



**HAL**  
open science

# Macrophagic response to carbon nanomaterials: effect of their physical and chemical characteristics on transcriptome

Sara Nahle

► **To cite this version:**

Sara Nahle. Macrophagic response to carbon nanomaterials: effect of their physical and chemical characteristics on transcriptome. Toxicology. Université de Lorraine, 2019. English. NNT : 2019LORR0142 . tel-02500089

**HAL Id: tel-02500089**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02500089>**

Submitted on 5 Mar 2020

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

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



## 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 : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

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

Présentée par Sara NAHLE

**Réponse macrophagique aux nanomatériaux carbonés : effets de leur  
caractéristiques physiques et chimiques sur le transcriptome.**

**Le 2 Octobre 2019**

Membres du Jury :

Rapporteurs : Mme Sophie Lanone

Docteur, Inserm, Paris

Mme Marie Carrière

Ingénieur-chercheur, CEA, Grenoble

Examineurs : Mr Emmanuel Flahaut

Professeur, Université Toulouse 3, Toulouse

Mme Muriel Barberi-Heyob

Professeur, Université Lorraine, Nancy

Mr Tobias Krebs

Fondateur du système VITROCELL, Allemagne

Directeur de thèse : Mr Luc Ferrari

Professeur, Université Lorraine, Nancy

---

Institut Jean Lamour campus ARTEM. UMR CNRS 7198, Nanomatériaux et Santé (équipe 403).

2 allée André Guinier, 54011 Nancy



## Je dédie ce manuscrit

Aux âmes de mon BEAU frère Mohamad Akar

A celui qui voudrait arriver ici

Mais qui est parti trop tôt

A celui qui aimait la science

A celui que j'aime plus que tout

A son âme qui m'a surveillé toutes ces longues nuits



---

# Remerciements

---

**A monsieur Luc Ferrari, Professeur,**

Pour la direction donnée à ma thèse,

Pour la disponibilité lorsque j'en avais le plus besoin,

Veillez accepter toute ma considération et ma sincère gratitude.

**A monsieur Bertrand Rhin, Professeur,**

Pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire,

Pour son écoute et ses conseils précieux,

Veillez accepter ma profonde reconnaissance.

**A madame Sophie Lanone, Professeur,**

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de ma thèse,

Veillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de ma considération.

**A madame Marie Carrière, Maître de Conférences,**

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de ma thèse,

Veillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de ma considération.

**A madame Muriel Barberi-Heyob, Professeur,**

Pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse,

Pour vos conseils, votre disponibilité lors des différents comités de thèse,

Veillez trouver ici l'expression de ma plus respectueuse gratitude.

**A monsieur Emmanuel Flahaut, Professeur,**

Pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse,

Pour vos conseils, votre disponibilité lors des différents comités de thèse,

Veillez trouver ici l'expression de mon plus profond respect et de ma plus vive reconnaissance.

**A monsieur Tobias Krebs,**

Pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse,

Veillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de ma considération.

**A monsieur Olivier Joubert, Maitre de Conférences,**

Je vous remercie pour votre gentillesse et vos conseils,  
Veuillez accepter ma gratitude ainsi que ma considération

**A monsieur Alain Le Faou, Professeur,**

Je vous remercie tout particulièrement pour votre précieuse contribution à ce travail,  
Pour votre disponibilité, vos conseils et vos corrections,  
Pour les discussions enrichissantes que j'ai toujours partagées avec vous,  
Veuillez trouver ici le témoignage de mon plus profond respect et de ma plus vive reconnaissance.

Je souhaite remercier également le Dr Ramia Safar qui a joué un rôle fondamental dans ma formation pour tous les aspects relatifs à la biologie moléculaire, et sans qui ce travail n'aurait pu aboutir.

Mes plus vifs remerciements aux membres de notre équipe, Dr. Mélanie Lovera Leroux, Dr. Zahra Manel Doumandji, Hoquel Romain, Timeh Saidou et tous les stagiaires pour la bonne humeur et l'enthousiasme qui m'ont permis de mener à bien mon travail de recherche dans une ambiance toujours amicale.

Un grand merci aux personnes que j'ai côtoyées à la faculté de Pharmacie, à l'IJL et à l'INRS, en particulier Dr. Carole Seidel et Dr. Sara Valentino pour toute l'aide qu'elles m'ont apportée dans la réalisation de ce travail.

Je remercie de tout cœur mes parents et mes frères, ma sœur Rana, de m'avoir toujours soutenue, encouragée, et sans qui je ne serais certainement pas arrivée ici.

Merci à mon mari, pour ta présence, ta confiance en moi, ta compréhension, tes sacrifices. Merci de m'accompagner jusque-là.

Je n'oublierai surtout pas remercier ma belle-famille et ma grande famille particulièrement Haj Abo Abed, Istez Abbes, Nadia, Mazen, Adnen, Myriana, Youssef, Maher, Ahmad, Mona, Dana, Yaghi, Ayda, Fatuma, Zanuba, Faten, Nimat, Nour, Dodo, Ourouba, Zahra...

A ma famille de cœur, à ma famille Nancéenne, merci de m'accepter parmi vous, merci de m'avoir supporté pendant mes plus durs moments, merci pour votre générosité introuvable ailleurs, merci pour les souvenirs inoubliables, pour le soutien, l'encouragement, merci d'être angéliques : mes deux J, mes plus précieux, Jizini et Jana, mes grand frères, Khadura et Farhan, mon « Collègue », mon beau gosse, Ziad, mon petit frère, Panda, mes très chers Huss et Wassim, ma jumelle Mira, ma belle Sara, ma petite Elissar, le grand chercheur Zied Ferjaoui, Elio, Nourhan, Abdallah, Rasha, Wazne, Ataa, Youssef, Sassin, Yara, Abudi, Ali rida... Une pensée spéciale à Sawsan Jaber, ma mère de cœur.

Enfin, un profond merci à mes amis d'ici et d'ailleurs et à toutes les personnes que j'aurais oublié par mégarde mais qui se reconnaîtront.



---

# Communications des travaux de thèse

---

## Publications

1. Single wall and multiwall carbon nanotubes induce different toxicological responses in rat alveolar macrophages. **Sara Nahle**, Ramia Safar, Stéphanie Grandemange, Bernard Foliguet, Mélanie Lovera Leroux, Zahra Doumandji, Alain Le Faou, Olivier Joubert, Bertrand Rihn, Luc Ferrari. Acceptée dans Journal of applied toxicology, IF= 3.065.
2. Cytotoxicity and global transcriptional responses induced by zinc oxide nanoparticles NM 110 in PMA-differentiated THP-1 cells. Ramia Safar, Zahra Doumandji, Timeh Saidou, Luc Ferrari, **Sara Nahle**, Bertrand Rihn, Olivier Joubert. Acceptée dans Journal of Toxicology Letters, IF= 3.858.
3. Protein and lipid homeostasis altered in rat macrophages after exposure to metallic oxide nanoparticles. Zahra Doumandji, Safar Ramia, Lovera-Leroux Mélanie, **Nahle Sara**, Cassidy Hilary, Matallanas David, Rihn Bertrand, Ferrari Luc, Joubert Olivier. Acceptée dans Cell Biology and Toxicology, IF= 5.097.
4. Gene expression profiling of alveolar macrophages exposed to non-functionalized, anionic or cationic multi-walled carbon nanotubes shows three different mechanisms of toxicity. **Sara Nahle**, Hilary Cassidy, Mélanie Lovera-Leroux, Reuben Mercier, Zahra Doumandji, David Gomez Matallanas, Bertrand Rihn, Olivier Joubert, Luc Ferrari. Soumise dans Journal of Nanobiotechnology, IF= 5.345.
5. Carbon-based nanomaterials induce inflammation and autophagy in rat alveolar macrophages. **Sara Nahle**, Ramia Safar, Zahra Doumandji, Bertrand Rihn, Olivier Joubert. Soumise dans Journal of Food and Chemical Toxicology, IF =3.78.

6. Cytotoxicity, fluorescence tagging and gene-expression study of CuInS/ZnS QDS - 5,10,15,20 meso (hydroxyphenyl) porphyrin conjugate against human monocytic leukemia cells (THP-1).  
Tsolekile, Ncediwe, **Nahle Sara**, Zikalala Nkosingiphile, Zikalala Sundararajan, Parani Sakho El hadji, Joubert Olivier, Matoetoe Mangaka, Songca Sandile, Oluwafemi Oluwatobi.  
Soumise dans Scientific Report, IF = 4.525.
  
7. Mitsui-7 induce lipid metabolism perturbation and syncytiums in rat alveolar macrophages.  
**Sara Nahle**, Hilary Cassidy, Halima Alem Marchand, David Gomez Matallanas, Bertrand Rihn, Olivier Joubert, Luc Ferrari.  
En cours de rédaction.

## Communications orales

- 30<sup>th</sup> Mar 2017** **Sara Nahle**, Luc Ferrari.  
“Toxicity study of carbon nanotubes”.  
Meeting at the Grand Hotel, Malahide, Dublin, Ireland.
- 30<sup>th</sup> Nov 2017** Olivier Joubert, Zahra Doumandji, **Sara Nahle**, Luc Ferrari.  
“Transcriptomic, the help for in vivo and in vitro nanotoxicology”.  
Nanomedecine and nanosafety conference, Teheran, Islamic Republic of Iran.
- 12<sup>th</sup> Jan 2018** **Sara Nahle**, Luc Ferrari.  
“Carbon nanotubes toxicity in Nr8383 cells: functionalizing effect”.  
The National Research Center for Work Environment, Copenhagen, Denmark.
- 20<sup>th</sup> Mars 2018** **Sara Nahle**, Luc Ferrari.  
“Carbon nanotubes induce lipid accumulation and syncytia”.  
Meeting Bohing ECO Hostel, Ljubljana, Slovenia.
- 20<sup>th</sup> Mars 2019** **Sara Nahle**, Luc Ferrari.  
“Carbon nanotubes and titanium dioxide toxicity study”.  
Meeting INRS, Nancy, France.

## Communications affichées

- 7<sup>nd</sup> Nov 2017** Toxicity of carbon nanotubes on in vitro murine model.  
Doctoral school day, Nancy, France.
- 27<sup>nd</sup> Nov 2018** Carbon nanotubes toxicity: functionalizing effect.  
Congrès Société Française de Toxicologie, Lille, France.
- 3<sup>nd</sup> Avril 2018** Carbon nanomaterials toxicity.  
Doctoriales retirement destined for PhD students, Saint-Dié des Vosges, France.
- 8<sup>nd</sup> Sept 2019** Functionalization of carbon nanotubes change their toxicity mechanisms induced in alveolar macrophages.  
55th Congress of the European Societies of Toxicology, Helseinki, Finland.
- 13<sup>nd</sup> June 2019** Equivalent *In Vivo* and *In Vitro* Doses: Unraveling the Effects of Particle Distribution, Dose Rate and Inter-Model Susceptibility.  
12th International Particle Toxicology Conference, Salzburg, Austria.



# Sommaire

## Liste des abréviations

## Liste des figures et tableaux

<b>I. Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
1 Nanotechnologies .....	3
2 Le projet Smartnanotox .....	5
2.1 Objectifs .....	5
2.2 Méthodologie.....	7
<b>II. Analyse bibliographique: état de l'art.....</b>	<b>9</b>
1 Le carbone dans la nature .....	11
2 Les formes nanométriques du carbone.....	12
2.1 Les formes étudiées : propriétés, synthèse et applications .....	13
2.1.1 Le noir de carbone.....	13
2.1.2 L'oxyde de graphène .....	14
2.1.3 Les nanotubes de carbone .....	16
2.2 Les voies d'exposition aux NMC.....	20
2.2.1 La voie aérienne .....	21
2.2.2 La voie gastro-intestinale .....	22
2.2.3 La voie cutanée.....	22
2.2.4 La voie parentérale.....	23
2.3 Les descripteurs des NMC : déterminants de toxicité.....	24
2.3.1 La taille .....	24
2.3.2 La surface spécifique : .....	26
2.3.3 Etat de surface et charge de surface (fonctionnalisation).....	27
2.3.4 Morphologie.....	29

2.3.5	Etat d'agrégation et d'agglomération .....	29
2.3.6	Composition .....	30
3	Evaluation de la toxicité : les modèles d'études expérimentaux .....	31
3.1	Approches <i>in vitro</i> .....	31
3.1.1	Les méthodes d'exposition.....	33
3.1.2	Approches <i>in vivo</i> .....	35
4	Etat de l'art sur la toxicité des NMC.....	35
4.1	Toxicité cellulaire.....	36
4.1.1	Milieu Extracellulaire .....	36
4.1.2	Milieu intracellulaire .....	44
4.1.3	Evènements clés.....	49
4.2	Toxicité animale .....	56
4.2.1	Inflammation .....	57
4.2.2	Fibrose .....	58
4.2.3	Cancérogenèse .....	59
4.3	Toxicité humaine .....	60
5	Règlementation.....	60
6	Synthèse du chapitre.....	64
<b>III. Objectifs de l'étude.....</b>		<b>66</b>
<b>IV. Méthodologie du travail.....</b>		<b>67</b>
1	Caractérisation des NMC.....	71
1.1	Dispersion des NMC .....	71
1.2	Diffusion dynamique de la lumière .....	71
1.3	Microscopie électronique à transmission .....	72
2	Evaluation de la cytotoxicité des NMC.....	72
2.1	WST-1 .....	73
2.2	Alamar Blue .....	74

2.3	LDH .....	75
2.4	Tests statistiques .....	75
3	Approches omiques.....	75
3.1	Transcriptomique .....	75
3.2	Protéomique.....	77
3.3	Analyses bioinformatiques .....	79
4	Autres techniques .....	79
<b>V. Résultats.....</b>		<b>78</b>
1	Etude comparative entre quatre composés carbonés : NC, OG, SWCNT et MWCNT .....	84
1.1	Introduction.....	84
1.2	Résumé des principaux résultats.....	85
1.3	Conclusion .....	85
1.4	Article I .....	85
2	Etude comparative entre un SWCNT et MWCNT : effet taille.....	86
2.1	Introduction.....	86
2.2	Résumé des principaux résultats.....	86
2.3	Conclusion .....	87
2.4	Article II .....	87
3	Etude comparative entre trois MWCNT de tailles similaires mais fonctionnalisés différemment : effet fonctionnalisation .....	88
3.1	Introduction.....	88
3.2	Résumé des principaux résultats.....	88
3.3	Conclusion .....	89
3.4	Article III .....	89
4	Etude comparative entre deux NTC de tailles similaires mais de diamètres différents : effet diamètre .....	90
4.1	Introduction.....	90

4.2	Résumé des principaux résultats.....	91
4.3	Conclusion .....	91
4.4	Article IV .....	92
5	Etude comparative entre NP de carbone sphériques et NTC : effet forme .....	126
5.1	Introduction.....	126
5.2	Matériels et Méthodes.....	126
5.2.1	Caractérisation des NMC.....	126
5.2.2	Culture cellulaire .....	127
5.2.3	Etude de la cytotoxicité <i>in vitro</i> .....	127
5.2.4	Etude transcriptomique.....	127
5.3	Résultats .....	129
5.3.1	Caractérisation des NMC.....	129
5.3.2	Le NC (Printex-90) et les nanotubes (Mitsui-7) ne produisent pas de cytotoxicité pour les cellules NR8383 aux doses testées.....	130
5.3.3	Etude comparative du transcriptome des cellules NR8383 exposées aux NP Printex-90 et aux nanotubes Mitsui 7.....	131
5.4	Discussion .....	136
5.5	Conclusion .....	139
<b>VI.</b>	<b>Discussion générale.....</b>	<b>194</b>
1	Caractérisation des NMC.....	142
2	Cytotoxicité .....	143
3	Etude du transcriptome .....	145
<b>Références</b>		
<b>Annexes</b>		
Annexe 1.	Tableau des NMC étudiés, conditions de dispersion, mesures DLS et ¼ IC50 déterminé par le test WST-1.....	167
Annexe 2.	Core list des NMC étudiés en transcriptomique.....	167



Annexe 3. Cytotoxicity and global transcriptional responses induced by zinc oxide nanoparticles NM 110 in PMA-differentiated THP-1 cells. Ramia Safar, Zahra Doumandji, Timeh Saidou, Luc Ferrari, Sara Nahle, Bertrand Rihn, Olivier Joubert. ....168

Annexe 4. Protein and lipid homeostasis altered in rat macrophages after exposure to metallic oxide nanoparticles. Zahra Doumandji, Safar Ramia, Lovera-Leroux Mélanie, Nahle Sara, Cassidy Hilary, Matallanas David, Rihn Bertrand, Ferrari Luc, Joubert Olivier. ....169



---

# Liste des abréviations

---

ADN: acide désoxyribonucléique  
AGHA: australien gouvernement of health and ageing  
AIST: advanced industrial science and technology  
Akt: serine/threonine kinase  
AL<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: oxyde d'aluminium  
ALI: air liquid Interface  
ANOVA : analyse de variance  
ANSES: agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail  
AO: adverse outcome  
AOP: adverse outcome pathway  
AP-1: activator protein 1  
ARN: acide ribonucléique  
ATCC: american type culture collection  
Atg2: Autophagy Related 2  
Bcl2: B-cell lymphoma 2  
BER: base excision repair  
BET: Brunauer, Emmett et Teller method  
BFG: bovine fibrinogen  
BSA: bovine serum albumin  
BS: british standard institute  
C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>: éthylène  
C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>: acétylène  
C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> : éthane  
C3: complement Component 3  
C3b: complement Component C3b  
CAGR: compound annual growth rate

