseigné. PCL : Polycaprolactone. PLGA : co-poly(lactate- acide glycolate). PEG : polyéthylène glycol

II.6.1. La toxicité des vecteurs nanométrique de l'Eudragit[®] et de PCL

L'Eudragit[®] et PCL sont de bons candidats à une utilisation comme vecteurs de médicaments anticancéreux comme le cisplatine [127], la doxorubicine [128] et la curcumine [129]. L'Eudragit[®] pourrait être un bon vecteur d'acides nucléiques du fait de la nature polycationiques de ces derniers [32]. D'autres molécules comme, la cyclosporine [75], l'indométhacine [76], la mélatonine [77], l'héparine de bas poids moléculaire (HBPM) et la diclofenac sodique [130] peuvent également être encapsulées dans des NPs d'Eudragit[®]. Cependant, les études de toxicité de ces nanovecteurs sont rares et souvent limitées à la viabilité cellulaire (MTT) et menées sur des modèles de cellules cancéreuses souvent résistantes aux toxiques comme la lignée Caco2 [131]. En général les études portent sur la comparaison des toxicités du principe actif seul ou encapsulé dans le nanovecteur. Mais la toxicité de NPs vides est rarement étudiée sachant que dans certains cas, les NPs vierges sont plus toxiques que celles chargées avec le principe actif [28].

En septembre 2011, les mots clés «*poly-caprolactone, toxicity, nanoparticles*» n'ont fourni que 20 entrées dans *Pubmed*, et 10 avec «*Eudragit[®], toxicity, nanoparticles*». Les données obtenues sur la toxicité des NPs de PCL et Eudragit[®] sont contradictoires du fait d'une absence de méthodologie standard aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Tableau 9)

Tableau 9 : Toxicité des NPs de PCL et Eudragit

NPs polymérique	Caractéristiques (taille, charge, préparation)	Principe actif encapsulé	Modèle utilisé et le test de toxicité	Observations	Références
<i>In vivo</i>					
1. PCL (polycaprolactone)	99 nm de diamètre	Etoposide	- souris et lapins, administration IV - Scintigraphie - A 4 et 24 h	Diminution de la toxicité	[132]
2. PLGA et PCL	- 120 à 290 nm - Emulsion-diffusion-évaporation	Acide ellagique	- Rats - Biochimie et histopathologie rénale - 50 mg/kg j tous les 3 j pendant 30 j	Prévention de la néphrotoxicité de la cyclosporine A	[133]
3. <i>core-corona</i> : copolymère d'acide hyaluronique (HA) – polyéthylène glycol (PEG)- PCL)	95 – 115 nm	Doxorubicine	- souris, administration IV - évaluation de l'action hémolytique.	Absence d'hémolyse	[128]
4. Eudragit® RS100, RS, et RL100, RL	~100 – 200 nm	Collyres	- lapin (œil) : test de Draie modifié. - 50 µL toutes les 30 min, 6 h.	Absence d'irritation de la cornée, de l'iris et de la conjonctive après 24 h	[134]
5. Eudragit® EPO	- 100 nm de diamètre - Nanoprécipitation	Meloxicam	- Administration orale (dose : N.R.)	Diminution du nombre d'ulcères	[135]
6. Eudragit® RS100, RS100R et RL100R	- 100 nm, +40 à +60 mV. - Quasi-émulsion solvant diffusion	Flurbiprofène (Ibuprofène)	- lapin (œil) - Doses : 50 µL / œil/ 3 à 5 j	Absence de toxicité	[75]
2. PCL magnétiques contiennent Fe ₃ O ₄	- 164 nm – Emulsion-diffusion	Gemcitabine	- cellules cancéreuses de HPAC	- Cytotoxicité modérée	[136]
3. Di-block copolymère de	- ~200 nm, - 0.6 à -3.8 mV.	Paclitaxel	- HepG2 - 0.01 – 10 mg/mL / 12h à 3j	- Augmentation de l'activité anticancéreuse et	[137]

NPs polymérique	Caractéristiques (taille, charge, préparation)	Principe actif encapsulé	Modèle utilisé et le test de toxicité	Observations	Références
MePEG-PCL et tri-block copolymère de PCL-PEG-PCL	- Nanoprécipitation - NPs sphériques			de la cytotoxicité (MTT)	
4. PCL avec hydroxyapatite (HA)	N.R.	-	- ostéoblastes humains (SaOS2) - fibroblastes de souris (L929) - 12% (w/v) de suspension, 24 h.	- Absence de cytotoxicité	[138]
5. PCL	- 176 nm - Nanoprécipitation	Digitoxine (DGT)	- les cellules glomérulaires mésangiales de rat. - Bleu trypan et la diminution du lactate déshydrogénase	-Absence de cytotoxicité	[139]
6. Hydroxypropyl-β-cyclodextrin et/ou d'Eudragit® L100	- 100 à 600 nm - émulsion –évaporation	Diclofenac	- les cellules muqueuses de porc - Caco 2	- Absence de cytotoxicité (MTT)	[140]
7. PLGA/ Eudragit® RL	- 148 à 219 nm, 19 - 25 mV - émulsion - évaporation et lyophilisation.	Cyclosporine A (CsA)	- L929 - 0.5 – 250 µg/mL / 24 à 48h	- absence de cytotoxicité (MTT) des NPs chargées ou non (0,5 mg/mL).	[141]
8. Eudragit® S100	- 97 nm - Emulsion-évaporation	Curcumine	- HT-29	- Absence de cytotoxicité (MTT) et de génotoxicité.(Comet test)	[129, 142]
9. Eudragit® L100/55	- 220 nm - Emulsion-polymérisation	- Lysozyme - Trypsine) - antigène (VIH-1 Tat)	- HL3T1, HeLa et MDDC - souris (administration intra - nasale). - doses : 10 – 500 µg/mL/ 1 à 96h.	Absence de cytotoxicité (MTT) Pas de toxicité chez l'animal.	[143]

HA : hyaluronique. PCL : Polycaprolactone. PEG : polyéthylène glycol. mPEG : Méthoxy polyéthylène glycol

Les nanotechnologies déjà présentes dans le domaine biomédical devraient connaître dans les prochaines années de spectaculaires développements telles la nanovectorisation de médicaments ou l'imagerie. Cependant, la toxicité de ces nanoparticules (nanotoxicité) est peu étudiée et souffre d'un manque de standardisation. Les caractéristiques physicochimiques des NPs utilisées sont souvent ignorées et leur internalisation n'est pas prise en compte. Aussi la « nanotoxicologie » doit établir de **nouveaux modèles d'étude** tels que :

1. Mise en place d'une méthodologie standard pour évaluer la cytotoxicité des nanoparticules sur des cellules.
2. Définition de modèles cellulaires, en nombre limité, en fonction des études menées afin de pouvoir établir des comparaisons entre les résultats.
3. Détermination de biomarqueurs qui permettent de rendre compte de l'effet toxique des NPs sur les cellules ou chez l'animal (expression de gènes, effet cytopathogène...).

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Etant donné les données limitées disponibles sur la toxicité des nanoparticules et le mécanisme de cette toxicité nous nous sommes fixés les objectifs suivant pour ce travail :

- Evaluer la toxicité de NPs polymériques (ERS et PCL) utilisées dans notre laboratoire pour le transport de principes actifs en utilisant comme modèle une lignée monocyttaire de rat (NR8383).
- Déterminer la cible intracellulaire des NPs utilisées et le mécanisme de la cytotoxicité grâce à la microscopie électronique, à l'analyse de l'expression de gènes par des micropuces à ADN et à la RT-PCR.

ÉTUDES EXPERIMENTALES ET PUBLICATIONS

1. Article I : *Cytotoxicity assessment of heparin nanoparticles in NR8383 macrophages*

Notre travail avait pour but d'évaluer la toxicité de nanovecteurs polymériques. Pour ce faire nous avons comparé la cytotoxicité des différents types de nanoparticules chargées ou non avec de l'héparine de bas poids moléculaire (HBPM). Ces NPs ont été obtenues par deux méthodes d'encapsulation, la nanoprécipitation (NP) et la double émulsion (DE), et synthétisées à partir d'ERS et de PCL. La cytotoxicité et l'apoptose induites par les nanoparticules ont été étudiées en utilisant les macrophages alvéolaires de rat NR8383. Nos résultats montrent que la méthode de préparation des NPs affecte leurs caractéristiques en particulier le taux d'encapsulation du principe actif et la toxicité. Lorsque la viabilité cellulaire était mesurée par l'exclusion au bleu Trypan, le diamètre des particules était un bon indicateur de cytotoxicité du fait d'une corrélation inverse entre le diamètre des particules et leur toxicité. D'autre part, les données de MTT montrent que la cytotoxicité de particules est fonction de leur potentiel zêta puisque les NPs positivement chargées sont plus toxiques que celles négativement chargées ou neutres. Les nanoparticules préparées par DE ont une toxicité moindre que celles préparées par nanoprécipitation. Nous avons conclu que l'évaluation de la cytotoxicité des nanoparticules doit être effectuée en utilisant au moins deux tests de cytotoxicité. Ces résultats ont été publiés dans *International Journal of Pharmaceutics* (*Impact Factor*: 3,607, en Août 2010).



Pharmaceutical Nanotechnology

Cytotoxicity assessment of heparin nanoparticles in NR8383 macrophages

H. Eidi^a, O. Joubert^{a,1}, G. Attik^{a,1}, R.E. Duval^b, M.C. Bottin^a, A. Hamouia^c, P. Maincent^a, B.H. Rihn^{a,*}^a Nancy-Université, Faculty of Pharmacy, EA 3452, 5 rue Albert Lebrun, 54001 Nancy Cedex, France^b Nancy-Université, Faculty of Pharmacy, Equipe GEVSM, SRSMC, CNRS, 5 rue Albert, Lebrun, 54001 Nancy Cedex, France^c University of Al-Baath, Pharmacology and Toxicology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Hama, Syria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 February 2010

Received in revised form 28 May 2010

Accepted 1 June 2010

Available online 11 June 2010

Keywords:

Nanoparticles

Nanoprecipitation

Double emulsion

Cytotoxicity

Macrophages

Apoptosis

ABSTRACT

The bioavailability of low molecular weight heparin (LMWH) has been increased by encapsulation in nanoparticles. As a complement to these results, the cytotoxicity and apoptosis induced by LMWH nanoparticles prepared by two methods [nanoprecipitation (NP) and double emulsion (DE)] using Eudragit® RS (RS) and poly-ε-caprolactone (PCL) have been analysed. Particle sizes varied from 54 to 400 nm with zeta potential values between –65 and +63 mV. Our results showed that the method of nanoparticle preparation affects their properties, especially in terms of drug incorporation and cell tolerance. Cell viability ranged from 6% to 100% depending on the preparation method and physicochemical properties of the particles and the type of toxicity assay. Particle diameter and zeta potential seemed to be the most valuable cytotoxicity markers when cell viability was measured by Trypan blue exclusion and MTT respectively. Nanoparticles prepared by DE were better tolerated than those of NP. LMWH encapsulation into the cationic nanoparticles reduces remarkably their toxicity. Apoptosis evaluation showed activated caspases in exposed cells. However, no nuclear fragmentation was detected in NR8383 cells whatever the tested nanoparticles. DE nanoparticles of RS and PCL can be proposed as a good LMWH delivery system due to their low toxicity (IC₅₀ ~ 2.33 and 0.96 mg/mL, respectively).

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Nanotechnology has a large number of potential applications in many different areas and as a result concern about the safety of nanomaterials has become a major concern. Novel engineered nanomaterials have unique physicochemical properties including small size, shape, high surface area, surface activity and chemical composition. Therefore, these nanomaterials might exhibit new toxic effects and thereby may represent a considerable health hazard (Kabanov, 2006). Therefore, the risk/benefit ratio for the use of nanoparticles needs to be evaluated for any technological or

medical development (Donaldson et al., 2004; Medina et al., 2007). Although numerous *in vitro* “nanotoxicology” studies have already been published, most of the experiments carried out so far, have not used particles that have been very well characterized for their composition and physicochemical properties (Kroll et al., 2009). This characterization is necessary because nanoparticles might interact differently with assay components, especially culture medium proteins, or interfere with detection systems resulting in unreliable data (Lison et al., 2008; Schulze et al., 2008).

Nanosystems with different compositions and biological properties have been extensively investigated for drug and gene delivery applications (Brannon-Peppas and Blanchette, 2004; Yokoyama, 2005; Pison et al., 2006; Schatzlein, 2006). Nanoparticles used as drug delivery vehicles are generally <500 nm in diameter and consist of different biodegradable or non-biodegradable materials such as natural or synthetic polymers, lipids or metals (Suri et al., 2007; Kroll et al., 2009). There are many publications describing the advantages of drug delivery systems (DDS) nanoparticles (Ferrari, 2005; Couvreur and Vauthier, 2006; Mohanraj and Chen, 2006; Zhang et al., 2008), but data on their toxicity are scarce. The majority of studies have focused on cytotoxicity of nanoparticles present in the environment rather than nanoparticles designed for drug delivery. Additionally, most of *in vitro* and *in vivo* studies investigated the toxicity of whole nanosized DDS but scarcely the nanoparticle itself. Beside their size, the toxicity of these DDS can be different according to their source: material-biological-metal based or polymeric,

Abbreviations: Aspec., specific surface area; DDS, drug delivery system; DE, double emulsion; DMSO, dimethyl sulfoxide; DQ12, quartz microparticles; FITC, fluorescein isothiocyanate; FMK, fluoro methyl ketone; IC₅₀, half-maximal inhibitory concentration; LMWH, low molecular weight heparin; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NP, nanoprecipitation; PCL, poly-ε-caprolactone; PI, polydispersity index; PLGA, poly(lactic-co-glycolic acid); PVA, polyvinyl alcohol; QESD, quasi-emulsion solvent diffusion; RS, Eudragit® RS; UFH, unfractionated heparin; VAD, valine-alanine-aspartate; + and –, nanoparticle with and without LMWH respectively.

* Corresponding author at: Faculty of Pharmacy, 5 rue Albert Lebrun, BP 80403, 54001 Nancy Cedex, France. Tel.: +33 0383 682 355; fax: +33 0383 682 301.

E-mail address: bertrand.rihn@pharma.uhp-nancy.fr (B.H. Rihn).

¹ Both these authors contributed equally to this work.

their preparation methods and their degradation products or biopersistence (Committee on Toxicity of Chemicals in Food Consumer Products and the Environment, 2006).

Poly- ϵ -caprolactone (PCL) and Eudragit® RS (RS) are widely used for manufacturing medical device and dosage forms, respectively. Indeed, PCL, a biocompatible and biodegradable polyester, is used for resorbable sutures whereas RS is often used for tablet coating; consequently, both are accepted by health authorities in major countries (Europe, Japan, USA) (Hoffart et al., 2006). Actually, RS was widely used because of its well-established mucoadhesive characteristics. This polycation is insoluble at physiological pH but swells in water (Pignatello et al., 2002). Moreover, this non-biodegradable positively charged polymer has been used for developing nanoparticles for the ophthalmic and oral administration of ibuprofen (Pignatello et al., 2002) and cyclosporins (Ubrich et al., 2005), as well as nano- and micro-fibers used as scaffolds in tissue engineering (Vaquettea et al., 2008). Few *in vitro* studies are dedicated to the toxicity of oral nanoparticulate DDS based on RS or PCL. Furthermore, the majority of these studies have been used only one assay (often MTT) to evaluate the toxicity of nanosized DDS. Although many studies have evaluated the nanosized-DDS toxicity depending on cell type, preparation methods, nanoparticle concentration and experimental conditions, they are estimated as limited data (Pignatello et al., 2002; Gargouri et al., 2009; Lopodota et al., 2009).

The injection of low molecular weight heparin (LMWH) does not necessarily require patient hospitalization, and for this reason it is now replacing unfractionated heparin (UFH) in many countries, thereby decreasing the cost in health care (Hull et al., 1998; Hoffart et al., 2006). However, both UFH and LMWH are still administered by injection only. So, it would be an important breakthrough in the care of such patients to be able to administer LMWH orally. In early eighties, Maincent et al. (1984, 1986) demonstrated that orally nanosized DDS were an improvement in bioavailability of drugs previously administered by parenteral route. Recently, an oral LMWH formulation based on nanoparticles formed from mixtures of PCL and RS has been developed. Although good oral bioavailability has already been demonstrated with these LMWH nanoparticles namely 20–40% of administered dose in rabbits (Jiao et al., 2002), pre-clinical and clinical studies will be necessary before they can be considered for pharmaceutical use. The effects of LMWH nanoparticles made of RS on human epithelial cell line have been investigated by Lamprecht et al. (2006) and found to have low toxicity. Thus, our work aim is to assess the toxic effects of these nanoparticles using another related cell model namely the macrophages. Actually, the largest database of the nanoparticles toxicity is provided by inhalation studies; then numerous *in vitro* assays are performed using macrophage cell lines (Nguea et al., 2008). Through their capacity to cross different biological barriers and their phagocytic activity, macrophages play a crucial role in determining the biopersistence of foreign particles and initiating inflammatory of non-specific or specific immune responses. Used in a convenient assay, macrophages allow to qualifying and comparing the cytotoxicity profiles of a range of nanoparticles according to size, surface activity, dissolution rate. Thus, macrophages can be considered as a valuable cell model to evaluate nanoparticle toxicity (Oberdorster et al., 2005b; AFSSAPS, 2009; Lanone et al., 2009).

The goal of this study was to evaluate and compare the cytotoxicity of a set of nanosized DDS obtained with two different LMWH encapsulation methods using well known pharmaceutical polymers. The cytotoxicity was explored through assessment of cell growth and apoptosis markers in a rat alveolar macrophage cell line NR8383 regarding to the physicochemical characteristics, composition and preparation method of the nanoparticles.

2. Materials and methods

2.1. Materials

LMWH, *i.e.*, bempiparin (mean MW = 3600 Da [91449-79-5]) was generously provided by Rovi (Madrid, Spain). Two polymers were used to prepare nanoparticles: Eudragit® RS PO (MW = 150,000 Da [33434-1]), an acrylic polycationic copolymer of acrylic and methacrylic acid esters with a proportion of quaternary ammonium groups (0.5–0.8%), was a gift of Evonik polymers (Darmstadt, Germany). Poly(- ϵ -caprolactone) (PCL) (MW = 42,000 Da [24980-41-4]) was purchased from Sigma (l'Isle d'Abeau Chesnes, France). Pluronic F 68 [11104-97-5] and poly(vinyl alcohol) (99% hydrolyzed, [9002-89-5]) (PVA) were used as surfactants, and obtained from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Quartz, type DQ12 microparticles (87% α -quartz + 13% amorphous, 2.99 μ m) were provided by the Institute of Toxicology and Experimental Medicine (Hanover, Germany).

For the culture of NR8383 cell line and cytotoxicity assay: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) was purchased from GIBCO (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), foetal calf serum was furnished by Eurobio (Eurobio, Les Ullis, France). Penicillin [113-98-4], streptomycin [128-46-1], amphotericin B [1397-89-3], L-glutamine [78354-52-6], 3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) [57360-69-7] and paraformaldehyde [30525-89-4] were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Hoechst dye 33258 and CasPACTM FITC-VAD-FMK (Fluorescein Iso-Thio Cyanate conjugate of the caspase inhibitor: Valine-Alanine-Aspartate Fluoro Methyl Ketone) were obtained from Promega (Promega, France).

2.2. Preparation of nanoparticles

2.2.1. Nanoparticles by nanoprecipitation method (NP)

Eudragit® RS (RS) and polycaprolactone (PCL) nanoparticles were prepared by the nanoprecipitation method as already described (Fessi and Puisieux, 1989; Bodmeier et al., 1991b). Briefly, 300 mg of polymer was dissolved in 15 mL of acetone (organic phase). In the case of LMWH-loaded particles, 1 mL of an aqueous LMWH solution (5000 IU) was added to the organic phase. The organic solution was poured in the body of a syringe, and flowed slowly, under stirring, in 40 mL of a Pluronic® F68 (0.5%, w/v) aqueous phase. The solvent was removed by rotary evaporation under vacuum at 40 °C (Heidolph, Schwabach, Germany) until 5 mL of nanoparticles suspension were obtained. RS or PCL nanoparticles prepared according to this method with and without LMWH (+ and -) were named NP/RS- and NP/RS+ or NP/PCL- and NP/PCL+, respectively.

2.2.2. Nanoparticles by double emulsion (DE)

Nanoparticles were prepared by using the double emulsion/solvent evaporation technique (w/o/w) (Bodmeier et al., 1991a,b). Briefly, 125 mg of PCL or RS was dissolved in 5 mL of the organic solution (ethylacetate or methylene chloride). Either water (1 mL) or an aqueous solution of LMWH (1 mL, 5000 IU) was emulsified into this organic phase by sonication (80 W for 30 s) using an ultrasonic homogenizer (Vibracell 75022, Bioblock, Illkirch, France) for the preparation of empty or LMWH-loaded nanoparticles, respectively. This primary w/o emulsion was then dispersed by sonication (80 W for 1 min) into 40 mL of an aqueous solution of PVA (0.1%, w/v), thus producing a secondary w/o/w emulsion. The resulting nanoparticles were obtained by the evaporation of the organic phase down to 5 mL RS or PCL nanoparticles prepared by this technique with and without LMWH (+ and -) were named DE/RS- and DE/RS+ or DE/PCL- and DE/PCL+, respectively.

2.3. Colloidal stability study

The stability of nanoparticles was determined by monitoring the changes in size, polydispersity and zeta potential as a function of storage time at 4 °C. To check the colloidal stability, nanoparticle suspensions were also diluted and investigated in the biological media used in the study namely DMEM and in double distilled water. All measurements were performed in triplicate.

2.3.1. Particle size measurement

Particle sizes were investigated by photon correlation spectroscopy (PCS) using a Zetasizer™ (Malvern Instruments, UK). Each sample was diluted with double distilled water until the appropriate concentration of particles to avoid multiscattering events was achieved. The concentration and dilution were kept constant for all samples. The particle size (z-average) and size distribution (polydispersity index, PI) of equivalent hydrodynamic spheres were calculated using the Malvern software associating analysis and an exponential sampling method. Each measurement was performed, at least, in triplicate. The particle z-average diameter was used to calculate the specific surface area (A_{spec} , given in m^2/g) of empty nanoparticles assuming a spherical particle shape (Eq. (1)). RS and PCL densities (ρ) were 0.82 and 1.05 g/cm^3 , respectively (Schubert and Muller-Goymann, 2005).

$$A_{\text{spec}} = \frac{\text{Surface area}}{\text{density} \times \text{volume}} = \frac{4\pi r^2}{\rho 4/3\pi r^3} = \frac{3}{\rho \times r} \quad (1)$$

Eq. (1) is calculation of particle specific surface area (A_{spec}).

2.3.2. Zeta potential measurement

Nanoparticle zeta potential is calculated by electrophoretic mobility which is determined by laser Doppler anemometry in a microelectrophoresis cell (Zetasizer™, Malvern Instruments, UK). Each sample was measured at least in triplicate.

2.4. LMWH encapsulation efficiency

The amount of LMWH entrapped within nanoparticles was determined by nephelometry (Ardry, 1967; Hoffart et al., 2006) measuring the amount of free LMWH in the aqueous PVA or Pluronic® solution recovered after centrifugation of the nanoparticle suspension (42,000 \times g; Biofuge Stratos, Heraeus Instrument GmbH). Typically, triplicate aliquots (500 μL) of aqueous samples were incubated at 37 °C for 1 h with sodium acetate [127-09-3] buffer (pH 5.25) and 1 M aqueous solution cetylpyridinium chloride [27841-61-8]. The mix absorbance is measured by UV spectroscopy at $\lambda = 500$ nm (Uvikon 922, Kontron, Eching, Germany). Drug entrapment efficiency was expressed as the percentage of LMWH entrapped with respect to the amount added to the preparation.

2.5. Cells and cell culture

The NR8383 rat alveolar macrophage cell line was purchased from the American Type Culture Collection (CRL-2192, ATCC, Manassas, VA) as a homogenous and expandable source of alveolar monocyte/macrophage-like cells not chemically or virally transformed. Cultures exhibited 50% adherent and 50% floating cell phenotypes. These cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplied with 200 mM L-glutamine, 15% of heat-inactivated foetal calf serum and a mixture of antibiotic/antimycotic compounds (100 U/mL of penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of streptomycin and 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of amphotericin B). Cultures were incubated at 37 °C under 5% CO_2 and split every 3 or 4 days.

2.6. Cell viability

Cytotoxicity was evaluated based on cell viability relative to controls as proposed by Kong et al. (2009):

- Non-cytotoxic > 90% cell viability.
- Slightly cytotoxic = 60–90% cell viability.
- Moderately cytotoxic = 30–59% cell viability.
- Severely cytotoxic \leq 30% cell viability.

Particle toxicity ranking was determined using the half-maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) for both of viability assays used in this study.

2.6.1. Cell viability evaluation by Trypan blue exclusion

Trypan blue is one of the many dye recommended techniques of exclusion staining, counting and evaluation of cellular population and acute cellular toxicity (Wong et al., 2006). This method is based on the principle that the living cells do not incorporate the dye, whereas dead cells incorporate it owing to their damaged membrane. Trypan blue exclusion assays were carried out as previously described (Liu et al., 1999). Cells were dispensed into 24-well microplates (at 10^5 cells/mL), in 1 mL of DMEM medium/well and incubated overnight at 37 °C, 5% CO_2 and 95% air. Cells are then treated with different concentrations of particles for 24 h. Unexposed control cultures were maintained under the same conditions. The enumeration is carried out by immediate microscopic observation using a Malassez counting cell. Six numerations per sample were performed to limit the risk of error. The percentage of viability corresponds to the percentage of living cells resistant to any adverse effect of the nanoparticles.

2.6.2. Cell viability evaluation by MTT assay

Colorimetric MTT assays were performed to assess the activity of living cells by their mitochondrial dehydrogenase activity. Mitochondrial dehydrogenases of viable cells cleave the tetrazolium ring, yielding purple formazan crystals that are insoluble in aqueous media. NR8383 cells were seeded in 96-well plates at 1×10^5 cells/mL. Two hundreds microlitres of suspended cells were added in DMEM medium/well and incubated overnight. Cells were exposed to different concentrations of nanoparticles for 24 h. Unexposed control cultures were maintained in the same conditions. After incubation, the percentage of cell viability was determined by using a procedure previously used in our laboratory (Attik et al., 2008), adapted from Mosmann (1983). Briefly, cells were washed once with PBS and a solution (2.5 mg/mL) of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was added to each well. After a 3-h incubation at 37 °C under 5% CO_2 , the MTT solution was discarded carefully and the blue formazan crystals, formed by reduction of MTT, were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO [67-68-5], Sigma-Aldrich). The amount of formazan was determined spectrophotometrically by measuring the absorbance at $\lambda = 540$ nm using a microplate reader (Model 3550-UV, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Each concentration was tested in quadruplicate and three independent experiments were done. Since absorbance is proportional to the number of living cells, cell viability was represented by the absorbance ratio of exposed to control cells expressed as a percentage.

2.7. Evaluation of apoptosis

One of the hallmarks in apoptosis is the cleavage of the genomic DNA in nucleosome units. Furthermore, the caspases cascade activation plays a central role in this process.

Table 1

Physicochemical properties of nanoparticles: diameter (by photon correlation spectroscopy), polydispersity index (PI), specific surface area ($A_{\text{spec.}}$), Zeta potential (by laser Doppler anemometry) and LMWH encapsulation efficiency (by nephelometry).

Particles	Diameter [nm] ($n = 8 \pm \text{SD}$)	PI	$A_{\text{spec.}}$ [m ² /g]	Zeta potential [mV] ($n = 8 \pm \text{SD}$)	LMWH encapsulation efficiency [%] ($n = 4 \pm \text{SD}$)
NP/RS–	54.2 ± 5	0.5 ± 0.04	68	40.63 ± 5	–
NP/RS+	195.6 ± 3	0.2 ± 0.01	NA ^a	–56.10 ± 2	56.0 ± 0.8
NP/PCL–	291.5 ± 63	0.4 ± 0.06	10	–13.06 ± 7	–
NP/PCL+	248.7 ± 17	0.1 ± 0.07	NA	–10.20 ± 12	31.0 ± 1.3
DE/RS–	364.0 ± 138	0.4 ± 0.20	13	62.93 ± 8	–
DE/RS+	241.6 ± 15	0.1 ± 0.03	NA	–65.30 ± 12	32.0 ± 0.9
DE/PCL–	269.8 ± 44	0.2 ± 0.06	11	–5.40 ± 5	–
DE/PCL+	401.1 ± 45	0.2 ± 0.04	NA	–3.60 ± 3	61.5 ± 0.6

^a NA: non-analysed.

2.7.1. DNA fragmentation

DNA fragmentation was quantified using the *Cell Death Detection ELISA^{PLUS}* (Biohit Diagnostics, Meylan, France). This assay based on the ELISA immunoassay principle uses anti-histone and anti-DNA mouse monoclonal antibodies to quantify specifically mono- and oligonucleosomes released during apoptosis.

NR8383 cells were seeded in 96-well plates at the density of 1×10^5 cells in 100 μL of medium/well. Following overnight incubation (37 °C, 5% CO₂, 95% air), nanoparticle suspensions were added to the culture wells at 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 6, 24, 48 and 72 h. Quartz microparticles (DQ12) was used as a positive control because they were known to induce apoptosis (Gao et al., 2001; Attik et al., 2008). Unexposed control cultures were maintained under the same conditions. Cells were then treated with lysis buffer for 30 min at 15–25 °C. After centrifugation (200 \times g), supernatant was transferred carefully into streptavidin-coated microplates; a mixture containing anti-DNA-peroxidase [EC 1.11.1.7] and anti-histone–biotin labelled antibodies was added to each well. After shaking, the solution was removed thoroughly by tapping or aspiration. After three washes with the incubation buffer, 100 μL of 2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate] (ABTS solution, [28752-68-3]) was added to each well. The plates were shaken until the colour development. The absorbance was measured at $\lambda = 405$ nm against an ABTS blank solution using a microplate reader (Model 3550-UV reader, Bio Rad, Marnes-la-Coquette, France). Three independent experiments were performed, each in triplicate. The specific enrichment factor of mono- and oligonucleosomes released into the cytoplasm was expressed as the absorbance ratio of exposed to unexposed cells.