CASG: competent authorities sub-group on nanomaterials

Casp 8: caspase 8

Ccl: C-C Motif Chemokine Ligand

CCs: complement Components

CD14/64: cluster of differentiation

Cha

CIB: current intelligence bulletin

Co: cobalt

CO<sub>2</sub>: carbon dioxide

Col IV: collagen IV

CVD: chemical vapor deposition

Cxcl : C-X-C Motif Chemokine Ligand

DAVID: database for annotation, visualization and integrated discovery

DDIT3: DNA damage-inducible transcript 3

DMEM: dulbecco's modified eagle's medium

DMSAE: dutch minister of social affairs and employment

DQ12: quartz

eIF4: eukaryotic initiation factor 4F

EIF4EBP1: eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1

EPA: environmental protection agency

FBS: fetal bovine serum

Fc: fragment commun aux IgG

FC: fold change

FCS: fetal calf serum

FDA: Food and Drug Administration

Fe: Fer

FLIP: FLICE-like inhibitory protein

FSAP: préparation d'échantillons assistée par filtre

GAARN: group assessing already registered nanomaterials

GEO: gene expression omnibus

GO: gene onthology

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peroxyde d'hydrogène

HiPco,31: high pressure CO disproportionation  
Hmox-1: heme oxygenase 1  
HS: human surfactant  
HSPA5: heat shock protein family A  
IFA: Institut für für Auslandsbeziehungen  
IgG: immunoglobulin G  
Igy: gamma globulin  
Il : interleukin  
INRS : institut national de recherche et de sécurité  
IPA: ingenuity pathway analysis  
KE: key event  
KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes  
KML: korean ministry of labour  
LDH: Lactate Dehydrogenase  
LPS: lipopolysaccharides  
MAPK: mitogen-activated protein kinase  
MARCO: macrophage receptor with collagenous structure  
MEC: matrice extracellulaire  
Mg: magnesium  
MIE: molecular initiating event  
MIP2: macrophage inflammatory protein 2  
MMP: matrix metalloproteinase  
Mn: manganèse  
mTOR: mammalian target of rapamycin  
MWCNT: multi walled carbon nanotube(s)  
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
NC : noir de carbone  
Ncf: neutrophil cytosolic factor  
NFK $\beta$ : nuclear factor kappa B  
Ni: nickel  
NIOSH: national institute for occupational safety and health  
NLPR3: NOD-like receptor pyrin domain-containing-3

NM: nanomateriau (x)  
NMC: nanomateriau(x) carboné(s)  
NOAEL: no observed adverse effect level  
NOX: NADPH Oxidase  
NP: nanoparticule(s)  
NRCWE: national research center for the working environnement  
NTC : nanotube de carbone (s)  
OCDE : organisation de coopération et de développement économiques  
OG : oxyde de graphène  
OPA1 : mitochondrial dynamin like GTPase  
OSHA: occupational safety and health administration  
p70S6K: ribosomal protein S6 kinase beta-1  
Pd: palladium  
Pdcd4: programmed cell death 4  
PDGF-AA: platelet-derived growth factor  
PEL : permissible exposure limit  
PLT : platelet  
PMA : phorbol 12-myristate 13-acetate  
PMN : polynucléaires neutrophiles  
PUFC : particules ultrafines de carbone  
QSAR: quantitative structure-activity relationship  
RE: reticulum endoplasmic  
REACH: registration, evaluation, authorization and restriction of chemicals  
Rock: rho associated coiled-coil containing protein kinase  
ROS: reactive oxygen species  
Rpl: ribosomal protein  
RT-PCR: real-time polymerase chain reaction  
Saa3: serum amyloid A3  
SDHA: succinate dehydrogenase complex  
SOD: superoxide dismutase  
SP3: solid-phase-enhanced sample-preparation  
String: search tool for the retrieval of interacting genes

SWA: safe work Australia  
SWCNT: single walled carbon nanotube(s)  
Tf: transferrin  
TEM: transmission electron microscopy  
Tgf- $\beta$ : Transforming Growth Factor Beta  
TIMP: metallopeptidase inhibitor  
TiO<sub>2</sub>: dioxyde de titane  
TLR: toll like receptor  
TNF: tumor necrosis factor  
TSC2: TSC complex subunit  
Tubb: tubulin beta class  
TWA: time-weighted average  
UCD : university college dublin  
UE : union européen  
UL : université lorraine  
UPR : unfolded protein response  
VLEP : valeur limite d'exposition professionnelle  
WEL: work exposure limit  
XBP-1s: X-box binding protein 1





---

# Liste des figures et tableaux

---

Figure 1 : Evolution du marché des nanotechnologies de 2010 à 2019 et projection pour 2017-2020.

Figure 2 : Schéma conceptuel d'un AOP.

Figure 3 : Différentes formes du carbone.

Figure 4 : Le marché du NC, applications, 2018.

Figure 5 : Représentation schématique de l'obtention d'OG.

Figure 6 : Les différents configurations pour un NTC.

Figure 7 : SWCNT (a) et MWCNT (b) observés au microscope électronique à transmission et schémas de leurs structures.

Figure 8 : Schéma des méthodes physique de synthèse des NTC par arc électrique (A) et par ablation par le laser (B).

Figure 9 : Le marché des NTC, applications, 2018.

Figure 10 : Marché des NTC, taux de croissance par région, 2019-2024.

Figure 11 : Dépôt théorique total chez l'homme, en fonction du diamètre des particules inhalées.

Figure 12 : Analyse en microscopie électronique à transmission de sortie de pots d'échappement (a) et de liquide broncho-alvéolaire (b) montrant la présence de nano-objets (NTC et NP de carbone).

Figure 13 : les différentes voies d'exposition aux NMC

Figure 14 : La clairance longueur dépendante des nanotubes et des fibres à partir de l'espace pleural. A : Fibres courtes et petits enchevêtrements de NTC qui se déposent dans les alvéoles situées au niveau sous-pleural et migrent vers la cavité pleurale puis sortent dans le flux de liquide pleural à travers les stomates, où ils suivent le drainage lymphatique vers les ganglions médiastinaux. B : Les fibres longues et les NTC longs atteignent également la cavité pleurale par les alvéoles sous-pleurales, mais ils ne peuvent pas parvenir aux stomates et sont retenus dans l'espace pleural.

Figure 15 : Le seuil de réponse inflammatoire pour les PUFC est présenté comme la corrélation entre la surface des particules et le nombre de leucocytes polymorphonucléaires (A) ou les concentrations d'IL-1 $\beta$  (B) ou de MIP2 (C). Deux doses supplémentaires instillées de 0,5 et 2  $\mu$ g, associées à 5, 20 et 50  $\mu$ g de PUFC représentent des surfaces spécifiques BET de 0,4 ; 16 ; 40 ; 161 et 404  $\text{cm}^2$ , respectivement. La ligne en pointillé indique les niveaux de base des animaux témoins.

Figure 16 : Différents modes de fonctionnalisation des NTC.

Figure 17 : Défauts de structure des NTC les plus communs. A gauche, « vacances » : lacunes, « edges » : arêtes, « adatoms » : adatoms, « interstitials » : carbone interstitiels. A droite, défaut de Thriwer-Stone-Wale.

Figure 18 : Les structures de la zone respiratoire. (a) L'alvéole, responsable de l'échange gazeux. (b) microphotographie montrant les structures alvéolaires dans le tissu pulmonaire LM× 178.

Figure 19 : Différents méthodes d'exposition : (a) modèle immergé, (b) modèle Ali et (c) modèle Vitrocell.

Figure 20 : Mécanismes potentiellement impliqués dans la toxicité des NMC.

Figure 21 : L'internalisation des NTC dans les cellules des mammifères.

Figure 22 : Influence des caractéristiques des MWCNT sur leur internalisation par les macrophages.

Figure 23 : NTC insérés dans une bicouche lipidique avec différents positions et orientations métastables. (a) NTC, (b) NTC fonctionnalisés, (c) NTC fonctionnalisé avec casquettes, (d) NTC fonctionnalisé avec casquettes et anneaux terminaux, (e) NTC court, (f) NTC long et (g) NTC large.

Figure 24 : Illustration schématique de la manière dont les caractéristiques physico-chimiques des NM peuvent influencer le degré et la conformation des protéines adsorbées.

Figure 25: Interaction des SWCNT avec la membrane mitochondriale.

Figure 26 : Les sources du stress du réticulum endoplasmique et son effet sur les macrophages.

Figure 27: Caractérisation par TEM de la distribution des MWCNT dans les lysosomes des macrophages.

Figure 28 : Différents mécanismes pouvant entraîner la formation d'ERO intracellulaires par les NM. 1: formation d'ERO extracellulaires; 2: formation d'ERO dans les vésicules; 3: dissolution des NM; 4: directement par les NM libres dans le cytoplasme; 5: Formation d'ERO par les mitochondries en réponse à l'interaction cellulaire avec les NM.

Figure 29: Différentes expressions de la *toxicité des NM liées au stress oxydant*.

Figure 30: Mécanisme possible de production d'IL-1 $\beta$  médié par NLRP3, et induit par les MWCNT.

Figure 31 : Mécanismes de survenue d'une inflammation, d'une fibrose et d'une tumorigénèse.

Figure 32 : Induction de la Production des protéines de la famille des SAA et conséquences de leurs interactions avec leurs récepteurs.

Figure 33: L'implication des macrophages dans le développement des mésothéliomes.

Figure 34 : Dispersion des NMC.

Figure 35 : Caractérisation des NMC par DLS et TEM.

Figure 36 : Exposition des cellules aux NMC pour la réalisation des tests de cytotoxicité.

Figure 37 : Principe du test WST-1.

Figure 38 : Principe du test de l'Alamar Blue.

Figure 39 : Le principe de la transcriptomique.

Figure 40 : Les différents étapes de la préparation des échantillons de protéines suivant la méthode SP3.

Figure 41 : Images de microscopie électronique à transmission des NMC. (A) NTC/Mitsui-7 et (B) NP sphériques (Printex-90).

Figure 42 : Variation de la viabilité (en %) des cellules NR8383 en fonction des concentrations du Mitsui-7 et du Printex-90 (en  $\text{cm}^2/\text{cm}^2$ ) par les deux tests WST-1 et Alamar Blue.

Figure 43 : Diagram de Venn des gènes différentiellement exprimés dans les cellules NR8383 exposées aux NMC : Printex-90 et Mitsui-7.

Figure 44 : Clusters des gènes communs entre NP Printex-90 et nanotubes Mitsui-7 (A), spécifiques de l'exposition aux NP Printex-90 : codant des protéines ribosomales (B) et des protéines pro-inflammatoires (C), et spécifiques à celle des nanotubes Mitsui-7 : codant des protéines intervenant dans le transport, microtubules dépendants, vers l'appareil de Golgi (D) et des protéines intervenant dans l'organisation du cytosquelette (E).

Figure 45: Actin cytoskeleton signaling path, as represented using IPA software, after NR8383 cells exposure to the same dose ( $1 \text{ cm}^2/\text{cm}^2$ ) for 4h (P value < 0.001 and FC  $\geq 1.5$ ).

Figure 46: Assimilation des nanotubes (2 et 3) à des NP sphériques (1) par DLS, a : diamètre hydrodynamique, b : rayon de la NP.

Figure 47: Comparaison des quarts des IC50 des différents NMC étudiés.

Tableau 1 : La toxicité associée à la corona des NMC.

Tableau 2 : Récepteurs des macrophages impliqués dans la phagocytose.

Tableau 3 : Effets des NP sur l'autophagie sans et avec évaluation du flux autophagique.

Tableau 4 : Limites d'exposition proposées sur le lieu de travail pour différents NM (toutes les données se réfèrent à la concentration par mètre cube, sauf indication contraire).

Tableau 5 : Caractérisation des NMC.

Tableau 6 : Principaux processus biologiques (GO), voies KEGG et voies Reactome communes et spécifiques pour chacun des NMC étudiés selon STRING (Stringency = 0.04).



# CHAPITRE I

---

## I. Introduction générale

---



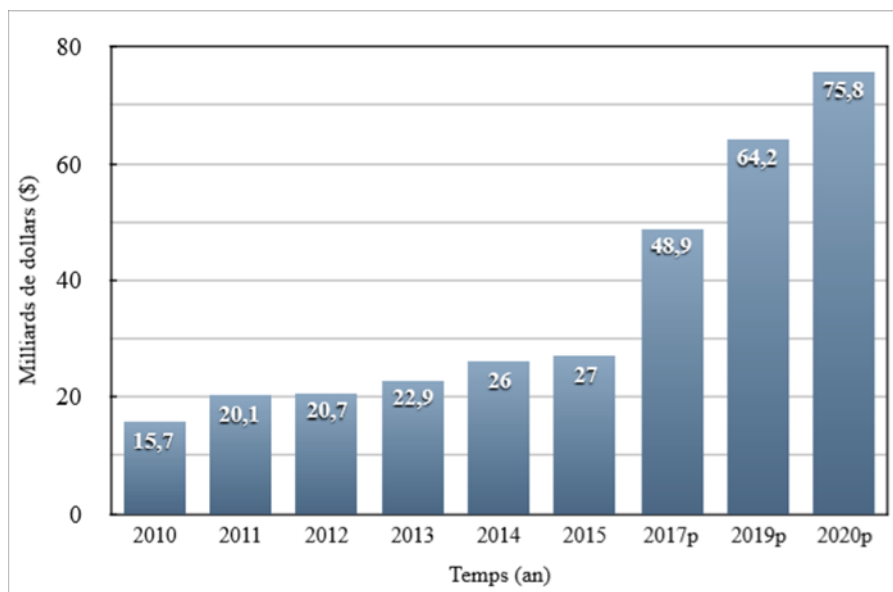
## 1 Nanotechnologies

On considère que c'est en 1981, avec le développement de la microscopie à effet tunnel permettant de visualiser des atomes isolés, qu'a débuté l'ère des nanotechnologies. L'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques) a défini en 2016 la nanotechnologie comme : « La compréhension des processus et des phénomènes et l'application de la science et de la technologie aux organismes, aux matériaux organiques et inorganiques, ainsi qu'à leurs pièces, produits et modèles, à l'échelle nanométrique dans une ou plusieurs dimensions, d'où l'apparition de phénomènes liés à la taille permettant généralement de nouvelles applications. Ces applications utilisent les propriétés de matériaux à l'échelle nanométrique, différentes de celles d'atomes, de molécules et de masses en vrac, pour la production de connaissances, de biens et de services, tels que des matériaux, des dispositifs et des systèmes améliorés exploitant ces nouvelles propriétés » [1].

La nanotechnologie permet la compréhension, la maîtrise et la manipulation des NM. Une définition de ces derniers par La Commission Européenne a été publiée le 18 Octobre 2011 (2011/696/UE). Ce document définit un nanomatériau (NM) comme étant un matériau naturel, formé accidentellement, ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions extérieures entre 1 nm et 100 nm [2]. D'autres définitions ont été aussi données par d'autres organismes comme l'AGHA (*Australian Government of Health and Ageing*), et la FDA (*Food and Drug Administration*). Toutes les différentes définitions évoquent la présence au moins d'une dimension nanométrique.

Les NM présents dans le monde vivant, peuvent être produits de manière naturelle dans l'environnement (fumées volcaniques, incendies de forêts...). L'homme produit des NM de façon non intentionnelle, du fait de son activité journalière (chauffage, véhicules à moteur ...) qui sont appelés particules ultrafines. Les NM manufacturés se divisent en deux grandes familles : les nano-objets et les matériaux nanostructurés. Le terme nano-objet s'applique à une structure nanométrique libre tels que les nanoparticules (NP), les nanotubes, les nanofeuillets, les quantum-dots... Les matériaux nanostructurés possèdent une structure interne ou de surface à l'échelle nanométrique, regroupent les agrégats et agglomérats de nano-objets, les nanocomposites et les matériaux nanoporeux [3].

Cette échelle nanométrique confère au matériau de nouvelles propriétés qui élargissent leur champ d'application. C'est pourquoi ces NM sont devenus des facteurs majeurs dans l'économie et sont utilisés en milieu industriel, en agriculture, dans l'alimentation ou le domaine de la santé. Ceci explique la multiplication de leurs applications et le développement rapide et continu de leur marché. Les nanotechnologies sont considérées comme la nouvelle « révolution industrielle » [4] et ce secteur novateur est en pleine expansion d'années en années (Figure 1) et les prévisions sont que le marché mondial des nanotechnologies atteigne 76 milliards de dollars en 2020.



**Figure 1 : Evolution du marché des nanotechnologies de 2010 à 2019 et projection pour 2017-2020.** (Modifiée) [5].

Avec le développement de ces nanotechnologies augmente, en parallèle, les risques d'exposition non seulement les travailleurs mais aussi de la population. Cette exposition croissante aux NM suscite logiquement des inquiétudes quant à leurs effets nocifs potentiels sur la santé humaine, animale et environnementale, surtout que l'état actuel des connaissances sur leur toxicité est limité.

La voie d'exposition la plus fréquente aux NM est l'inhalation. Leur taille favorise la formation d'aérosols, donc leur pénétration dans l'appareil respiratoire [6]. Une fois dans l'arbre respiratoire, les premières cellules avec lesquelles elles rentrent en contact sont les macrophages, première ligne de défense contre le non soi. De ce fait, les lignées macrophagiques alvéolaires sont des modèles pertinents pour les études de la toxicité de ces NM.