2.7.2. In situ FITC-VAD-FMK labelling

The FITC-VAD-FMK *In situ* Marker Assay System is a cell-permeable FITC conjugate of the caspase inhibitor VAD-FMK (Duval et al., 2002). Briefly, according to manufacturer instructions, 2–3 mL of a NR8383 suspension (10^5 cells) was added to a slide-flask (Nunc) and exposed 24 h to nanoparticles (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$). After the incubation period, medium from samples was removed and the slide was rinsed with PBS. FITC-VAD-FMK marker was added at a final concentration of 1×10^{-4} M. The samples were returned to the humidified chamber at 37 °C until the appearance of fluorescence. Cells were fixed with 4% para-formaldehyde [30525-89-4] in PBS, examined by fluorescent microscopy (Zeiss), fixed and photographed at 400 \times magnification.

2.7.3. FITC-VAD-FMK/Hoechst double staining

The Hoechst dye 33258 is an intercalating DNA agent binding preferentially to A:T and it is widely used to observe the cell nucleus. Double staining experiments were done as follows: after FITC labelling, cells were washed in PBS and stained 1 min with Hoechst dye (1:2000). Cells were simultaneously examined under fluorescence microscopy with appropriate filters.

2.8. Statistical analysis

One-way ANOVA with Fisher's Least Significant Difference (LSD) *post hoc* comparisons at 95% confidence interval was used for statistical comparisons in both the MTT and Trypan blue assays.

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical characteristics of nanoparticles

Since many unique properties of nanomaterials stem from their size, nanoparticle sizing is a prerequisite of cytotoxicity assessment. Additionally, because of intrinsic high dispersion and elevated surface energy, nanoparticle aggregation is thought to be common in complex experimental conditions such as biological media. Surprisingly, only few studies report such aggregation data. At the nanoscale, aggregation is extremely difficult to detect, especially in biological milieu, but could have a strong influence on the specific properties of nanomaterials when they interact with cells and tissues. These properties include colloidal stability and homogeneity, electronic and optical behaviour and their uptake and targeting to cells and bacteria, especially in the presence of proteins (Jones and Grainger, 2009).

In this report, two techniques of nanoparticle preparation: double emulsion (DE) and nanoprecipitation (NP) were compared to investigate whether the preparation method could affect LMWH incorporation, particle properties and cytotoxicity. The main properties of the prepared nanoparticles are given in Table 1. The nanoparticles have nominal mean diameters ranging from 54 to 401 nm and entrapment efficiencies for LMWH ranging from 31% to 61%. The mean specific surface area ($A_{\text{spec.}}$) was calculated as being between 10 and 68 m²/g, depending on the diameter. Therefore, particles with a shorter diameter have the highest $A_{\text{spec.}}$ (Table 1). Our data showed that nanoparticles prepared by DE were bigger than those formed by NP using the same polymer (401 nm vs 54 nm). Indeed, NP/RS– (54 nm) and DE/PCL+ (401 nm) were the biggest and smallest particles, respectively (Table 1). The relatively low encapsulation efficiency is probably due to the loss of LMWH into the external aqueous phase as a result of its hydrophilic nature favouring its diffusion before the precipitation of the polymers (Hoffart et al., 2006). RS nanoparticles obtained by NP have a higher entrapment efficiency than those produced by the DE method (56% vs 32%). On the reverse, PCL nanoparticles prepared according to DE have a higher encapsulation efficiency than those of NP (61% vs 31%).

The zeta potential of the particles under study varied from –65 to +63 mV depending on the preparation method, the polymer used and whether LMWH was loaded or not (Table 1). Although unloaded RS nanoparticles were positively charged owing to the quaternary ammonium groups of the polycationic RS polymer: +40 and +63 mV for NP/RS– and DE/RS–, respectively, a dramatic

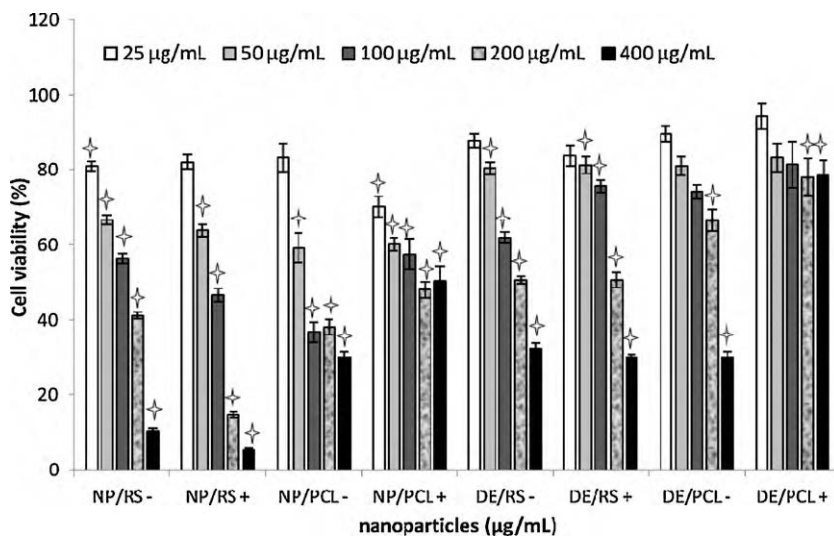


Fig. 1. Cell viability assayed by cellular membrane damage assessment using the Trypan blue exclusion test. Cells were treated with different concentrations of nanoparticles for 24 h. Results are expressed as mean \pm standard deviation ($n=9$). † Significant difference (LSD test) at $p < 0.05$.

change in zeta potential occurred when LMWH was encapsulated within these nanoparticles namely -56 and -65.4 mV for NP/RS+ and DE/RS+, respectively. The shift in the zeta potential is due to LMWH loading on the particle surface rather than incorporation into the particle matrix. Indeed, Positively charged quaternary ammonium groups interact with the negatively charged sulphate and carboxylate groups of LMWH, anchoring the polysaccharide on the surface and conferring a strong negative charge to the LMWH-loaded nanoparticles (Hoffart et al., 2006).

Nanoparticle stability was assessed by monitoring changes in size, polydispersity and zeta potential. Our data demonstrated that most nanoparticle formulations were stable for 4 weeks after dilution in double distilled water, whereas DE/RS+ nanoparticles were only stable for 2 weeks (13 ± 5 days). However, tested nanoparticles were much less stable in the culture medium namely DMEM: RS nanoparticles kept their colloidal stability for at most 24 h, whereas PCL nanoparticles were more stable: 3 and 28 days for NP/PCL- and DE/PCL+, respectively. Furthermore, PCL nanoparticles prepared by DE were more stable (26 ± 3 and 28 ± 1 days for DE/PCL- and DE/PCL+, respectively) than those prepared by NP (3 ± 2 and 4 ± 2 days for NP/PCL- and NP/PCL+, respectively). In all cases, the colloidal stability of nanoparticles was dramatically reduced ($\sim 97\%$ in RS nanoparticles) when they were suspended in DMEM. This decrease in stability may be due to the adsorption of culture medium components onto the polycationic nanoparticle surface. The comparison of different data of nanoparticle zeta potential, size and stability shows that nanoparticles have a broad tendency to form micro-sized agglomerates ($5\text{--}10 \mu\text{m}$) in culture medium (DMEM). These agglomerates can induce a significant reduction in the effective concentration of the nanosized fraction along the current study. We can also hypothesise the opsonisation of nanoparticles by adsorption of medium serum proteins which facilitate their uptake by the macrophage (Schulze et al., 2008). These key elements can affect the biodistribution and biocompatibility of nanoparticles throughout the body (Aggarwal et al., 2009). Indeed, the present results could reflect the underestimation of nanoparticle toxicity. Therefore, the results obtained cannot be attributed solely to the nanoscale properties of the particles. The nanoparticles produced for industrial applications are not designed to be compatible with *in vitro* cell culture tests which are carried out in isotonic solutions at physiological pH and often in presence of proteins (Schulze et al., 2008). Thus, many researchers tried to avoid the colloidal instability of nanoparticles in culture media by using

other buffers that are unfortunately far away from the *in vivo* conditions. Therefore, it remains a very important need to achieve more physiologically relevant *in vitro* testing models that can substitute for *in vivo* “nanotoxicology” studies (Fischer and Chan, 2007).

3.2. Cell viability

To evaluate interaction of nanoparticles and the immune system, the NR8383 macrophage cell line was used as a model to study *in vitro* cytotoxicity, since macrophages are the first line of defence in the body. As a mediator, the mononuclear system can modify advantageously the cytotoxicity and the bioavailability of the nanosized-DDS (Soma et al., 2000), or, in contrast as a target of nanoparticles toxicity, it can induce adverse effects such as oxidative stress and be less effective in the clearance of these potentially damaging particles. Human or rodent macrophages cell line are widely used and recommended to evaluate the cytotoxicity of environmental and engineered nanoparticles at first as historical “standard” in *in vitro* studies (Oberdorster et al., 2005b; Lanone et al., 2009). In fact, macrophages are able to migrate into many different organs where they have the important roles of engulfing and clearing of pathogens as well as small particles (Ahsan et al., 2002). Besides, nanomaterials introduced into the blood stream (e.g., via systemic injection, oral absorption, or inhalation) would immediately encounter a high number of platelets and red blood cells and would also have frequent contact with the blood-filtering cells of the liver and the mononuclear phagocytic system (i.e., reticuloendothelial system) including macrophages (Jones and Grainger, 2009). Thus, as NR8383 macrophages have been reported to represent the best currently available cell line for studying the macrophage function (Lane et al., 1998), they were considered as a satisfactory cell model for cytotoxicity assessment. Moreover, the survival of macrophages is considered as one of key prerequisites for an effective elimination of potentially harmful particles (Albrecht et al., 2009). Our preliminary data from electron microscopy showed that RS particles were taken up by NR8383 macrophages (data not shown). Therefore, it was interesting to test the influence of nanoparticle on this macrophage cell line. Additionally, the unwanted exposure route to DDS nanoparticles (mainly respiratory) during their manufacture process should be taken into account.

Nanoparticle suspended in culture medium collide with cells mainly as a result of convection forces and exert their biological

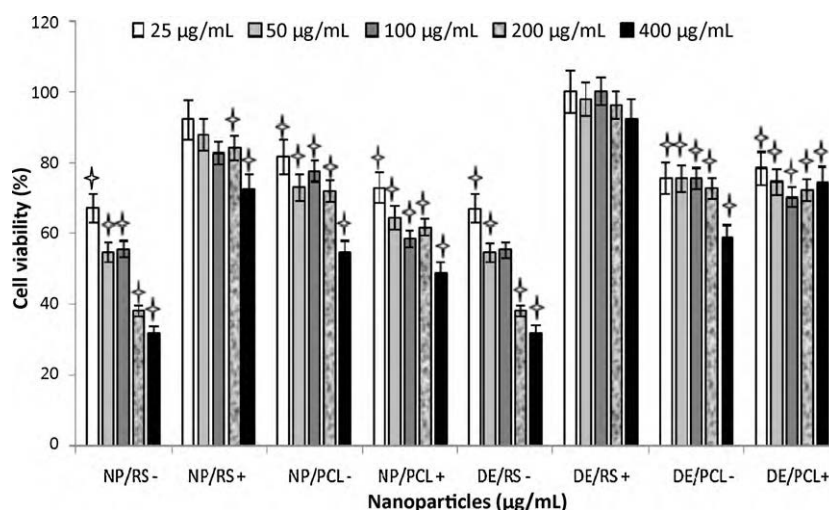


Fig. 2. Cell viability assayed by mitochondrial metabolism assessment (MTT test). Cells were incubated with different concentrations of nanoparticles for 24 h. Viability was normalized to the value determined in untreated cells. Results are expressed as mean \pm standard deviation ($n = 12$). † Significant difference (LSD test) at $p < 0.05$.

effects after these contacts (Lison et al., 2008). It was important to assess nanoparticle cytotoxicity after a 24-h exposure period since the cells would be in an exponential growth phase during this period and any toxicity due to inhibition of proliferation and/or cell death would be clearly visible (Nafee et al., 2009).

Figs. 1 and 2 show that cell viability ranged from 6% to 100% depending on the particle concentration, preparation method, size and zeta potential of the tested particles. Most of nanoparticles showed a dose-dependent cytotoxicity, whereas DE/PCL+ nanoparticles have a low dose-independent toxicity (Fig. 1). However, our results of MTT assay showed a dose-dependent cytotoxicity of empty RS nanoparticles (Fig. 2). Data displayed in Fig. 2 and Table 2 showed that empty nanoparticles exhibit more toxicity than LMWH-loaded ones. According to the MTT results, DE/RS+ nanoparticles were rated as non-toxic whatever the dose, whereas the other nanoparticles varied from slightly to severely cytotoxic depending on the nanoparticle type and the concentration in the culture medium. Indeed, cell viability was $74\% \pm 0.03$ and $32\% \pm 0.03$ for DE/PCL+ and NP/RS-, respectively at a $400 \mu\text{g/mL}$ concentration. When the viability was measured by Trypan blue exclusion, cytotoxicity was well inversely correlated with particle diameter, as the particles with smaller diameters were the most toxic (Fig. 3).

When possible, IC_{50} was calculated in each viability assay in order to compare the nanoparticles cytotoxicity (Pennati et al., 2006). Table 2 shows a strong discrepancy in IC_{50} results between the two assays depending perhaps on the cell death mechanism. The nature of the nanoparticles such as their surface charge, their adsorption capacity and their uptake may interfere with the detection system (Kroll et al., 2009).

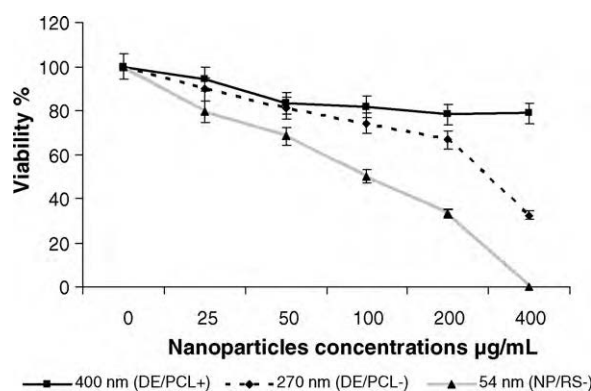


Fig. 3. Influence of nanoparticle diameter on cell viability assayed by the Trypan blue assay. Cells were incubated with nanoparticles for 24 h ($n = 9 \pm$ mean SD).

A_{spec} is often proposed as an important physical determinant of cytotoxicity (Lanone et al., 2009), therefore we propose an “ $A_{\text{spec}} \times \text{IC}_{50}$ -index” to illustrate $A_{\text{spec}}/\text{IC}_{50}$ relationships. The index values reported in Table 2 clearly show that there is a positive relationship between toxicity and A_{spec} , since the particles with the largest A_{spec} are the most toxic. In case of Trypan blue, this index was $11,968 \times 10^{-2} \text{ cm}^{-1}$ for NP/RS-, and was found to be much lower when the particle A_{spec} decreased: 3198, 1790 and $2760 \times 10^{-2} \text{ cm}^{-1}$ for DE/RS-, NP/PCL- and DE/PCL-, respectively. Since the Trypan blue test assesses damage to the cell membrane (Liu et al., 1999), it seems reasonable that nanoparticle A_{spec} would be one of main factors affecting the cytotoxicity since it

Table 2
Half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) and “ $A_{\text{spec}} \times \text{IC}_{50}$ index” of nanoparticles for both viability tests: Trypan blue and MTT.

Particles	IC_{50} ($\times 10^{-6} \text{ g/cm}^3$)		A_{spec} ($\times 10^4 \text{ cm}^2/\text{g}$)	[$A_{\text{spec}} \times \text{IC}_{50}$] index ($\times 10^{-2} \text{ cm}^{-1}$)	
	Trypan blue	MTT		Trypan blue	MTT
NP/RS-	176	188	68	11,968	12,784
NP/RS+	142	>400 (781)	NA ^a	NA	NA
NP/PCL-	179	>400 (445)	10	1790	4450
NP/PCL+	317	339	NA	NA	NA
DE/RS-	246	187	13	3198	2431
DE/RS+	259	>400 (2329)	NA	NA	NA
DE/PCL-	276	>400 (506)	11	2760	5060
DE/PCL+	>400 (1037)	>400 (959)	NA	NA	NA

^a NA: non-analysed.

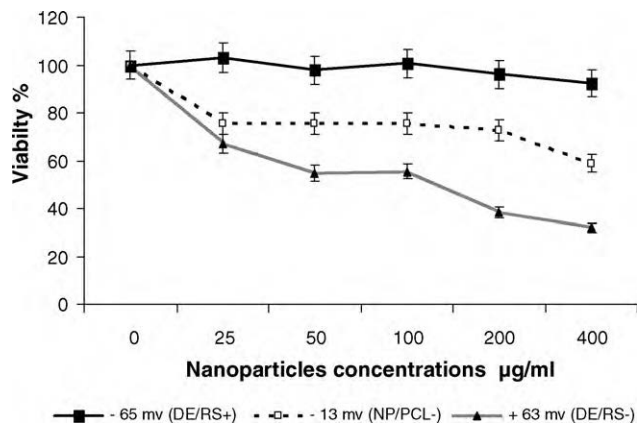


Fig. 4. Influence of nanoparticle zeta potential on cell viability assayed by the MTT assay. Cells were incubated with nanoparticles for 24 h ($n = 12 \pm$ mean SD).

would determine the extent of interactions between particles and cellular membranes.

According to IC_{50} results obtained with Trypan blue, the tested particles showed the following order of cytotoxic potency:

$$NP/RS+ > NP/RS- \approx NP/PCL- > DE/RS- \approx DE/RS+ > DE/PCL- > NP/PCL+ > DE/PCL+.$$

When the endpoint was MTT reduction, the zeta potential of the nanoparticles seemed to be a valuable marker of cytotoxicity, since this parameter showed a positive relationship with their cytotoxic effects (Fig. 4). The IC_{50} values calculated from the MTT measurements showed that cytotoxic effect of the tested nanoparticles could be ranked as:

$$NP/RS- \approx DE/RS- > NP/PCL+ > NP/PCL- > DE/PCL- > NP/RS+ > DE/PCL+ > DE/RS+.$$

Heparin encapsulation dramatically changed the nanoparticle toxicity. The MTT data showed that, in contrast to PCL nanoparticles, RS nanoparticles without LMWH were more toxic than those with LMWH because of the lower zeta potential of LMWH-loaded nanoparticles, namely -56 and -65 mV for NP/RS+ and DE/RS+, respectively. Indeed, while the IC_{50} values were 188 and 781 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for NP/RS- and NP/RS+, they were 445 and 339 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for NP/PCL- and NP/PCL+, respectively. Furthermore, RS nanoparticles without LMWH were more toxic than PCL ones, whereas LMWH-loaded RS nanoparticles were less toxic than LMWH-loaded PCL particles obtained by the same preparation method. For example, the IC_{50} values were 188 and 445 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for NP/RS- and NP/PCL-, respectively as compared to 781 and 339 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for NP/RS+ and NP/PCL+, respectively. The cytotoxicity of nanoparticles prepared by DE varied in the same manner (Table 2).

Table 3
Apoptosis assessment in NR8383 by quantification the mono- and oligonucleosomes release (DNA fragmentation assay). DQ12 microparticles were used as a positive control of apoptosis. Cells were treated with 400 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of tested nanoparticles and DQ12 microparticles, respectively.

Nanoparticles	Enrichment factor			
	6 h	24 h	48 h	72 h
Unexposed cells	1.00 \pm 0.01	1.00 \pm 0.03	1.00 \pm 0.01	1.00 \pm 0.01
NP/RS-	0.76 \pm 0.01	0.86 \pm 0.01	0.73 \pm 0.01	0.70 \pm 0.05
NP/PCL-	0.74 \pm 0.01	0.61 \pm 0.03	1.10 \pm 0.01	1.62 \pm 0.08
DE/RS-	0.61 \pm 0.01	0.61 \pm 0.03	0.85 \pm 0.01	0.77 \pm 0.01
DE/PCL-	0.87 \pm 0.01	0.78 \pm 0.01	0.14 \pm 0.03	1.32 \pm 0.01
DQ12	23.20* \pm 0.30	3.95* \pm 0.08	ND	ND

ND: not determined. Results expressed as mean \pm standard deviation ($n = 9$). *Significant difference at $p < 0.05$.

The results obtained from the MTT and Trypan blue assays reveal that nanoparticles with the smallest diameter and the highest zeta potential, namely NP/RS- nanoparticles, were the most toxic (Figs. 3 and 4). Thus, DE/RS+ and DE/PCL+ can be proposed as a good delivery system for LMWH due to their relative high encapsulation efficiency (32% and 61%, respectively) and low toxicity ($IC_{50} \sim 1.0$ and 2.3 mg/ml, respectively).

The main factors affecting cytotoxicity of polycationic agents have been reported to be molecular weight, charge density and type of cationic functionality, structure and sequence (block, random, linear, and branched) and conformational flexibility (Unger et al., 2007). Polymers with a linear (PCL) or branched (RS) and flexible structure showed higher cell damaging effects as compared to other structures (Fischer et al., 2003). According to some authors, cationic agents such as RS could affect the cell viability through their positive charge interacting with the negatively charged cell membrane (Morgan et al., 1988). Furthermore, cationic agents have been reported to induce some cell damage through their interaction with anionic components (sialic acid) of glycoproteins on the epithelial cell surface (Fischer et al., 2003). Verma and Stellacci (2010) reported that regardless of the type of particle, cationic particles penetrate cell membranes which may contribute to the cytotoxicity observed with such particles. Our study confirms these observations for RS nanoparticles (Fig. 4).

It is also noteworthy that our results are in accordance with those of Delie et al. (2001) and Gargouri et al. (2009) since nanoparticles of the same polymer, prepared by the DE technique were less cytotoxic than those obtained by NP. This result could be explained by the small size of NP nanoparticles compared with those of DE. Indeed, whereas the IC_{50} values obtained by Trypan blue were 142 and 176 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for NP/RS+ and NP/RS- respectively, they were very different for the same particles prepared by DE (259 and 246 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for DE/RS+ and DE/RS-, respectively) (Table 2). In contrast, Sun et al. (2008) reported that cationic biodegradable micellar nanoparticles prepared by nanoprecipitation displayed good cytocompatibility against HEK293 cells even at high concentration. Such differences in cytotoxicity may be due to the active principle, physicochemical modifications, polymer biodegradability and cell type (Mueller et al., 2004; Kean et al., 2005). Lanone et al. (2009) suggested that the different sensitivity of cell lines has to be carefully taken into account when assessing nanoparticles toxicity. For example, Lamprecht et al reported that RS nanoparticles produced by oil/water emulsification-solvent evaporation had a low toxicity on Caco-2 cells (Lamprecht et al., 2006). This cancerous cell line used as model for the gastrointestinal tract epithelium is characterized by its high robustness compared to other cell lines (Pertuit et al., 2007). Additionally, Lamprecht et al. used a different nanoparticle preparation method, namely oil/water emulsification-solvent evaporation as well as a different cell density in the MTT assay. The latter parameter has been reported to be an important factor that affects nanoparticle cytotoxicity data (Geys et al., 2009). Another study reported that

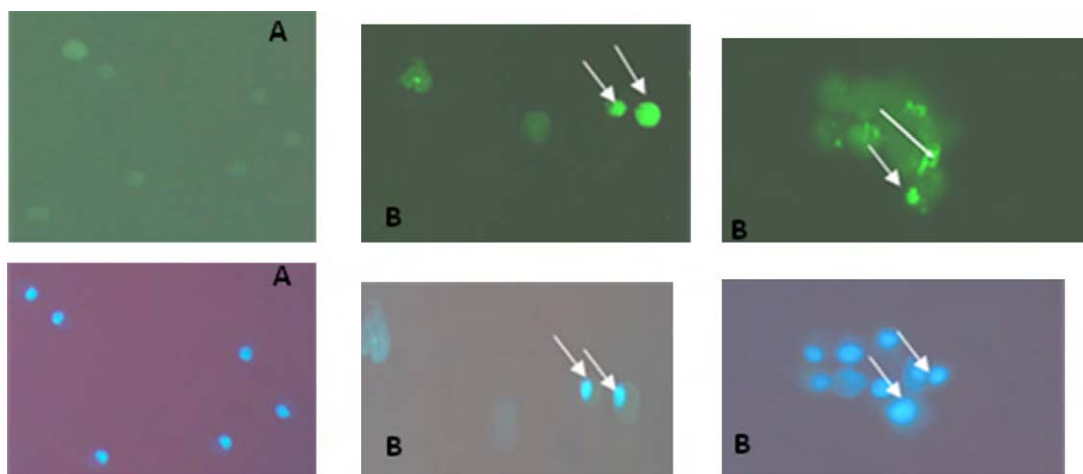


Fig. 5. Double staining FITC-VAD-FMK (green)/Hoechst dye 33258 (blue) of NR8383. Arrows show caspase activation and chromatin condensation using FITC-VAD-FMK and Hoechst staining, respectively. (A) Unexposed cells, B: cells incubated with 400 µg/mL of NP/RS- for 24 h. Each field was viewed at a magnification of $\times 400$. This figure is representative of three experiments. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

hydroxylapatite particles showed low toxicity towards NR8383 cells (Albrecht et al., 2009). Indeed, these differences in toxicity data were due to the use of other nanoparticles-hydroxylapatite- at higher cell density (1×10^6 cells/mL) compared with our work, namely 1×10^5 cells/mL. Furthermore, Gargouri et al. (2009) showed that unloaded RS nanoparticles prepared by NP and DE showed cytotoxic effects depending on both cell type and nanoparticle concentration. These nanoparticles were found to be less toxic towards MDA-MB 231 and MCF-7 cells than towards FaDu cells using the MTT assay without serum, which also may affect nanoparticle cytotoxicity (Geys et al., 2009). Glutathione-loaded RS/cyclodextrin nanoparticles prepared using the quasi-emulsion solvent diffusion technique did not show any cytotoxicity towards the RAW264.7 macrophage cell line using the MTT assay (Lopedota et al., 2009).

Few studies are realized to evaluate the toxicity of nanosized-DDS based on the biodegradable PCL polymer. No toxic effect of PCL itself was noticed in cell culture using neutral red and MTT assays (Dang et al., 1997). PCL nanoparticles prepared by NP and a simple oil/water emulsification technique showed a higher cytotoxic effect in the HEK293 cell line as compared to Caco-2 (Pertuit et al., 2007). However, PCL microparticles prepared by DE were reported to be slightly toxic towards the J774.2 cell line (Murillo et al., 2002a,b). Furthermore, Luong-Van et al. (2006) demonstrated that heparin-containing PCL electrospun fibers did not induce any inflammatory response in the mouse RAW264.7 macrophage cell line.

Our findings confirm the hypothesis that nanoparticle toxicity is not only due to the preparation method and composition of nanoparticles. In fact, the overall physicochemical properties and assay conditions have to be taken in account.

3.3. Apoptosis

Apoptosis is a genetically regulated of cell death characterized by cell shrinkage, plasma membrane blebbing, nuclear chromatin condensation and DNA fragmentation (Matute-Bello and Martin, 2003; Shih et al., 2003). The results exposed in Table 3 show that no nuclear fragmentation occurs when the cells were treated with a cytotoxic dose of unloaded nanoparticles (400 µg/mL) whatever the nanoparticles and the time of exposure. In addition, nuclear fragmentation featured by the enrichment factor value is significantly enhanced when cells are exposed to 200 µg/mL of DQ12 microparticles (23.20) as previously demonstrated by Attik et al.

(2008) and Gao et al. (2001). Caspases activation plays a central role in the apoptosis process. *In situ* double labelling of NR8383 with FITC-VAD-FMK/Hoechst dye after a 24 h exposure to 400 µg/mL of the same nanoparticles shows activated caspases in the cytoplasm and chromatin condensation without DNA fragmentation (Fig. 5). The discrepancy between the two detection methods could be explained by the apoptosis asynchronous process. A limited number of cells will be progressing through programmed cell death as indicated by the immunohistological method. So, the level of DNA laddering obtained from apoptotic cells is below the detection limit of our biochemical method. However, Dursun et al. (2006) have shown that caspases, the major mediators of programmed cell death, can also cause necrosis. Our findings showed that NP/RS- nanoparticles induced cell death by either necrosis or apoptosis distinguished by caspase activation without DNA fragmentation.

4. Conclusion

In summary, our results show that the preparation method for nanoparticles and the assay conditions influence their properties, especially in terms of LMWH encapsulation and cytotoxic effect profiles. DE/RS+ and DE/PCL+ can be considered as a satisfactory nanosized delivery system for LMWH because of their high encapsulation efficiency and low toxicity. LMWH encapsulation dramatically reduces the cationic nanoparticles toxicity owing to the serious modifications in particle zeta potential.

Our work also showed that nanoparticles can induce cell death. Which kind of cell death (necrosis or apoptosis) involved in this cytotoxicity should be investigated further. Whether the cell death induced by tested nanoparticles is due to their internalisation by the cells or their interaction with cell membranes should also be further investigated. Although many researchers have earlier reported cytotoxicity evaluations of DDS nanoparticles based on physicochemical properties, more relevant biological and molecular assays such as apoptosis, *in situ* caspase marker assay and transcriptomic microarray require attention. IC_{50} varies as a function of the cytotoxicity endpoint since each endpoint screens a specific mechanism of toxicity. Thus, in order to obtain comparable results of “nanotoxicology”, it is necessary to standardize the *in vitro* toxicity experiments in terms of cell line type, cell density, cytotoxicity assay type and the different *in vitro* conditions. Since nanoparticle cytotoxicity data differ for different cell types, complimentary *in vivo* studies will be needed to confirm our findings *in vitro*.

Acknowledgements

Eidi H was financially supported by grant of the University of Al-Baath, Homs, Syria. The authors thank Rovi Pharmaceutical Laboratories (Madrid, Spain) for supplying the gift samples of bemparin. The authors also thank Dr G. Barratt for her help and support in reviewing the revised manuscript.

References

- AFSSAPS (French Agency for Safety of Health Products), October 2009. Recommendations for Toxicological Evaluation of Nanoparticle Medicinal Products. French Agency for Safety of Health Products.
- Aggarwal, P., Hall, J.B., Mcleland, C.B., Dobrovolskaia, M.A., Mcneil, S.E., 2009. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 428–437.
- Ahsan, F., Rivas, I.P., Khan, M.A., Torres Suarez, A.I., 2002. Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers—liposomes and microspheres—on the phagocytosis by macrophages. *J. Control. Release* 79, 29–40.
- Albrecht, C., Scherbar, A.M., van Berlo, D., Braunbarth, C.M., Schins, R.P., Scheel, J., 2009. Evaluation of cytotoxic effects and oxidative stress with hydroxyapatite dispersions of different physicochemical properties in rat NR8383 cells and primary macrophages. *Toxicol. Int. Vitro* 23, 520–530.
- Ardry, 1967. Dosage de l'héparine: étude critique. *Bull. Ordre.* 135, 699–708.
- Attik, G., Brown, R., Jackson, P., Creutzenberg, O., Aboukhamis, I., Rihn, B.H., 2008. Internalization, cytotoxicity, apoptosis, and tumor necrosis factor- α expression in rat alveolar macrophages exposed to various dusts occurring in the ceramics industry. *Inhal. Toxicol.* 20, 1101–1112.
- Bodmeier, R., Chen, H., Tyle, P., Jarosz, P., 1991a. Pseudoephedrine HCl microspheres formulated into an oral suspension dosage form. *J. Control. Release* 15, 65–77.
- Bodmeier, R., Chen, H., Tyle, P., Jarosz, P., 1991b. Spontaneous formation of drug-containing acrylic nanoparticles. *J. Microencapsul.* 8, 161–170.
- Brannon-Peppas, L., Blanchette, J.O., 2004. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 1649–1659.
- Committee on toxicity of chemicals in food consumer products and the environment, 2006. The toxicology of nanoparticles used in health care. *Annexe 2*.
- Couvreur, P., Vauthier, C., 2006. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. *Pharm. Res.* 23, 1417–1450.
- Dang, M.H., Birchler, F., Wintermantel, E., 1997. Toxicity screening of biodegradable polymers. II. Evaluation of cell culture test with medium extract. *J. Polym. Environ.* 5, 49–56.
- Delie, F., Berton, M., Allemann, E., Gurny, R., 2001. Comparison of two methods of encapsulation of an oligonucleotide into poly(D,L-lactic acid) particles. *Int. J. Pharm.* 214, 25–30.
- Donaldson, K., Stone, V., Tran, C.L., Kreyling, W., Borm, P.J., 2004. Nanotoxicology. *Occup. Environ. Med.* 61, 727–728.
- Dursun, B., He, Z., Somerset, H., Oh, D.J., Faubel, S., Edelstein, C.L., 2006. Caspases and calpain are independent mediators of cisplatin-induced endothelial cell necrosis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 291, F578–F587.
- Duval, R., Bellet, V., Delebasse, S., Bosgiraud, C., 2002. Implication of caspases during maedi-visna virus-induced apoptosis. *J. Gen. Virol.* 83, 3153–3161.
- Ferrari, M., 2005. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Cancer* 5, 161–171.
- Fessi, H., Puisieux, F., 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* 55, 1–4.
- Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J., Kissel, T., 2003. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* 24, 1121–1131.
- Fischer, H.C., Chan, W.C., 2007. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 565–571.
- Gao, N., Keane, M.J., Ong, T., Ye, J., Miller, W.E., Wallace, W.E., 2001. Effects of phospholipid surfactant on apoptosis induction by respirable quartz and kaolin in NR8383 rat pulmonary macrophages. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 175, 217–225.
- Gargouri, M., Sapin, A., Bouli, S., Becuwe, P., Merlin, J.L., Maincent, P., 2009. Optimization of a new non-viral vector for transfection: Eudragit nanoparticles for the delivery of a DNA plasmid. *Technol. Cancer Res. Treat.* 8, 433–444.
- Geys, J., Nemery, B., Hoet, P.H., 2009. Assay conditions can influence the outcome of cytotoxicity tests of nanomaterials: better assay characterization is needed to compare studies. *Toxicol. Int. Vitro* 24, 620–629.
- Hoffart, V., Lamprecht, A., Maincent, P., Lecompte, T., Vigneron, C., Ubrich, N., 2006. Oral bioavailability of a low molecular weight heparin using a polymeric delivery system. *J. Control. Release* 113, 38–42.
- Hull, R.D., Pineo, G.F., Raskob, G.E., 1998. The economic impact of treating deep vein thrombosis with low-molecular-weight heparin: outcome of therapy and health economy aspects. *Haemostasis* 28 (Suppl. 3), 8–16.
- Jiao, Y., Ubrich, N., Marchand-Arvier, M., Vigneron, C., Hoffman, M., Lecompte, T., Maincent, P., 2002. In vitro and in vivo evaluation of oral heparin-loaded polymeric nanoparticles in rabbits. *Circulation* 105, 230–235.
- Jones, C.F., Grainger, D.W., 2009. In vitro assessments of nanomaterial toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 438–456.
- Kabanov, A.V., 2006. Polymer genomics: an insight into pharmacology and toxicology of nanomedicines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 1597–1621.
- Kean, T., Roth, S., Thanou, M., 2005. Trimethylated chitosans as non-viral gene delivery vectors: cytotoxicity and transfection efficiency. *J. Control. Release* 103, 643–653.
- Kong, N., Jiang, T., Zhou, Z., Fu, J., 2009. Cytotoxicity of polymerized resin cements on human dental pulp cells in vitro. *Dent. Mater.* 25, 1371–1375.
- Kroll, A., Pillukat, M.H., Hahn, D., Schnekenburger, J., 2009. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72, 370–377.
- Lamprecht, A., Koenig, P., Ubrich, N., Maincent, P., Neumann, D., 2006. Low molecular weight heparin nanoparticles: mucoadhesion and behaviour in Caco-2 cells. *Nanotechnology* 17, 3673–3680.
- Lane, K.B., Egan, B., Vick, S., Abdolrasulnia, R., Shepherd, V.L., 1998. Characterization of a rat alveolar macrophage cell line that expresses a functional mannose receptor. *J. Leukoc. Biol.* 64, 345–350.
- Lanone, S., Rogerieux, F., Geys, J., Dupont, A., Maillot-Marchal, E., Boczkowski, J., Lacroix, G., Hoet, P., 2009. Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. *Part Fibre Toxicol.* 6, 14.
- Lison, D., Thomassen, L.C., Rabolli, V., Gonzalez, L., Napierska, D., Seo, J.W., Kirsch-Volders, M., Hoet, P., Kirschhock, C.E., Martens, J.A., 2008. Nominal and effective dosimetry of silica nanoparticles in cytotoxicity assays. *Toxicol. Sci.* 104, 155–162.
- Liu, Z., Wu, X.Y., Bendayan, R., 1999. In vitro investigation of ionic polysaccharide microspheres for simultaneous delivery of chemosensitizer and antineoplastic agent to multidrug-resistant cells. *J. Pharm. Sci.* 88, 412–418.
- Lopedota, A., Trapani, A., Cutrignelli, A., Chiarantini, L., Pantucci, E., Curci, R., Manuali, E., Trapani, G., 2009. The use of Eudragit RS 100/cyclodextrin nanoparticles for the transmucosal administration of glutathione. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72, 509–520.
- Luong-Van, E., Grøndahl, L., Chua, K., Leong, K.W., Nurcombe, V., Cool, S.M., 2006. Controlled release of heparin from poly(ϵ -caprolactone) electrospun fibers. *Biomaterials* 27, 2042–2050.
- Maincent, P., Devissaguet, J.P., Leverage, R., Sado, P.A., Couvreur, P., 1984. Preparation and in vivo studies of a new drug delivery system. Nanoparticles of alkylcyanoacrylate. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 10, 263–265.
- Maincent, P., Le Verge, R., Sado, P., Couvreur, P., Devissaguet, J.P., 1986. Disposition kinetics and oral bioavailability of vincamine-loaded polyalkyl cyanoacrylate nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* 75, 955–958.
- Matute-Bello, G., Martin, T.R., 2003. Science review: apoptosis in acute lung injury. *Crit. Care* 7, 355–358.
- Medina, C., Santos-Martinez, M.J., Radomski, A., Corrigan, O.I., Radomski, M.W., 2007. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *Br. J. Pharmacol.* 150, 552–558.
- Mohanraj, V.J., Chen, Y., 2006. Nanoparticles—a review. *Trop. J. Pharm. Res.* 5, 561–573.
- Morgan, D.M., Clover, J., Pearson, J.D., 1988. Effects of synthetic polycations on leucine incorporation, lactate dehydrogenase release, and morphology of human umbilical vein endothelial cells. *J. Cell Sci.* 91 (Pt 2), 231–238.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Mueller, H., Kassack, M.U., Wiese, M., 2004. Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *J. Biomol. Screen* 9, 506–515.
- Murillo, M., Gamazo, C., Goni, M., Irache, J., Blanco-Prieto, M., 2002b. Development of microparticles prepared by spray-drying as a vaccine delivery system against brucellosis. *Int. J. Pharm.* 242, 341–344.
- Murillo, M., Gamazo, C., Irache, J.M., Goni, M.M., 2002a. Polyester microparticles as a vaccine delivery system for brucellosis: influence of the polymer on release, phagocytosis and toxicity. *J. Drug Target.* 10, 211–219.
- Nafee, N., Schneider, M., Schaefer, U.F., Lehr, C.M., 2009. Relevance of the colloidal stability of chitosan/PLGA nanoparticles on their cytotoxicity profile. *Int. J. Pharm.* 381, 130–139.
- Nguea, H.D., de Reydellet, A., le Faou, A., Zaiou, M., Rihn, B., 2008. Macrophage culture as a suitable paradigm for evaluation of synthetic vitreous fibers. *Crit. Rev. Toxicol.* 38, 675–695.
- Oberdorster, G., Oberdorster, E., Oberdorster, J., 2005b. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113, 823–839.
- Pennati, R., Gropelli, S., Zega, G., Biggiogero, M., de Bernardi, F., Sotgia, C., 2006. Toxic effects of two pesticides, Imazalil and Triadimefon, on the early development of the ascidian *Phallusia mammillata* (Chordata, Ascidiacea). *Aquat. Toxicol.* 79, 205–212.
- Pertuit, D., Moulari, B., Betz, T., Nadaradjane, A., Neumann, D., Ismaili, L., Refouvet, B., Pellequer, Y., Lamprecht, A., 2007. 5-Amino salicylic acid bound nanoparticles for the therapy of inflammatory bowel disease. *J. Control. Release* 123, 211–218.
- Pignatello, R., Bucolo, C., Ferrara, P., Maltese, A., Puleo, A., Puglisi, G., 2002. Eudragit RS100 nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen. *Eur. J. Pharm. Sci.* 16, 53–61.
- Pison, U., Welte, T., Giersig, M., Groneberg, D.A., 2006. Nanomedicine for respiratory diseases. *Eur. J. Pharmacol.* 533, 341–350.
- Schatzlein, A.G., 2006. Delivering cancer stem cell therapies—a role for nanomedicines? *Eur. J. Cancer* 42, 1309–1315.

- Schubert, M.A., Muller-Goymann, C.C., 2005. Characterisation of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): influence of lecithin and nonionic emulsifier. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 61, 77–86.
- Schulze, Kroll, A., Lehr, C.-M., Schaumlfer, U.F., Becker, K., Schnekenburger, J., Schulze Isfort, C., Landsiedel, R., Wohleben, W., 2008. Not ready to use—overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media. *Nanotoxicology* 2, 51–61.
- Shih, C.M., Wu, J.S., Ko, W.C., Wang, L.F., Wei, Y.H., Liang, H.F., Chen, Y.C., Chen, C.T., 2003. Mitochondria-mediated caspase-independent apoptosis induced by cadmium in normal human lung cells. *J. Cell Biochem.* 89, 335–347.
- Soma, C.E., Dubernet, C., Barratt, G., Benita, S., Couvreur, P., 2000. Investigation of the role of macrophages on the cytotoxicity of doxorubicin and doxorubicin-loaded nanoparticles on M5076 cells in vitro. *J. Control. Release* 68, 283–289.
- Sun, T.M., Du, J.Z., Yan, L.F., Mao, H.Q., Wang, J., 2008. Self-assembled biodegradable micellar nanoparticles of amphiphilic and cationic block copolymer for siRNA delivery. *Biomaterials* 29, 4348–4355.
- Suri, S.S., Fenniri, H., Singh, B., 2007. Nanotechnology-based drug delivery systems. *J. Occup. Med. Toxicol.* 2, 16.
- Ubrich, N., Schmidt, C., Bodmeier, R., Hoffman, M., Maincent, P., 2005. Oral evaluation in rabbits of cyclosporin-loaded Eudragit RS or RL nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 288, 169–175.
- Unger, F., Wittmar, M., Kissel, T., 2007. Branched polyesters based on poly[vinyl-3-(dialkylamino)alkylcarbamate-co-vinyl acetate-co-vinyl alcohol]-graftpoly(D,L-lactide-co-glycolide): effects of polymer structure on cytotoxicity. *Biomaterials* 28, 1610–1619.
- Vaquettea, C., Babak, V.G., Baros, F., Boulanouar, O., Dumas, D., Fievet, P., Kildeeva, N.R., Maincent, P., Wang, X., 2008. Zeta-potential and morphology of electrospun nano- and microfibers from biopolymers and their blends used as scaffolds in tissue engineering. *Mendeleev Commun.* 18, 38–41.
- Verma, A., Stellacci, F., 2010. Effect of surface properties on nanoparticle–cell interactions. *Small* 6, 12–21.
- Wong, H.L., Rauth, A.M., Bendayan, R., Manias, J.L., Ramaswamy, M., Liu, Z., Erhan, S.Z., Wu, X.Y., 2006. A new polymer-lipid hybrid nanoparticle system increases cytotoxicity of doxorubicin against multidrug-resistant human breast cancer cells. *Pharm. Res.* 23, 1574–1585.
- Yokoyama, M., 2005. Drug targeting with nano-sized carrier systems. *J. Artif. Organs* 8, 77–84.
- Zhang, L., Gu, F.X., Chan, J.M., Wang, A.Z., Langer, R.S., Farokhzad, O.C., 2008. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clin. Pharmacol. Ther.* 83, 761–769.

Dans ce travail sur la toxicité de différentes préparations de NP, les données concernant les caractéristiques physico-chimiques des NPs montrent qu'elles ont tendance à former des agglomérats (5-10 μm) dans le milieu de culture. La formation de tels agglomérats micrométriques peut induire une réduction significative de la concentration des particules nanométriques libres. *In vivo*, une opsonisation des NPs par des protéines sériques, facilitant leur phagocytose par les macrophages est possible [144]. Ces phénomènes peuvent affecter la biodistribution et la biocompatibilité des NPs en cas d'administration à l'animal ou à l'homme [145] et entraîner une sous-estimation de la toxicité des NPs.

Nous avons également montré que les NPs vides ont une toxicité plus importante que celles chargées avec l'HBPM. En effet, l'encapsulation de l'héparine dans les NPs d'ERS, polycationiques, neutralise leurs charges positives et modifie leur taille ce qui peut réduire leur internalisation.

Pour déterminer l'origine de cette toxicité au niveau cellulaire et moléculaire, nous avons mis en place une étude afin d'étudier l'internalisation des NPs, leur cible intracellulaire ainsi que leur effet sur l'expression de gènes et le type de mort cellulaire induit en utilisant les particules les plus toxiques, NP/ERS⁻, (cf. l'article II et III ci-après).

2. Article II: *Nano systems for drug delivery: Which gap in preclinical studies?*

Le résumé d'une conférence sur invitation au 47^{ème} Congrès des Sociétés Européennes de Toxicologie (EUROTOX) a été publié dans *Toxicology Letters. Volume 205, Supplement, 28 August 2011, Pages S43-S44. OS5-1 (impact factor 3.581, en Octobre 2011).*

Un poster résumant les premiers résultats de la suite de notre travail a été également présenté à ce congrès (Figure 14). Nous avons étudiés les effets des NPs d'ERS vides qui ont été trouvées les plus toxiques dans le travail présenté dans l'article I au niveau moléculaire pour déterminer le mécanisme de leur cytotoxicité et le type de mort cellulaire provoquée par ces particules. Les résultats sont exposés dans l'*International Journal of Pharmaceutics* (cf. Article III) en décembre 2011.

Nano systems for drug delivery: Which gap in preclinical studies?



Eidi H, Joubert O, Safar R, Maincent P and Rihn BH
EA 3452, School of Pharmacy, Nancy-University, 54001 Nancy cedex.

Nancy-Université

BACKGROUND

Recently, we reported that empty Eudragit® RS (ERS) nanoparticles prepared by nanoprecipitation techniques (NP/ERS) impair cellular membrane integrity and mitochondrial functions of a NR8383 macrophage cell line (Eidi et al, 2010). To fill a gap in toxicology assessment, complementary preclinical study of RS nanoparticles was needed. In this study, we investigated both biochemical and morphological effects of NP/ERS as well as their effects on gene expressions nanoparticles using NR8383 cells as an *in vitro* model.

MATERIALS AND METHODS

I. Nanoparticles

- ✓ polymer: Eudragit™ RS (ERS)
- ✓ NP/ERS- nanoparticles: prepared with the nanoprecipitation method and positively charged (+40mV, 55nm).

II. Electron microscopic: to check (i) cellular uptake by NR8383 macrophages and (ii) nanoparticle integrity, TEM and SEM were used.

III. Transcriptomic microarray

- ✓ NR8383 rat macrophages were incubated with two doses (25 or 100µg/ml) of NP/ERS- nanoparticles
- ✓ RNA were hybridized on Agilent 4 x 44 K Whole Rat Genome Microarray™
- ✓ Data were analyzed using Agilent Feature Extraction Software and GeneSpring GX software (Agilent Technologies, Palo Alto, USA).

IV. q-PCR and Western blot: Microarray result confirmation was evaluated with a Stratagene MX3000P device

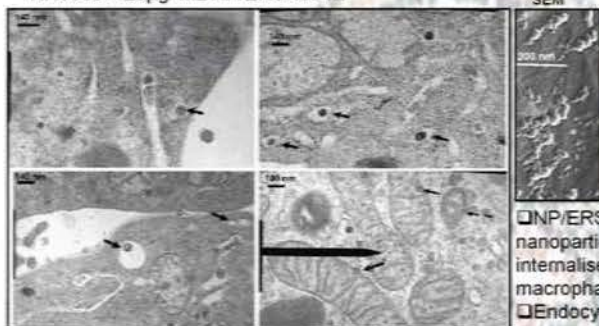
V. Immunofluorescence assay: LC3 protein conversion into the LC3-II isoform, an autophagy marker, was assessed by immunostaining.

RESULTS

I. Electron microscopic analysis

1. Nanoparticle internalisation by macrophages

NR8383 + 25µg/ mL NP/ERS for 1h

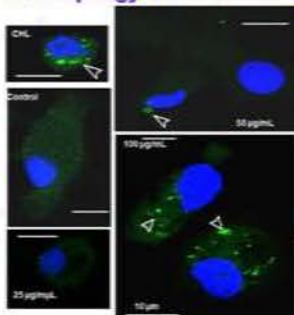


□ They reached the mitochondria that lost their physiological shape and integrity.

III. Transcriptomic microarray

GO ID and GO Terms	Symbol	100 µg/mL	Fold change
Autophagic vacuole formation	<i>atg16l1</i>	up	2.3
Apoptosis	<i>opa1</i>	down	2.3

V. Autophagy confirmation by Immunofluorescence



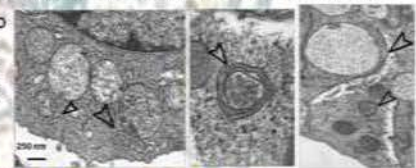
□ CHL: chloroquine, a positive control of autophagy.

□ A dose-dependent accumulation of LC3-positive vesicles in NR8383 cells in comparison to no exposed cells.

LC3-II DNA

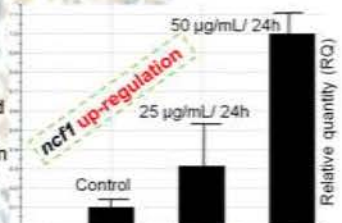
2. Autophagy induced in treated cells by NP/ERS-

□ cells displayed also autophagic changes such as phagophore and autophagosome (multi membrane structures)

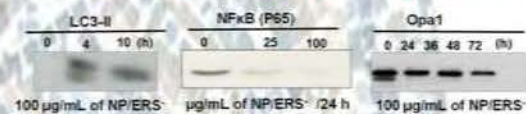
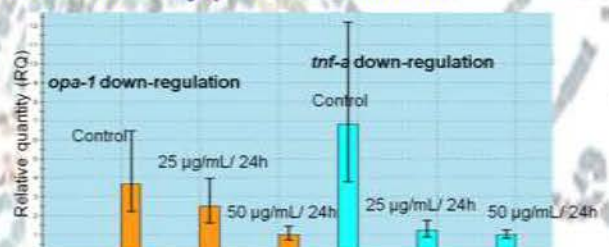


II. Oxidative stress assessment

□ *ncf1* encodes a subunit of NADPH oxidase located in phagolysosome and responsible for ROS formation in oxidative burst.



IV. Result confirmation by q-PCR and Western blot



□ Mitochondria decay is confirmed by microarray and western blot analysis that revealed an *opa1* gene and protein down-expression.

DISCUSSION AND CONCLUSION

We reported for the first time that polymeric nanoparticles designed for drug delivery systems:

- ✓ penetrated per unit by endocytosis in macrophages,
- ✓ were retrieved in the vicinity of the inner membrane of mitochondria and inside of it,
- ✓ induced an oxydative stress as well as mitochondrial decay through phagophore and autophagosome formation,
- ✓ activated the autophagic pathway in NR8383 macrophages leading to mitochondrial decay.

Synair Mosaic

Figure 14 : Poster présenté au 47ème Congrès des Sociétés Européennes de Toxicologie (EUROTOX), août 2011 à Paris.



Articles All fields Author
Images Journal/Book title Volume Issue Page

[Back to results](#) | [< Previous](#) **145 of 971** [Next >](#)

[PDF \(64 K\)](#) | [Export citation](#) | [E-mail article](#) | [Highlight keywords on](#)

Article

[Thumbnails](#) | [Full-Size images](#)

Toxicology Letters
Volume 205, Supplement, 28 August 2011, Pages S43-S44
Abstracts of the 47th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX)



doi:10.1016/j.toxlet.2011.05.173 | [How to Cite or Link Using DOI](#)

[Permissions & Reprints](#)

OS5-1

Nano systems for drug delivery: Which gap in preclinical studies?

B. Rihn , H. Eidi, O. Joubert, C. Némos, S. Grandemange, P. Maincent, B. Mograbi, L. Marocci

EA 3452, Faculté de Pharmacie, Nancy, France

Available online 22 July 2011.

OS5**Toxicology of Nanomaterials****OS5-1****Nano systems for drug delivery: Which gap in preclinical studies?**

B. Rihn*, H. Eidi, O. Joubert, C. Némos, S. Grandemange, P. Maincent, B. Mograbi, L. Marocci

EA 3452, Faculté de Pharmacie, Nancy, France

Recently, we reported that empty Eudragit® RS (RS-) nanoparticles used as drug delivery systems and prepared by nanoprecipitation techniques or double emulsion impair cellular membrane integrity and mitochondrial functions of a NR8383 macrophage cell line. Particles prepared by nanoprecipitation were more toxic than those prepared by double emulsion. To understand the molecular events that underlie cytotoxicity, we investigated both biochemical and morphological effects of RS-nanoparticles on NR8383 cells. All together our data confirm the occurrence of the cytotoxic effect of nanoparticles via mitochondrial decay as they (i) penetrated per unit by endocytosis in macrophages, (ii) were described in the vicinity of the inner membrane of mitochondrion and inside of

it, and (iii) induced mitochondrial decay through phagophore and autophagosome formation. Indeed nanoparticle effects on mitochondria were confirmed by a transcriptomic analysis that revealed over-expression of Opa1, a dynamin-related GTPase located in the inner membrane of mitochondria. It was also shown that the proautophagic gene – Atg16L1 – was up-regulated. The results presented in our study on immune system cells should prompt researchers in nanomedicine and toxicologists to test autophagy as well as cell necrosis or apoptosis for pharmacological safety since they might alter functions of immune system with potential consequence on human health.

This work was supported by ANR2010_93.

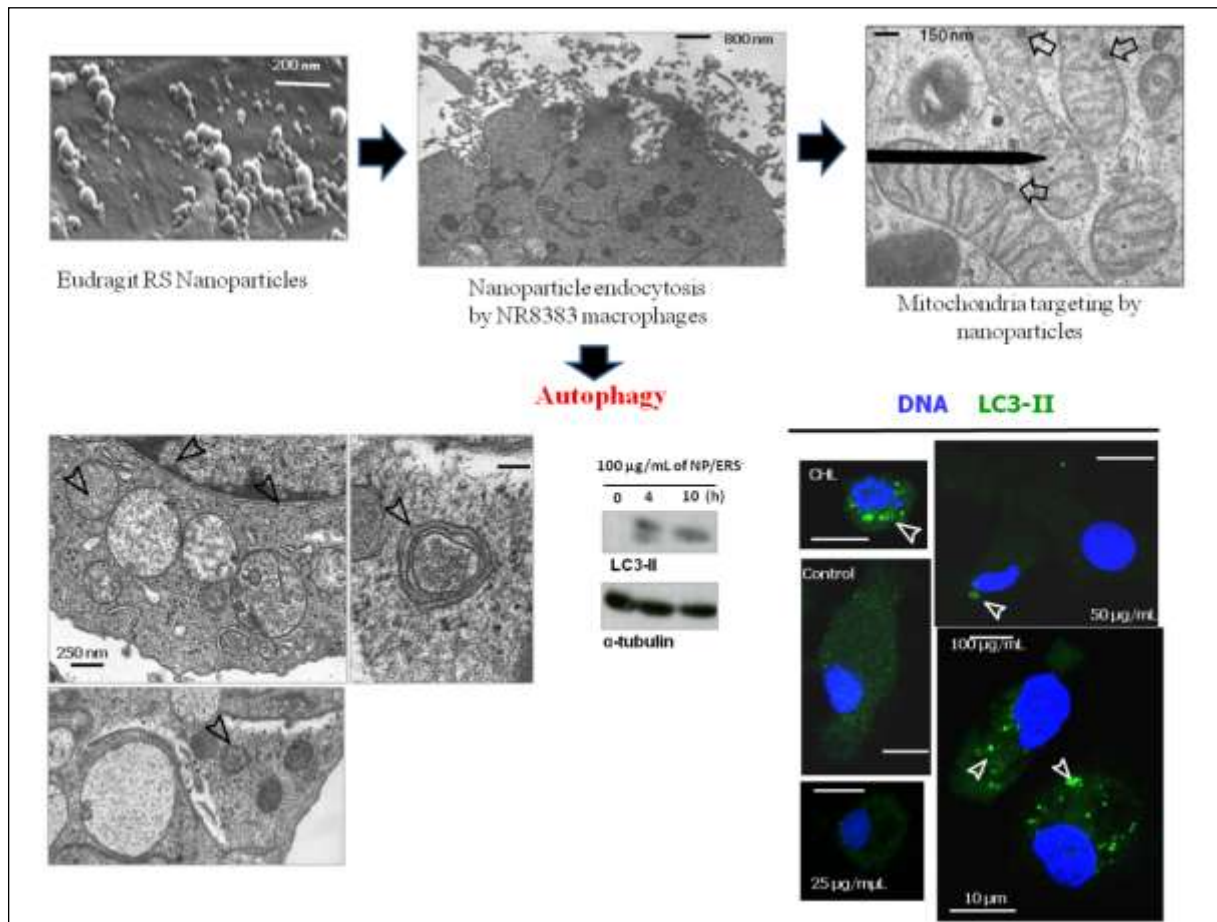
doi:10.1016/j.toxlet.2011.05.173

3. Article III: *Drug delivery nanoparticles are autophagic inducers in macrophages*

Ce travail comprend trois parties. Une étude morphologique de l'internalisation des NPs dans les macrophages de rats par microscopie électronique, une évaluation de l'expression des gènes par l'étude du transcriptome de macrophages de rat avec des puces à ADN (*microarray*) et enfin une étude par RT-PCR quantitative et Western-blot des principaux gènes dont l'expression était la plus modifiée. Les gènes pro-apoptotiques de la voie extrinsèque de l'apoptose, *tnf- α* et *casp 8*, sont sous-régulés; ainsi que les gènes anti-apoptotiques impliqués dans la voie intrinsèque, *bcl-2* et *nfbk*. Ces éléments suggèrent que la voie intrinsèque de l'apoptose serait impliquée. Cependant, ni la fragmentation de l'ADN, ni l'activation de la Poly (ADP-Ribose) Polymérase (PARP), deux marqueurs essentiels de l'apoptose, n'ont été observées. Par contre les études en microscopie électronique et la sur-régulation du gène pro-autophagique, *atg16l* sont en faveur d'une cytotoxicité due à un processus autophagique dans les cellules traitées par les NPs.