Ce travail de thèse s'intègre dans le cadre du projet européen SmartNanotox dont le but est de proposer un système de QSAR associé à des tests toxicologiques simples permettant d'évaluer la toxicité de NM afin de prévoir les risques d'exposition humaine et surtout professionnelle. Ce travail en particulier consiste à étudier la toxicité d'une famille de celles-ci, les nanomatériaux carbonés (NMC), en raison de leur fort intérêt technologique et de leur importante production, en se focalisant sur les nanotubes de carbone (NTC), sur lesquels porte l'essentiel de notre travail, en utilisant un modèle *in vitro* de lignée de macrophages alvéolaire de rats et des approches transcriptomiques et protéomiques. Une analyse bibliographique portant essentiellement sur les caractéristiques physiques et chimiques des NMC, l'exposition, leur marché, les propriétés influençant leur toxicité et l'état actuel des connaissances sur leur toxicité, sera présentée. Après avoir exposé les objectifs et la démarche retenue pour l'étude, les résultats obtenus seront ensuite détaillés dans un quatrième chapitre qui comprend quatre articles, dont l'un est en cours de rédaction, et une étude qui reste à finaliser ; puis l'ensemble des résultats et leurs perspectives seront discutés dans une dernière partie.

Ce travail a été réalisé sous la direction du Professeur Luc Ferrari au sein de l'EA 3452 Cithefor dirigé par le Professeur Pierre Leroy, puis, à partir de 2019, de l'équipe 403 "Nanomatériaux et santé" dirigée par le Professeur Bertrand Rihn, à l'Institut Jean Lamour. Cette thèse a été financée par un projet Horizon 2020.

## 2 Le projet Smartnanotox

### 2.1 Objectifs

SmartNanoTox est un projet de recherche et d'innovation européen d'une durée de 48 mois porté dans notre équipe par le Dr. Joubert, maître de conférences à l'Université de Lorraine, et coordonné par Dr Vladimir Lobaskin de l'UCD (University College Dublin). Ce projet financé par Horizon 2020 (n° d'agrément 686098) met en collaboration 11 partenaires tant académiques qu'industriels européens du domaine. Huit pays font partie de ce consortium : Irlande, Allemagne, Slovénie, Royaume-Uni, Suède, Danemark, Finlande et la France avec deux partenaires, l'INRS (*Institut National de Recherche et de Sécurité*) et l'UL (*Université de Lorraine*), avec pour cette dernière, l'équipe 403 au sein de l'Institut Jean Lamour. Ce projet mène à une étude cohérente et complète comprenant des expérimentations *in vivo*, *in vitro* et *in silico*, afin d'identifier divers mécanismes de toxicité liés à une large gamme de NM. Munies des différents outils de la biologie, de la toxicogénomique et de la protéomique parallèlement à la poursuite d'études des NM *in vivo* en temps réel, le projet identifiera des MIE (Molecular Initiating Event), ou

événements moléculaires, initiateurs et des KE (Key Event), ou événements clés, des voies métaboliques ou signalétiques liées à la toxicité observée *in vivo*. Ces MIE sont des événements critiques nécessaires pour déclencher une cascade biologique menant à une réponse au niveau de l'organisme appelé AO (Adverse Outcome) ou effet adverse. Le diagramme (Figure 2) montre le concept d'un AOP (Adverse Outcome Pathway) comprenant MIE. Concernant les KE, ce sont des événements biologiques intermédiaires importants et mesurables qui relient l'événement moléculaire initial MIE à la réponse finale AO. La liste exhaustive des effets toxicologiques et des voies métaboliques correspondantes avec les NM sélectionnées servira à déduire la corrélation entre les voies de toxicité perturbées et les diverses propriétés physiques et chimiques des NM et à obtenir des relations structure-activité quantitatives, QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship). Le projet produira une base de données comprenant des descripteurs de NM pertinents liés aux interactions biomoléculaires, aux MIE / KE identifiés et aux AO. Le regroupement des NM qui en résultera sera basé sur leur capacité à induire un MIE déterminé conduisant à une cascade de KE et à une éventuelle AO. Celles-ci seront validées par des simulations moléculaires et des expériences. L'application de nouveaux outils de criblage *in silico* développés et des tests *in vitro* simples et économiques validés dans le cadre de ce projet permettront par la suite une évaluation efficace de la toxicité éventuelle des NM et facilitera ainsi l'élaboration de nouvelles NM, sûres tout en réduisant le recours à l'expérimentation animale

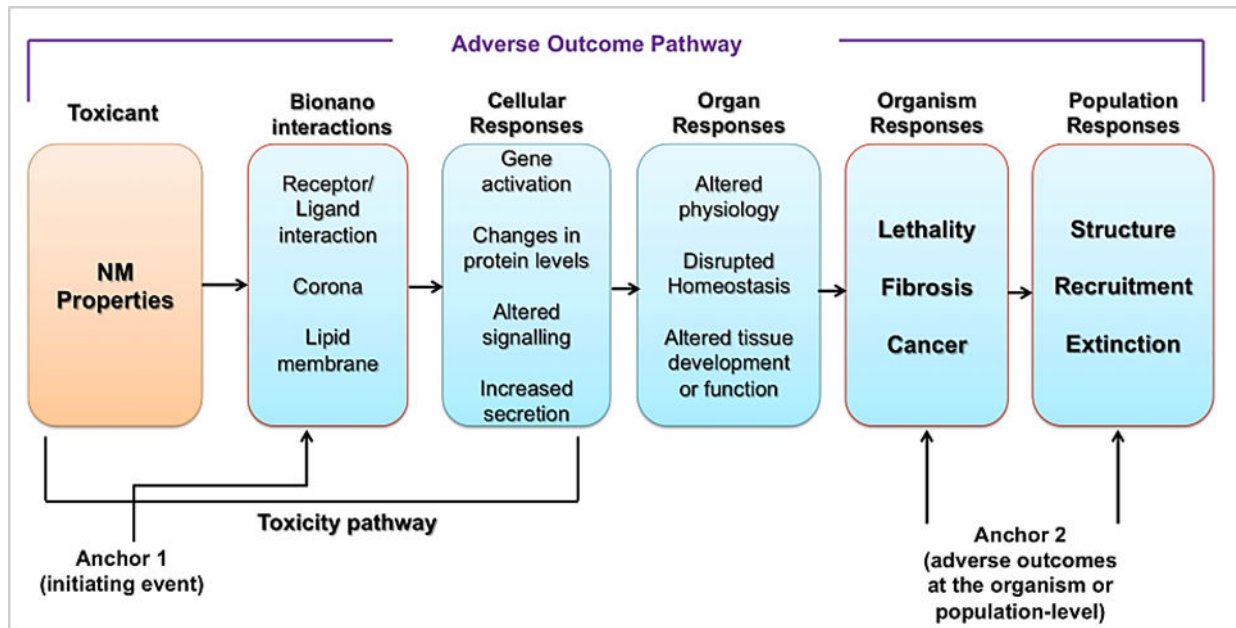


Figure 2 : Schéma conceptuel d'un AOP [7], [8].

## 2.2 Méthodologie

Les NM utilisés au cours du projet sont fournis par JRC (Joint Research Center). Il en existe une soixantaine disponible au NRCWE (National Research Center for the Working Environment). La caractérisation physico-chimique de ces NM est celle réalisée lors du projet Nanogenotox. Dans le cadre de Smartnanotox sont réalisées des expérimentations *in vivo* en utilisant 2 modèles animaux, rat et souris, et 2 méthodes d'exposition respiratoires, instillation et inhalation. Sont également réalisés des tests *in vitro* sur des modèles cellulaires variés (LA-4, MH-S, NR8383, THP-1) et sur des co-cultures développés également, suivant le modèle d'exposition immergé classique ou le modèle interface air-liquide. Le système interface air-liquide utilisé est le Vitrocell développé par deux partenaires allemands (Tobias Krebs et Otmar Schmid). Il mime une exposition par voie aérienne tout en utilisant le surfactant humain. Ces données permettent d'établir une étude comparative entre les endpoints de *in vivo* et *in vitro* qui aboutira à la sélection des tests *in vitro* les plus pertinents. Le projet recourt à des approches « Omics » ce qui conduira à relier les différents descripteurs des NM aux voies de signalisation altérées. Ces liens seront établis après modélisation statistique. Parmi les approches utilisées pour comprendre les effets des NM, Smartnanotox considérera l'étude de la corona formée autour des NM et la compréhension de son implication dans la toxicité de ces derniers. Parmi toutes ces différentes tâches, celle de l'équipe 403 à

l'institut Jean LAMOUR, étudie la toxicité *in vitro* (immersion et Vitrocell) d'une soixantaine de NM comprenant les NMC et les oxydes métalliques sur deux lignées cellulaires macrophagiques *NR8383* et *THP-1*. Ce travail de thèse qui s'intègre dans cette étude est consacré au développement des tests d'évaluation de la toxicité des NMC *in vitro* et a pour but de comprendre la réponse macrophagique à la suite de l'exposition à ces NMC, en particulier les effets de leurs caractéristiques physiques et chimiques sur le transcriptome.

## CHAPITRE II

---

### II. Analyse bibliographique : état de l'art

---



## 1 Le carbone dans la nature

Le carbone est l'élément chimique de numéro atomique 6 et de symbole C. Il possède trois isotopes naturels :  $^{12}\text{C}$  (majoritaire),  $^{13}\text{C}$  qui sont stables et  $^{14}\text{C}$  qui est radioactif avec une demi-vie de 5 730 années. Le carbone, est le 4<sup>e</sup> élément le plus abondant dans l'univers et le 15<sup>e</sup> le plus abondant dans la croûte terrestre. C'est le principal composant des êtres vivants. Il est présent dans la nature à l'état amorphe pur et sous forme de graphite diamant et lonsdaléite, trois allotropes à formes cristallines. Le carbone est également présent sous forme de composés inorganiques comme le dioxyde de carbone, ou organiques notamment le pétrole et le gaz naturel.

Le graphite et le diamant diffèrent par leurs structures et leurs propriétés. Les atomes de carbone du graphite forment des grilles à mailles hexagonales séparées les unes des autres. Cependant, dans le cas de diamant, l'atome de carbone est lié aux 4 atomes de carbone voisins formant un tétraèdre, structure de base des cristaux. En conséquence le graphite est un matériau mou, conducteur de courant du fait de l'existence d'un électron libre pour chaque atome de carbone et médiocre conducteur de chaleur alors que le diamant est très dur, isolant électrique (en l'absence d'électrons libres) et un excellent conducteur de chaleur. La lonsdaléite, découverte en 1967, est un allotrope du diamant, avec agencement cubique des atomes de carbone [9]. En plus, de nombreuses structures synthétiques à base de carbone existent parmi lesquelles le charbon actif, le noir de carbone (NC), le graphène, l'oxyde de graphène (OG), les fullerènes et les NTC. Les applications du carbone et de ses dérivés sont multiples.

La forme amorphe du charbon utilisé comme combustible est extraite de mines. Elle est de moins en moins utilisée. Le carbone a la propriété de former des chaînes d'atomes, liées à des atomes d'hydrogène, formant les hydrocarbures (alcanes, alcènes...). Ceux-ci, extraits du sol (pétrole et gaz naturel) sont principalement utilisés comme combustible. Une partie est utilisée par les industries pétrochimiques produisant des peintures, des solvants et des plastiques, etc...

Sur le plan biologique, le carbone est un élément essentiel de la vie. Il est utilisé par les organismes photosynthétiques sous forme de dioxyde de carbone pour la formation de la matière organique indispensable à la vie. Ce dioxyde de carbone forme avec l'hydrogène les glucides et avec d'autres éléments comme l'azote, l'oxygène et le phosphore les autres molécules du vivant : acides aminés, bases azotées, coenzymes....

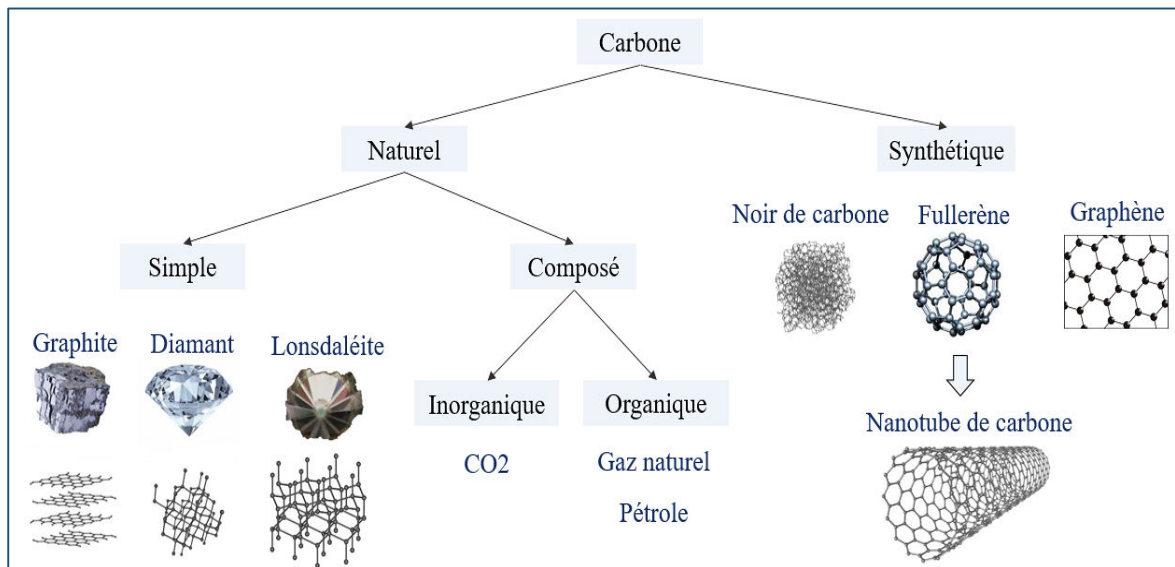
## 2 Les formes nanométriques du carbone

Les NMC (Figure 3) regroupent : (a) les NP sphériques ayant une structure amorphe qu'on appelle NC, structure à une dimension, et (b) le graphène. Ce dernier, découvert par Novoselov et Geim en 2004 (Prix Nobel de Physique en 2010), se présente comme un simple feuillet en deux dimensions, composé uniquement d'atomes de carbone, arrangés selon un réseau hexagonal. Cette structure est retrouvée dans d'autres formes du carbone (nanotubes, fullerènes).

Le graphène a des caractéristiques intéressantes : (a) les liaisons covalentes entre les atomes de carbone lui confèrent une résistance importante, (b) c'est un matériau léger avec une capacité d'adsorption élevée, (c) il est conducteur. C'est un semi-conducteur de gap nul, propriété liée à la présence d'un électron libre pour chaque atome de carbone. Le graphène est obtenu à partir du graphite. De nombreuses applications sont en cours de développement. Il pourrait permettre de fabriquer des batteries à charge élevée et de recharge rapide.

Les fullerènes, comme le graphène, sont constitués d'un réseau d'atomes de carbone hexagonal mais qui prend, selon les conditions de synthèse, la forme d'une sphère, d'un ellipsoïde ou d'un tube. Ils forment non plus des surfaces planes, mais une cage fermée ou l'on peut piéger un ou plusieurs atomes. Cette caractéristique est intéressante pour des applications biomédicales. Il est possible de greffer des molécules à leur surface qui leur confère des propriétés nouvelles sources d'applications intéressantes.





**Figure 3 : Différentes formes du carbone.**

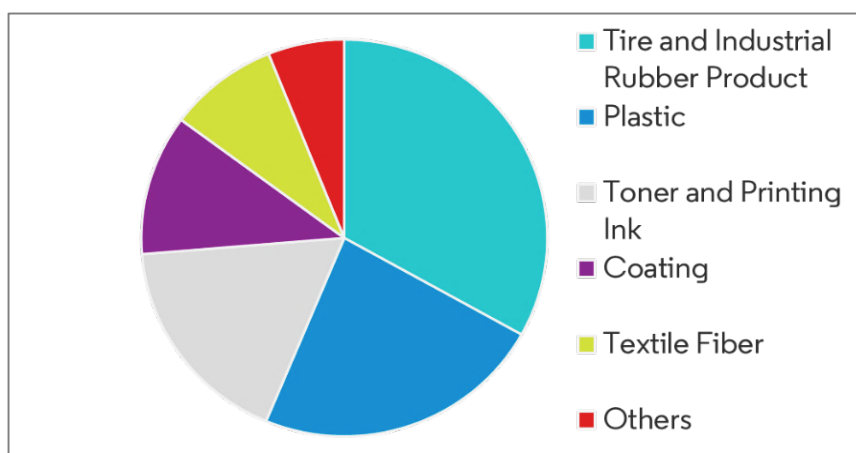
## 2.1 Les formes étudiées : propriétés, synthèse et applications

Trois formes nanométriques du carbone, le NC, l'OG et les NTC ont été utilisés dans ce travail. L'analyse bibliographique porte donc sur ces trois formes en insistant plus particulièrement sur les NTC qui étaient les plus étudiés.

### 2.1.1 Le noir de carbone

C'est une forme du carbone élémentaire de plus en plus produite et qui est devenue la plus répandue du fait de son importante utilisation. C'est un mélange de NP sphériques de 15 à 30 nm de diamètre, d'agrégats de 85 à 500 nm et d'agglomérats de 1 à 100  $\mu\text{m}$ . Le NC est produit par la combustion incomplète d'hydrocarbures. Il est sous forme amorphe. C'est un matériau léger de faible densité (1.7 à 1.9  $\text{g}/\text{cm}^3$ ) [10]. Les NP de NC, du fait de leur grande surface spécifique ont une résistance élevée d'où leur utilisation comme agent de renforcement dans les pneus de véhicules. Une caractéristique importante du NC est sa structure : l'arrangement tridimensionnel de particules primaires au sein d'agrégats. Plus sa structure est ramifiée plus sa viscosité et sa conductivité sont grandes et sa dispersion facile. Sa porosité, contrôlable au cours de la synthèse lui confère donc une plus grande conductivité électrique.