La microscopie électronique à transmission a montré que les NPs pénètrent par endocytose de manière unitaire et sont retrouvées dans les mitochondries. Ces dernières, dans les cellules traitées avec les NPs, sont altérées avec perte des *cristae* (Article II, Figure 3c et d). Cette souffrance mitochondriale a été confirmée par la sous-expression du gène *opa1* et de la protéine correspondante. Ces résultats ont été publiés dans *International Journal of Pharmaceutics* (*Impact Factor*: 3,607, en Novembre 2011).

Graphical abstract





Pharmaceutical nanotechnology

Drug delivery by polymeric nanoparticles induces autophagy in macrophages

Eidi H.^a, Joubert O.^a, Némós C.^{b,e}, Grandemange S.^c, Mograbi B.^d, Foliguet B.^e, Tournebize J.^a, Maincent P.^a, Le Faou A.^a, Aboukhamis I.^f, Rihn B.H.^{a,*}

^a Faculté de Pharmacie, EA 3452 CITHEFOR, Nancy-Université, 54001 Nancy Cedex, France

^b Human Genetics Laboratory, EA 4368, Centre Hospitalier et Universitaire de Nancy, Nancy-Université, Vandoeuvre-Lès-Nancy, Nancy, France

^c Faculté de Sciences et Technique, EA 4421 SIGRETO, Nancy-Université, Vandoeuvre-Lès-Nancy, Nancy, France

^d Inserm ERI-21/EA 4319, Faculté de Médecine, University of Nice Sophia-Antipolis, Nice, France

^e Histology-Embryology-Cytogenetics Department of Faculté de Médecine, Nancy-Université, Vandoeuvre-Lès-Nancy, Nancy, France

^f Biochemistry Department, Arab European University and Damascus University, Damascus, Syria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 September 2011

Received in revised form 9 November 2011

Accepted 12 November 2011

Available online 22 November 2011

Keywords:

Nanoparticles

Drug delivery

Autophagy

Apoptosis

Microarray

Mitochondria

ABSTRACT

Drug delivery nanosystems are currently used in human therapy. In preliminary studies we have observed that Eudragit® RS nanoparticles, prepared by nanoprecipitation or double emulsion techniques, are cytotoxic for NR8383 rat macrophages. In this study, we expand our previous analysis and suggest that unloaded Eudragit® RS nanoparticles prepared by nanoprecipitation (NP/ERS) may induce important morphological and biochemical cellular modifications leading to cellular death. In NR8383 rat macrophages cell line exposed to doses varying from 15 to 100 µg/mL, NP/ERS nanoparticles are internalized inside the cells, reach the mitochondria and alter the structure of these organelles. In addition, the exposure to nanoparticles induces cellular autophagy as demonstrated by electron microscopy analysis, microchip array, qRT-PCR and Western blot assays. Although toxicity of nanoparticles has already been evidenced, it is the first time that results show clearly that the toxicity of polymeric nanovectors may be related to an activation of autophagy.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Nano-drug delivery systems (NDDS) based on polymeric biomaterials have received considerable interest as drug delivery vehicles, and as nonviral gene delivery systems (Unger et al., 2007). Nanoparticles used as drug delivery vehicles are generally <500 nm in at least one dimension, and consist of different biodegradable or non biodegradable materials such as natural or synthetic polymers, lipids or metals (Hoffart et al., 2006; Suri et al., 2007). Despite their wide use, their toxicity is seldom evaluated and the studies are limited, in most cases, to the effect of loaded nanoparticles. On the contrary, the toxicity of the unloaded

nanoparticles is not investigated and the mechanisms through which they might interfere with the cellular metabolism are largely unknown. Among the numerous available nanoparticles, those prepared from Eudragit® RS (ERS), a non-biodegradable positively charged copolymer, licensed for clinical use by the major health authorities of Europe, Japan and USA (Hoffart et al., 2006), are efficient NDDS. ERS nanoparticles prepared by nanoprecipitation (NP) or by double emulsion (DE) techniques containing ibuprofen (Pignatello et al., 2002), cyclosporin (Pignatello et al., 2002), indomethacin (Bhardwaj et al., 2010), melatonin (Schaffazick et al., 2008), DNA plasmid (Gargouri et al., 2009) and low molecular weight heparin (Jiao et al., 2002) (LMWH) have been obtained and suggested to be used for the treatment of different pathological conditions. A previous work from our laboratory has already shown, by using MTT and Trypan blue exclusion tests, that unloaded NP/ERS nanoparticles, at a final concentrations ranging from 25 to 400 µg/mL, have cytotoxic effects on the rat macrophage cell line NR8383 (Eidi et al., 2010). Additionally, other studies performed on ERS nanoparticles toxicity are scarce and often they are limited to cell survival (Gargouri et al., 2009; Lamprecht et al., 2006). Taking into consideration that (i) 44% of the total nanoparticles present in a formulation is empty (Eidi et al., 2010); (ii) as demonstrated in rabbits, nanoparticles reach the blood stream after oral administration (Hoffart et al., 2006) and that (iii) macrophages are among the first cells they interact with, we extended our study on the effect of

Abbreviations: CHL, chloroquine; DCFH₂-DA, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DE, double emulsion; DE/ERS, Eudragit® RS empty nanoparticles prepared by double emulsion technique; ERS, Eudragit® RS PO; GO, gene ontology terms; LPS, lipopolysaccharide; LMWH, low molecular weight heparin; NDA, naphthalene-2,3 dicarboxyaldehyde; NDDS, nano drug delivery systems; NP, nanoprecipitation; NP/ERS, Eudragit® RS PO empty nanoparticles prepared by nanoprecipitation technique; SWCNTs, single-walled carbon nanotubes; SDS, sodium dodecyl sulfate; SEM, scanning electron microscopy; TEM, transmission electronic microscopy.

* Corresponding author at: Faculté de Pharmacie, 5 rue Albert Lebrun, BP 80403, 54001 Nancy Cedex, France. Tel.: +33 0383 682 355; fax: +33 0383 682 301.

E-mail addresses: bertrand.rihn@pharma.uhp-nancy.fr, housam.eidi@gmail.com (B.H. Rihn).

NP/ERS on NR8383 rat macrophages, which evolve in fully activated macrophages (Nguea et al., 2008), with the aim to better elucidate the molecular mechanisms that may be responsible of the observed cytotoxicity and so to further address the safety issues surrounding nanoparticles use.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Eudragit® RS PO (ERS; MW = 150,000 Da) was a gift of Evonik polymers (Darmstadt, Germany). CAS number: 33434-24-1, chemical/IUPAC name: poly(ethyl acrylate-co-methyl methacrylate-co-trimethylammonioethyl methacrylate chloride) 1:2:0.1. INCI name: Acrylates/Ammonium Methacrylate Copolymer, molecular weight: 32 g/mol. Eudragit® RS PO was described in the following monographs: (i) European pharmacopoeia: Ammonio Methacrylate Copolymer, Type B; (ii) USA pharmacopoeia: Ammonio Methacrylate Copolymer, Type B – NF; (iii) Japanese pharmacopoeia: Aminoalkyl Methacrylate Copolymer RS. Pluronic® F68 [CAS number: 11104-97-5] (Saint-Quentin Fallavier, France) was used as surfactant for particle preparations. Reduced glutathione (GSH), naphthalene-2,3-dicarboxyaldehyde (NDA), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH₂-DA) and dichlorofluorescein (DCF) were purchased from Sigma–Aldrich (France).

2.2. Methods

2.2.1. Nanoparticle preparation

Nanoparticles were prepared by nanoprecipitation as previously described (Bodmeier et al., 1991; Fessi and Puisieux, 1989). Briefly, 300 mg of polymer were dissolved in 15 mL of acetone (organic phase). The solution was poured in a glass syringe, and flowed slowly under stirring, in 40 mL of a Pluronic® F68 (0.5%, w/v) aqueous solution. The solvent was removed by rotary evaporation under vacuum at 40 °C (Heidolph, Schwabach, Germany) and the solution concentrated to 15 mL.

2.2.2. Particle size measurement

Particle sizes were estimated by photon correlation spectroscopy (PCS) using a Zetasizer™ (Malvern Instruments Worcestersher, UK). Each sample was diluted with filtrated bidistilled water until the appropriate concentration of particles was achieved to avoid multiscattering events. Using cumulative analysis software and exponential sampling method, particle size (*z*-average) and polydispersity index of equivalent hydrodynamic spheres were determined using the results of three determinations.

2.2.3. Zeta potential measurement

Particle electrophoretic mobility was determined three times for each sample by laser Doppler anemometry in a microelectrophoresis cell of Zetasizer™.

2.2.4. Scanning electron microscopy (SEM)

Briefly, nanoparticles deposited on a plastic coverslip (Thermanox, 174950, Merck Eurolab, Strasbourg, France) were dehydrated by increased ethanol concentrations (25°, 50°, 70°, 90°, and 100°) and treated with hexamethyldisilazane for 10 min at room temperature. The coverslips were coated with gold. Preparations were observed under SEM (Stereoscan 240 S/N, Léo, Rueil-Malmaison, France) at less than 20 kV.

2.2.5. Cells and cell culture

The NR8383 rat alveolar macrophage cell line was purchased from the American Type Culture Collection (CRL-2192, ATCC,

Manassas, VA). Cells were grown as 50% adherent and 50% floating cells in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM: GIBCO Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 15% fetal calf serum (FCS, Eurobio, Les Ullis, France), 200 mM L-glutamine (G7513, Sigma–Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) and antibiotic (A5955, Sigma–Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) at 37 °C under 5% CO₂. Cells were treated with nanoparticles using this culture medium in all the following experiments.

2.2.6. Transmission electron microscopy (TEM)

Briefly, NR8383 cells were treated with 15 and 25 µg/mL of NP/ERS for 2 h, then they were immediately fixed with ice-cold 3% glutaraldehyde for 3 h. Cells were then post-fixed in 1% OsO₄ for 1 h at 4 °C, progressively dehydrated by increasing concentrations of ethanol and finally treated with propylene oxide and included in resin semi-fine (1.5 µm) and ultra-fine sections (70–90 nm) were prepared with an ultra-microtome (Reichert-Yung) and examined with the electron microscope Philips CM12 (FEI Electron Optics, Eindhoven, The Netherlands).

2.2.7. Total RNA extraction

Total RNA was extracted from cells, treated with 15 and 100 µg/mL of NP/ERS for 24 h, using RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France) following manufacturer instructions. RNA purity and concentration were determined spectrophotometrically using a NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

2.2.8. Microarray

Microarray experiments were performed following the MIAME (Minimal Information About a Microarray Experiment) criteria (Brazma et al., 2001). Briefly, RNA samples were extracted from NR8383 cells and melted at 65 °C. cDNA was then synthesized using M-MLV reverse transcriptase (RT) (EC 2.7.7.6.9, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). The cDNA was transcribed to cRNA using T7 RNA polymerase and labeled with fluorescent Cyanine 3-CTP. The cRNA (350 ng) was amplified and labeled using One-Color Gene Amp Labeling Kit (Agilent Technologies, Massy, France) following manufacturer's instructions, then purified using RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France) and quantified spectrophotometrically using a NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). The One-Color Spike-In Kit (Agilent Technologies, Massy, France) was used to provide positive controls. Before the hybridization step, 1.65 µg of cRNA was fragmented using the Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies, Massy, France) by incubation with fragmentation buffer and 10× blocking agent for 30 min at 60 °C. Fragmented cRNA was hybridized to Agilent 4× 44 K Whole Rat Genome Microarray (Agilent Technologies, Massy, France) using hybridization chambers (Agilent Technologies, Massy, France) and hybridization oven (Agilent Technologies, Massy, France) for 20 h at 65 °C. One-minute wash was performed twice using wash solution 1 and 2, respectively (Agilent Technologies, Massy, France). Microarrays were stabilized and dried by acetonitrile (Sigma–Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). The slides were scanned with the Agilent Microarray Scanner (Agilent technologies, Palo Alto, CA, USA) and the scanned images were extracted using Feature Extraction Software version 9.5.3 (Agilent). Analysis was performed with Genespring GX10 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

2.2.9. RNA reverse transcription and quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Total RNA (1 µg) from control or treated cell samples were reverse-transcribed with 50 nmol of oligo (dT) using M-MLV reverse transcriptase (RT) [EC 2.7.7.4.49, Invitrogen, Cergy Pontoise, France] following manufacturer's protocol. qRT-PCR was

Table 1
Primers sequences used in qRT-PCR experiments.

Primers	Sens	Anti sens
<i>s18</i>	5'-CGCCGCTAGACGTAGAATTCT-3'	5'CATTCTGGCAAATGCTTTGC-3'
<i>nfxb2</i>	5'-TTCGGAAGTGGGCAAATGTT-3'	5'-ACACGTAGCGGAATCGAAAT-3'
<i>opa1</i>	5'-TCTGTGCATTCAAGATGGA-3'	5'-GAGCTTTCATTGGGAAGAGC-3'
<i>tnf</i>	5'-TAGCCACGTCGTAGCAAAC-3'	5'-TGGTATGAAATGGCAAATCG-3'
<i>bcl2l13</i>	5'-TGGGATGCCTTTGTGGAATAT-3'	5'-GGTCTGCTGACCTCACTTGT-3'
<i>casp8</i>	5'-GGTTTCGCTACAGGGTTA-3'	5'-TCGTAATCGTCGATCCTCC-3'
<i>pdc4</i>	5'-GGTGTGCCCGTGTGGCAGT-3'	5'-GGCCCAACAATCGTGGTGTCT-3'
<i>ncf1</i>	5'-TTCACAACACTACGAGTGAA-3'	5'-TTATCTCTCTCCAGCCTTC-3'
<i>atg16l1</i>	5'-CTTGAATTCCCGCATTGCT-3'	5'-GCCTCGTATGCTTTGATGC-3'

performed with a Stratagene Mx3000p system and Mesa Green qPCR MasterMix Plus for SYBR® (RT-SY2X-03-WOULR, Eurogentec, Belgium). Briefly, 100 ng of reverse-transcribed RNA from each sample were mixed with appropriate concentrations of tested gene primers (Table 1) and the Mesa Green qPCR MasterMix. *MRPS18A* (*s18*) was used as internal control gene. PCR amplifications were carried out as follows: 5 min at 95 °C; 45 cycles (15 s at 95 °C, 40 s at 60 °C and 40 s at 72 °C). A standard curve was made for each gene and the subsequent slope was used to calculate the PCR reaction efficiency ($E = 10^{(-1/\text{slope})}$). For each sample, the gene expression level was calculated from the threshold cycle (C_t), which is the number of cycles necessary for the first detection of a PCR product.

2.2.10. Western blot

Total proteins (25 µg) from NR8383 cells either exposed (25 and 100 µg/mL of NP/ERS for 4, 10, 24, 36, 48 and 72 h) or not to nanoparticles were run on SDS-polyacrylamide gels (10%) as previously described (Corcelle et al., 2006; Laemmli, 1970) and transferred onto a PVDF membrane, followed by immunoblot analysis using monoclonal antibodies directed against anti-cleaved PARP (cat #552596, BD Biosciences Pharmingen, France), anti-p65 (cat #sc7178, Santa Cruz Biotechnology, France), mouse anti-OPA1 (cat #612606, BD Transduction Laboratories, France), anti LC3-II (clone 5F10; Nanotools, France), anti-actin (cat #C-11, Santa Cruz Biotechnology, France) or anti-tubulin (Santa Cruz Biotechnology, France) at the optimized dilutions. Bands were detected using an IgG polyclonal anti-mouse antibody conjugated to peroxidase (EC 1.11.1.7; Sigma) after addition of a chemiluminescent substrate (Roche).

2.2.11. Immunofluorescence

Cells were treated with either NP/ERS (0, 25, 50 and 100 µg/mL for 4 h) or chloroquine (CHL) CAs # [58175-87-4] as a positive control of autophagy (30 µM, 4 h). Cells deposited on a glass coverslip were fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde in PBS at 4 °C and washed in PBS. Nonspecific binding was blocked with 1% bovine serum albumin–PBS for 15 min. Anti-LC3 antibody (1/100) was applied overnight at 4 °C. After two washes with PBS, sections were incubated with FITC-conjugated anti-mouse secondary antibody for 1 h at room temperature. The preparations were examined under a confocal laser-scanning microscope (Zeiss LSM510 Meta™) fitted with a 405 and 488 krypton/argon laser for simultaneous detection of DAPI and FITC fluorescence.

2.2.12. Intracellular reduced glutathione (GSH) measurement

Reduced glutathione measurements were performed as previously described (Lewicki et al., 2006), with some modifications. Briefly, cells were dispensed (5×10^5 cells/well) into a 6-well microplate. Cells were incubated with 25 and 100 µg/mL of NP/ERS for 24 h. Then, cells were washed three times with PBS solution (pH 7.4), and 1 mL of lysis solution [0.5 M perchloric acid, 0.1 M HCl and 2 mM EDTA] was added to cells. In order to remove the precipitated protein, cell lysates were centrifuged at $10,000 \times g$ at 4 °C

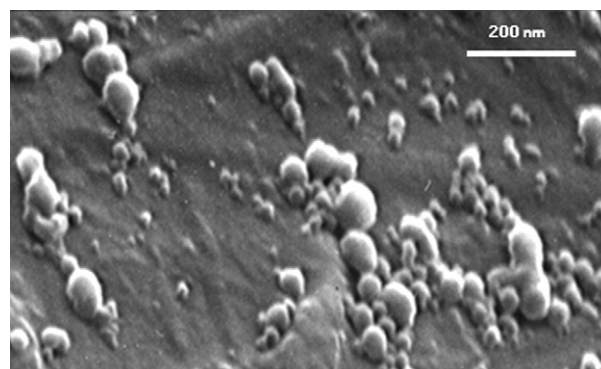


Fig. 1. SEM observation of NP/ERS nanoparticles.

for 15 min. 60 µL of supernatant, 120 µL of borate buffer (0.4 M, pH 9.2) and 20 µL of naphthalene-2,3- dicarboxyaldehyde (NDA) solution in ethanol were mixed in a 96-black well microplate and incubated in the dark at 4 °C for 25 min. Fluorescence intensity was then measured at 485-nm excitation and 528-nm emission using a microplate reader (Biotek Synergy). Results were expressed as nmol of GSH per mg of protein. Total protein quantity in cell lysate was determined by the Lowry method (Lowry et al., 1951).

2.2.13. Intracellular ROS measurement

The production of intracellular reactive oxygen species (ROS) was measured using an oxidation-sensitive fluorescent probe, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH₂-DA) (Wang and Joseph, 1999). DCFH₂-DA passively enters the cell where it reacts with ROS to form a highly fluorescent compound, namely the dichlorofluorescein (DCF). Briefly, cells were dispensed (5×10^5 cells/well) into a 6-well microplate. Cells were exposed to 25 and 100 µg/mL for 24 h of NP/ERS. Lipopolysaccharide (LPS) was used as a positive control of ROS production (1 µg/mL for 24 h). Cells were washed three times with PBS solution (pH 7.4), resuspended in 1 mL of 4 µM DCFH₂-DA solution and incubated for 40 min at 37 °C. Cells were lysed using a lysis buffer (0.5 M Tris–HCl, 1.5 M NaCl, 3.5 mM SDS, 16 mM Triton X-100 and 1 × protease inhibitor cocktail). The conversion of DCFH to the fluorescent product (DCF) was measured using a microplate reader (Biotek Synergy) with 485-nm excitation and 528-nm emission. ROS production was quantified from a DCF standard curve and results were expressed as DCF concentration (nM).

2.2.14. Statistical and data analysis

Microarray data and statistics were analyzed using GeneSpring GX10 software. Regarding qRT-PCR and array results, genes which showed more than a 2-fold or less than 0.5-fold intensity as compared to control, were considered respectively as up- or down-regulated (Lin et al., 2003). In our study, the differences between the control and the experimental group were evaluated with the one-paired *t*-test. *p*-Values ≤ 0.01 were considered as significant.

3. Results

3.1. Nanoparticle characterization

NP/ERS nanoparticles were positively charged ($+40.6 \pm 5$ mV) owing to the quaternary ammonium groups of the polycationic ERS polymer. In addition, these nanoparticles had a mean nominal diameter value of 54.2 ± 6 nm and a weak polydispersity index (0.5 ± 0.04). Particle size results obtained by Zetasizer™ were comparable to those measured by SEM analysis (Fig. 1).

Endocytosis

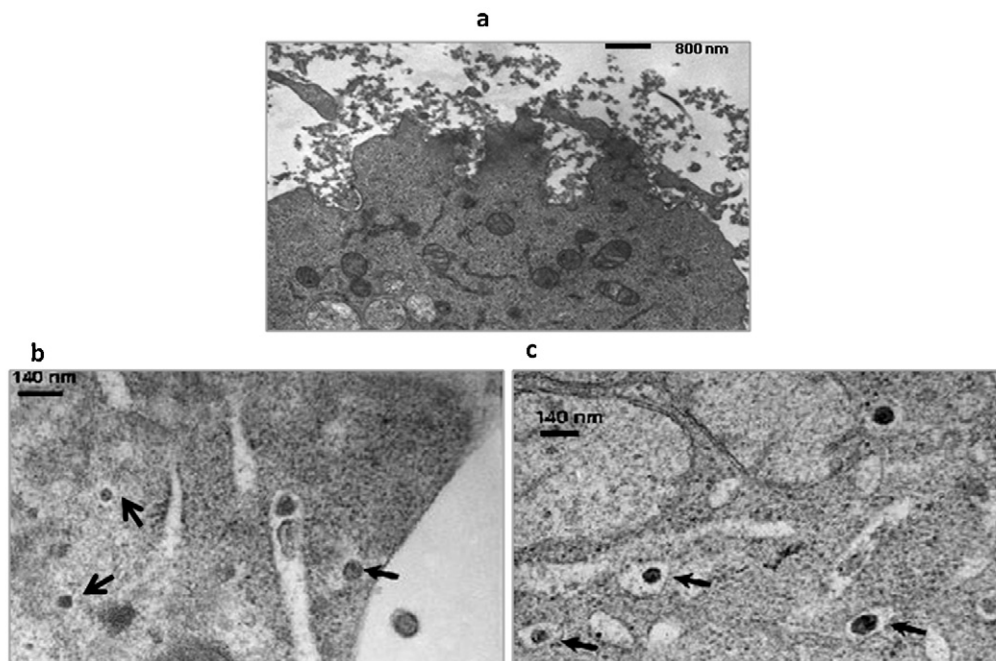


Fig. 2. Nanoparticle uptake by NR8383 macrophages. Macrophages exposed for 2 h to nanoparticles at a final concentration of 25 µg/mL (a) and 15 µg/mL (b and c). Arrows indicate internalized nanoparticles (a).

Mitochondria

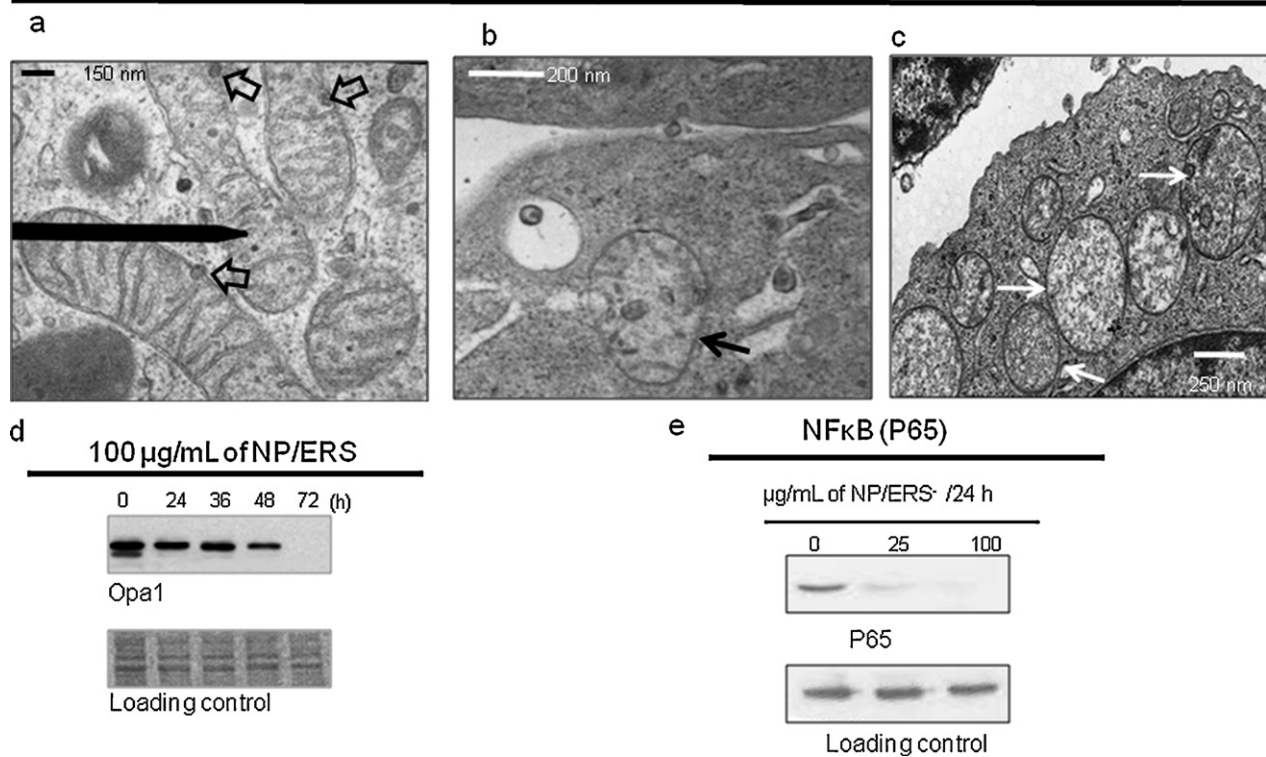


Fig. 3. Mitochondria are the intracellular target of NP/ERS nanoparticles. (a) Macrophages exposed to 15 µg/mL of nanoparticles for 1 h. Arrows indicate internalized nanoparticles into the cells and present on the border or inside the mitochondria. (b and c) Particle in an endosome and disorganization of *cristae* structure of mitochondria, cells were treated with 15 and 50 µg/mL of NP/ERS for 1 and 6 h, respectively. (d) and (e) Western blotting: (d) time-dependent down regulation of OPA1, (e) effect of nanoparticle concentration on the down regulation of NfκB (loading control is stained with Red Ponceau).

Autophagy

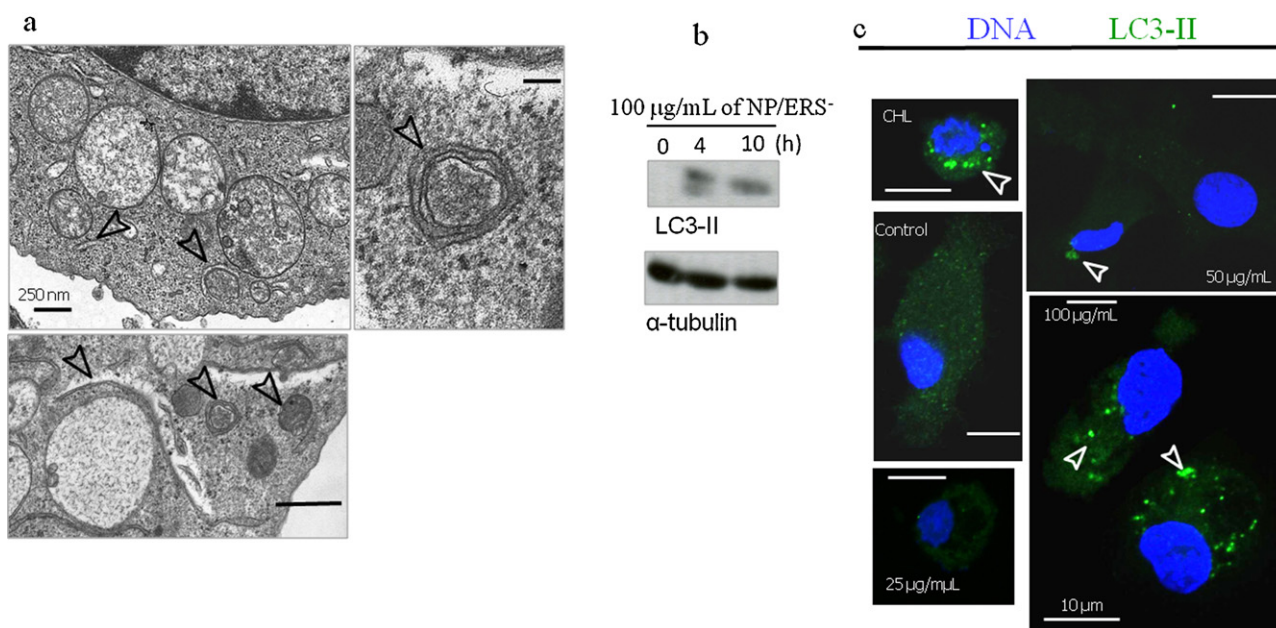


Fig. 4. Autophagy induced by NP/ERS particles. (a) Cells exposed to 50 µg/mL of nanoparticles for 6 h. Arrows indicate accumulation of double- and multi-membrane phagophores as well as lamellar autophagosomes. Note the dense aspect of mitochondria. (b) LC3-II protein levels obtained by Western blotting. No LC3-II protein was evidenced in control cells. Cells were exposed to 100 µg/mL of nanoparticles for 4 and 10 h, respectively. α -Tubulin was used as loading control. (c) In vitro accumulation of LC3-positive vesicles in NR8383 cells treated with NP/ERS observed by confocal fluorescence microscopy. Arrows indicate LC3-positive vesicles (green fluorescence). The blue fluorescence corresponds to DNA (stained with DAPI). (For interpretation of the references to color in the figure caption, the reader is referred to the web version of the article.)