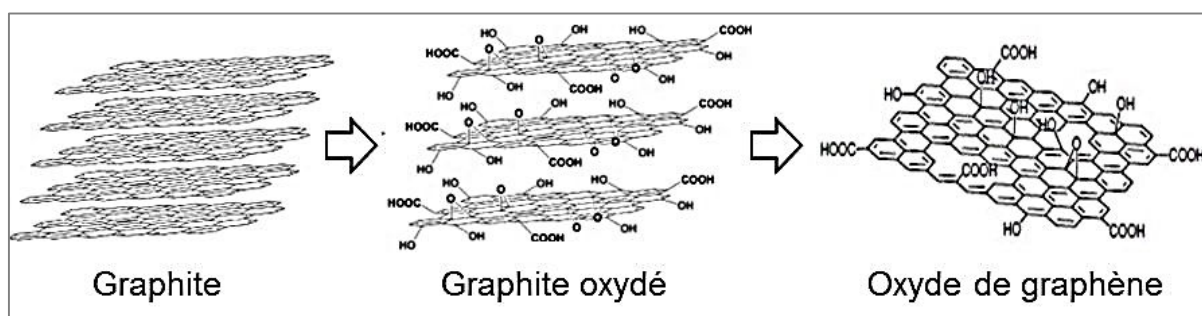
Ses principales applications industrielles sont la fabrication des pneumatiques, l'industrie du caoutchouc et l'utilisation de son pouvoir colorant (encres et toners d'imprimantes, tissus, peinture...). Il a également des applications dans l'industrie du plastique. Son utilisation dans les emballages d'aliments et de boissons est actuellement discutée [11]. En France, les NMC et les NM organiques sont les NM les plus produits et importés en 2017 (> 100 000 t) au sein desquels, le NC est le plus important (>10 000 t).



**Figure 4 : Le marché du NC, applications, 2018 [12].**

### 2.1.2 L'oxyde de graphène

Avec l'OG on reste sur un composé en deux dimensions. Le traitement du graphène avec des oxydants forts puis sa dispersion dans des solutions basiques produit des feuillets monomoléculaires d'OG. L'OG est un composé inorganique de carbone, oxygène et hydrogène dans des rapports atomiques variables. La fonctionnalisation des feuillets de graphène par des groupements oxygénés augmente de la distance entre les plans et lui confère un caractère hydrophile particulièrement utile.

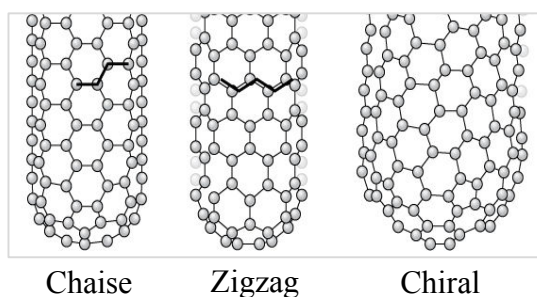


**Figure 5 :** Représentation schématique de l'obtention d'OG [13].

L'OG se disperse facilement dans l'eau, les solvants organiques ainsi que les différentes matrices. Ceci explique son incorporation dans les céramiques et les polymères dont il améliore les propriétés électriques et mécaniques. Autrement, l'OG contenant de carbone hybrides  $sp^2$  et  $sp^3$  est un isolant électrique. En jouant sur la fraction  $sp^2$ , sur sa taille et sa forme, cet isolant devient conducteur après réduction chimique. Finalement, il possède des propriétés électroniques distinctes, et ainsi il est utilisé dans les matériaux composites en graphène/polymères, les batteries, les super condensateurs et la recherche biomédicale. D'après Han et al., l'OG fonctionnalisé à l'hypéricine a montré un ciblage amélioré des mitochondries et un effet anticancéreux synergique [14, p.]. Cependant la délivrance des médicaments pré-apoptotiques vers la mitochondrie d'une manière efficace reste encore loin d'être accomplie à cause des limites de pénétration des NM à travers la membrane cellulaire [15]. Le marché des OG reste pour le moment limité malgré les nombreuses applications, du fait de la limitation technique de leur production commerciale et le coût élevé des équipements.

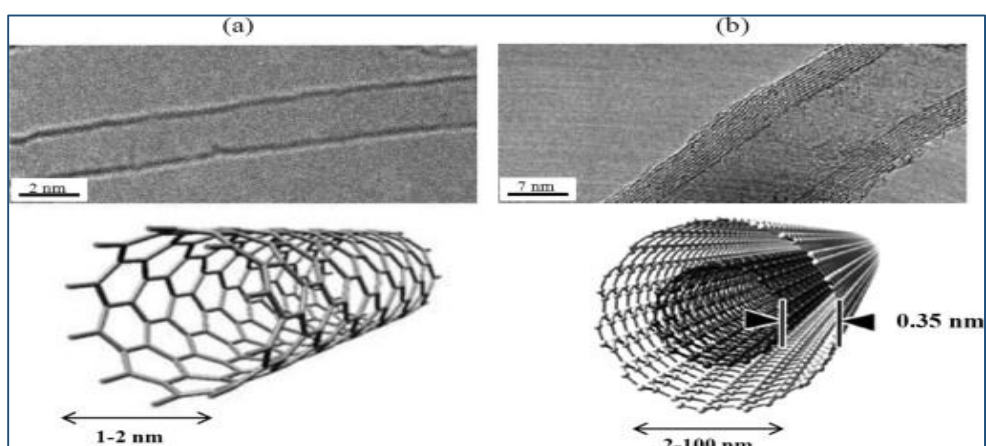
### 2.1.3 Les nanotubes de carbone

Les NTC découverts en 1991 par Sumio Iijima sont définis comme des structures composées d'un ou plusieurs feuillets de graphène enroulés formant une structure cylindrique. L'angle d'enroulement du feuillet de graphène, fixe la structure du nanotube. Cet angle varie de 0 à 30° compte tenu de la symétrie du réseau hexagonal et permet de classer toutes les configurations possibles en trois catégories appelées « chaise » (angle = 30°) ; « zig-zag » (angle = 0°) et « chirale » (0° < angle < 30°) [16]. Il existe deux grandes familles de NTC, selon le nombre de feuillets : les NTC monofeuillets, SWCNT (Single-Walled Carbon Nanotubes) et les NTC multifeuillets, MWCNT (Multi-Walled Carbon Nanotubes).



**Figure 6 : Les différentes configurations des NTC.**

Un nanotube monofeuillet est formé d'une seule couche de graphène enroulé sur elle-même pouvant être fermée aux deux extrémités. Ces extrémités sont coniques, polygonales ou sphériques. Le regroupement d'une dizaine de NTC monofeuillets constitue un faisceau. Un nanotube multifeuillet est formé de plusieurs couches de graphène, concentriques (Figure 7) [17]. On distingue le modèle poupée russe dont les plans de graphène sont arrangés en cylindres concentriques et le modèle parchemin, ou un seul feuillet de graphène est enroulé sur lui-même, comme une feuille de papier. Les SWCNT ont un diamètre compris entre 0,6 et 6 nanomètres et sont de longueur variable, pouvant aller jusqu'à plusieurs micromètres. Quant aux MWCNT, leur diamètre peut varier de 2 à 30 nanomètres en fonction du nombre de couche qu'ils contiennent. L'espacement entre deux feuillets est d'environ 0,34 nanomètre [18].



**Figure 7:** SWCNT (a) et MWCNT (b) observés au microscope électronique à transmission et schémas de leurs structures [19].

### 2.1.3.1 Synthèse des NTC

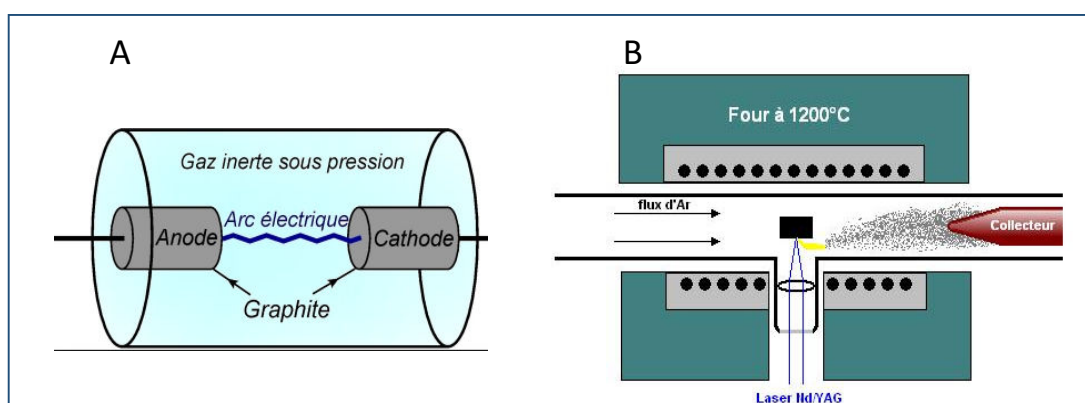
Les méthodes de synthèse des NTC se répartissent en deux groupes : les méthodes physiques utilisant des températures élevées,  $T > 3000^{\circ}\text{C}$ , et les méthodes chimiques à températures moyennes entre  $500^{\circ}\text{C}$  et  $1200^{\circ}\text{C}$ . Pour les méthodes physiques on distingue l'arc électrique et l'ablation Laser et pour les méthodes chimiques, la CVD (Chemical Vapor Deposition) et la HiPco,<sup>31</sup> (High Pressure CO disproportionation).

#### Méthodes physiques :

Elles reposent sur la condensation d'atomes de carbone générés par la sublimation du carbone solide dans un plasma sous atmosphère inerte. Elles utilisent ou non des catalyseurs,

- A. Arc électrique : une décharge électrique entre deux électrodes de graphite placées dans une enceinte remplie d'un gaz inerte (hélium ou argon) produit une température inter-électrode élevée qui entraîne la sublimation du carbone. Des nanotubes multifeuillets sont obtenus sans catalyseurs alors que l'emploi de ceux-ci génère des nanotubes simple-feuillets. Ce procédé très simple et peu coûteux a un rendement faible et un taux d'impuretés très important [20], [21].
- B. Ablation Laser : Cette technique consiste à ablater une cible de graphite avec un rayonnement laser à impulsion ou continu de forte énergie. Ceci génère les deux types de NTC: multifeuillets en absence de catalyseurs et simple-feuillets en présence de ces derniers. Ce procédé, certes plus coûteux que le précédent, a un meilleur rendement car 70 à 90% de la masse de graphite de départ est convertie en nanotubes.

Ces méthodes conduisent à la synthèse de nanotubes avec un grand degré de cristallinité cependant elles génèrent un grand nombre de dérivés carbonés comme du carbone amorphe et des coques graphitiques. La purification mise en œuvre afin d'éliminer ces produits altèrent les nanotubes et conduit à une perte de masse. De ce fait le procédé par dépôt chimique en phase vapeur, CVD, plus efficaces, est préféré.



**Figure 8 :** Schéma des méthodes physique de synthèse des NTC par arc électrique (A) et par ablation par le laser (B).

### Méthodes Chimiques :

Elles reposent sur la décomposition catalytique d'un précurseur carboné gazeux sur des NP métalliques. Chemical Vapor Deposition, CVD : elle consiste à décomposer un gaz carboné (CO, CH<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, ou C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>) par des NP de catalyseur métallique (Co, Ni, Fe, Pd). Si la température est comprise entre 600°C et 800°C, on obtient des multifeuillets dont le diamètre est entre 10 et 240 nm. Par contre les NTC formés à des températures de 900°C et 1200°C produisent des monofeuillets de diamètre de 0,7 à 4 nm [13]. Ces procédés CVD ont un meilleur rendement et sont, en général, préférés.

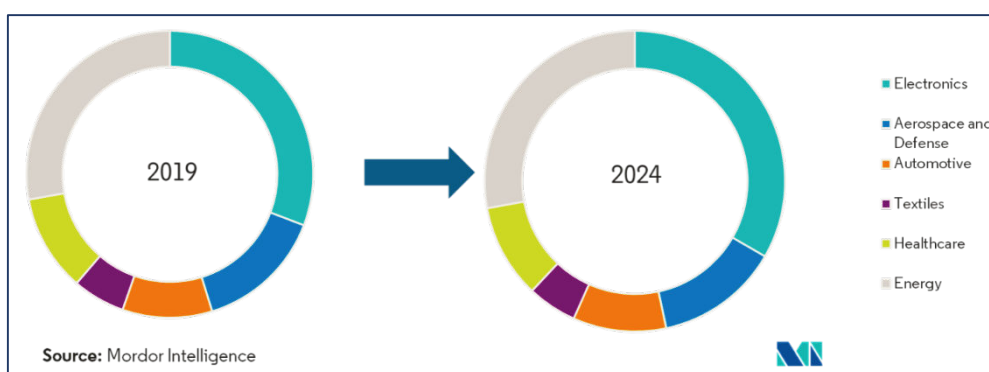
### 2.1.3.2 Propriétés des NTC

Les NTC bénéficient d'une tenue mécanique supérieure à celle du graphite. De plus ils sont 100 à 200 fois plus résistant que l'acier. En effet, chaque atome de carbone dans une feuille de graphite, est relié par des liaisons covalentes fortes à trois atomes voisins, d'où la rigidité et la résistance exceptionnelles. Il allie à cette rigidité, une grande flexibilité. Les NTC ont tendance à se plier jusqu'à des angles très importants, à se déformer, à se tordre selon leur axe mais à revenir à leur état d'origine dès que la force cesse. Les NTC peuvent être isolant, métalliques ou semi-conducteur. Cela dépend de leur angle d'enroulement et de leur diamètre.

La configuration « chaise » présente un caractère métallique alors que les autres sont des semi-conducteurs [21],[22], [23]. Les NTC peuvent transporter des densités de courant remarquables soit au moins deux ordres de grandeur de plus que les métaux [15]. Les NTC monofeuillets possèdent de meilleures propriétés électriques que les multifeuillets. Il est possible d'ajouter des groupes fonctionnels ou d'intercaler des atomes et des molécules entre les nanotubes monofeuillets ou entre les différentes couches d'un nanotube multifeuillet ce qui permet de contrôler leurs propriétés électroniques. Il est également possible de remplir par capillarité leur canal central par des atomes ou des composés cristallins de façon à obtenir des nanofils encapsulés. Finalement ces nanotubes ont aussi des propriétés d'émission par effet de champs. Ils peuvent envoyer des électrons à un endroit très précis.

### 2.1.3.3 Applications des NTC

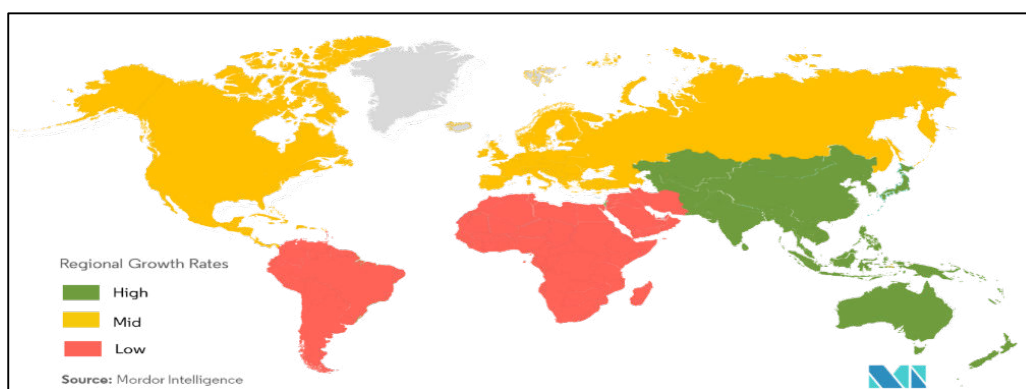
Les NTC sont incorporés dans des matrices auxquelles ils confèrent légèreté et résistance : cadres de vélo, raquettes de tennis, clubs de golf (associés à des fibres de carbone). Ils ont également été introduits dans divers matériaux pour l'électronique, l'électromagnétique, l'optique et dans certains plastiques [22]. Du fait de leur excellente conductivité, ils permettent de développer des capteurs [23]. Ils ont aussi des propriétés adsorbantes ce qui les rend de bons candidats pour filtrer les gaz, l'air ou l'eau [24],[25]. Plus récemment ils ont été proposés en nanomédecine notamment comme des systèmes de délivrance des médicaments, car les NTC peuvent facilement s'adsorber ou se conjuguer à de nombreuses molécules thérapeutiques (médicaments, protéines, anticorps, enzymes...). Les NTC pourraient être utilisés pour le criblage de la mitochondrie dans les traitements anti-cancéreux [26]. De plus, ils sont utilisés dans certains implants artificiels, dans l'ingénierie tissulaire ou encore dans des systèmes d'identification de cellules cancéreuses [27], [28].



**Figure 9 : Le marché des NTC, applications, 2018 [29].**

### 2.1.3.4 Marché des NTC

Le marché des NTC est en pleine expansion. En France, Arkema, principale société productrice de NTC, a déclaré en 2018 un chiffre d'affaires de 8.816 million euros. Au niveau mondial, le marché de NTC a été évalué à 4.55 milliards de dollars en 2018 et les prévisions pour 2023 seraient que ces NT atteignent 9.84 milliards de dollars sur le marché mondial, soutenu par un CAGR de 16.70%. Le nord de l'Amérique est en premier par rapport à l'Europe selon le rapport 2016 et l'analyse du marché montre que les NTC multi-feuillets ont un marché plus important que les monofeuillets. En termes d'application, l'électronique et l'énergie sont les plus importants segments d'application des NMC, suivis de l'industrie automobile. Depuis peu, ils sont utilisés de plus en plus pour les équipements sportifs.



**Figure 10 :** *Marché des NTC, taux de croissance par région, 2019-2024* [29].

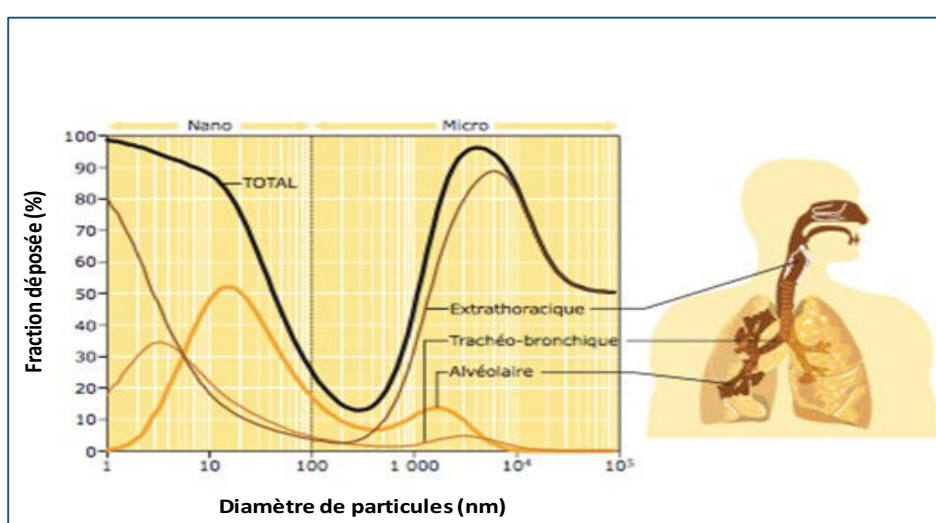
## 2.2 Les voies d'exposition aux NMC

Même si les NMC font partie intégrante de la révolution industrielle apportée par les NM, du fait de leurs multiples applications, les NMC, très légers, se retrouvent dans l'air et sont sources potentielles de problèmes de santé et peuvent devenir un problème de santé publique [30], [31]. L'exposition se produit sur les lieux de production, stockage et utilisation mais ces NMC sont également présents dans la vie de tous les jours. Par exemple, l'usure des pneus entraîne leur libération dans l'environnement [32]. Ils pénètrent dans l'organisme par voie aérienne. Cependant la voie digestive, secondaire à la première et la voie cutanée par contact ne sont pas à négliger. La voie parentérale est observée surtout en milieu médical lors d'administration de médicaments.



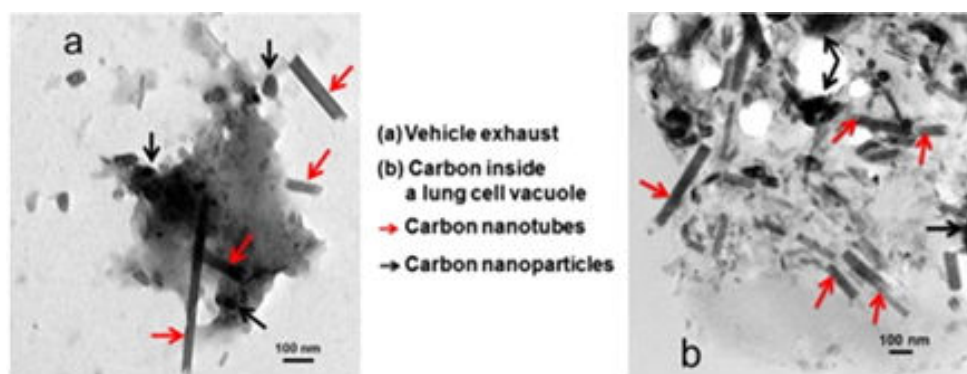
## 2.2.1 La voie aérienne

L'inhalation est la voie de pénétration dans l'organisme humain la plus fréquente et la plus importante. Les moyens de défense de l'appareil respiratoire contre les particules inhalées permettent leur piégeage avant qu'elles atteignent les alvéoles. Mais les mécanismes mis en jeu, la paroi nasale, le mucus, l'épithélium trachéo-bronchique cilié sont d'autant plus efficaces que les particules sont plus grosses. La clairance bronchique qui fait remonter le mucus vers le pharynx où il est dégluti assure la remontée des particules piégées en son sein. Mais celles de plus petite taille, microscopiques (bactéries, virus) ou nanométriques peuvent gagner les alvéoles.



**Figure 11 : Dépôt théorique total chez l'homme, en fonction du diamètre des particules inhalées [33].**

Le faible diamètre des NTC leur permet d'atteindre les alvéoles pulmonaires. Ainsi des NTC ont été retrouvés dans les poumons d'enfants asthmatiques âgés de 2 à 17 ans, vivant en milieu urbain. Sur les 69 échantillons analysés, tous ont révélé la présence de NTC dont la structure est identique à ceux retrouvés dans les échappements de moteurs diesel (Figure 12) [34] ce qui est en faveur d'une exposition permanente à ces NM. Les NTC gagnent la plèvre. Les plus longs entraînent le développement chez les rongeurs de mésothéliomes après inoculation intrapéritonéale.



**Figure 12 :** Analyse en microscopie électronique à transmission de sortie de pots d'échappement (a) et de liquide broncho-alvéolaire (b) montrant la présence de nano-objets (NTC et NP de carbone) [34].

### 2.2.2 La voie gastro-intestinale

L'exposition aux NTC par voie digestive est rarement directe. En milieu professionnel, cette exposition est considérée comme accidentelle ou secondaire à leur inhalation. Après inhalation la clairance bronchique fait remonter les particules piégées dans le mucus vers le carrefour aéro-digestif où elles sont dégluties [35], [36], [37]. Peu d'études ont pris en compte ce mode d'exposition bien qu'en théorie le passage de NTC à travers la muqueuse digestive est possible. Autrement, le relargage des NMC dans l'environnement entraîne une contamination de l'écosystème surtout le milieu aquatique. Il y a une ingestion de ces NMC par différentes espèces aquatiques comme la *Daphnia magna* et *Ceriodaphnia dubia*. Ils sont trouvés aussi dans des aliments comme le concombre, *Cucumis sativus* Linn [38]. Toutefois, l'ingestion de ces NMC survient principalement lors de la consommation des aliments et des produits agricoles contaminés [39]. Au niveau de l'intestin, ils pourront être absorbés par les entérocytes intestinaux ou les cellules épithéliales membraneuses des plaques de Peyer [35]. Ensuite, ces NM se disséminent dans le corps et s'accumulent aux niveaux de certains organes cibles. Dans certains cas, ils seront excrétés et éliminés (fèces, urines).

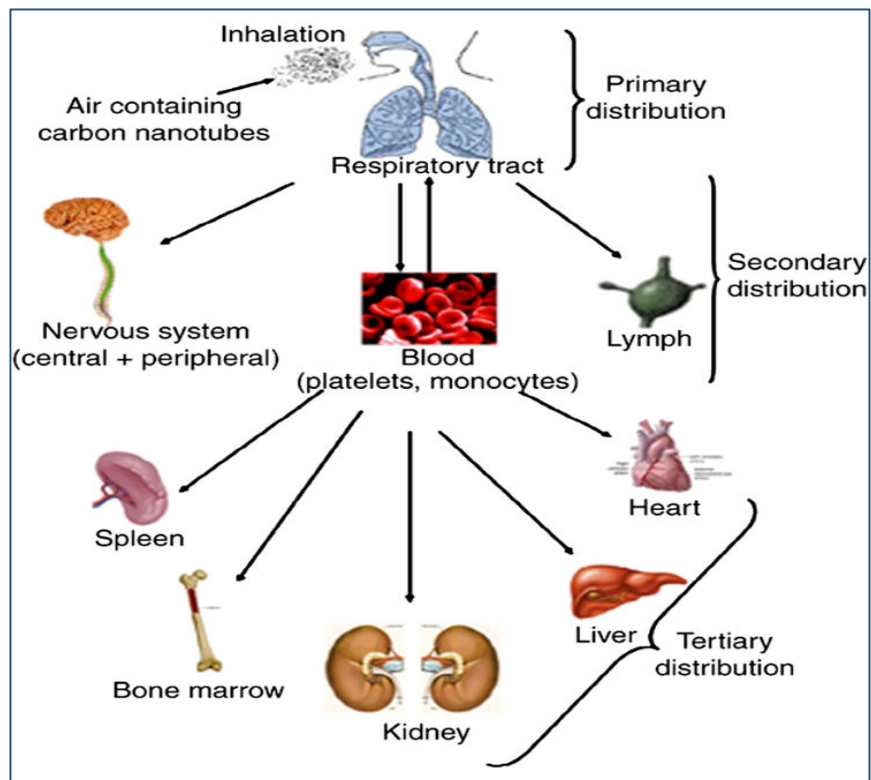
### 2.2.3 La voie cutanée

Une exposition cutanée aux NTC est possible cependant ces NM ne peuvent pas spontanément traverser la peau saine. Récemment, les NTC sont apparus comme un outil polyvalent permettant d'administrer des traitements à travers la peau. Les NTC ont donc largement participé à la mise au point de systèmes transdermiques tels que des hydrogels accordables, des membranes non poreuses programmables, des

modèles cutanées électrosensibles, des plates-formes mimétiques de canaux protéiques, une iontophorèse inverse et des microaiguilles [40].

### 2.2.4 La voie parentérale

La voie parentérale directe est utilisée en milieu hospitalier dans le cadre de traitements ou d'essais thérapeutiques. Les NTC sont des vecteurs de médicaments à titre expérimental. Dans ce cas les quantités utilisées sont faibles et généralement en administrations uniques ou en petit nombre. Par contre après pénétration par voie aérienne ou digestive, les NTC peuvent gagner la circulation générale, essaimer dans l'organisme et gagner différents organes. Ils peuvent aussi passer des poumons vers le foie, les reins, le cœur et le cerveau (modèles animaux) [41], [42], [43].



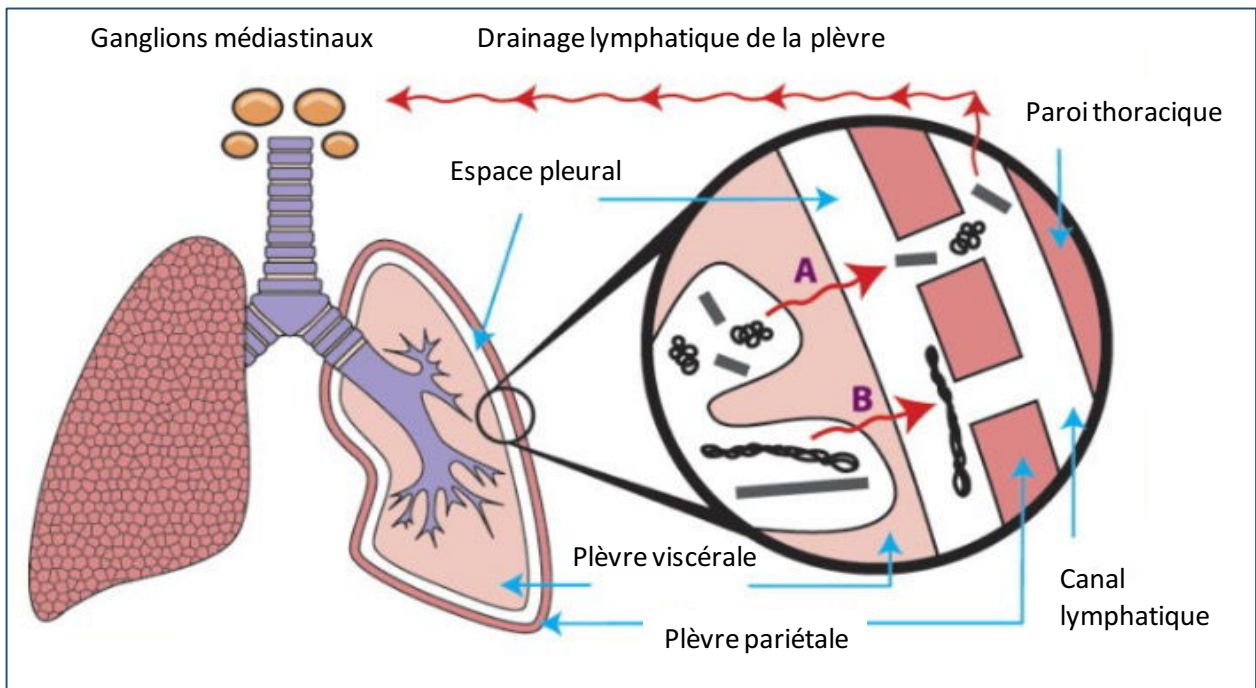
**Figure 13:** les différentes voies d'exposition aux NMC [44].

## 2.3 Les descripteurs des NMC : déterminants de toxicité

L'OCDE a mis en place une liste de 52 critères décrivant les NM. En effet, il existe une très grande quantité de NM se distinguant par leurs caractéristiques intrinsèques. Ces différents paramètres physico-chimiques devraient permettre de définir leur comportement dans l'environnement. Cependant l'évaluation et la quantification de chaque type de NM n'est pas envisageable. Il faut donc parvenir à identifier les paramètres en lien avec leur toxicité potentielle. Selon l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), un minimum de huit caractéristiques définit un NM. Ces descripteurs ont un rôle dans la toxicité [45]. Nous évoquons maintenant les liens entre ces différents descripteurs, mis à part la composition chimique, et la toxicité des NMC.

### 2.3.1 La taille

La taille est l'un des déterminants de toxicité les plus étudiés des NMC car d'elle dépendent la biodistribution, les mécanismes d'internalisation [46], leur rétention et leur clairance. De ce fait, plusieurs études ont été faites afin d'étudier l'effet de la taille sur la toxicité induite par les NMC et on a pu identifier un effet diamètre et un effet longueur. En comparant des MWCNT de diamètres différents, il a été montré que les MWCNT les plus fins sont plus cytotoxiques [47]. Il a également été démontré que les SWCNT, qui ont des diamètres plus petits que les MWCNT, s'accumulent dans les régions pulmonaires les plus profondes avec des concentrations plus élevées que les MWCNT. Par conséquent ils pourront engendrer une toxicité plus importante [48]. Concernant l'effet de la longueur, il a été mis en évidence que les NTC longs sont retenus au niveau du stroma de la cavité pleurale et qu'ils conduisent à une inflammation aiguë et une fibrose progressive. Par contre, les NTC courts migrent en dehors de cette zone pleurale et n'ont pas ces effets [49]. Boyles et al., ont démontré que la phagocytose frustrée, la cytotoxicité et la réaction inflammatoire induite par les NTC sont longueur dépendante, et sont plus importants que ceux induits par l'amiante [50].



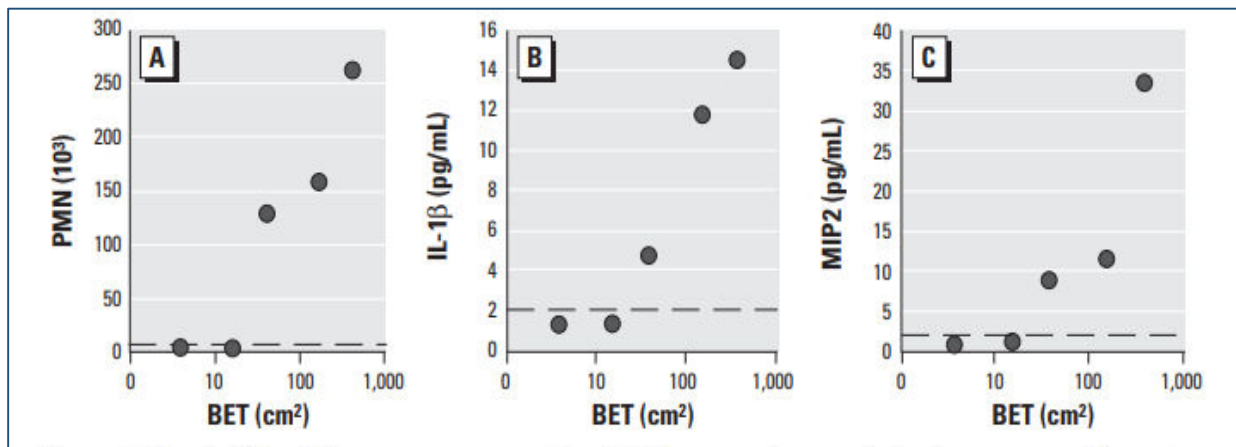
**Figure 14 :** La clairance longueur dépendante des nanotubes et des fibres à partir de l'espace pleural. A : Fibres courtes et petits enchevêtrements de NTC qui se déposent dans les alvéoles situées au niveau sous-pleural et migrent vers la cavité pleurale puis sortent dans le flux de liquide pleural à travers les stomates, où ils suivent le drainage lymphatique vers les ganglions médiastinaux. B : Les fibres longues et les NTC longs atteignent également la cavité pleurale par les alvéoles sous-pleurales, mais ils ne peuvent pas parvenir aux stomates et sont retenus dans l'espace pleural [49]. (Modifiée)

Par ailleurs, la clairance dépend de la longueur [49], [51]. Les macrophages incapables d'éliminer les longs NTC des tissus pulmonaires, subissent une phagocytose frustrée ce qui entraîne une importante production d'espèces réactives à l'oxygène (ERO) et l'induction d'une apoptose [52],[53]. De même, certaines études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les NTC les plus longs sont les plus susceptibles d'induire une inflammation et une fibrose [54]. Mais d'autres études affirment le contraire : Bussy et al. [55] ont démontré que les MWCNT les plus courts induisaient une cytotoxicité plus grande, une inflammation et un stress oxydant alors que les longs NTC n'avaient induit aucune inflammation. Cela peut être expliqué par un deuxième facteur, à savoir la différence de rigidité des NTC utilisés dans chaque étude. Ces disparités de conclusions mettent en évidence l'importance de réaliser des études monofactorielles, afin de déterminer s'il existe des corrélations entre une caractéristique physico-chimique donnée des NMC et leur toxicité.