3.2. TEM observations

Uptake of particles occurred in NR8383 macrophages upon incubation for 2 h with nanoparticles at a final concentration of 15 and 25 µg/mL. The particles were inside endosomes, free in the cytoplasm (Fig. 2a–c) or in contact with mitochondria. Some particles were inside those organelles, associated to their inner membrane (Fig. 3a). Alteration in the structure of mitochondria and disorganization of the *cristae* were also noted (Fig. 3b and c). When exposed to higher doses, namely 50 µg/mL for 6 h, cells displayed additional

modifications characteristic of autophagy such as phagophore and autophagosome formation (Fig. 4a).

3.3. Microarray result analysis

Cells exposed to 25 µg/mL or 100 µg/mL nanoparticles had 56 and 427 transcripts significantly and differentially expressed as compared to unexposed cells. Several down or up regulated genes were associated with autophagy, G-protein signaling pathway, apoptosis and oxidative stress (Table 2). The effect was dose dependent

Table 2

Incidence of nanoparticles on gene expression as measured by microarray analysis. Only genes showing a significant up or down regulation are noted ($p \leq 0.01$).

	Approved gene symbol	Fold change in gene expression \pm SD		HUGO approved gene name
		25 µg/mL	100 µg/mL	
GO ^a :0006915, apoptosis	<i>pdcd4</i>	-2.46 \pm 0.08	-4.16 \pm 0.09	Programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)
	<i>bcl2l13</i>	-	-2.18 \pm 0.05	BCL2-like 13 (apoptosis facilitator)
	<i>bfar</i>	-	-2.13 \pm 0.04	Bifunctional apoptosis regulator
	<i>casp8</i>	-	-2.00 \pm 0.03	Caspase 8
	<i>rtkn</i>	-	+2.08 \pm 0.07	Rhotekin
	<i>opa1</i>	-	-2.23 \pm 0.03	Optic atrophy 1 (autosomal dominant)
	<i>tnfrsf5</i>	-	+2.26 \pm 0.09	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5
GO:0007165, signal transduction	<i>tnf</i>	-	-2.53 \pm 0.06	Tumor necrosis factor (<i>tnf</i> superfamily, member 2)
	<i>arhgap22</i>	-	+2.07 \pm 0.8	Rho GTPase activating protein 22
	<i>rhov</i>	-	+2.17 \pm 0.05	ras homolog gene family, member V
GO:0003824, catalytic activity	<i>atg16l1</i>	-	+2.30 \pm 0.03	atg16 autophagy related 16-like 1
GO:0001664, G-protein coupled receptor binding	<i>apln</i>	-	+2.20 \pm 0.09	Apelin
GO:0003700, transcription factor activity	<i>nfkb2</i>	-	-2.61 \pm 0.04	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)
GO: response to oxidative stress	<i>gclc</i>	-	+2.53 \pm 0.04	<i>Rattus norvegicus</i> glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit

^a Gene ontology terms.

Table 3
Incidence of nanoparticles on gene expression as measured by RT-qPCR ($p \leq 0.01$).

Approved gene symbol	Fold change \pm SD	
	NP/ERS (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	NP/ERS (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
<i>pdcd4</i>	-1.22 ± 0.07	-2.10 ± 0.08
<i>bcl2</i>	-1.29 ± 0.06	-2.00 ± 0.05
<i>casp8</i>	-0.85 ± 0.04	-1.90 ± 0.03
<i>opa1</i>	-1.35 ± 0.05	-2.45 ± 0.04
<i>tnf</i>	-1.00 ± 0.02	-1.80 ± 0.08
<i>nfkcb2</i>	-1.76 ± 0.07	-2.28 ± 0.05
<i>atg16l1</i>	$+19.20 \pm 0.92$	$+17.45 \pm 0.68$
<i>ncf1</i>	$+4.78 \pm 0.14$	$+9.82 \pm 0.29$

– and + indicate under- and up-expression, respectively as compared to untreated cells.

and more pronounced in 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ treated cells. The exposure of cells to nanoparticles at a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ resulted in the down regulation of the *opa1* gene, of the two anti-apoptotic genes *bcl2l13* and *nfkcb2* and of the bifunctional apoptosis regulator (*bfar*) as well as of the pro-apoptotic genes *casp8* and *pdcd4*. On the contrary, the *tnfrsf5* genes (TNF receptor superfamily member 5 and cd40), the anti-apoptotic genes [*rhov* and *arhgap22* (a rho GTPase activating protein), *rtkn* (the rho effector rhotekin) and *apl* (apelin related to G-proteins)] as well as *atg16l1* a pro-autophagic gene encoding for a protein belonging to a large protein complex necessary for autophagy (Saitoh et al., 2008), were up regulated. The gene of the glutamate-cysteine ligase (a key gene in the glutathione homeostasis) catalytic subunit (*gclc*) was also up regulated in cells treated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NP/ERS (Table 2).

3.4. qRT-PCR

qRT-PCR confirmed the microarray data indicating a down-expression of *opa1*, *bcl2l13*, *pdcd4*, *casp8*, *tnf* and *nfkcb2* in 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ particle-treated cells (Table 3). Our results showed also a significant up regulation of *atg16l1* in cells treated with 25 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of NP/ERS (Table 3). Additionally, a dose-dependent up regulation of *ncf1* (neutrophil cytosolic factor 1), an $\text{O}_2^{\cdot-}$ generating enzyme, was evidenced (Table 3)

3.5. Western blot

Western blot showed a time- and dose-dependent decrease of OPA1 and NF κ B protein content in cells exposed to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NP (Fig. 3d and e). In agreement with up regulation of the autophagy *atg16l1* gene, above reported, the conversion of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) into the LC3-II isoform, a common autophagy marker (Asanuma et al., 2003), was also detected in nanoparticle exposed cells (Fig. 4b). Additionally, no poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) protein fragmentation was detected in the NP/ERS-treated cells whatever the nanoparticle concentration (data not shown).

3.6. Immunofluorescence assay

Treatment of NR8383 with NP/ERS at a final concentration of 25, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 4 h induced a dose-dependent accumulation of LC3-positive vesicles (Fig. 4c).

3.7. Intracellular GSH

Our data showed a significant decrease of intracellular reduced GSH ($\sim 52\%$) in cells treated with the higher concentration of NP/ERS, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h, as compared to control (Fig. 5).

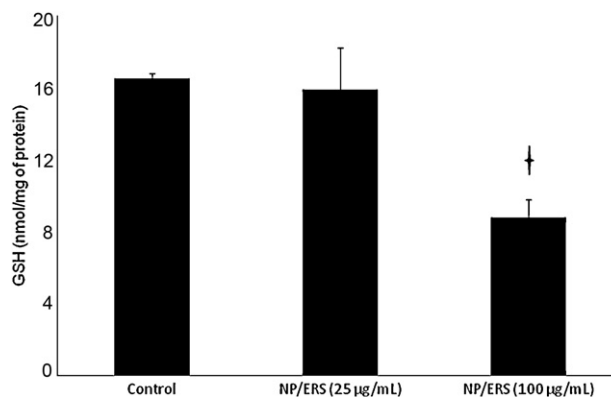


Fig. 5. The decrease of intracellular reduced GSH level in NR8383 cells exposed to 25 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of NP/ERS for 24 h. Data were expressed as nmol of GSH per mg of protein. Dagger indicates a significant difference at $p \leq 0.01$.

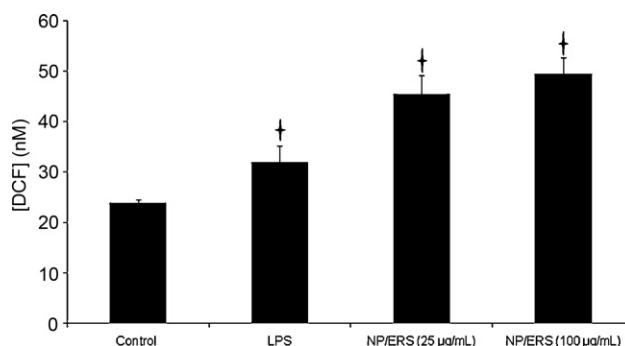


Fig. 6. Intracellular ROS level increase in NR8383 cells after a 24 h exposure to NP/ERS. LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) is used as a ROS inducer. Dagger indicates a significant difference at $p \leq 0.01$.

3.8. ROS production

A significant increase of ROS production ratio, expressed by DCF concentration (nM), was evidenced in cells incubated with 25 (~ 1.9 times) and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (~ 2.1 times) of NP/ERS for 24 h as compared to unexposed cells (Fig. 6).

4. Discussion

4.1. NP/ERS uptake by NR8383 macrophages and mitochondria targeting

It has been reported that endocytosis pathway plays a fundamental role in a wide range of cellular function; in particular it affects the functions of mitochondria (Polo and Di Fiore, 2006). Uptake of particles by endocytosis depends primarily on their size and ionic charge (Xia et al., 2006). It has been documented that cationic and small diameter nanoparticles, such as 60 nm NH_2 -labeled nanospheres, are internalized into the cells and gain access to cellular organelles and may damage mitochondria. On the contrary, anionic and larger nanoparticles of 200 nm diameter do not (Xia et al., 2006, 2008). In addition, it has been reported that single-walled carbon nanotubes (SWCNTs), which are known to induce cytotoxicity, target the mitochondria (Yang et al., 2010). In line with these evidences, in our study we observed numerous NP/ERS in the vicinity of the inner mitochondrial membrane. Among the genes responsible of mitochondria functions, *opa1* gene plays a major role in the maintenance of the mitochondrial network morphology and dynamics and in the regulation of the signal pathways of cellular death (Chen et al., 2003). In fact, *opa1* was reported to play this

role along with *mfn1* and *mfn2* genes, of which respective products mitofusin1 and 2, are mediators of mitochondrial fusion. In retinal ganglial cells, a down regulation of *opa1* has been reported to promote the aggregation of the mitochondrial network and to alter the structure of the mitochondrial inner membrane (Kamei et al., 2005). In particular the disorganization of the *cristae*, the release of cytochrome *c* and the induction of intrinsic apoptosis has been observed (Arnoult et al., 2005; Olichon et al., 2003). In our study, *opa1* down regulation as well as electron microscopy observations suggest that NP/ERS cytotoxicity in macrophages is triggered by their effect on mitochondria. However, it is difficult to determine whether nanoparticles induce the mitochondrial decay by altering gene expression or by a mechanical impairment, e.g. by abolishing transmembrane proton gradient.

4.2. Oxidative stress induction by ERS nanoparticles

Damage to the mitochondrial inner membrane, caused by *opa1* down expression, increases ROS production that causes further lysosomal disruption (Arnoult et al., 2005). This disruption could liberate nanoparticles enclosed in endocytic vesicles which eventually reach their target, namely the mitochondria and penetrate them triggering the autophagy process. These data suggest that crosstalk between the lysosome and mitochondria could play an important role in determining cell death type. Intracellular reactive oxygen species (ROS) production as well as oxidative stress occurs in NP/ERS-treated cells. In fact, by using qRT-PCR assays we observed the over expression of both *ncf1*, a gene encoding a subunit of NADPH oxidase (Dika Nguea et al., 2008), and of *gclc*, one of the key genes responsible for GSH homeostasis (Dickinson et al., 2004). In agreement with these data, in NP/ERS-treated cells we evidenced a significant decrease of the cellular concentration of reduced glutathione (GSH) and an increase of ROS production.

4.3. Apoptosis inhibition by NP/ERS

Treatment of NR8383 cells with NP/ERS nanoparticles does not induce apoptotic cellular death. In our previous work, we have shown the absence of apoptotic processes that was ascertained by the facts that neither the poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) fragmentation nor the formation of DNA laddering was observed. However, histochemical assays indicate the activation of caspase 3 and caspase 7 (Eidi et al., 2010). Although many reports indicate that *tnf* expression was elevated by nanoparticle treatment (Chen et al., 2006; Minematsu et al., 2007), there are contradictory data on its expression due to the use of different experimental cell models (Niu et al., 2007). TNF receptor superfamily member 5 (*tnfrsf5*), known as a potent inhibitor of *nfkβ2* gene expression in dendritic cells (Mann et al., 2002) affecting the extrinsic apoptosis pathway (Wallach et al., 1997), was up regulated in our experiment. It has been proved also that *tnf* is able to induce extrinsic apoptosis through the *casp8* activation pathway that was under expressed in our study (Bhattacharyya et al., 2010). Evidence of suppression of the cellular signaling pathway leading to extrinsic apoptosis was obtained in our study by the down regulation of proapoptotic genes, e.g. *pdcd4* (Vikhreva et al., 2010), *casp8* and *bcl2L13* (Talotta et al., 2009). Furthermore, genes involved in extrinsic apoptosis inhibition were up regulated like *rhov*, *arhgap22*, *rtnk* and *apln*. Those data are not in favor of an underlying extrinsic apoptosis process triggered by nanoparticles and we explored further the intrinsic apoptosis. In fact, a possible activation of intrinsic apoptosis is supported by microarray and qRT-PCR assays which show the down regulation of *opa1*, *nfkβ2*, *bcl2*. Indeed, some reports have indicated that *nfkβ2* induced *bcl2* expression and promoted cell survival (Oberdorster et al., 2005; Viatour et al., 2003). Furthermore, the bifunctional apoptosis regulator (*bfar*), an inhibitor of BAX-induced

apoptosis (Zhang et al., 2000), was down-regulated in our experiment. Interestingly, our data showed that neither extrinsic nor intrinsic apoptotic cell death pathways are activated in NR/ERS-treated cells. Instead NR/ERS seem to lead the cells toward the autophagic cell death.

4.4. ERS nanoparticles induce autophagy

An inverse relationship between the activation of the genes involved in the apoptosis and those involved in the autophagy, which may corresponds to a switch from apoptosis to autophagy, has been described (Luo and Rubinsztein, 2007; Shimizu et al., 2004). In particular a decrease in the expression of the apoptotic *bcl* family genes and the activation of the autophagic *atg* family genes has been reported. In our system we observe a decreased expression of *bcl2*, an efficient autophagy inhibitor (Sasi et al., 2009) and an over expression of *atg16l1* as well as the conversion of the microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) into the LC3-II isoform, a common marker of autophagy (Asanuma et al., 2003). Moreover, we report the down regulation of proautophagic gene, namely *casp8* that was reported to induce autophagy cell death in U937 macrophages (Yu et al., 2004). Furthermore, we observed cellular alterations characteristic of autophagic cell death: phagophores, autophagosomes and “mitophagy”. Such morphological modifications have been described recently in cells treated with gold nanoparticles (Li et al., 2010), soluble fullerenes (Yamawaki and Iwai, 2006), viruses (Sir and Ou, 2008), quantum dots (Seleverstov et al., 2006) and SWCNTs (Yang et al., 2010). Through autophagy, cells not only recycle intracellular components and compensate for nutrient deprivation but also they eliminate selectively damaged organelles/proteins and maintain cellular homeostasis. Non-selective autophagy degrades all organelles and long-lived proteins to provide the energy required for cell survival. By contrast, mitophagy selectively eliminates mitochondria to regulate their number as well as to remove specifically the damaged ones (Youle and Narendra, 2011). Our results demonstrate that NP/ERS-mediated cell toxicity occurs *via* organelle, notably mitochondrion, autophagy which amplifies a physiological process. In a future work, it would be interesting to study the cytotoxicity and cell morphological modifications occurring after longer exposure of macrophages with lower doses.

5. Conclusion

Nanotechnology has attracted increasing interest among almost all fields of research. Notable improvements in our knowledge about metallic nano-objects or carbon nanotubes toxicity and their influence on the expression of genes and the impairment of the oxidant/antioxidant cellular balance have been obtained. Nevertheless, data on the toxicity of drug delivery nanoparticles remain extremely scarce. To the best of our knowledge, this article is the first to report that polymeric nanoparticles designed for drug delivery, upon their enclosure into macrophages by endocytosis, are able to cross the mitochondrial membranes and enter inside these organelles. This process induces a cascade of events such as the unbalance of the oxidant/antioxidant homeostasis and the modification of the expression of genes and proteins, especially those implied in macrophages activation and autophagy. As a consequence, a mitochondrial decay through phagophore and autophagosome formation and eventually mitophagy occurs. How immune cells deal with nanoparticles is an interesting issue as this process presents some analogy with viral infections. Furthermore, the identification of the early cellular markers described and discussed in this article may serve as a conceptual scaffold for designing experiments for a better understanding of the cellular

toxicity of loaded and unloaded nanoparticles. The evaluation of cytotoxic effects in term of autophagy is a rather new concept but it should be investigated for every type of carrier to be used for drug delivery. As we have used a model of rat macrophages, human derived cell lines as well as in vivo models should be also tested to confirm these results.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Lucia Marcocci for her help and support in reviewing the manuscript. Authors would like to acknowledge Lu Zhang, Kevin Dalleau, Bouchra Mouaraki, Christine Manencq and Ramia Safar for their kind help in microarray and PCR experiments.

References

- Arnoult, D., Grodet, A., Lee, Y.J., Estaquier, J., Blackstone, C., 2005. Release of OPA1 during apoptosis participates in the rapid and complete release of cytochrome c and subsequent mitochondrial fragmentation. *J. Biol. Chem.* 280, 35742–35750.
- Asanuma, K., Tanida, I., Shirato, I., Ueno, T., Takahara, H., Nishitani, T., Kominami, E., Tomino, Y., 2003. MAP-LC3, a promising autophagosomal marker, is processed during the differentiation and recovery of podocytes from PAN nephrosis. *FASEB J.* 17, 1165–1167.
- Bhardwaj, P., Chaurasia, H., Chaurasia, D., Prajapati, S.K., Singh, S., 2010. Formulation and in-vitro evaluation of floating microballoons of indomethacin. *Acta Pol. Pharm.* 67, 291–298.
- Bhattacharyya, S., Dudeja, P.K., Tobacman, J.K., 2010. Tumor necrosis factor alpha-induced inflammation is increased but apoptosis is inhibited by common food additive carrageenan. *J. Biol. Chem.* 285, 39511–39522.
- Bodmeier, R., Chen, H., Tyle, P., Jarosz, P., 1991. Spontaneous formation of drug-containing acrylic nanoparticles. *J. Microencapsul.* 8, 161–170.
- Brazma, A., Hingamp, P., Quackenbush, J., Sherlock, G., Spellman, P., Stoeckert, C., Aach, J., Ansorge, W., Ball, C.A., Causton, H.C., Gaasterland, T., Glenisson, P., Holstege, F.C., Kim, I.F., Markowitz, V., Matese, J.C., Parkinson, H., Robinson, A., Sarkans, U., Schulze-Kremer, S., Stewart, J., Taylor, R., Vilo, J., Vingron, M., 2001. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat. Genet.* 29, 365–371.
- Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., Chan, D.C., 2003. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.* 160, 189–200.
- Chen, H.W., Su, S.F., Chien, C.T., Lin, W.H., Yu, S.L., Chou, C.C., Chen, J.J., Yang, P.C., 2006. Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice. *FASEB J.* 20, 2393–2395.
- Corcelle, E., Nebout, M., Bekri, S., Gauthier, N., Hofman, P., Poujeol, P., Fenichel, P., Mograbi, B., 2006. Disruption of autophagy at the maturation step by the carcinogen lindane is associated with the sustained mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase activity. *Cancer Res.* 66, 6861–6870.
- Dickinson, D.A., LeVonen, A.L., Moellering, D.R., Arnold, E.K., Zhang, H., Darley-Usmar, V.M., Forman, H.J., 2004. Human glutamate cysteine ligase gene regulation through the electrophile response element. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1152–1159.
- Dika Nguea, H., de Reydellet, A., Lehuède, P., De Meringo, A., Le Faou, A., Marcocci, L., Rihn, B.H., 2008. Gene expression profile in monocyte during in vitro mineral fiber degradation. *Arch. Toxicol.* 82, 355–362.
- Eidi, H., Joubert, O., Attik, G., Duval, R.E., Bottin, M.C., Hamouia, A., Maincent, P., Rihn, B.H., 2010. Cytotoxicity assessment of heparin nanoparticles in NR8383 macrophages. *Int. J. Pharm.*
- Fessi, H., Puisieux, F., 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* 55, 1–4.
- Gargouri, M., Sapin, A., Bouli, S., Becuwe, P., Merlin, J.L., Maincent, P., 2009. Optimization of a new non-viral vector for transfection: Eudragit nanoparticles for the delivery of a DNA plasmid. *Technol. Cancer Res. Treat.* 8, 433–444.
- Hoffart, V., Lamprecht, A., Maincent, P., Lecompte, T., Vigneron, C., Ubrich, N., 2006. Oral bioavailability of a low molecular weight heparin using a polymeric delivery system. *J. Control. Release* 113, 38–42.
- Jiao, Y., Ubrich, N., Marchand-Arvier, M., Vigneron, C., Hoffman, M., Lecompte, T., Maincent, P., 2002. In vitro and in vivo evaluation of oral heparin-loaded polymeric nanoparticles in rabbits. *Circulation* 105, 230–235.
- Kamei, S., Chen-Kuo-Chang, M., Cazeville, C., Lenaers, G., Olichon, A., Belenguer, P., Roussignol, G., Renard, N., Eybalin, M., Michelin, A., Delettre, C., Brabet, P., Hamel, C.P., 2005. Expression of the Opa1 mitochondrial protein in retinal ganglion cells: its downregulation causes aggregation of the mitochondrial network. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 4288–4294.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lamprecht, A., Koenig, P., Ubrich, N., Maincent, P., Neumann, D., 2006. Low molecular weight heparin nanoparticles: mucoadhesion and behaviour in Caco-2 cells. *Nanotechnology* 17, 3673–3680.
- Lewicki, K., Marchand, S., Matoub, L., Lulek, J., Coulon, J., Leroy, P., 2006. Development of a fluorescence-based microtiter plate method for the measurement of glutathione in yeast. *Talanta* 70, 876–882.
- Li, J.J., Hartono, D., Ong, C.N., Bay, B.H., Yung, L.Y., 2010. Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles. *Biomaterials* 31, 5996–6003.
- Lin, Z., Fillmore, G.C., Um, T.H., Elenitoba-Johnson, K.S., Lim, M.S., 2003. Comparative microarray analysis of gene expression during activation of human peripheral blood T cells and leukemic Jurkat T cells. *Lab. Invest.* 83, 765–776.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Luo, S., Rubinsztein, D.C., 2007. Atg5 and Bcl-2 provide novel insights into the interplay between apoptosis and autophagy. *Cell Death Differ.* 14, 1247–1250.
- Mann, J., Oakley, F., Johnson, P.W., Mann, D.A., 2002. CD40 induces interleukin-6 gene transcription in dendritic cells: regulation by TRAF2, AP-1, NF-kappa B, and CBF1. *J. Biol. Chem.* 277, 17125–17138.
- Minematsu, H., Shin, M.J., Celil Aydemir, A.B., Seo, S.W., Kim, D.W., Blaine, T.A., Macian, F., Yang, J., Young-In Lee, F., 2007. Orthopedic implant particle-induced tumor necrosis factor-alpha production in macrophage-monocyte lineage cells is mediated by nuclear factor of activated T cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1117, 143–150.
- Nguea, H.D., de Reydellet, A., Le Faou, A., Zaiou, M., Rihn, B., 2008. Macrophage culture as a suitable paradigm for evaluation of synthetic vitreous fibers. *Crit. Rev. Toxicol.* 38, 675–695.
- Niu, J., Azfer, A., Rogers, L.M., Wang, X., Kolattukudy, P.E., 2007. Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy. *Cardiovasc. Res.* 73, 549–559.
- Oberdorster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., Carter, J., Karn, B., Kreyling, W., Lai, D., Olin, S., Monteiro-Riviere, N., Warheit, D., Yang, H., 2005. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol.* 2, 8.
- Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P., Lenaers, G., 2003. Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 7743–7746.
- Pignatello, R., Bucolo, C., Ferrara, P., Maltese, A., Puleo, A., Puglisi, G., 2002. Eudragit RS100 nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen. *Eur. J. Pharm. Sci.* 16, 53–61.
- Polo, S., Di Fiore, P.P., 2006. Endocytosis conducts the cell signaling orchestra. *Cell* 124, 897–900.
- Saitoh, T., Fujita, N., Jang, M.H., Uematsu, S., Yang, B.G., Satoh, T., Omori, H., Noda, T., Yamamoto, N., Komatsu, M., Tanaka, K., Kawai, T., Tsujimura, T., Takeuchi, O., Yoshimori, T., Akira, S., 2008. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature* 456, 264–268.
- Sasi, N., Hwang, M., Jaboin, J., Csiki, I., Lu, B., 2009. Regulated cell death pathways: new twists in modulation of BCL2 family function. *Mol. Cancer Ther.* 8, 1421–1429.
- Schaffazick, S.R., Siqueira, I.R., Badejo, A.S., Jornada, D.S., Pohlmann, A.R., Netto, C.A., Guterres, S.S., 2008. Incorporation in polymeric nanocapsules improves the antioxidant effect of melatonin against lipid peroxidation in mice brain and liver. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 64–71.
- Seleverstov, O., Zbirnyk, O., Zscharnack, M., Bulavina, L., Nowicki, M., Heinrich, J.M., Yezhelyev, M., Emmrich, F., O'Regan, R., Bader, A., 2006. Quantum dots for human mesenchymal stem cells labeling. A size-dependent autophagy activation. *Nano Lett.* 6, 2826–2832.
- Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C.B., Tsujimoto, Y., 2004. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat. Cell Biol.* 6, 1221–1228.
- Sir, D., Ou, J.H., 2008. Autophagy in viral replication and pathogenesis. *Mol. Cells* 29, 1–7.
- Suri, S.S., Fenniri, H., Singh, B., 2007. Nanotechnology-based drug delivery systems. *J. Occup. Med. Toxicol.* 2, 16.
- Talotta, F., Cimmino, A., Matarazzo, M.R., Casalino, L., De Vita, G., D'Esposito, M., Di Lauro, R., Verde, P., 2009. An autoregulatory loop mediated by miR-21 and PDCD4 controls the AP-1 activity in RAS transformation. *Oncogene* 28, 73–84.
- Unger, F., Wittmar, M., Kissel, T., 2007. Branched polyesters based on poly[vinyl-3-(dialkylamino)alkylcarbamate-co-vinyl acetate-co-vinyl alcohol]-graftpoly(D,L-lactide-co-glycolide): effects of polymer structure on cytotoxicity. *Biomaterials* 28, 1610–1619.
- Viatour, P., Bentires-Alj, M., Chariot, A., Deregowski, V., de Leval, L., Merville, M.P., Bours, V., 2003. NF-kappa B2/p100 induces Bcl-2 expression. *Leukemia* 17, 1349–1356.
- Vikhreva, P.N., Shepelev, M.V., Korobko, E.V., Korobko, I.V., 2010. Pdc4 tumor suppressor: properties, functions, and their application to oncology. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* 3–11.
- Wallach, D., Boldin, M., Varfolomeev, E., Beyaert, R., Vandenaabee, P., Fiers, W., 1997. Cell death induction by receptors of the TNF family: towards a molecular understanding. *FEBS Lett.* 410, 96–106.
- Wang, H., Joseph, J.A., 1999. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 612–616.
- Xia, T., Kovochich, M., Brant, J., Hotze, M., Sempf, J., Oberley, T., Sioutas, C., Yeh, J.L., Wiesner, M.R., Nel, A.E., 2006. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett.* 6, 1794–1807.
- Xia, T., Kovochich, M., Liang, M., Zink, J.L., Nel, A.E., 2008. Cationic polystyrene nanoparticle toxicity depends on cell-specific endocytic and mitochondrial injury pathways. *ACS Nano* 2, 85–96.

- Yamawaki, H., Iwai, N., 2006. Cytotoxicity of water-soluble fullerene in vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 290, C1495–C1502.
- Yang, Z., Zhang, Y., Yang, Y., Sun, L., Han, D., Li, H., Wang, C., 2010. Pharmacological and toxicological target organelles and safe use of single-walled carbon nanotubes as drug carriers in treating Alzheimer disease. *Nanomedicine* 6, 427–441.
- Youle, R.J., Narendra, D.P., 2011. Mechanisms of mitophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 9–14.
- Yu, L., Alva, A., Su, H., Dutt, P., Freundt, E., Welsh, S., Baehrecke, E.H., Lenardo, M.J., 2004. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* 304, 1500–1502.
- Zhang, H., Xu, Q., Krajewski, S., Krajewska, M., Xie, Z., Fuess, S., Kitada, S., Pawlowski, K., Godzik, A., Reed, J.C., 2000. BAR: an apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 2597–2602.

4. Travaux complémentaires, non publiés

4.1. Les contrôles utilisés dans les tests de toxicité des NPs

Pour l'évaluation de la cytotoxicité de NPs (par le test de MTT et ceux de BT), nous avons utilisé comme contrôle positif de cytotoxicité, les particules de quartz ou DQ12 à des concentrations de 25 à 400 µg/mL. La solution d'HBPM (5000 UI), le tampon pluronic (0.5 %) et le PVA (0.1 %), utilisés pour préparer les NPs sont dénués de toxicité aux concentrations utilisées dans les différentes formulations. Par contre, la toxicité des particules de DQ12 est dose-dépendante [146].

4.2. Influence de la masse molaire du polymère sur la cytotoxicité des NPs

4.2.1. Matériel et méthodes

Nous avons comparé la cytotoxicité des NPs obtenues par deux types de PCL, commercialisées : PCL1000 (masse moléculaire nominale = 10000 daltons) [24980-41-3, Sigma-Aldrich] et NPs de PCL6000 (masse moléculaire nominale = 60000 daltons) [24980-41-4, Sigma-Aldrich]. Les macrophages NR8383 sont incubés 24 h avec 100 µg/mL des deux types de NPs (PCL 10000 et PCL 60000), chargées ou non avec de l'HBPM et préparées selon deux méthodes (NP et DE). La viabilité cellulaire a été évaluée par le test au MTT et au bleu Trypan.

4.2.2. Résultats

Nos résultats confirment les données de la viabilité cellulaire de l'article 1. Avec le test au MTT les NPs, chargées ou non avec l'HBPM, de PCL60000 sont plus toxiques (~ -22 %) que celles de PCL10000 (Figure 15).

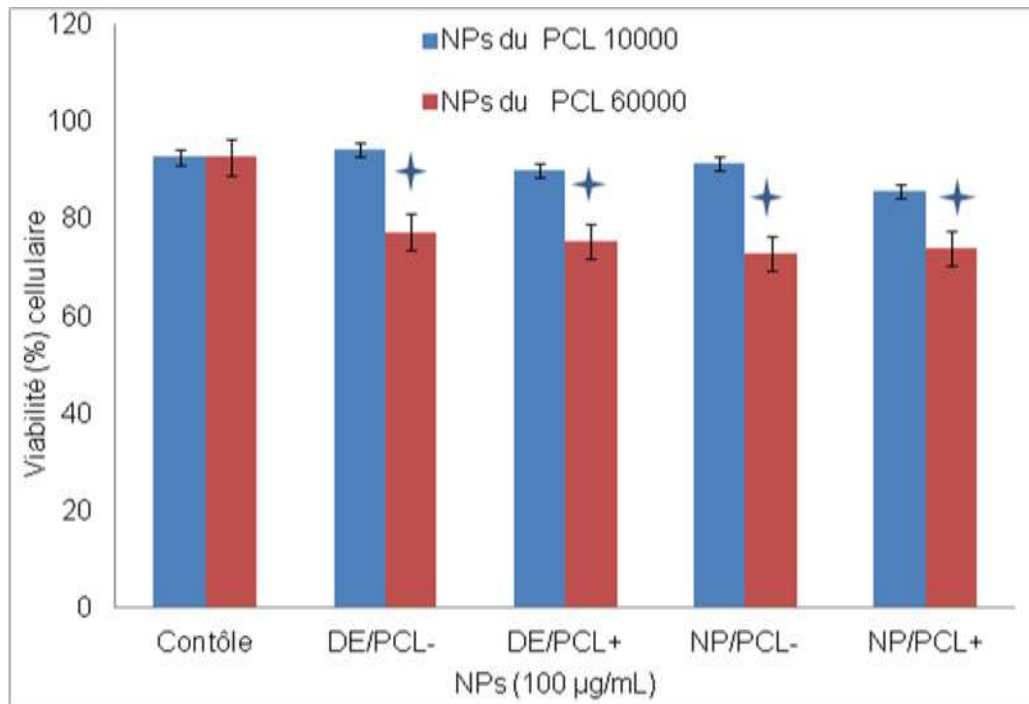


Figure 15 : Effet de la masse moléculaire du polymère sur la viabilité mesurée par le test au MTT. Les cellules sont incubées 24 h avec 50 $\mu\text{g/mL}$ de NP/ERS⁻ préparées à partir de deux types de PCL (10000 et 60000). * : Différence statistiquement significative au seuil de 0,01 (n = 12).

Par contre, avec le test au bleu Trypan, cet effet de la masse molaire du polymère n'est pas retrouvé avec les NPs de PCL préparées par DE (Figure 16). La masse molaire des NPs de PCL n'a pas d'effet sur la viabilité cellulaire quand elles sont préparées par NP (Figure 16) et le niveau de cytotoxicité est identique quelque soit la formulation. Cependant, les NPs de PCL10000 préparées par DE ne sont pas cytotoxiques à la concentration de 50 $\mu\text{g/mL}$ après 24 h à la différence des NPs de PCL60000.

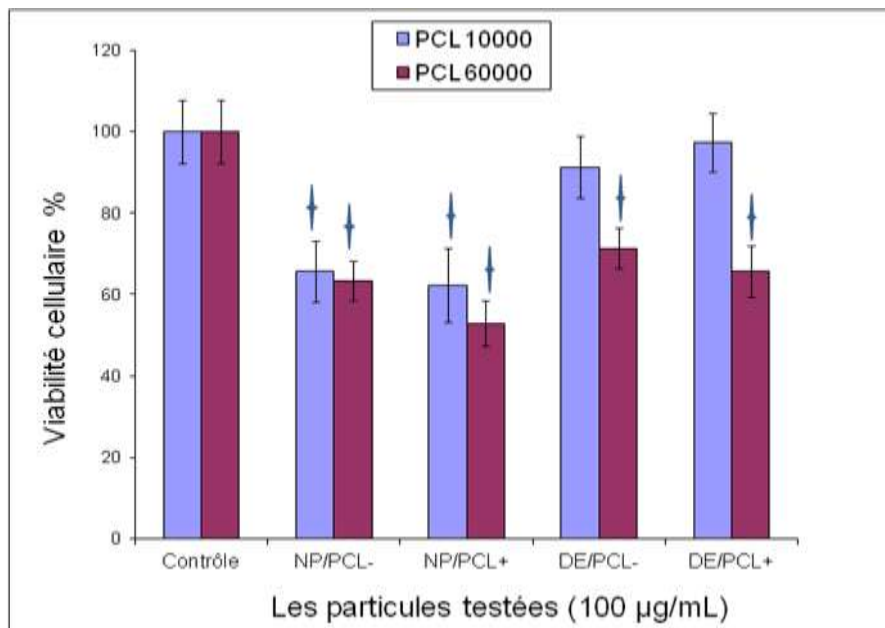


Figure 16 : Effet de la masse molaire du polymère sur la viabilité mesurée par le test de BT. Les cellules sont incubées 24 h avec 50 µg/mL de NP/ERS⁻ préparées à partir de deux types de PCL (10000 et 60000). † : Différence statistiquement significative au seuil de 0,01 (n = 12).

4.3. Les effets de doses subtoxiques de NPs du PCL sur la prolifération des macrophages

4.3.1. Matériels et méthodes

Nous avons évalué la toxicité de 0,01, 0,1, 1 et 10 µg/mL de NPs de PCL préparé par NP et DE chargées (+) ou pas (-) avec de l'HBPM sur les cellules NR8383 en utilisant le test au MTT. Les particules de DQ12 ont servi de contrôle positif (200 µg/mL / 24 h).

Pour évaluer l'effet des NPs sur la prolifération des NR8383, a été évaluée avec la trousse *Cell Prolifération ELISA, BrdU (colorimetric)* (Roche, France). Après 24 h d'incubation avec les différentes concentrations subtoxiques de NPs de PCL (0,1, à 10 µg/mL), les cellules sont traitées avec du BrdU (10 µmol/L pendant 18 h). Après avoir retiré le milieu de marquage, les cellules sont fixées et l'ADN est dénaturé en ajoutant le tampon FixDenat[®]. Ensuite, l'anticorps anti-BrdU est ajouté (Figure 17). La réaction est quantifiée en mesurant l'absorbance à 370 nm (spectrophotomètre Model 3550-UV, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

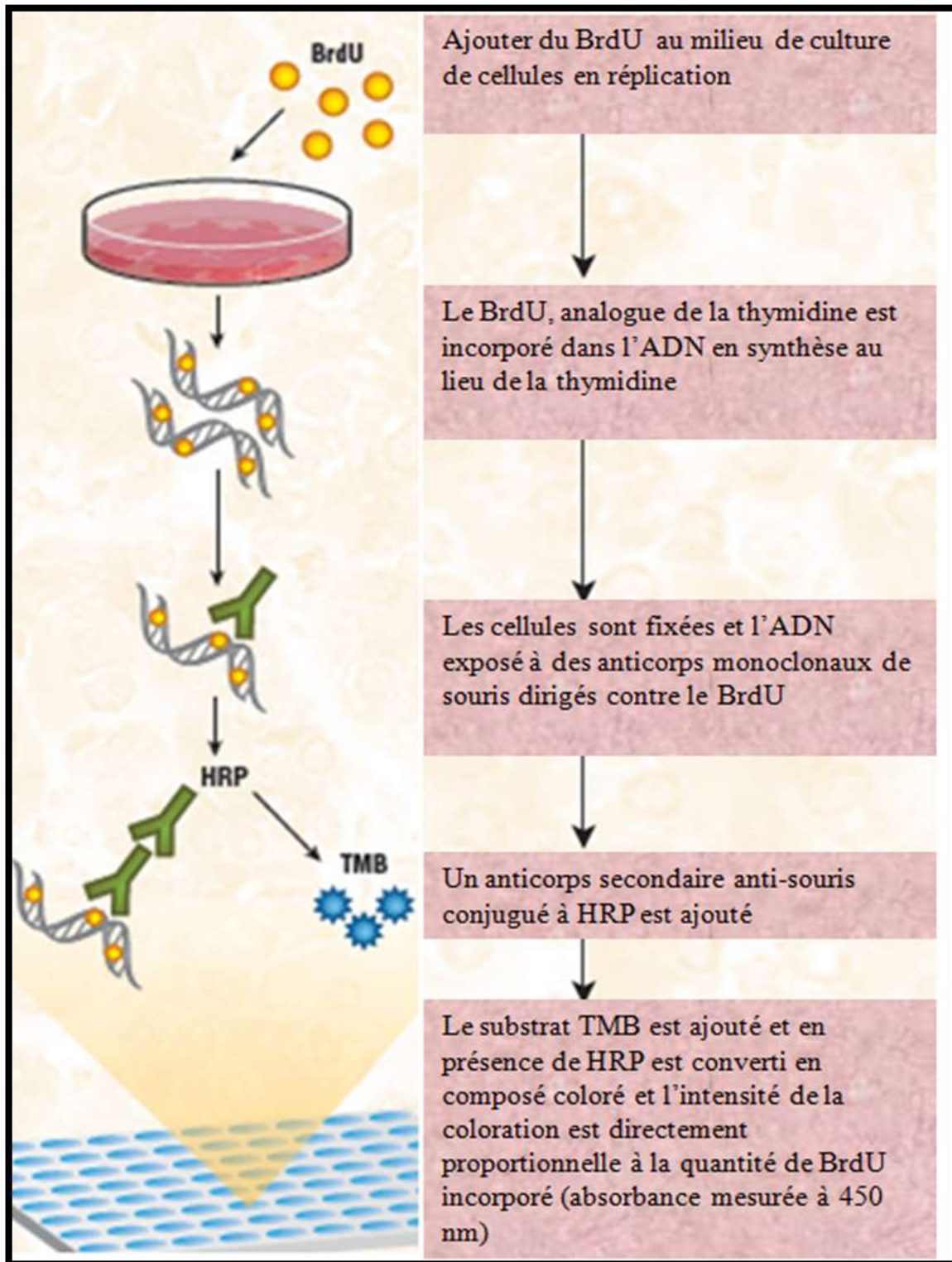


Figure 17 : Principe du test du BrdU (*Cell Proliferation ELISA, BrdU*)

4.3.2. Résultats

Des doses non toxiques de 0,1, 1 et 10 $\mu\text{g/mL}$ de NPs sont utilisées pour l'étude de prolifération (Figure 18).

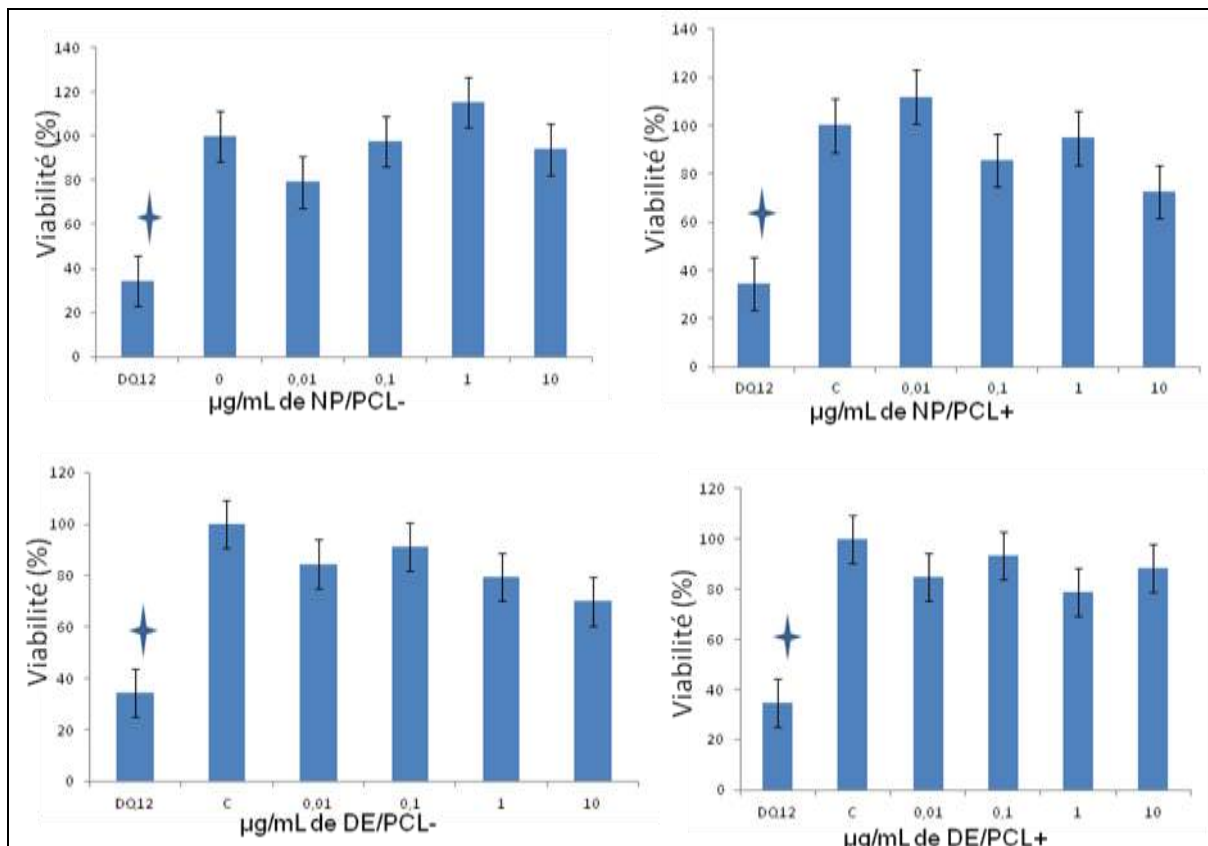


Figure 18 : La viabilité cellulaire mesurée par le test au MTT. Les cellules sont incubées 24 h avec les différentes doses de NPs de PCL. DQ12: cellules traitées avec le quartz (200 $\mu\text{g/mL}$ / 24 h). C: contrôle (cellules non traitées). \star : Différence statistiquement significative au seuil de 0,01 (n = 12).

Les doses subtoxiques de NPs de PCL ont un effet prolifératif sur les macrophages NR8383 en comparaison avec les contrôles. L'augmentation du taux de prolifération des cellules traitées avec les NPs varie, selon la méthode de préparation des NPs et leur dose, du 15 à 24 % (Figure 19). La dose de 10 $\mu\text{g/mL}$ de DE/PCL⁺ apparaît comme ayant l'activité la plus proliférative (~ +24 %) ; en revanche, celle de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de NP/PCL⁻ et de NP/PCL⁺ n'a aucun effet.

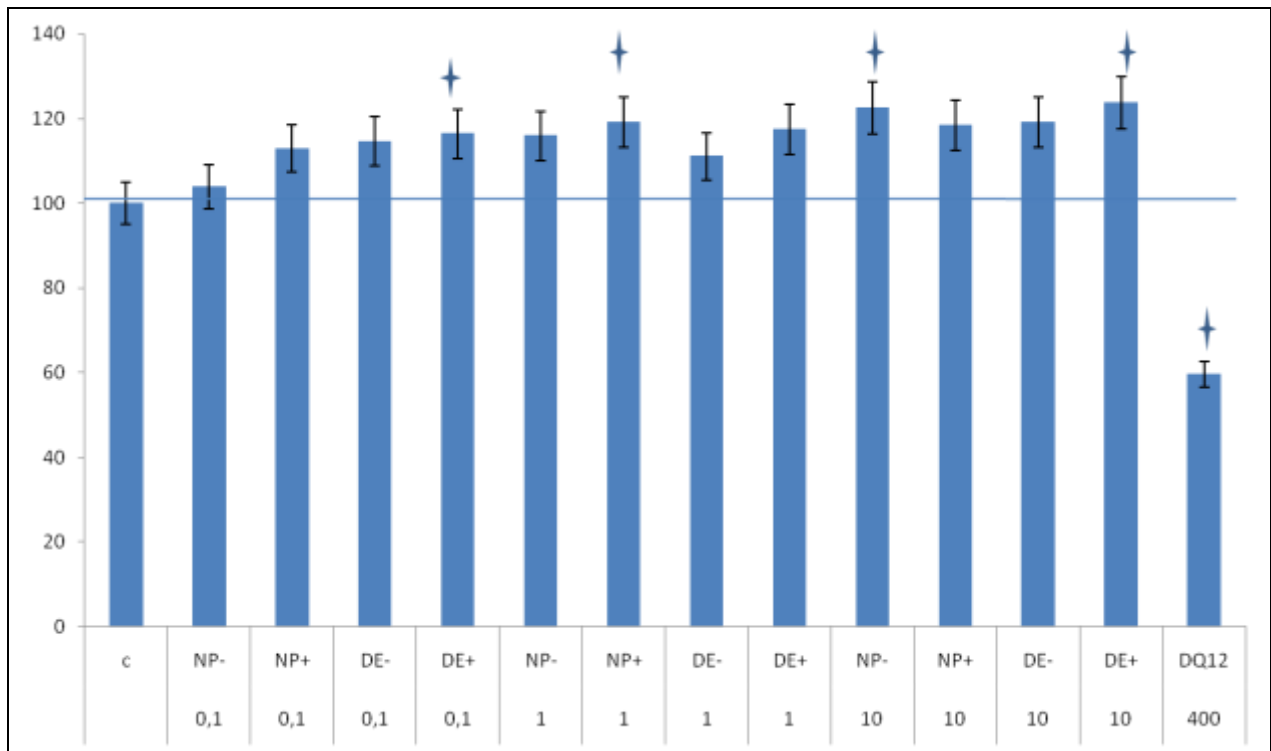


Figure 19 : Effet de NPs de PCL sur la prolifération des NR8383.

Les cellules sont incubées avec différentes doses de NPs pendant 24 h.

(c): cellules témoins non traitées, la prolifération est considérée comme étant 100 %.

DQ12: cellules incubées avec 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de particules de quartz agent toxique et inhibiteur de la prolifération cellulaire.

+ et - correspondent respectivement aux particules chargé ou non avec l'HBPM, * : Différence statistiquement significative au seuil de 0,05 (n = 12).

4.4. Internalisation des NP/ERS⁻ par les macrophages NR8383

La microscopie électronique à transmission montre l'internalisation des NP/ERS⁻ par endocytose dépendante de la clathrine (dépôt sous membranaire au niveau de la particule) (Figure 20). Les NPs pourraient donc être reconnues par des récepteurs membranaires mais il reste à déterminer si cette reconnaissance est spécifique. La MEB montre une activation des macrophages en présence de NPS avec émission de pseudopodes ainsi qu'une interaction avec les NPs étape préliminaire à l'internalisation (Figure 21).

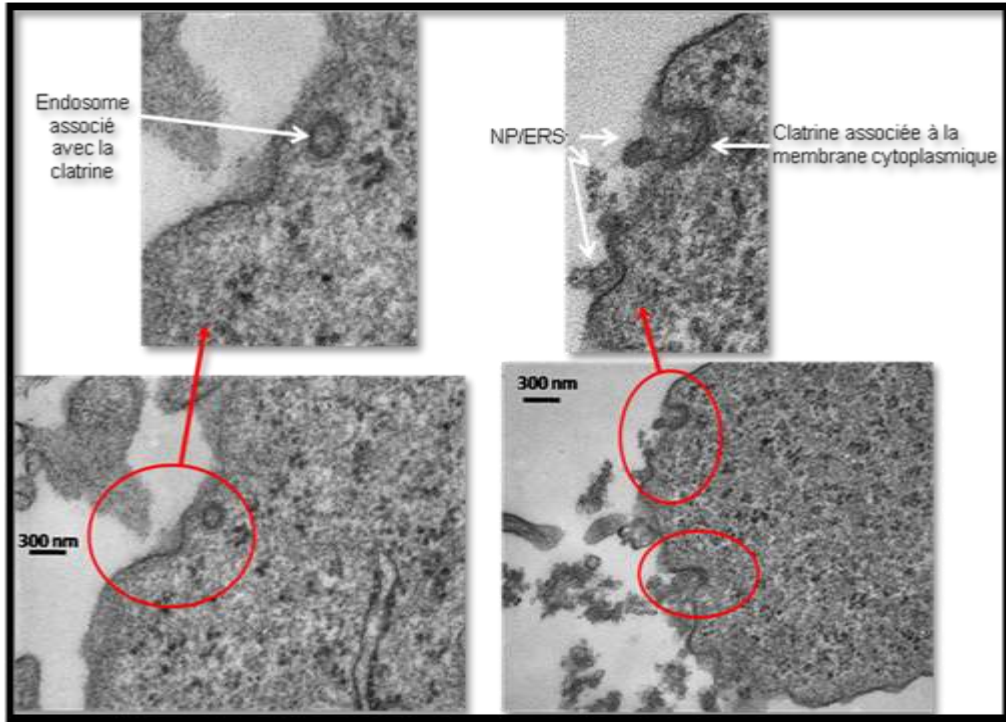


Figure 20 : Endocytose clathrine-dépendante des NP/ERS- par les macrophages NR8383.

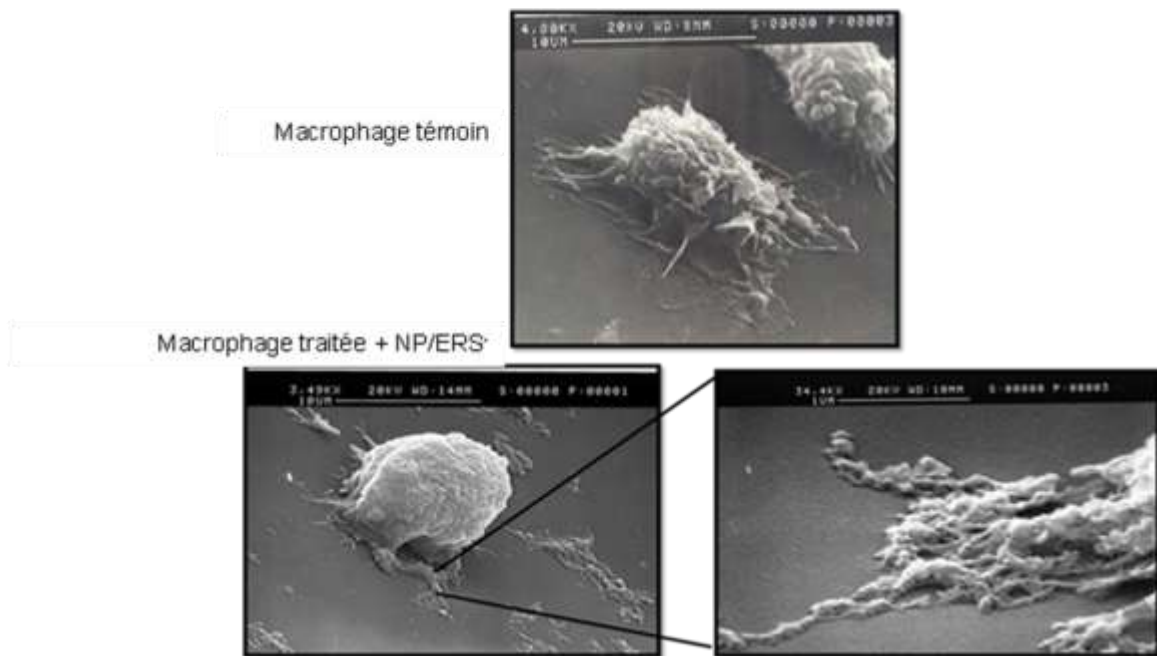


Figure 21 : Aspect au MEB des macrophages, traitées avec 25 $\mu\text{g/mL}$ de NP/ERS⁻ à 6 h, Activation des macrophages par émission de pseudopodes et de voiles cytoplasmiques absents des cellules témoins.

DISCUSSION GENERALE, PERSPECTIVES ET CONCLUSION

La cytotoxicité masse moléculaire-dépendante vis-à-vis des macrophages NR8383 des deux types de NPs de PCL montrée par le test au MTT rejoint les résultats d'Unger et coll. [147]. Cependant, cette cytotoxicité, évaluée avec le bleu Trypan, n'est pas retrouvée avec les NPs préparées par nanopréciipitation (NP). Cette divergence peut être liée à plusieurs facteurs ; *i* : les tests de cytotoxicité, MTT et bleu Trypan évaluent différents « endpoints », respectivement l'activité enzymatique mitochondriale et l'intégrité membranaire ; *ii* : le colorant utilisé, surtout le MTT, peut interagir avec les NPs et en modifier les propriétés de, en particulier de surface; *iii* : les mitochondries, probablement la cible intracellulaire des NPs de PCL préparées par la méthode de NP (comme NP/ERS⁻) voient leur activité affectée. Ceci justifie l'utilisation de plusieurs tests de viabilité pour évaluer la nanotoxicité *in vitro*.

Les études de nanotoxicité ont consisté majoritairement à mesurer la toxicité aigüe des NPs à des doses relativement élevées. Or, il est nécessaire d'évaluer l'effet de faibles doses de particules non biodégradables, qui du fait d'une exposition chronique pourrait se traduire par une accumulation dans les organes cibles et atteindre ainsi un seuil toxique. Par exemple, une augmentation significative de la prolifération de cellules HepG2 a été observée du fait d'un traitement avec des doses non toxiques de NPs d'argent [97].

L'IC₅₀ est le marqueur de cytotoxicité le plus utilisé. Parmi les facteurs potentiellement lié à la cytotoxicité, la surface spécifique (A_{spec}) des NPs apparait un important déterminant [26]. Par conséquent, nous avons intégré ces deux valeurs dans un nouvel indice de nanotoxicité que nous proposons :

$$AIC_{\text{nano}} = A_{\text{spec}} \times IC_{50}$$

Avec AIC_{nano} = indice de nanocytotoxicité, A_{spe} = surface spécifique, IC_{50} = concentration provoquant 50 % d'inhibition de viabilité.

Cet indice permet une comparaison plus aisée des cytotoxicités de NPs de différentes tailles [28]. Plus cet indice est faible, plus la particule est toxique.

Pour une même composition, la méthode de préparation des NPs affecte leur cytotoxicité. Ainsi pour Delie et coll. [148] et Gargouri et coll. [32]. Les NPs préparées par la technique DE étaient moins cytotoxiques que celles obtenues par NP. Cela pourrait s'expliquer par la plus petite taille des NPs préparées par NP. Par contre, pour Sun et coll. [149] les NPs micellaires cationiques biodégradables préparées par NP sont dénuées de toxicité pour les cellules HEK293, même à forte concentration. Cette différence pourrait provenir des conditions expérimentales (principe actif utilisé : l'HBPM, caractéristiques physico-chimiques des NPs, nature du polymère et lignée cellulaire utilisée) [150, 151]. De même, les NPs d'ERS produites par émulsion (huile/eau) -évaporation du solvant ont une faible toxicité sur la lignée Caco-2 [152] et Gargouri et coll. ont montré que la toxicité des NPs d'ERS vides préparée par NP ou DE était fonction du type de cellule [32]. Donc, la lignée cellulaire utilisée pour ces études de cytotoxicité doit également être prise en compte [26].

La lignée de macrophages de rat NR8383 a été utilisée comme modèle *in vitro* pour évaluer la cytotoxicité de NPs. En effet les macrophages font partie du système de défense de première ligne et sont couramment utilisés pour les études de cytotoxicité *in vitro*. Cependant, l'utilisation de cellules d'origine animale, en lignée continue, peut être discutable, car les résultats obtenus ne sont pas forcément extrapolables à l'homme. Les mêmes expériences devront être répétées sur des macrophages humains de primo-explantation.

Peu d'études ont été consacrées à la toxicité de nanovecteurs polymériques de PCL. Le PCL n'est pas cytotoxique même à une concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$ [153], par contre, une dose de 10 $\mu\text{g/mL}$ d'une préparation de NPs de PCL préparée par une simple émulsion (huile/eau) s'est révélée cytotoxique. [131]. En revanche, les NPs de PCL semblent stimuler la

prolifération des macrophages à des doses subtoxiques comme cela a été sur des cellules mésenchymateuses humaines avec ce polymère [154]. Les mécanismes mis en jeu restent pour le moment non élucidés.

Les NPs cationiques telles que l'ERS pourraient affecter la viabilité cellulaire par leur charge positive en interagissant avec une membrane cellulaire chargée négativement [155]. Ainsi, Verma et coll. [29] ont démontré que, que soit leur type, les particules cationiques pénètrent plus facilement les membranes cellulaires ce qui facilite l'expression de leur cytotoxicité et leur action sur les mitochondries. Ces données ont été confirmées dans notre étude, avec les NPs d'ERS, par la mesure de la viabilité cellulaire et la MET.