### 2.3.2 La surface spécifique:

L'aire de surface spécifique correspond au rapport de la surface sur la masse ( $\text{m}^2/\text{g}$ ). Elle est déterminée par la méthode décrite par Brunauer, Emmett et Teller appelée technique BET qui est la plus utilisée. Elle est basée sur la détermination de la quantité d'azote nécessaire pour former une couche mono-moléculaire autour d'un échantillon à basse température. L'aire de surface spécifique sera alors l'aire de cette monocouche. Elle varie selon plusieurs critères tels que le diamètre de la particule, la porosité ou encore la rugosité [6]. La plupart de NTC sont dotés d'une aire de surface spécifique élevée [56]. Les MWCNT ont en général une aire de surface spécifique plus faible que les SWCNT car malgré la présence de plusieurs couches, les MWCNT sont des structures fermées et seule la surface extérieure est prise en compte.

Bien que négligeable pour les études toxicologiques des particules micrométriques, ce paramètre est indispensable lors de l'étude de la toxicologie des NP. Plus la surface spécifique d'un NM est importante, plus le nombre d'atomes en contact avec l'extérieur et possédant une activité toxique potentielle sur le vivant augmente [51]. Stoeger T et al., ont testé la toxicité de différentes NMC sur des souris BALB/cj. L'administration des particules ultrafines de carbone (PUFC) a été faite à des doses différentes (5, 20, et 50  $\mu\text{g}$ ) par instillation et par injection en intra-trachéale [57]. Un lavage broncho-alvéolaire a été réalisé après 24h, le taux de polynucléaires neutrophiles (PMN) et des marqueurs d'inflammation (IL-1 $\beta$  et le MIP2) ont été étudiés. Les résultats ont montré une corrélation positive entre l'inflammation et l'aire de surface spécifique.



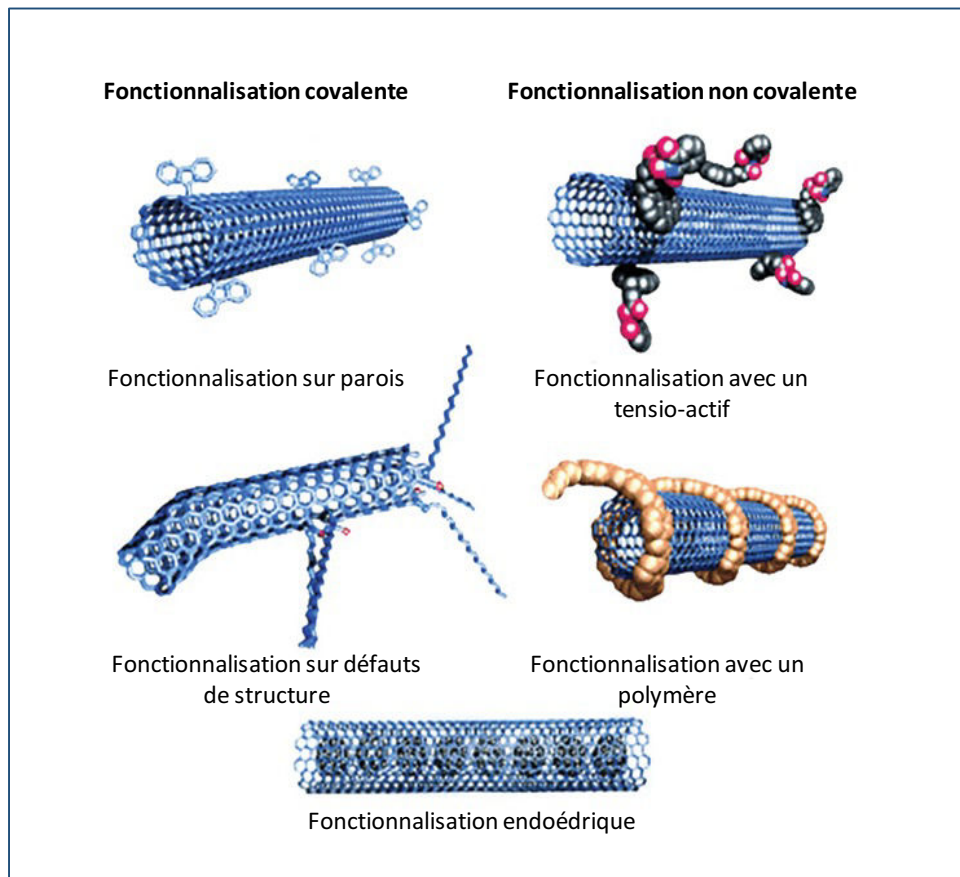
**Figure 15 :** Le seuil de réponse inflammatoire pour les PUFC est présenté comme la corrélation entre la surface des particules et le nombre de leucocytes polymorphonucléaires (A) ou les concentrations d'IL-1 $\beta$  (B) ou de MIP2 (C). Deux doses supplémentaires instillées de 0,5 et 2  $\mu\text{g}$ , associées à 5, 20 et 50  $\mu\text{g}$  de PUFC

*représentent des surfaces spécifiques BET de 0,4 ; 16 ; 40 ; 161 et 404 cm<sup>2</sup>, respectivement. La ligne en pointillé indique les niveaux de base des animaux témoins [57].*

D'autres études *in vitro* et *in vivo* aussi, ont montré qu'il est plus pertinent de prendre en compte le paramètre « surface » plutôt que celui de « masse », afin d'évaluer la toxicité des NM. Il se trouve que la masse est un paramètre pertinent pour les molécules de taille micrométriques mais lorsqu'on aborde les tailles nanométriques, le paramètre surface est le plus pertinent. Cependant, certaines études ont privilégié le nombre de particules ou le volume, pour l'étude de la toxicité plutôt que la surface.

### **2.3.3 Etat de surface et charge de surface (fonctionnalisation)**

La fonctionnalisation d'un NTC correspond à l'ajout de groupements fonctionnels soit carboxyle soit amine tout en contrôlant les conditions de synthèse. La fonctionnalisation établie peut être alors covalente avec une liaison chimique forte, ou non covalente avec des liaisons hydrogènes faibles de type Van der Waals (liaison  $\pi$ - $\pi$ ). Ces groupements additionnels modifient la charge de surface de ces NM. Par exemple, le groupement carboxyl (-COOH) va permettre d'obtenir une charge négative alors que le groupement amine (-NH<sub>2</sub>) une charge positive selon les conditions de pH du milieu.



**Figure 16 :** *Différents modes de fonctionnalisation des NTC* [58]. (Modifiée)

Concernant la relation fonctionnalisation-toxicité, plusieurs études mettent en évidence l'influence de ces modifications sur la toxicité des NTC [59], [60]. La fonctionnalisation influe sur l'interaction des NTC avec différentes molécules comme les protéines, et ainsi elle modifie la corona de ces NM. Des MWCNT fonctionnalisés (COOH ou NH<sub>2</sub>) ou non ont été mis en présence de BSA (Bovine Serum Albumine), de plasma humain ou d'un extrait protéique d'*Escherichia coli* [61]. La fonctionnalisation n'a pas de réel effet sur le type d'acides aminés favorisés pour l'interaction mais plutôt un impact sur la fonction biologique des protéines entrant en interaction avec les MWCNT. La fonctionnalisation, par COOH ou NH<sub>2</sub> favorise l'interaction avec des immunoglobulines G et les molécules du complément, correspondant à une opsonisation qui permet la phagocytose. D'autre part, il semble que les MWCNT fonctionnalisés vont davantage interagir avec des protéines telles que la céruléoplasmine impliquée dans le transport et l'homéostasie du cuivre. Ces récepteurs membranaires à ces protéines sont d'ores et déjà utilisés dans la facilitation de l'internalisation de médicaments, d'où les projets de vectorisation impliquant des NTC fonctionnalisés. Ainsi il serait possible que la présence de ces protéines au sein de la corona facilite l'internalisation des MWCNT. La fonctionnalisation



des MWCNT facilite également l'interaction avec des apolipoprotéines ainsi qu'avec des inhibiteurs de la trypsine, favorisant également l'internalisation des MWCNT. Les MWCNT non fonctionnalisés ont tendance à endommager la membrane cytoplasmique, alors que les MWCNT fonctionnalisés, en particulier avec des groupements COOH, ont plutôt tendance à la traverser [62]. Autrement, la fonctionnalisation peut aussi jouer sur l'état d'agglomération des NM, leur stabilité et leur interaction avec les différents organites intracellulaires.

### 2.3.4 Morphologie

Les principales formes des NMC étudiées sont les NTC à une seule ou plusieurs couches, les nanosphères de carbone [63] et il existe également des NP cubiques [64]. La forme, comme la taille et la surface, agissent principalement sur l'internalisation [65] de ces NM, il a été démontré par Gratton et al. [66], que les tubes sont les plus internalisés suivis par les sphères, les cylindres et enfin les cubes. D'autre part, la forme peut contrôler le mécanisme de mort cellulaire. Cohignac et al. [67] ont montré que les NTC bloquent l'autophagie en induisant une déstabilisation lysosomale alors que les NP sphériques n'ont pas cet effet. Mais les études de l'effet forme des NMC sont encore en nombre restreint alors qu'elles ont été comparées à d'autres NP comme les NP de silicium [68], d'oxyde de zinc [69] et d'argent [70]. Pourtant la ressemblance morphologique entre les NTC et les fibres d'amiante a été discutée et liée à des mécanismes de toxicité communs aux deux.

### 2.3.5 Etat d'agrégation et d'agglomération

Les NMC et particulièrement les NTC présentent une tendance très prononcée à former des agglomérats sous l'action des interactions de Van der Waals, surtout à une fraction massique élevée [73]. Ces interactions sont faibles et se rompent facilement par sonication à la différence des liaisons fortes formées lorsque ces nanotubes s'agrègent. L'agrégation des NTC est due à leur grande surface hydrophobe. La formation d'agrégats et /ou agglomérats est à la base d'une toxicité différente de celle induite par des nanotubes dispersés car il en résulte une modification de la taille, de la déposition dans les poumons, de la clairance et de la réactivité. Selon une étude faite sur des cellules humaines de mésothéliome, les agglomérats de SWCNT plus gros, plus solides conduisent à une cytotoxicité plus importante [74]. Warheit et al. [75], ont démontré, in vivo chez les rats, que la formation de granulome et d'inflammation pulmonaire, est probablement due à l'agrégation des NTC. Pourtant d'autres études montrent l'inverse. Des NTC mieux dispersés ont entraîné une plus grande toxicité dans trois organismes marins *Thalassiosira pseudonana*, *copepod (Neoergasilus japonicas)* and *medaka (Oryzias melastigma)* [76]. Par ailleurs, Allergi et al., ont démontré que la formation d'agglomérats suite à la fonctionnalisation des NTC réduit leur toxicité [49]. La dispersion des NMC, qui varie selon le milieu/environnement dans lequel ces NM sont libérés, influence donc leur toxicité vis-à-vis du vivant [77].

## 2.3.6 Composition

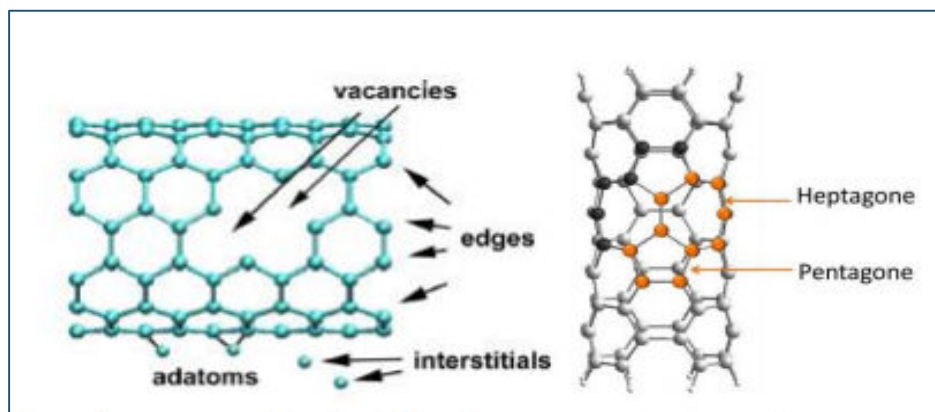
### 2.3.6.1 Impuretés catalytiques

Durant leur synthèse, les catalyseurs utilisés, notamment les métaux comme Fe, Y, Ni, Mo et CO, contaminent les NMC et diminuent leur pureté. Il a été montré que ces impuretés peuvent être à la base des effets biologiques observés lors d'exposition aux NMC. Selon Pulskamp et al., [71] une exposition à des NTC commerciaux non purifiés, entraîne une augmentation dose et temps dépendante de la production d'ERO intracellulaires et une diminution du potentiel membranaire mitochondrial qui ne sont pas observés avec les mêmes NTC purifiés. Il a également été démontré que des NTC contenant différents taux de métaux induisent des granulomes épithélioïdes, une inflammation interstitielle et péribronchique, de façon dose-dépendante, ainsi que des effets cardiovasculaires, des dysfonctionnements endothéliaux dans la circulation pulmonaire et une thrombose vasculaire périphérique [72]. De même, Kagan et al, ont aussi prouvé que le fer présent dans les nanotubes favorise la génération des groupements hydroxyles [73]. Donc, ces contaminants favorisent la toxicité induite par les NTC et il est donc important de contrôler les processus de synthèse afin de minimiser le pourcentage de ces impuretés.

### 2.3.6.2 Structure cristalline, défauts et désordre structurel

Certains NMC possèdent une structure cristalline comme les NTC et d'autres possèdent une structure amorphe comme le NC. Ces formes amorphe ou cristalline, ainsi que le degré de cristallinité, peuvent jouer un rôle dans la toxicité, comme il a été démontré avec les NP de titane [74] et de silice [75] qui ont induit une toxicité cristallinité dépendante. A notre connaissance, les études sur les NMC mettant en relief ce facteur ne sont pas nombreuses. On peut citer Figaro et al., qui ont comparé des NC brutes et des NC fonctionnalisés (NCf) et ont lié la faible toxicité du NCf à sa faible cristallinité [76]. Par ailleurs Boyles et al. [50], ont proposé que la cristallinité n'aurait pas d'influence sur la cytotoxicité, l'inflammation et la fibrose induite par les NTC sur les macrophages.

Un autre facteur qui se discute aussi rarement que la cristallinité mais qui pourrait avoir un impact sur la toxicité est la présence de défauts de la structure des NTC [77]. On parle de défaut lorsqu'il y a une ré-hybridation des carbones  $sp^2$  en carbones  $sp^3$  dont la structure en 3 dimensions forme des irrégularités dans l'alignement hexagonal.



**Figure 17 : Défauts de structure des NTC les plus communs. A gauche, « vacancies » : lacunes, « edges » : arêtes, « adatoms » : adatoms, « interstitials » : carbone interstitiel. A droite, défaut de Thirier-Stone-Wale [77]. (Modifiée).**

Ces défauts présentés dans la figure 17 résultent de plusieurs paramètres intrinsèques comme la contamination par des impuretés catalytiques métalliques au cours de la synthèse ou extrinsèques comme la fonctionnalisation et l'adsorption de molécules provenant de l'air [77]. Ils ont un effet sur la toxicité. Ces défauts modifient la corona (couche de protéines) formée autour des NTC, ce qui peut conduire à des réponses biologiques différentes de celle produites en absence de ces défauts [78]. Deux études [79], [80] ont montré une diminution de la cytotoxicité, de la génotoxicité, de l'inflammation *in vitro* et de la toxicité aigüe *in vivo* après exposition à des NTC ayant moins de défauts. Ils ont suggéré que les NTC avec de nombreux défauts adsorbent plus les radicaux libres, ce qui a été aussi trouvé par Porter et al., en 2010 [81].

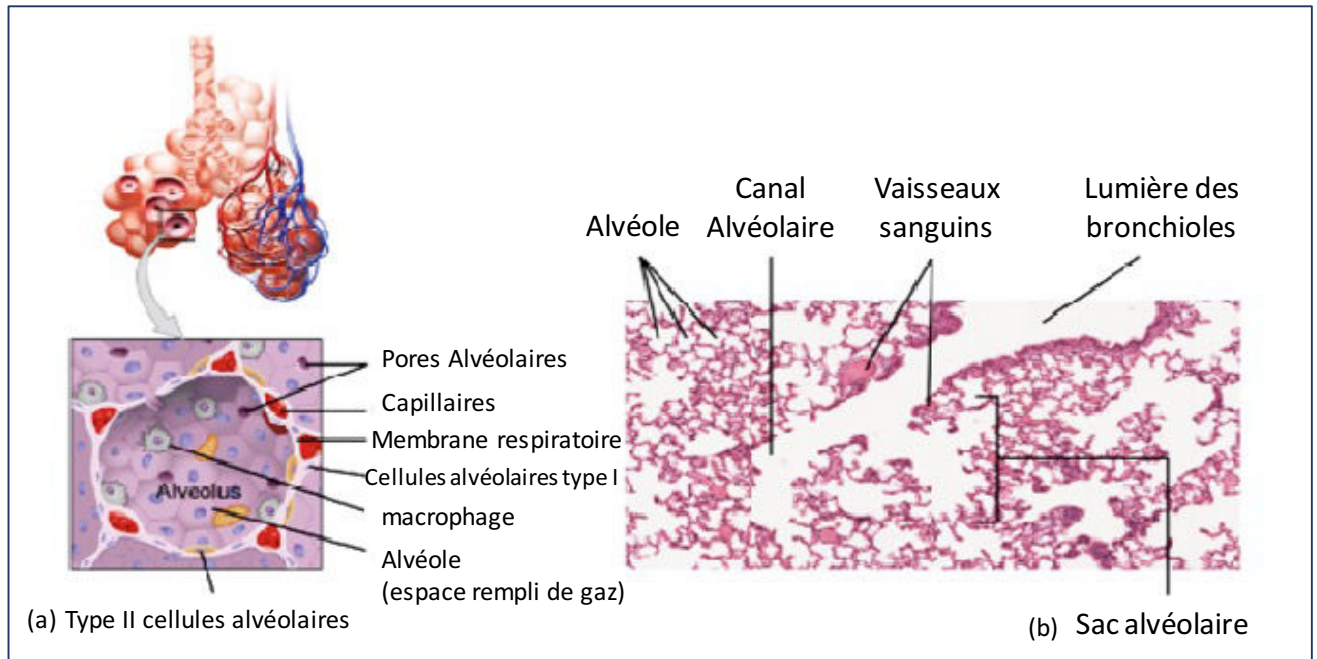
### 3 Evaluation de la toxicité : les modèles d'études expérimentaux

#### 3.1 Approches *in vitro*

Par respect de la loi des 3R, décrite par Russel et Bruch, afin de Réduire, Remplacer et Raffiner le recours à l'expérimentation animale, l'utilisation de lignées cellulaires pour les études de toxicologie *in vitro* s'est généralisé. Malgré l'imperfection du système du fait de l'emploi de cellules isolées en dehors de leur environnement naturel, ce système procure des connaissances qui servent à l'identification et à la

compréhension des événements moléculaires initiaux et des événements clés, au niveau cellulaire. Ces modèles permettent aussi d'étudier facilement les interactions avec les NM, de déterminer des doses toxiques, de varier les conditions d'exposition, et de comparer les effets de différents NM. Le recours aux cellules primaires est possible pour certains types de cellules mais leur culture est difficile, leur survie dans le temps est limitée aussi sont-elles peu utilisées.