La morphologie du réseau mitochondrial, qui est affecté par NP/ERS⁺, dépend de l'équilibre entre fusion et fragmentation [156-158]. Les NPs perturbent la dynamique mitochondriale et l'expression des gènes qui la régulent. La balance fusion/fragmentation mitochondriale est contrôlée par des protéines comme Opa1, Mfn1 et Mfn2 qui gèrent la fusion; tandis que Drp1, Fis1 et Mtp18 contrôlent la fragmentation (Figure 22). Opa1 a un rôle clé dans le maintien de l'intégrité de la membrane mitochondriale et de sa structure de crête ou *cristae* [158, 159] (Figure 22 et 23).

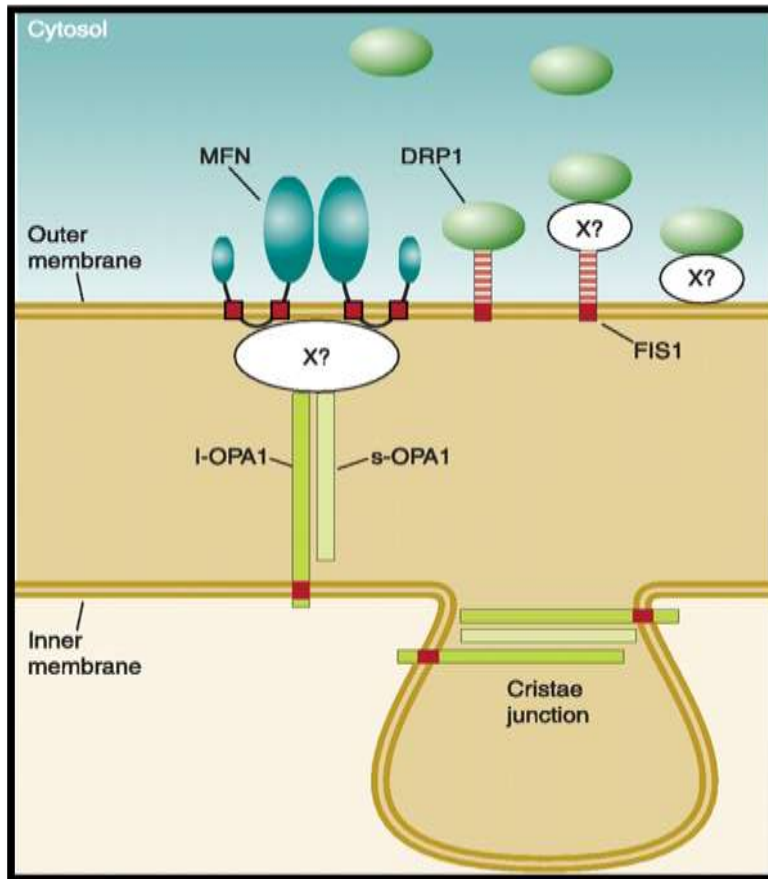


Figure 22 : Topologie des protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale chez les Mammifères.

Mitofusins (Mfn) et Fis1 [*fission 1 (mitochondrial outer membrane protein) homolog (S. cerevisiae)*] sont situées dans la membrane externe de mitochondrie.

Drp1 (*dynammin-related protein 1*) est en général cytosolique et se localise dans la membrane mitochondriale externe gérant la fragmentation mitochondriale.

Opa1 est située dans l'espace intermembranaire des mitochondries sous forme soluble (forme courte, s-Opa1) ou associée à la membrane mitochondriale interne (forme longue, l-Opa1, contenant le domaine transmembranaire,). L'interaction entre ces deux formes pourraient contrôler la morphologie de la membrane interne de mitochondrie (d'après Liesa et coll. [159]).

La sous régulation d'*opa1*, qui bloque la fusion des mitochondries, réduit la respiration mitochondriale et induit la diminution du potentiel mitochondrial transmembranaire. Ce gène joue aussi un rôle majeur dans le maintien de la morphologie du réseau et la dynamique mitochondriale, puisque sa sous-expression favorise la fragmentation du réseau mitochondrial, ainsi que dans la régulation des voies de mort cellulaire *via* l'autophagie. (Figure 1, article III ; Figure 23). En effet, la sous-régulation d'*opa1* favorise l'agrégation du réseau mitochondrial dans les cellules ganglionnaires rétiniennes et la modification de la

structure de la membrane mitochondriale interne avec une désorganisation des crêtes et la libération du cytochrome *c* ce qui induit l'apoptose intrinsèque ou mitochondriale. De même, la régulation d'*opa1* affecte la fusion des mitochondries contrôlant leur élimination par autophagie [159]. Les NPs pourraient agir en empêchant le fonctionnement d'*opa1* et favoriser ainsi la fragmentation des mitochondries.

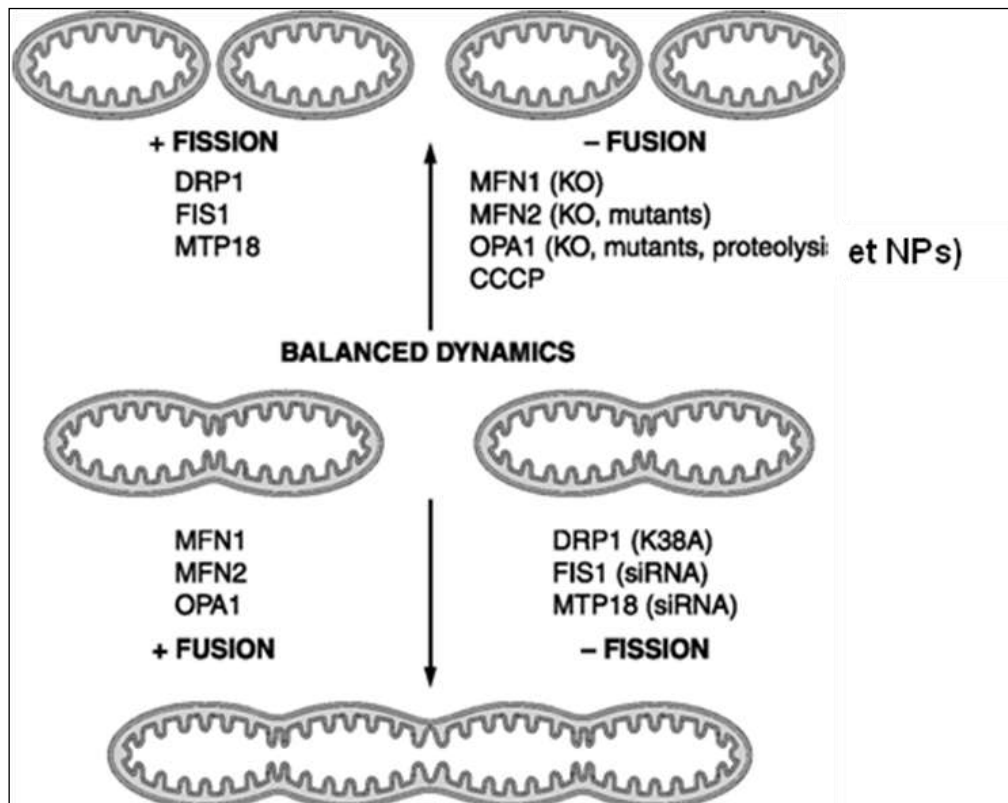


Figure 23 : La morphologie mitochondriale dépend en partie d'un équilibre entre les processus de fusion et de fragmentation contrôlé par les protéines mitochondriales (modifié d'après Liesa et coll. [159]).

Ainsi, nous proposons comme biomarqueur de nanotoxicité l'évaluation de la balance fusion/fragmentation mitochondriale (Figure 24). Or, il n'existe pas à ce jour de méthode permettant l'évaluation de cette balance [159]. Cependant, une mesure indirecte de la dynamique mitochondriale serait la mesure de l'expression des gènes impliqués comme *opa1*, *mfn1*, *mfn2*, *drp1* et *fis1*. Par ailleurs, l'utilisation du biomarqueur fusion/fragmentation

mitochondriale permettrait également d'améliorer la compréhension et le diagnostic de plusieurs atteintes associées à une perturbation de la dynamiques mitochondriale tels que l'obésité, le diabète de type 1 ou 2 et les maladies de Parkinson et d'Alzheimer [159]. Si cette implication dans les maladies complexes est confirmée, le ciblage de protéines mitochondriales pourrait représenter une nouvelle opportunité thérapeutique.

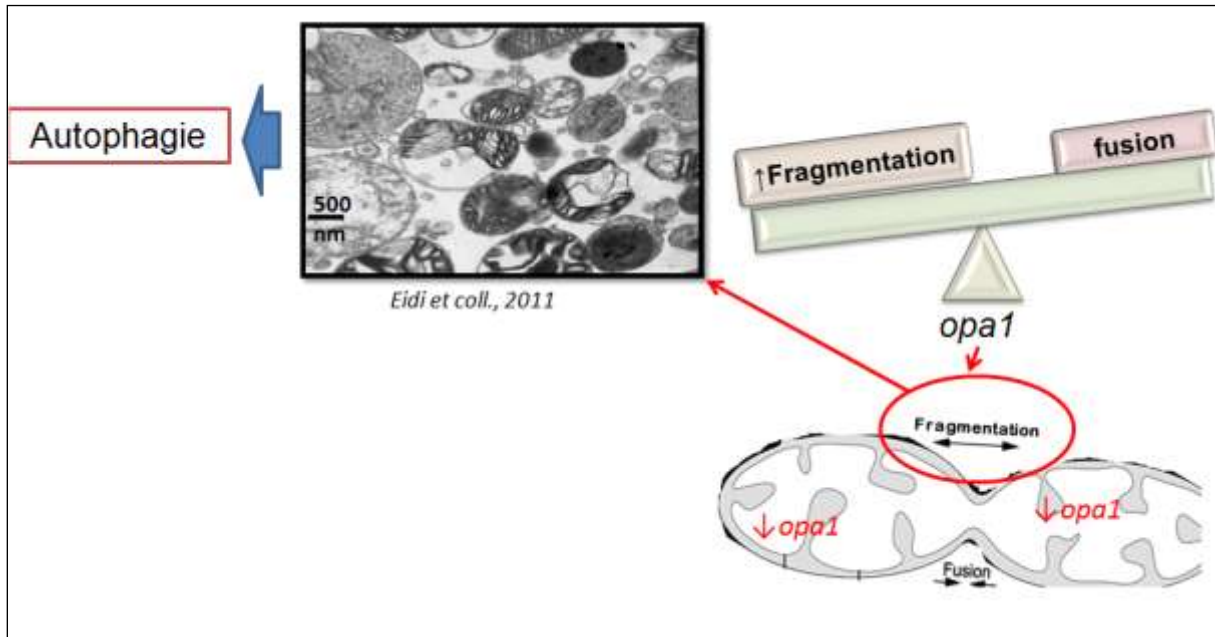


Figure 24 : La balance fusion/fragmentation mitochondriale et le rôle de la sous-expression de l'*opa-1* favorisant cette balance vers la fragmentation et induisant l'autophagie.

Il existe une balance entre les niveaux d'expression des gènes impliqués dans l'apoptose et ceux de l'autophagie. Par exemple, à une diminution de l'expression des gènes pro-apoptotiques de la famille *bcl* correspond une activation des gènes pro-autophagiques *atg* [160, 161]. En plus de la fragmentation mitochondriale, la sous régulation d'*opa1* favorise la mort cellulaire *via* l'apoptose faisant de ce gène un gène anti-apoptotique et un lien entre dynamique mitochondriale et apoptose [158]. En effet, la surexpression d'*opa1* protège les cellules contre l'apoptose intrinsèque en inhibant la libération du cytochrome *c*.

L'autophagie non sélective dégrade les organelles et les protéines pour fournir l'énergie nécessaire à la survie de la cellule. La mitophagie est un mécanisme d'élimination sélective des mitochondries pour réguler leur nombre ou éliminer celles qui sont endommagées [162]. Récemment, l'autophagie a été considérée comme une réaction cellulaire à certaines NPs telles que les fullerènes [163], les NPs d'or [164], les nanotubes à simple paroi [165] et les *quantum dots* [166]. Dans cette dernière étude une relation inverse entre la taille de la particule et l'autophagie a été mise en évidence. Une analogie a été établie entre les NPs inertes et certains virus (ex *Human (parvovirus) B19* et *Simian virus 40, SV40*) pro-autophagiques [167]. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que l'autophagie est induite par une variété de « nano-objets » à condition qu'ils entrent dans les cellules d'une façon unitaire. Nos résultats permettent de compléter le schéma de Donaldson (figure 25) en y incluant l'hypothèse d'une activation de l'autophagie par les NPs (Figure 26).

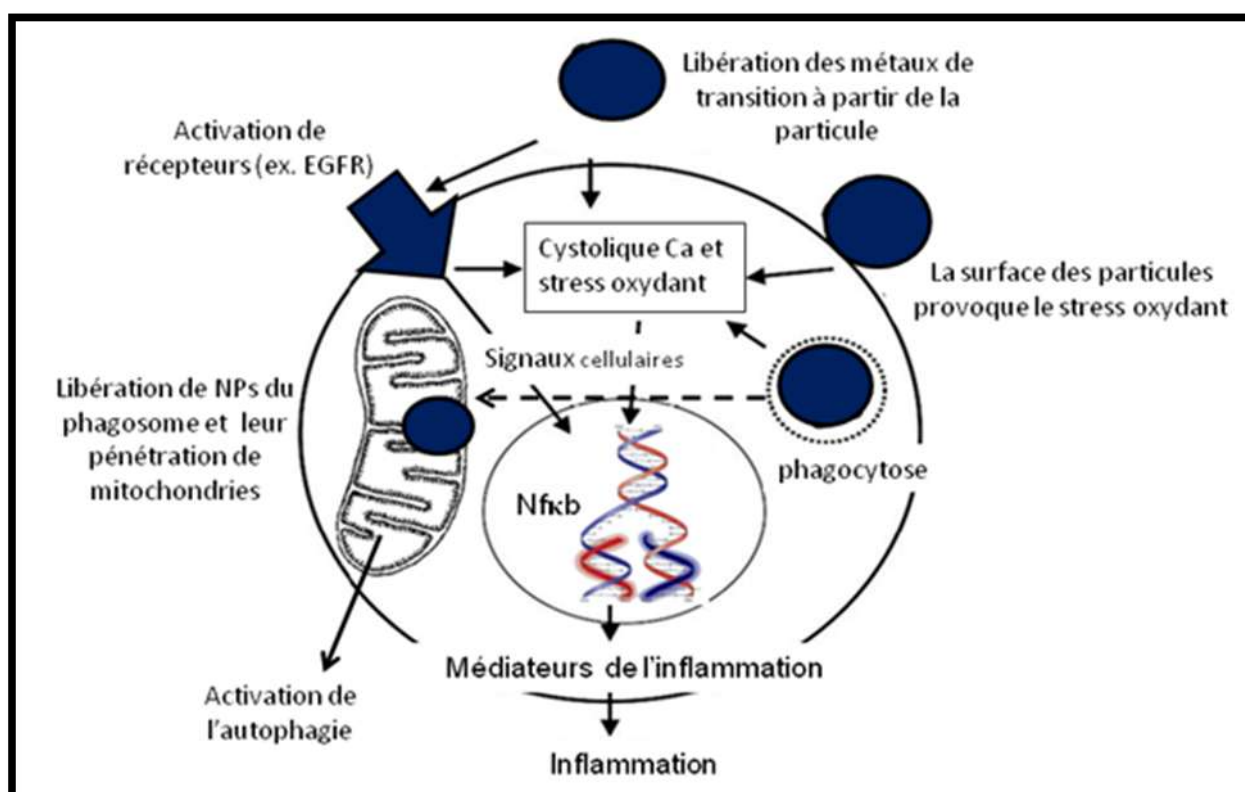


Figure 25 : Mécanisme hypothétique de l'activité cytotoxique des NPs. Modifiée d'après Oberdörster et coll. [55] et adapté d'après Donaldson et coll. [56]. EGFR : récepteurs du facteur de croissance épithéliale.

L'autophagie pourrait intervenir dans les mécanismes antitumoraux, en limitant la prolifération et l'instabilité chromosomique des cellules, en prévenant l'inflammation ou en provoquant la mort cellulaire suite au traitement des cellules tumorales par des agents anticancéreux. Mais elle pourrait aussi être un mécanisme promoteur de tumeur en permettant la survie des cellules cancéreuses en réponse au stress métabolique induit par la prolifération cellulaire ou ces mêmes agents anticancéreux (Figure 26). Des études complémentaires seront nécessaires afin de déterminer si l'autophagie induite par les NPs aurait un effet anti- ou pro-tumoral et la possibilité d'intégrer ces nanovecteurs dans le traitement du cancer.

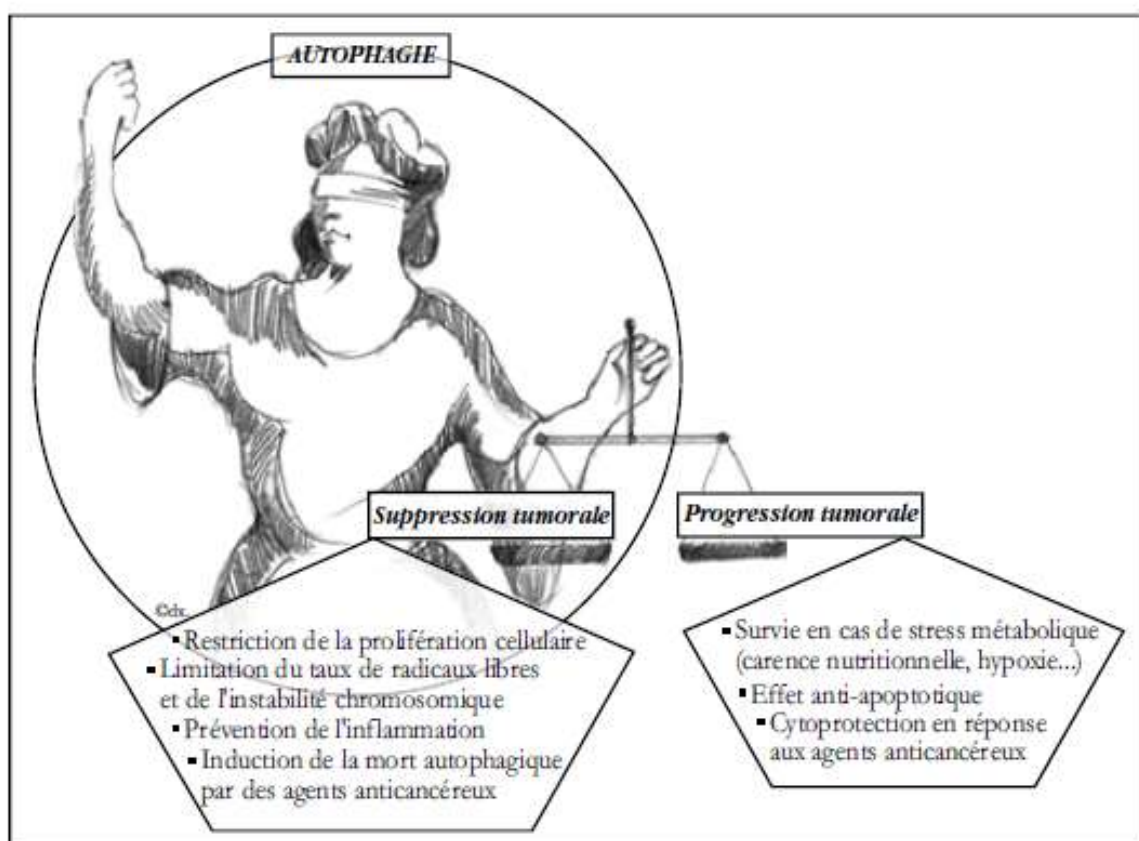


Figure 26 : Rôle de l'autophagie dans la suppression et la progression tumorale.

« Dame autophagie » tient une balance représentant le double rôle de l'autophagie dans la suppression et la progression tumorale. Le bandeau qu'elle porte sur les yeux symbolise le manque de connaissance des facteurs qui influent l'équilibre des fonctions antitumorales et protumorales de l'autophagie. (D'après Lorin et coll.[168]).

L'endocytose des NPs/ERS⁻ et leur pénétration dans la mitochondrie, par un mécanisme chlatrine-dépendant, que nous avons observée fait de ces organite la cible des NPs comme cela a été suggéré pour les nanotubes de carbone simple paroi [165]. L'origine de la souffrance mitochondriale reste à préciser. Elle pourrait être liée à un simple effet mécanique des NPs, qui pénètrent à travers les deux membranes de l'organite, mais elle pourrait aussi être la conséquence de la modulation des gènes comme *opal* dont l'expression est modulée sous l'action des NPs.

Des auteurs suggèrent que la sous-expression d'*opal* provoque une perturbation lysosomale [60] avec libération des NPs internalisées par endocytose et présentes au sein des phagolysosomes. La perturbation de la dynamique mitochondriale induite par les NPs a été considérée comme le facteur responsable de la diminution du potentiel membranaire de la mitochondrie ainsi que de l'augmentation de production de ROS [169]. Dans notre étude, un stress oxydant ainsi que la production de ROS sont observés dans les cellules traitées avec NP/ERS. Cependant, le rôle du stress oxydant dans l'autophagie et dans la perturbation de la balance fusion/fragmentation mitochondriale induites. Notre hypothèse sur les conséquences de l'interaction NPs / macrophages (Figure 27) s'appuie sur le rôle de l'endocytose, du stress oxydant et de la souffrance mitochondriale dans la cytotoxicité des NPs.

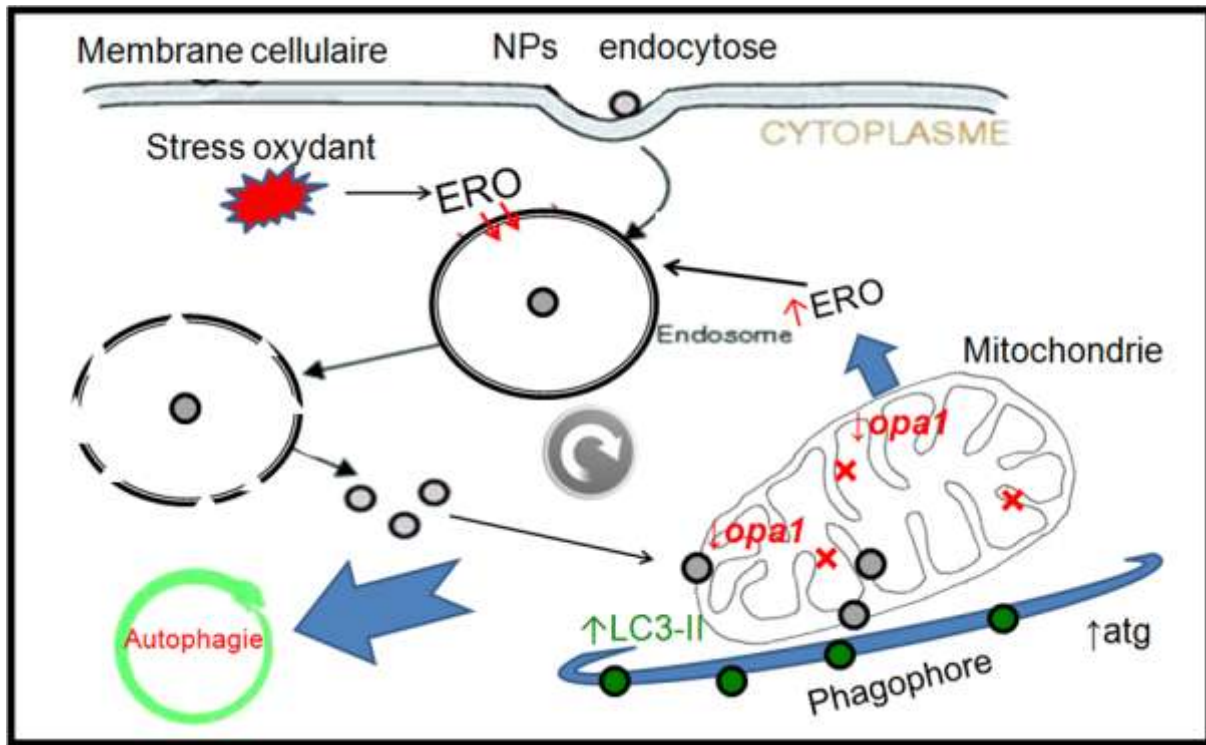


Figure 27 : Mécanisme hypothétique de l'interaction NPs / macrophages

Les domaines d'application des NPs sont très larges, médecine, pharmacie, électronique et aéronautique notamment. Les progrès induits par ces nouvelles technologies se traduisent par une révolution industrielle. Cependant, ceci se traduit par un manque de connaissances des effets sur le vivant des NPs. Les avancées technologiques permises par les NPs doivent bénéficier d'une science toxicologique la plus mécanistique possible, afin d'évaluer sereinement leur risque potentiel, détachée des pressions médiatiques. En effet ces nouvelles technologies suscitent beaucoup d'inquiétudes dans la population et c'est le rôle sociétal du toxicologue de répondre à ces questions. Cette cohabitation entre nanotechnologie et toxicologie pourra conduire à un bénéfice mutuel, sécurité sanitaire d'un côté et meilleure compréhension des interactions nanoparticules / Vivant de l'autre.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ostiguy C, et al., *Guide de bonnes pratiques favorisant la gestion des risques reliés aux nanoparticules de synthèse* 2008, IRSST: Montréal
2. Ostiguy C, et al., *Les effets sur la santé reliés aux nanoparticules*. 2008, IRSST, Montréal
3. Ostiguy, C., et al., *Les nanoparticules: Connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en santé et en sécurité du travail*. 2006: Québec.
4. Kreuter, J., *Nanoparticles and microparticles for drug and vaccine delivery*. J Anat, 1996. **189 (Pt 3)**: p. 503-5.
5. Mohanraj, V.J. and Y. Chen, *Nanoparticles – A Review*. Trop. J. Pharm. Res., 2006. **5(1)**: p. 561-73.
6. Borm, P.J., et al., *The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC*. Part Fibre Toxicol, 2006. **3**: p. 11.
7. Wittmaack, K., *In search of the most relevant parameter for quantifying lung inflammatory response to nanoparticle exposure: particle number, surface area, or what?* Environ Health Perspect, 2007. **115(2)**: p. 187-94.
8. Jones, C.F. and D.W. Grainger, *In vitro assessments of nanomaterial toxicity*. Adv Drug Deliv Rev, 2009. **61(6)**: p. 438-56.
9. Lövestam G, et al., *Considerations on a Definition of Nanomaterial for Regulatory Purposes*. 2010, European Commission JRC: Luxembourg.
10. Rosset, T., *Définition des nanomatériaux : la prudence reste de mise*. J environ., 2010: <http://www.journaldelenvironnement.net/article/definition-des-nanomateriaux-la-prudence-reste-de-mise,18013>.

11. Lafontaine, S., *Les nanoparticules et la toxicologie pulmonaire : une évaluation en 2009*. 2009: Nancy - Université.
12. Testard-Vaillant, P., *Les promesses tenues des nanos*. 2009, CNRS le journal; <http://www2.cnrs.fr/journal/4502.htm>
13. AFSSET, *Les Nanomatériaux : Effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement* 2006: Maison Alfort.
14. CEA. *Nanobiotechnologies – Nanomédecine : Quels espoirs, quelles limites ?* 2007 [cited; Available from : http://www.cea.fr/technologies/nanobiotechnologies_nanomedecine_quels_espoi.
15. Riviere, C., et al., *Iron oxide nanoparticle-labeled rat smooth muscle cells: cardiac MR imaging for cell graft monitoring and quantitation*. *Radiology*, 2005. **235**(3): p. 959-67.
16. Vega-Villa, K.R., et al., *Clinical toxicities of nanocarrier systems*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008. **60**(8): p. 929-38.
17. Oberdorster, E., *Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass*. *Environ Health Perspect*, 2004. **112**(10): p. 1058-62.
18. Hervé-Bazin B, *Nanoparticules : principales données toxicologiques actuelles*. ADHYS, Association pour le Développement de l'Hygiène et de la Sécurité dans les établissements de recherche ou d'enseignement supérieur, Paris, 18/10/2006, disponible sur <http://www.adhys.org/documentation/2006/nano/bazin.pdf>. , 2006: p. 1-14.
19. Chithrani, B.D., A.A. Ghazani, and W.C. Chan, *Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells*. *Nano Lett*, 2006. **6**(4): p. 662-8.

20. Chithrani, B.D. and W.C. Chan, *Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes*. Nano Lett, 2007. 7(6): p. 1542-50.
21. AFSSAPS, (*French Agency for Safety of Health Products*). *Recommendations for toxicological evaluation of nanoparticle medicinal products, French Agency for Safety of Health Products, October 2009*. 2009.
22. Jiang, W., et al., *Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent*. Nat Nanotechnol, 2008. 3(3): p. 145-50.
23. Brown, D.M., et al., *Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. 286(2): p. L344-53.
24. Tsuji, J.S., et al., *Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part IV: risk assessment of nanoparticles*. Toxicol Sci, 2006. 89(1): p. 42-50.
25. Hervé-Bazin B, *Nanoparticules: nanorisques?* Journée de sensibilisation CNRS, Meudon, disponible sur :
http://www.dr5.cnrs.fr/IMG/pdf/Expose_B.HERVE_BAZIN.pdf, 2006: p. 1-9.
26. Lanone, S., et al., *Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines*. Part Fibre Toxicol, 2009. 6: p. 14.
27. Fubini B, *Généralités sur les propriétés de surface*
in *Les Nanoparticules, un enjeu majeur pour la santé au travail ?* B. Hervé-Bazin (2007), aux éditions EDP Sciences, ISBN : 978-2-86883-995-4., 2007. **chap3** p. 89-95.
28. Eidi, H., et al., *Cytotoxicity assessment of heparin nanoparticles in NR8383 macrophages*. Int J Pharm, 2010. 396(1-2): p. 156-65.
29. Verma, A. and F. Stellacci, *Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions*. Small, 2010. 6(1): p. 12-21.

30. Alberts, A.J.B., et al., *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, Taylor and Francis Group, New York. 2002.
31. Harush-Frenkel, O., et al., *Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **353**(1): p. 26-32.
32. Gargouri, M., et al., *Optimization of a new non-viral vector for transfection: Eudragit nanoparticles for the delivery of a DNA plasmid*. *Technol Cancer Res Treat*, 2009. **8**(6): p. 433-44.
33. Gargouri, M., et al., *Photochemical internalization for pDNA transfection: evaluation of poly(d,l-lactide-co-glycolide) and poly(ethylenimine) nanoparticles*. *Int J Pharm*, 2011. **403**(1-2): p. 276-84.
34. Rejman, J., et al., *Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis*. *Biochem J*, 2004. **377**(Pt 1): p. 159-69.
35. Fuller, J.E., et al., *Intracellular delivery of core-shell fluorescent silica nanoparticles*. *Biomaterials*, 2008. **29**(10): p. 1526-32.
36. Zhu, Z.J., et al., *Multiplexed screening of cellular uptake of gold nanoparticles using laser desorption/ionization mass spectrometry*. *J Am Chem Soc*, 2008. **130**(43): p. 14139-43.
37. Witschger O and Fabriès JF. *Particules ultra-fines et santé au travail 2- source et caractérisation de l'exposition*. 2005 [cited; Available from: [http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.nsf/intranetobject-accesparreference/ND%202228/\\$file/nd2228.pdf](http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.nsf/intranetobject-accesparreference/ND%202228/$file/nd2228.pdf)].
38. Oberdorster, G., *Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles*. *Int Arch Occup Environ Health*, 2001. **74**(1): p. 1-8.
39. CSST. *Noir de carbone*. 2009 [cited; Available from: http://www.reptox.csst.qc.ca/Produit.asp?no_produit=14043].

40. Grassian, V.H. and J.M. Veranth, *In Vitro Models for Nanoparticle Toxicology*. Nanoscience and Nanotechnology: Environmental and Health Impacts 2008. **Chap 11**: p. DOI: 10.1002/9780470396612.
41. Hughes, P., et al., *The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need?* Biotechniques, 2007. **43**(5): p. 575, 577-8, 581-2 passim.
42. Freshney, R.I., *Culture of Animal Cells*. 4th ed., New York. John Wiley and Sons, 2000: p. 110-111.
43. Palazzolo-Ballance, A.M., C. Suquet, and J.K. Hurst, *Pathways for intracellular generation of oxidants and tyrosine nitration by a macrophage cell line*. Biochemistry, 2007. **46**(25): p. 7536-48.
44. Wottrich, R., S. Diabate, and H.F. Krug, *Biological effects of ultrafine model particles in human macrophages and epithelial cells in mono- and co-culture*. Int J Hyg Environ Health, 2004. **207**(4): p. 353-61.
45. Tao, F. and L. Kobzik, *Lung macrophage-epithelial cell interactions amplify particle-mediated cytokine release*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002. **26**(4): p. 499-505.
46. Oberdorster, G., *Toxicokinetics and effects of fibrous and nonfibrous particles*. Inhal Toxicol, 2002. **14**(1): p. 29-56.
47. Becker, S., et al., *Stimulation of human and rat alveolar macrophages by urban air particulates: effects on oxidant radical generation and cytokine production*. Toxicol Appl Pharmacol, 1996. **141**(2): p. 637-48.
48. Long, T.C., et al., *Nanosize titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons in vitro*. Environ Health Perspect, 2007. **115**(11): p. 1631-7.

49. Oberdorster, G., E. Oberdorster, and J. Oberdorster, *Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles*. Environ Health Perspect, 2005b. **113**(7): p. 823-39.
50. Curtis, J., et al., *Nanotechnology and nanotoxicology: a primer for clinicians*. Toxicol Rev, 2006. **25**(4): p. 245-60.
51. Kabanov, A.V., *Polymer genomics: an insight into pharmacology and toxicology of nanomedicines*. Adv Drug Deliv Rev, 2006. **58**(15): p. 1597-621.
52. Dickinson, D.A., et al., *Human glutamate cysteine ligase gene regulation through the electrophile response element*. Free Radic Biol Med, 2004. **37**(8): p. 1152-9.
53. Dika Nguea, H., et al., *Gene expression profile in monocyte during in vitro mineral fiber degradation*. Arch Toxicol, 2008. **82**(6): p. 355-62.
54. Donaldson, K. and V. Stone, *Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles*. Ann Ist Super Sanita, 2003. **39**(3): p. 405-10.
55. Oberdorster, G., E. Oberdorster, and J. Oberdorster, *Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles*. Environ Health Perspect, 2005. **113**(7): p. 823-39.
56. Donaldson, K. and A. Seaton, *The Janus faces of nanoparticles*. J Nanosci Nanotechnol, 2007. **7**(12): p. 4607-11.
57. Goutayer, M., *Nano-émulsions pour la vectorisation d'agents thérapeutiques ou diagnostiques ; étude de la biodistribution par imagerie de fluorescence in vivo*. 2008, Paris Universitas: Paris.
58. Koo, O.M., I. Rubinstein, and H. Onyuksel, *Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review*. Nanomedicine, 2005. **1**(3): p. 193-212.
59. Li, L., et al., *A novel antiangiogenesis therapy using an integrin antagonist or anti-Flk-1 antibody coated 90Y-labeled nanoparticles*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004. **58**(4): p. 1215-27.

60. Arnoult, D., et al., *Release of OPA1 during apoptosis participates in the rapid and complete release of cytochrome c and subsequent mitochondrial fragmentation*. J Biol Chem, 2005. **280**(42): p. 35742-50.
61. Wust, P., et al., *Magnetic nanoparticles for interstitial thermotherapy--feasibility, tolerance and achieved temperatures*. Int J Hyperthermia, 2006. **22**(8): p. 673-85.
62. Ferrari, M., *Cancer nanotechnology: opportunities and challenges*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(3): p. 161-71.
63. Chouard, C.-H., et al., *Nano sciences et médecine*. 2008. p. 1253 -1260.
64. Torchilin, V.P., *Multifunctional nanocarriers*. Adv Drug Deliv Rev, 2006. **58**(14): p. 1532-55.
65. Tada, H., et al., *In vivo real-time tracking of single quantum dots conjugated with monoclonal anti-HER2 antibody in tumors of mice*. Cancer Res, 2007. **67**(3): p. 1138-44.
66. Yang, J., et al., *Fluorescent magnetic nanohybrids as multimodal imaging agents for human epithelial cancer detection*. Biomaterials, 2008. **29**(16): p. 2548-55.
67. Cai, W., et al., *Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects*. Nano Lett, 2006. **6**(4): p. 669-76.
68. Farokhzad, O.C., et al., *Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(16): p. 6315-20.
69. Chen, J., et al., *Ligand conjugated low-density lipoprotein nanoparticles for enhanced optical cancer imaging in vivo*. J Am Chem Soc, 2007. **129**(18): p. 5798-9.
70. Schroeder, J.E., et al., *Folate-mediated tumor cell uptake of quantum dots entrapped in lipid nanoparticles*. J Control Release, 2007. **124**(1-2): p. 28-34.
71. Zhang, Z., S. Huey Lee, and S.S. Feng, *Folate-decorated poly(lactide-co-glycolide)-vitamin E TPGS nanoparticles for targeted drug delivery*. Biomaterials, 2007. **28**(10): p. 1889-99.

72. Neeley, M., A. Annapragada, and Bellamkonda. R.V, *Decreased circulation time offsets increased efficacy of PEGylated nanocarriers targeting folate receptors of glioma*. Nanotec., 2007. **18**(38).
73. Andrieux, K., *Nanotechnologies and new drugs*. Actualite Chimique, 2003(11-12): p. 135-139.
74. Couvreur, P., et al., *Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties*. J Pharm Pharmacol, 1979. **31**(5): p. 331-2.
75. Pignatello, R., et al., *Eudragit RS100 nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen*. Eur J Pharm Sci, 2002. **16**(1-2): p. 53-61.
76. Bhardwaj, P., et al., *Formulation and in-vitro evaluation of floating microballoons of indomethacin*. Acta Pol Pharm, 2010. **67**(3): p. 291-8.
77. Schaffazick, S.R., et al., *Incorporation in polymeric nanocapsules improves the antioxidant effect of melatonin against lipid peroxidation in mice brain and liver*. Eur J Pharm Biopharm, 2008. **69**(1): p. 64-71.
78. Jiao, Y., et al., *In vitro and in vivo evaluation of oral heparin-loaded polymeric nanoparticles in rabbits*. Circulation, 2002. **105**(2): p. 230-5.
79. Hoffart, V., et al., *Oral bioavailability of a low molecular weight heparin using a polymeric delivery system*. J Control Release, 2006. **113**(1): p. 38-42.
80. Socha, M., et al., *Stealth nanoparticles coated with heparin as peptide or protein carriers*. J Drug Target, 2009. **17**(8): p. 575-85.
81. INRS. *Les dendrimères 2000* [cited; Available from: <http://www.cnrs.fr/Cnrspresse/n383a5.htm>].
82. Boas, U. and P.M. Heegaard, *Dendrimers in drug research*. Chem Soc Rev, 2004. **33**(1): p. 43-63.

83. Kabanov, A.V. and E.V. Batrakova, *New technologies for drug delivery across the blood brain barrier*. *Curr Pharm Des*, 2004. **10**(12): p. 1355-63.
84. Vinogradov, S.V., *Colloidal microgels in drug delivery applications*. *Curr Pharm Des*, 2006. **12**(36): p. 4703-12.
85. Vinogradov, S.V., *Nanogels in the race for drug delivery*. *Nanomedicine (Lond)*. **5**(2): p. 165-8.
86. Fluckiger, L., *Intérêt des nanosphères comme forme orale à libération modifiée pour améliorer la biodisponibilité et le profil pharmaco-dynamique de l'isradipine*. 1999, Nancy-Université: Nancy - Université, Thèse.
87. Cohen, S. and H. Bernstein, *Drug and pharmaceutical sciences / ed. sci pham*, 1996. **5**(2): p. 203-242.
88. ADEME, *Biodégradabilité et matériaux polymères biodégradables*. 2005 disponible sur : <http://www.ademe.fr/partenaires/agrice/htdocs/Documents/Biodeweb.pdf>.
89. Ikada, Y. and H. Tsuji, *Biodegradable polyesters for medical and ecological applications*. *Macromolecular Rapid Communications*, 2000. **21** (3): p. 117-132.
90. Gombotz, W.R. and D.K. Pettit, *Biodegradable polymers for protein and peptide drug delivery*. *Bioconjug Chem*, 1995. **6**(4): p. 332-51.
91. Labet, M. and W. Thielemans, *Synthesis of polycaprolactone: a review*. *Chem Soc Rev*, 2009. **38**(12): p. 3484-504.
92. Blanco, M., M.J. Sanchez, and M. Alcala, *Study of epsilon-caprolactone polymerization by NIR spectroscopy*. *Anal Bioanal Chem*. **397**(8): p. 3575-9.
93. Sinha, V.R., et al., *Poly-epsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview*. *Int J Pharm*, 2004. **278**(1): p. 1-23.
94. Chen, D., et al., *Morphology and biodegradation of microspheres of polyester-polyether block copolymer based on polycaprolactone/polylactide/poly(ethylene oxide)*. *Polym. Int.*, 2000. **49**: p. 269-276.

95. Lehmann K, *Practical Course in Film Coating of Pharmaceutical Dosage Forms with Eudragit®*. Rohm® Pharma, 1996.
96. Dittgin, M., M. Durrani, and K. Lehman, *Acrylic polymers. A review of pharmaceutical applications*. S.T.P. Pharma ScL, 1997. **1**: p. 403-437.
97. Kawata, K., M. Osawa, and S. Okabe, *In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells*. Environ Sci Technol, 2009. **43**(15): p. 6046-51.
98. Du, Y.Z., et al., *Receptor-mediated gene delivery by folic acid-modified stearic acid-grafted chitosan micelles*. Int J Nanomedicine, 2011. **6**: p. 1559-68.
99. Truong, N.P., et al., *Self-catalyzed degradable cationic polymer for release of DNA*. Biomacromolecules, 2011. **12**(10): p. 3540-8.
100. Rejinold, N.S., et al., *Curcumin-loaded biocompatible thermoresponsive polymeric nanoparticles for cancer drug delivery*. J Colloid Interface Sci. **360**(1): p. 39-51.
101. Rejinold, N.S., et al., *Biocompatible, biodegradable and thermo-sensitive chitosan-g-poly (N-isopropylacrylamide) nanocarrier for curcumin drug delivery*. Int J Biol Macromol, 2011. **49**(2): p. 161-72.
102. Cunha-Azevedo, E.P., et al., *In vitro antifungal activity and toxicity of itraconazole in DMSA-PLGA nanoparticles*. J Nanosci Nanotechnol, 2011. **11**(3): p. 2308-14.
103. Rajam, M., et al., *Chitosan nanoparticles as a dual growth factor delivery system for tissue engineering applications*. Int J Pharm, 2011. **410**(1-2): p. 145-52.
104. Kohl, Y., et al., *Near-infrared dye-loaded PLGA nanoparticles prepared by spray drying for photoacoustic applications*. Int J Artif Organs, 2011. **34**(2): p. 249-52.
105. Mehrotra, A., R.C. Nagarwal, and J.K. Pandit, *Lomustine loaded chitosan nanoparticles: characterization and in-vitro cytotoxicity on human lung cancer cell line L132*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2011. **59**(3): p. 315-20.

106. Tahara, K., et al., *Improvements in transfection efficiency with chitosan modified poly(DL-lactide-co-glycolide) nanospheres prepared by the emulsion solvent diffusion method, for gene delivery*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2011. **59**(3): p. 298-301.
107. Liu, D., et al., *Preparation, characterization, and in vitro evaluation of docetaxel-loaded poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles for parenteral drug delivery*. J Biomed Nanotechnol, 2011. **6**(6): p. 675-82.
108. Liu, Z., et al., *Docetaxel-loaded pluronic p123 polymeric micelles: in vitro and in vivo evaluation*. Int J Mol Sci, 2011. **12**(3): p. 1684-96.
109. Verma, A.K., A. Chanchal, and A. Maitra, *Co-polymeric hydrophilic nanospheres for drug delivery: release kinetics, and cellular uptake*. Indian J Exp Biol, 2010. **48**(10): p. 1043-52.
110. Mishra, V., U. Gupta, and N.K. Jain, *Influence of different generations of poly(propylene imine) dendrimers on human erythrocytes*. Pharmazie, 2010. **65**(12): p. 891-5.
111. Agashe, H.B., et al., *Investigations on the toxicological profile of functionalized fifth-generation poly (propylene imine) dendrimer*. J Pharm Pharmacol, 2006. **58**(11): p. 1491-8.
112. Malhotra, M., et al., *A novel method for synthesizing PEGylated chitosan nanoparticles: strategy, preparation, and in vitro analysis*. Int J Nanomedicine, 2011. **6**: p. 485-94.
113. Batheja, P., et al., *Topical drug delivery by a polymeric nanosphere gel: Formulation optimization and in vitro and in vivo skin distribution studies*. J Control Release. **149**(2): p. 159-67.
114. Loh, J.W., et al., *Uptake and cytotoxicity of chitosan nanoparticles in human liver cells*. Toxicol Appl Pharmacol, 2010. **249**(2): p. 148-57.

115. Thomas, T.P., et al., *In vitro targeting of synthesized antibody-conjugated dendrimer nanoparticles*. *Biomacromolecules*, 2004. **5**(6): p. 2269-74.
116. Hong, S., et al., *Interaction of polycationic polymers with supported lipid bilayers and cells: nanoscale hole formation and enhanced membrane permeability*. *Bioconjug Chem*, 2006. **17**(3): p. 728-34.
117. Leroueil, P.R., et al., *Wide varieties of cationic nanoparticles induce defects in supported lipid bilayers*. *Nano Lett*, 2008. **8**(2): p. 420-4.
118. Mecke, A., et al., *Direct observation of lipid bilayer disruption by poly(amidoamine) dendrimers*. *Chem Phys Lipids*, 2004. **132**(1): p. 3-14.
119. Mecke, A., et al., *Lipid bilayer disruption by polycationic polymers: the roles of size and chemical functional group*. *Langmuir*, 2005. **21**(23): p. 10348-54.
120. Roberts, J.C., M.K. Bhalgat, and R.T. Zera, *Preliminary biological evaluation of polyamidoamine (PAMAM) Starburst dendrimers*. *J Biomed Mater Res*, 1996. **30**(1): p. 53-65.
121. McNerny, D.Q., P.R. Leroueil, and J.R. Baker, *Understanding specific and nonspecific toxicities: a requirement for the development of dendrimer-based pharmaceuticals*. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2010. **2**(3): p. 249-59.
122. Khachane, P., A.A. Date, and M.S. Nagarsenker, *Positively charged polymeric nanoparticles: application in improving therapeutic efficacy of meloxicam after oral administration*. *Pharmazie*, 2011. **66**(5): p. 334-8.
123. Lekshmi, U.M., N. Kishore, and P.N. Reddy, *Sub acute toxicity assessment of glipizide engineered polymeric nanoparticles*. *J Biomed Nanotechnol*, 2011. **7**(4): p. 578-89.

124. Dhana Lekshmi, U.M., et al., *In vitro* characterization and *in vivo* toxicity study of repaglinide loaded poly (methyl methacrylate) nanoparticles. *Int J Pharm*, 2010. **396**(1-2): p. 194-203.
125. Liu, Q., et al., *In vivo* toxicity and immunogenicity of wheat germ agglutinin conjugated poly(ethylene glycol)-poly(lactic acid) nanoparticles for intranasal delivery to the brain. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011. **251**(1): p. 79-84.
126. Batheja, P., et al., *Topical drug delivery by a polymeric nanosphere gel: Formulation optimization and in vitro and in vivo skin distribution studies*. *J Control Release*, 2011. **149**(2): p. 159-67.
127. Li, X., et al., *Superior antitumor efficiency of cisplatin-loaded nanoparticles by intratumoral delivery with decreased tumor metabolism rate*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008. **70**(3): p. 726-34.
128. Yadav, A.K., et al., *Preparation and characterization of HA-PEG-PCL intelligent core-corona nanoparticles for delivery of doxorubicin*. *J Drug Target*, 2008. **16**(6): p. 464-78.
129. Dandekar, P., et al., *Toxicological evaluation of pH-sensitive nanoparticles of curcumin: acute, sub-acute and genotoxicity studies*. *Food Chem Toxicol*. **48**(8-9): p. 2073-89.
130. Cetin, M., A. Atila, and Y. Kadioglu, *Formulation and in vitro characterization of Eudragit(R) L100 and Eudragit(R) L100-PLGA nanoparticles containing diclofenac sodium*. *AAPS PharmSciTech*. **11**(3): p. 1250-6.
131. Pertuit, D., et al., *5-amino salicylic acid bound nanoparticles for the therapy of inflammatory bowel disease*. *J Control Release*, 2007. **123**(3): p. 211-8.
132. Snehalatha, M., et al., *Etoposide loaded PLGA and PCL nanoparticles II: biodistribution and pharmacokinetics after radiolabeling with Tc-99m*. *Drug Deliv*, 2008. **15**(5): p. 277-87.

133. Sonaje, K., et al., *Development of biodegradable nanoparticles for oral delivery of ellagic acid and evaluation of their antioxidant efficacy against cyclosporine A-induced nephrotoxicity in rats*. *Pharm Res*, 2007. **24**(5): p. 899-908.
134. Pignatello, R., C. Bucolo, and G. Puglisi, *Ocular tolerability of Eudragit RS100 and RL100 nanosuspensions as carriers for ophthalmic controlled drug delivery*. *J Pharm Sci*, 2002. **91**(12): p. 2636-41.
135. Khachane, P., A.A. Date, and M.S. Nagarsenker, *Eudragit EPO nanoparticles: application in improving therapeutic efficacy and reducing ulcerogenicity of meloxicam on oral administration*. *J Biomed Nanotechnol*. **7**(4): p. 590-7.
136. Gang, J., et al., *Magnetic poly epsilon-caprolactone nanoparticles containing Fe₃O₄ and gemcitabine enhance anti-tumor effect in pancreatic cancer xenograft mouse model*. *J Drug Target*, 2007. **15**(6): p. 445-53.
137. Hu, Y., et al., *Effect of PEG conformation and particle size on the cellular uptake efficiency of nanoparticles with the HepG2 cells*. *J Control Release*, 2007. **118**(1): p. 7-17.
138. Wutticharoenmongkol, P., et al., *Preparation and characterization of novel bone scaffolds based on electrospun polycaprolactone fibers filled with nanoparticles*. *Macromol Biosci*, 2006. **6**(1): p. 70-7.
139. Guzman, M., et al., *Effect of nanoparticles on digitoxin uptake and pharmacologic activity in rat glomerular mesangial cell cultures*. *Drug Deliv*, 2000. **7**(4): p. 215-22.
140. Gavini, E., et al., *Development of solid nanoparticles based on hydroxypropyl-beta-cyclodextrin aimed for the colonic transmucosal delivery of diclofenac sodium*. *J Pharm Pharmacol*. **63**(4): p. 472-82.
141. Aksungur, P., et al., *Development and characterization of Cyclosporine A loaded nanoparticles for ocular drug delivery: Cellular toxicity, uptake, and kinetic studies*. *J Control Release*. **151**(3): p. 286-94.

142. Prajakta, D., et al., *Curcumin loaded pH-sensitive nanoparticles for the treatment of colon cancer*. J Biomed Nanotechnol, 2009. **5**(5): p. 445-55.
143. Voltan, R., et al., *Preparation and characterization of innovative protein-coated poly(methylmethacrylate) core-shell nanoparticles for vaccine purposes*. Pharm Res, 2007. **24**(10): p. 1870-82.
144. Schulze, et al., *Not ready to use - overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media* Nanotoxicology, 2008. **2**(2): p. 51-61.
145. Aggarwal, P., et al., *Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy*. Adv Drug Deliv Rev, 2009. **61**(6): p. 428-37.
146. Attik, G., et al., *Internalization, cytotoxicity, apoptosis, and tumor necrosis factor-alpha expression in rat alveolar macrophages exposed to various dusts occurring in the ceramics industry*. Inhal Toxicol, 2008. **20**(12): p. 1101-12.
147. Unger, F., M. Wittmar, and T. Kissel, *Branched polyesters based on poly[vinyl-3-(dialkylamino)alkylcarbamate-co-vinyl acetate-co-vinyl alcohol]-graftpoly(D,L-lactide-co-glycolide): Effects of polymer structure on cytotoxicity*. Biomaterials, 2007. **28**: p. 1610-19.
148. Delie, F., et al., *Comparison of two methods of encapsulation of an oligonucleotide into poly(D,L-lactic acid) particles*. Int J Pharm, 2001. **214**(1-2): p. 25-30.
149. Sun, T.M., et al., *Self-assembled biodegradable micellar nanoparticles of amphiphilic and cationic block copolymer for siRNA delivery*. Biomaterials, 2008. **29**(32): p. 4348-55.
150. Muller, R.H. and C.M. Keck, *Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs--a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles*. J Biotechnol, 2004. **113**(1-3): p. 151-70.

151. Kean, T., S. Roth, and M. Thanou, *Trimethylated chitosans as non-viral gene delivery vectors: cytotoxicity and transfection efficiency*. J Control Release, 2005. **103**(3): p. 643-53.
152. Lamprecht, A., et al., *Low molecular weight heparin nanoparticles: mucoadhesion and behaviour in Caco-2 cells* Nanotechnology, 2006. **17**: p. 3673–80.
153. Dang, M.H., F. Birchler, and E. Wintermantel, *Toxicity screening of biodegradable polymers. II. Evaluation of cell culture test with medium extract* J Polymers and Environ., 1997. **5**: p. 49-56.
154. Huang, M.H., et al., *Degradation and cell culture studies on block copolymers prepared by ring opening polymerization of epsilon-caprolactone in the presence of poly(ethylene glycol)*. J Biomed Mater Res A, 2004. **69**(3): p. 417-27.
155. Morgan, D.M., J. Clover, and J.D. Pearson, *Effects of synthetic polycations on leucine incorporation, lactate dehydrogenase release, and morphology of human umbilical vein endothelial cells*. J Cell Sci, 1988. **91 (Pt 2)**: p. 231-8.
156. Westermann, B., *Merging mitochondria matters: cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion*. EMBO Rep, 2002. **3**(6): p. 527-31.
157. Berman, S.B., F.J. Pineda, and J.M. Hardwick, *Mitochondrial fission and fusion dynamics: the long and short of it*. Cell Death Differ, 2008. **15**(7): p. 1147-52.
158. Landes, T., et al., *OPA1 (dys)functions*. Semin Cell Dev Biol, 2010. **21**(6): p. 593-8.
159. Liesa, M., M. Palacin, and A. Zorzano, *Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease*. Physiol Rev, 2009. **89**(3): p. 799-845.
160. Luo, S. and D.C. Rubinsztein, *Atg5 and Bcl-2 provide novel insights into the interplay between apoptosis and autophagy*. Cell Death Differ, 2007. **14**(7): p. 1247-50.
161. Shimizu, S., et al., *Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(12): p. 1221-8.

162. Youle, R.J. and D.P. Narendra, *Mechanisms of mitophagy*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(1): p. 9-14.
163. Yamawaki, H. and N. Iwai, *Cytotoxicity of water-soluble fullerene in vascular endothelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **290**(6): p. C1495-502.
164. Li, J.J., et al., *Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles*. Biomaterials, 2010. **31**(23): p. 5996-6003.
165. Yang, Z., et al., *Pharmacological and toxicological target organelles and safe use of single-walled carbon nanotubes as drug carriers in treating Alzheimer disease*. Nanomedicine, 2010. **6**(3): p. 427-41.
166. Seleverstov, O., et al., *Quantum dots for human mesenchymal stem cells labeling. A size-dependent autophagy activation*. Nano Lett, 2006. **6**(12): p. 2826-32.
167. Sir, D. and J.H. Ou, *Autophagy in viral replication and pathogenesis*. Mol Cells, 2008. **29**(1): p. 1-7.
168. Lorin, S., P. Codogno, and M. Djavaheri-Mergny, *Autophagy: a new concept in cancer research*. Bull Cancer, 2008. **95**(1): p. 43-50.
169. Lee, S., et al., *Mitochondrial fission and fusion mediators, hFis1 and OPA1, modulate cellular senescence*. J Biol Chem, 2007. **282**(31): p. 22977-83.

Résumé

L'utilisation de nanoparticules (NPs) comme vecteur de médicaments est actuellement en plein développement de vectoriser des principes actifs dans l'organisme pour en diminuer les effets secondaires. Cependant peu d'études portent sur l'activité biologique de ces NPs et plus particulièrement sur leur toxicité intrinsèque. Récemment, une formulation orale d'Héparine de Bas Poids Moléculaire (HBPM) à base de NPs composées d'un mélange de deux polymères, polycaprolactone (PCL) et Eudragit® RS (ERS), a été développée au sein de l'EA3452. Nous avons entrepris d'étudier la cytotoxicité de ces NPs vides ainsi que celles chargées avec le médicament par deux méthodes d'encapsulation : la nanoprécipitation et la double émulsion. La toxicité observée des NP vides a été étudiée. Elles sont toxiques pour la lignée de macrophages de rat NR8383 d'une manière dose dépendante (15 – 400 µg/mL) et temps-dépendante (4 – 24 h). La microscopie électronique a montré que les NPs pénétraient dans la cellule, de façon unitaire, par endocytose et gagnent les mitochondries déclenchant un phénomène de mitophagie alors qu'aucune image évoquant une apoptose n'a été observée. Ceci est confirmé par l'étude des voies métaboliques par « microchip arrays » et RT-PCR quantitative. Les voies métaboliques conduisant à l'autophagie sont activées (en particulier le gène *atg1611*) sans que les apoptoses intrinsèques et extrinsèques soient mise en jeu. La désorganisation des structures mitochondriales est associée à une répression de l'expression du gène *opa1*. Ces résultats obtenus avec des cellules d'origine animale doivent être confirmé sur des macrophages humains. Cependant ils tendent à montrer que les NPs seules ont des effets biologiques qui doivent être pris en compte avant toute utilisation chez l'homme.

Mots clés : Nanoparticules, Vecteurs de médicaments, Mitochondrie, Toxicologie cellulaire, Autophagocytose.

Abstract

Nanoparticles (NPs) are more and more used in medicine, in imaging and as vector for drugs. In this case, NPs are used to lessen the toxicity of the active product. However, a possible toxicity of these carriers is seldom taken into account. In the EA3452, low molecular weight heparin (LMWH)-based NPs have been devised a mix of two polymers, polycaprolactone (PCL) and Eudragit® RS (ERS). Preliminary works has shown that these NPs preparations, obtained by either nanoprecipitation or double emulsion, are cytotoxic *per se*. on a rat macrophage cell line, NR8383 in a dose-dependent (15 – 40 µg/mL) and time-dependent (4 – 24 h) manner which was further investigated. Electron microscopy has shown that NPs enter the cell unitarily by endocytosis. They enter the mitochondria inducing a phenomenon of mitophagy but no pictures evocating apoptosis were observed. Then, we have investigated the metabolic pathways using microchip array and quantitative RT-PCR. The pathways conducting to autophagy are activated (e.g. gene *atg1611*) while there is no activation of the pathways conducting to apoptosis. The alteration of the morphology of the mitochondria was associated to an underexpression of *opa1*. Although these results were obtained with animal cell line, and should be confirmed with human macrophages, they show that NPs have biological effects that have to be evaluated before their use in human.

Keywords: Nanoparticles, Drug vectors, Mitochondria, Cellular toxicology, Autophagocytosis.