Le choix de la lignée dépend de l'objectif de l'étude. Il est fonction de l'organe ou du tissu dont on veut étudier la sensibilité ou le comportement au contact des NM. Dans le cadre du projet SmartNanotox, on est intéressé par l'étude de la toxicité des NMC sur le système respiratoire. Pour notre part, nous étudions la réaction macrophagique vis à vis des NMC. C'est pourquoi, à Nancy, deux lignées de macrophages (NR8383, macrophages alvéolaires de rat, et THP-1, lignée humaine de monocyte provenant d'une leucose monocyttaire aiguë) ont été retenues.

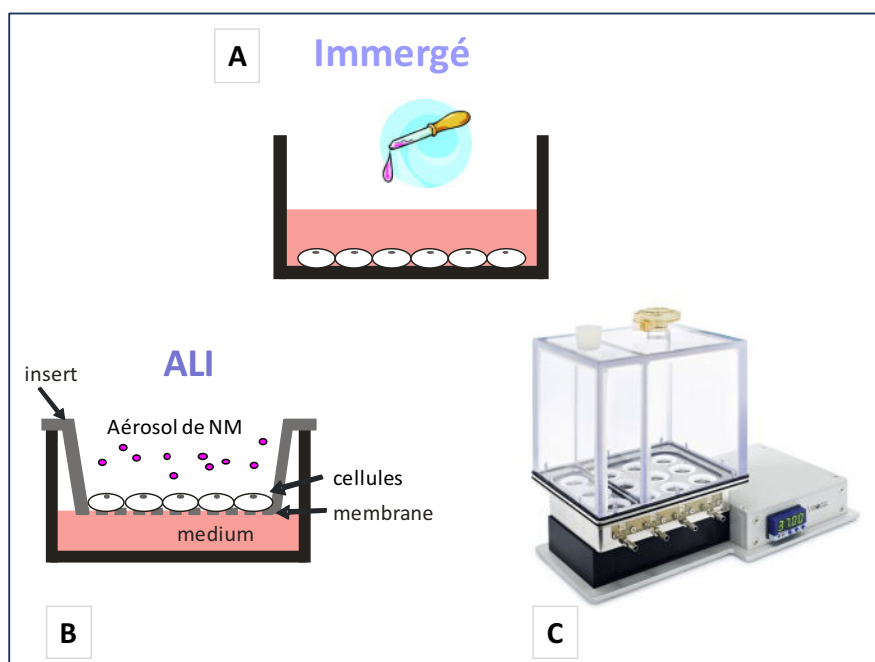


**Figure 18 : Les structures de la zone respiratoire. (a) L'alvéole, responsable de l'échange gazeux. (b) microphotographie montrant les structures alvéolaires dans le tissu pulmonaire LM× 178 [82]. (Modifiée)**

### 3.1.1 Les méthodes d'exposition

Deux modèles d'exposition de cellules sont utilisés. Le plus courant est le modèle immergé, expérimentalement simple et pertinent pour les produits solubles dans l'eau. Cependant, pour les NM, la dosimétrie est questionnée [83]. Le matériel utilisé est soumis à des modifications de forme, de chimie, voire de taille au sein du milieu de culture. Pour des études portant sur une exposition respiratoire ou cutanée, le modèle interface air liquide (ALI), comme le Vitrocell® permet de s'affranchir de ces contraintes.

Vitrocell® est un système ALI biomimétique permettant le développement des essais de toxicité physiologiquement plus réalistes et donc une prédiction plus correcte de la toxicité. En pratique, selon le modèle retenu par Smartnanotox, les NM seront déposés dans un nébuliseur, puis un nuage dense d'aérosol est généré. Cela permettra un dépôt uniforme des particules d'intérêt sur les cellules. C'est une méthode simple, rapide (le temps d'exposition est court <3min) et fiable sur le plan dosimétrique car la même dose est délivrée à toutes les cellules simultanément [84]. Ce système a été utilisé récemment pour évaluer la toxicité après exposition de cellules bronchiques humaines primaires à des MWCNT. Ces derniers n'ont induit ni une augmentation de la libération de lactate déshydrogénase (LDH), ni une altération de la réponse inflammatoire, mesurée par l'expression de l'ARN et la sécrétion des cytokines Il-6, Il-8, Cxcl10, Il-1 $\beta$  et Tgf- $\beta$  et les marqueurs du stress oxydatif Hmox-1 et Sod-2 alors que les contrôles positifs utilisés (DQ12 et amiante) les présentaient. Cette étude a confirmé ainsi la valeur de ce système [85]. Par ailleurs, Chortarea et al., ont mis en évidence sa sensibilité en comparant la réponse des cellules épithéliales bronchiques humaines primaires provenant d'individus sains à la réponse de cellules provenant d'individus asthmatiques, après exposition à des MWCNT. Ils ont montré que les cellules provenant des individus asthmatiques sont plus sensibles aux effets des MWCNT que les cellules normales [86].



**Figure 19 :** Différents méthodes d'exposition : (a) modèle immergé, (b) modèle Ali et (c) modèle Vitrocell®.

En plus de sa meilleure sensibilité, il permet également d'expérimenter sur des systèmes cellulaires plus complexes (co-cultures) et d'être dans des conditions plus physiologiques grâce à l'utilisation de surfactant. Celui-ci joue un rôle essentiel dans la détermination de toxicité des NM. Il est composé à 85-90% de phospholipides, et environ 10% de protéines spécifiques. Sa fonction principale est la réduction de la tension de surface alvéolaire et la conservation d'une surface d'échange gazeux optimale au cours du mouvement respiratoire. Lors d'une exposition, les composants du surfactant se lient à la surface des MWCNT. Kapralov et al., ont montré que les SWCNT ont adsorbé à leur surface les lipides du surfactant ce qui aurait facilité leur internalisation par les macrophages RAW264 [87]. Ce phénomène était rarement pris en compte auparavant dans les études de toxicité pulmonaire *in vitro*. Selon l'étude réalisée par Gasser et al., les MWCNT induisent un stress oxydant, une réponse inflammatoire et une apoptose plus importante lorsqu'ils ont interagi avec le surfactant. Wang et al., ont également constaté que les SWCNT, plus dispersés après interaction avec le surfactant, induisent une prolifération des cellules épithéliales de poumons BEAS-2B à des doses moins importantes alors que les SWCNT ne produisent pas ces effets [88]. Donc la prise en compte de l'interaction du surfactant avec les NMC est un facteur important dans la détermination de leur toxicité.

### 3.1.2 Approches *in vivo*

Malgré les obstacles en particulier éthiques de plus en plus importantes, l'utilisation des modèles animaux permettent le travail sur organisme entier. Les rongeurs sont couramment utilisés. Depuis peu, les cyprinidés sont utilisés comme modèle d'étude *in vivo* en particulier les Zebra fish ou poisson zèbre. Mais ce modèle est encore plus éloigné du modèle humain. Pour le moment, le rat reste l'un des modèles les plus utilisés pour l'évaluation toxicologique [89]. Il est utilisé notamment pour les études de toxicité respiratoire par inhalation, à la fois en aigu et en chronique, de par sa grande sensibilité qui est due à la localisation des particules inhalées majoritairement dans les alvéoles chez le rat alors que chez l'homme les particules résident plutôt dans l'interstitium pulmonaire [90], [91]. En fait, il a été démontré que le rat développe, à charge pulmonaire retenue équivalente à celle retenue par d'autres espèces, des réponses inflammatoires plus sévères ainsi que des modifications épithéliales, métaplastiques et fibroprolifératives, après exposition par inhalation à des particules de TiO<sub>2</sub> [92]. Ainsi en prenant en compte les études de toxicité chez le rat surtout les VLEP, on pourrait intégrer un facteur de sécurité chez l'Homme [93]. Toutefois, des travaux ont été faits pour l'estimation de la dose des NP d'argent inhalés par l'homme en s'appuyant sur les données du rat en utilisant un modèle de dosimétrie qui prends en compte les différences entre les deux espèces.

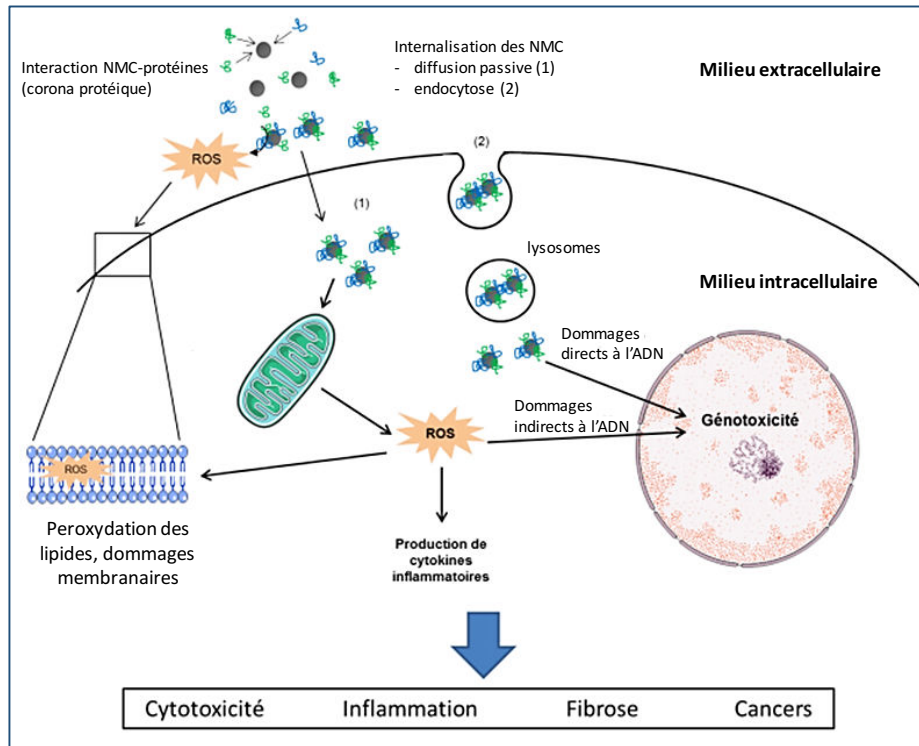
Le problème des animaux est la durée de vie et la physiologie qui peut rendre difficile une extrapolation des résultats à l'homme. Pourtant des études génomiques sont utilisables et les conditions d'exposition expérimentales des animaux aux NM tentent de reproduire celles auxquelles les Hommes sont exposés naturellement ou en milieu professionnel. L'exposition des animaux sur plusieurs semaines et des études de toxicité après plusieurs mois permettent de se rapprocher des expositions, à court et à long terme, de l'Homme en particulier en milieu professionnel [91].

## 4 Etat de l'art sur la toxicité des NMC

Dans la partie précédente, nous avons détaillé les différentes propriétés physiques et chimiques des NMC aussi bien que leur applications et leur marché . Nous avons détaillé également les descripteurs de ces NMC, en évoquant les liens entre ces descripteurs et la toxicité des NMC. Dans cette partie, nous développons l'état de l'art de leur toxicité au niveau cellulaire et au niveau de l'organisme.

## 4.1 Toxicité cellulaire

Plusieurs études mettent en évidence le potentiel toxique des NMC [72], [94], [95], [96], [97]. Ce dernier dépend de certains descripteurs, comme la forme, l'état de surface qui influent sur l'interaction de ces NMC avec le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire conduisant à des événements clés comme la mort cellulaire ou l'induction d'une réaction inflammatoire.



**Figure 20 :** Mécanismes potentiellement impliqués dans la toxicité des NMC [98].

### 4.1.1 Milieu Extracellulaire

#### 4.1.1.1 Corona protéique: interaction avec protéines

Les interactions entre les NM et les protéines du milieu biologique ont été mises en évidence à partir des années 2000 [99]. C'est à ce moment, qu'on a commencé à parler de la couronne protéique dite « corona ». Celle-ci est supposée altérer « l'identité synthétique » de ces NM et changer ainsi leur « identité biologique » ce qui modifiera le déterminisme initial de ces NM. On distingue deux coronas « Hard corona » où les protéines se lient étroitement, mais pas complètement d'une manière irréversible à la surface des NM et « Soft corona » constituée d'une couche plus faiblement associée avec un échange rapide de biomolécules. Au sein de la « Hard corona », on a pu identifier quelques protéines centrales, mais pas nécessairement celles qui sont les



plus abondantes dans le milieu biologique, qui se lient aux différents NM avec une spécificité élevée. Du fait de sa stabilité, elle devient alors une corona mémoire de l'environnement où ces NM étaient précédemment [100]. Donc, outre les propriétés des NM (charge, taille, hydrophobicité...), la composition du milieu participe à la formation d'une nouvelle identité synthétique et par conséquent biologique de ces NM. Wan et al., ont montré que la suppression de glycanes de la couronne protéique améliore l'adhésion des NM à la membrane cellulaire et leur internalisation par rapport à la forme entièrement glycosylée, ce qui favorise l'induction de l'inflammation par les macrophages [101]. Concernant les NMC, Cai et al., ont montré que la composition de la corona est fonction de la nature du NMC. [102]. Zhao et al, ont montré que l'aire de la surface spécifique et le diamètre des NMC, agissent sur la structure de la corona et en conséquence sur la cytotoxicité qu'ils induisent. Sur les NTC de petit diamètre s'adsorbent plus de protéines ce qui réduit leur cytotoxicité [103]. Pour les NMC, la présence d'une corona se traduit par une diminution de la toxicité [104], [105], [106], [107], [108], [109].

**Tableau 1 : La toxicité associée à la corona des NMC [104].**

NMC	Taille	Protéines dans la corona	Effet sur la cytotoxicité	Le type de cytotoxicité/ immunotoxicité
<b>SWCNT</b>	Diamètre : <2 nm Longueur : 5-30 µm	BFG Igy Tf BSA HSA	Diminue	Atténuation de la viabilité cellulaire
<b>MWCNT-COOH</b>	Diamètre : 60-100 nm Longueur : 1-2 µm	« HSA »	Diminue	Agrégation des plaquettes, production d'ERO Libération de LDH
<b>NC</b>	14 nm	« FBS »	Diminue	Atténuation de la viabilité cellulaire
<b>OG</b>	Diamètre : 4-18 nm Longueur : 10 µm	« FBS »	Diminue	Atténuation de la viabilité cellulaire et production d'ERO

**Abréviations :** BFG, bovine fibrinogen; Igy, gamma globulin; Tf, transferrin; BSA, bovine serum albumin; FFBS, fetal bovine serum; FCS, fetal calf serum; IgG, immunoglobulin G; C3, complement component 3; CCs, complement components; C3b, complement component C3b; PLT, platelet; ROS, reactive oxidative stress; LDH, lactate dehydrogenase.

#### 4.1.1.2 Mécanismes d'internalisation : interaction avec la membrane cellulaire

Les macrophages internalisent les éléments étrangers y compris les NM en quelques minutes [110]. Cui et al., ont pu démontrer que la vitesse d'internalisation diminue avec l'augmentation de la concentration des nanotubes ce qui montre que l'internalisation intracellulaire est un phénomène saturable [111]. La pénétration des NMC débute par une reconnaissance des récepteurs présents sur la surface des macrophages pour laquelle la corona peut jouer un rôle. A part la diffusion passive, trois principaux mécanismes d'internalisation sont connus, pinocytose, macropinocytose, et phagocytose, qui dépendent des récepteurs, des mécanismes membranaires et de la disposition intracellulaire des macrophages.

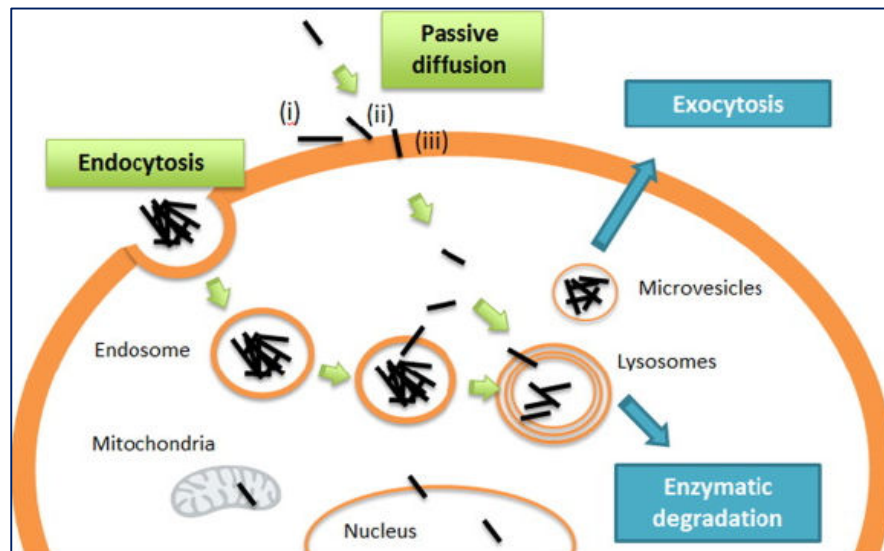
**Tableau 2 : Récepteurs des macrophages impliqués dans la phagocytose. (Modifié)**

Type de récepteur	Sous- type	Localisation et rôle
Récepteur Type Toll	TLR 1,2,4,5,6	Localisés à la surface des macrophages
	TLR 3,7,8,9	Présents dans les compartiments intracellulaires
	TLR 2,3,7	Induisent les mécanismes réduisant l'inflammation tels que l'autophagie
	TLR 4	<ul style="list-style-type: none"> <li>Le LPS partie de la paroi de bactéries à gram négatif peut s'absorber sur les NM. Il est reconnu par les récepteurs TLR 4 qui activent la production d'inflamasome</li> <li>Initie l'inflammation pour lutter contre les agents pathogènes</li> </ul>
Récepteurs éboueurs	MARCO	Récepteur à structure collagène lié à l'absorption de NP de polystyrène et des agrégats d'oxyde de fer dans les macrophages alvéolaires
Récepteurs FC	CD64	<ul style="list-style-type: none"> <li>Reconnaît la région Fc des IgG,</li> <li>Induit la phagocytose</li> </ul>

**Abréviations:** TLR, Toll like receptor; IgG, immunoglobulin G; Fc, fragment commun aux IgG; MARCO, Macrophage Receptor with Collagenous Structure; CD64, Cluster of Differentiation 64; LPS, lipopolysaccharides.

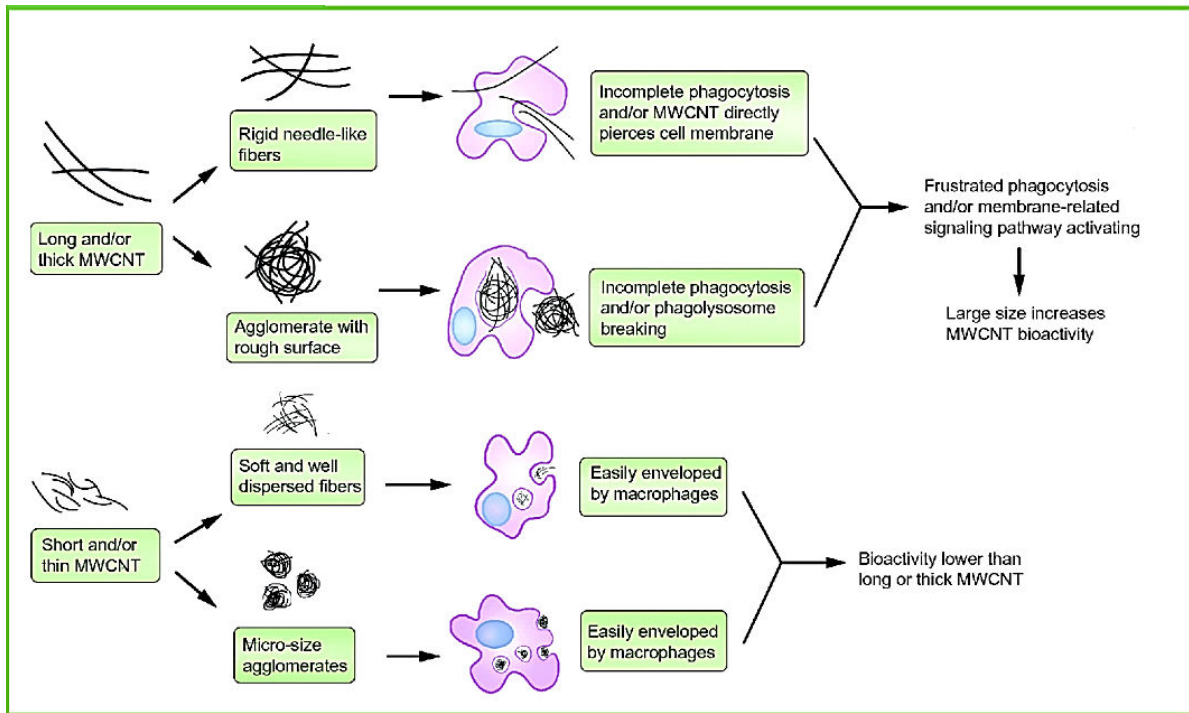
Les MWNT agrégés peuvent se lier aux membranes cellulaires et être ensuite internalisés par endocytose. Dans les endosomes, les MWCNT peuvent s'individualiser, et pénétrer dans le cytosol à travers les membranes endosomales. Alternativement, des CNT courts et individualisés (i) adhèrent à la surface de la membrane plasmique, (ii) s'intercalent entre les têtes globulaires des phospholipides et enfin (iii) glissent à travers les queues lipidiques pour diffuser passivement à travers la membrane cellulaire. Les MWCNT agrégés

résiduels dans les endosomes et les MWCNT libres dans le cytosol pénètrent dans les lysosomes. Les NTC peuvent alors être excrétés par exocytose ou dans des microvésicules autophagiques en cas de stress. Un autre mécanisme de sortie a été rapporté dans les neutrophiles polymorphonucléaires et les macrophages où les nanotubes sont digérés par des peroxidases. Les NTC peuvent également pénétrer dans les organites et le noyau (figure 21) [112].



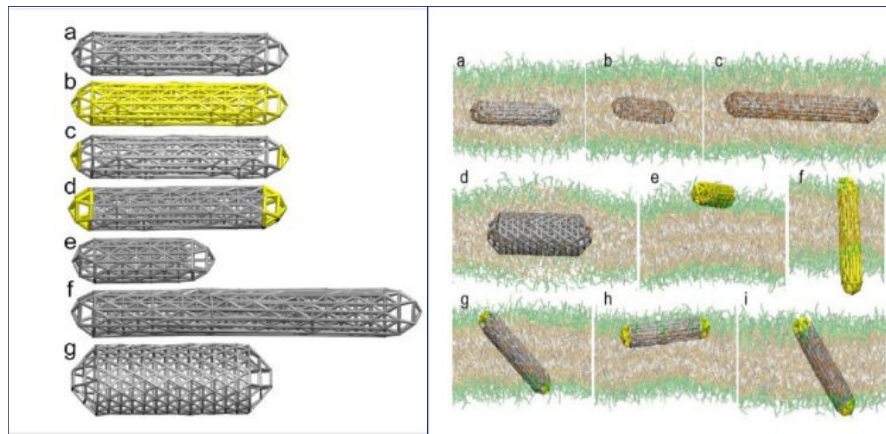
**Figure 21 : L'internalisation des NTC dans les cellules des mammifères [112].**

Le mécanisme d'internalisation des NM dépend alors de leurs caractéristiques physiques et chimiques. La taille par exemple est un facteur essentiel dans la détermination du mode d'internalisation. La pinocytose peut être classée en endocytose médiée par la clathrine, dans le cas des NM avec une taille comprise entre 100 et 350 nm et une pinocytose classée en endocytose médié par la cavéole pour une taille de NP entre 20 et 100 nm Il existe aussi une endocytose clathrine et cavéole indépendantes pour des NP dont la taille est environ 90 nm [113]. Pour des NM avec une taille comprise entre 0.5 et 5  $\mu\text{m}$ , il s'agit d'une macropinocytose [114]. On parle également d'une phagocytose pour les NM dont la taille est inférieure à 10  $\mu\text{m}$ , et d'une « phagocytose frustrée » c'est à dire une incapacité des macrophages à englober les nanotubes d' une longueur supérieur ou égale à 10  $\mu\text{m}$  *in vivo* et 14  $\mu\text{m}$  *in vitro* [115]. Il a été démontré que les longs NTC conduisent à une phagocytose frustrée accompagnée d'une augmentation de la réponse inflammatoire [116]. Outre la taille, la rigidité favorise la survenue d'une phagocytose frustrée [55]. Plus les nanotubes sont rigides plus ils engendrent une phagocytose frustrée.



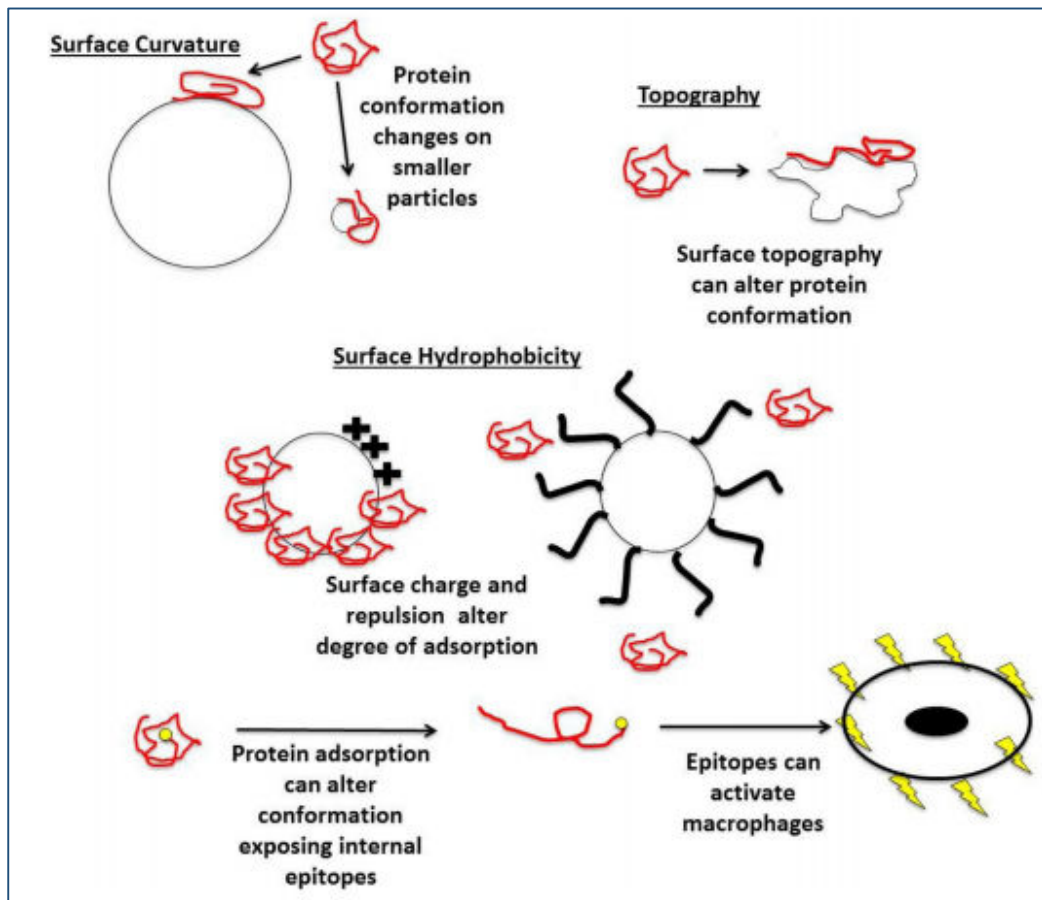
**Figure 22 : Influence des caractéristiques des MWCNT sur leur internalisation par les macrophages**[117].

La fonctionnalisation influence aussi l'internalisation des NMC et leur interaction avec la membrane. Les NTC courts et non fonctionnalisés s'insèrent plus facilement dans les membranes et adoptent une orientation parallèle au plan de la membrane et se situent au centre de celle-ci. En plus il a été démontré que cette interaction est facilitée par la présence de coins (sommet pointu à angle aigu) [118].



**Figure 23:** *NTC insérés dans une bicouche lipidique avec différents positions et orientations métastables. (a) NTC, (b) NTC fonctionnalisés, (c) NTC fonctionnalisés avec casquettes, (d) NTC fonctionnalisés avec casquettes et anneaux terminaux, (e) NTC court, (f) NTC long et (g) NTC large [118].*

Un autre facteur agissant aussi sur ces mécanismes d’internalisation est l’adsorption des protéines de la corona à la surface des NM [119]. Comme suggéré précédemment, cette corona conditionne l’apparence de la surface des NM vis-à-vis des macrophages [117]. . La courbure de surface, la topographie, la chimie hydrophile / hydrophobe et les polymères couvrant les barrières stériques sur les surfaces des NM altèrent les quantités et les conformations des protéines adsorbées à la surface. Ces derniers (opsonines) influencent la reconnaissance des macrophages et l’internalisation des NM. De plus, les modifications conformationnelles de protéines sur la surface des NM modifient l'exposition des épitopes de protéines aux phagocytes. Certains épitopes ont la capacité d'activer les macrophages (Figure 23) [114].



**Figure 24 :** *Illustration schématique de la manière dont les caractéristiques physico-chimiques des NM peuvent influencer le degré et la conformation des protéines adsorbées* [114].

Finalement, l’environnement extracellulaire des macrophages contrôle aussi la pénétration des NM. L’interféron gamma induit une augmentation de l’internalisation des particules de chitine par les macrophages alvéolaires [120].

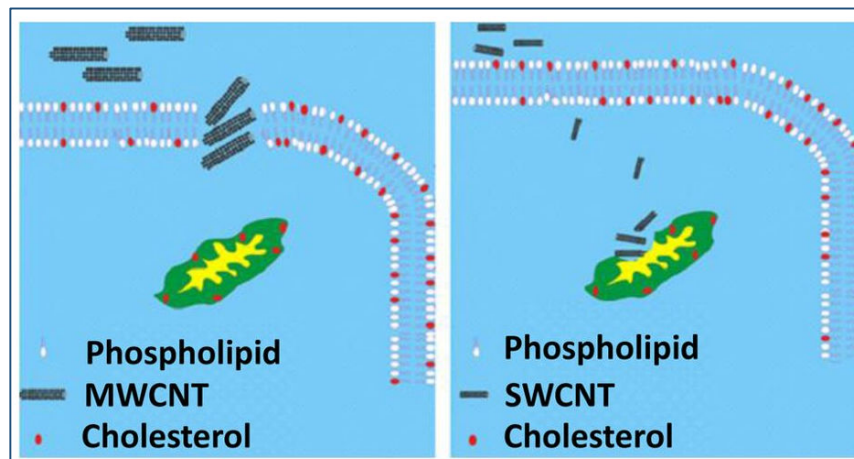
L’interaction des NTC avec la membrane cytoplasmique pourrait se traduire par des lésions de cette dernière et ainsi induire une certaine toxicité[121]. Des images de microscopie électronique à balayage montrent que les macrophages RAW 264 exposés à des NTC possèdent de nombreuses structures ressemblant à des microvillosités. Donc cette interaction avec les NTC a altéré la morphologie de ces macrophages [122]. En effet, la possibilité des NTC à pénétrer dans les bicouches lipidiques (cf. décrit ci-dessus) pourraient entraîner une réorganisation structurale de la membrane cytoplasmique [123]. Également, l’OG induit une rupture de la bicouche lipidique ainsi que la formation de pores dans la membrane des cellules RAW 264 et des cellules A549 [124], [125].

## 4.1.2 Milieu intracellulaire

### 4.1.2.1 Stress mitochondrial

Les NMC peuvent provoquer un stress mitochondrial directement (interaction physique) et indirectement (biochimiquement). Les NTC ayant la capacité de pénétrer dans les mitochondries et d'y induire des changements morphologiques comme l'altération de la structure des crêtes, telle celle observée dans les cellules épithéliales humaines KB après exposition à des SWCNT [126]. Les MWCNT induisent également une altération de la membrane mitochondriale des macrophages humains THP-1 [127]. Les NMC qui ne pénètrent pas dans la mitochondrie agissent sur différentes voies métaboliques, comme le stress oxydant ou une modification de l'expression des gènes qui affectent alors indirectement la biologie de la mitochondrie. Les NTC en induisant un stress oxydant entraînent l'oxydation des phospholipides mitochondriaux et l'oxydation du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) entraînant inflammation et apoptose [128]. OPA1 qui joue un rôle clé dans le maintien de l'intégrité membranaire mitochondriale et de la structure des crêtes est sous exprimé en présence de NM ce qui induit une fragmentation du réseau mitochondrial, une diminution de l'activité respiratoire et du potentiel transmembranaire mitochondrial activant de ce fait les voies de mort cellulaire [129], [130], [131], [132], [133]. Cette sous-expression entraîne également une perturbation des lysosomes. Il a été montré que ce gène est dérégulé après exposition des cellules épithéliales de poumons BEAS-2B à des SWCNT[134]. Les NMC perturbent aussi la dynamique mitochondriale et l'expression des gènes impliqués dans ce processus. Ainsi il a été montré que les MWCNT entraînent des lésions de l'ADN mitochondrial dans les spermatoocytes [135]. Mais à notre connaissance peu d'études détaillant les liens entre les caractéristiques physiques et chimiques de ces NMC et le stress mitochondrial ont été menées. Selon Zeinabad et al., la polarité des NTC influence ce stress, les SWCNT plus hydrophiles induisent un stress mitochondrial plus important que les MWCNT. La membrane cellulaire montre une distribution plus élevée du cholestérol que la membrane mitochondriale et elle procure ainsi un microenvironnement plus hydrophobe. MWCNT avec une tension de surface plus basse s'intègre dans la membrane tandis que les SWCNT avec une tension de surface plus élevée conduisent à des lésions de la mitochondrie [136].





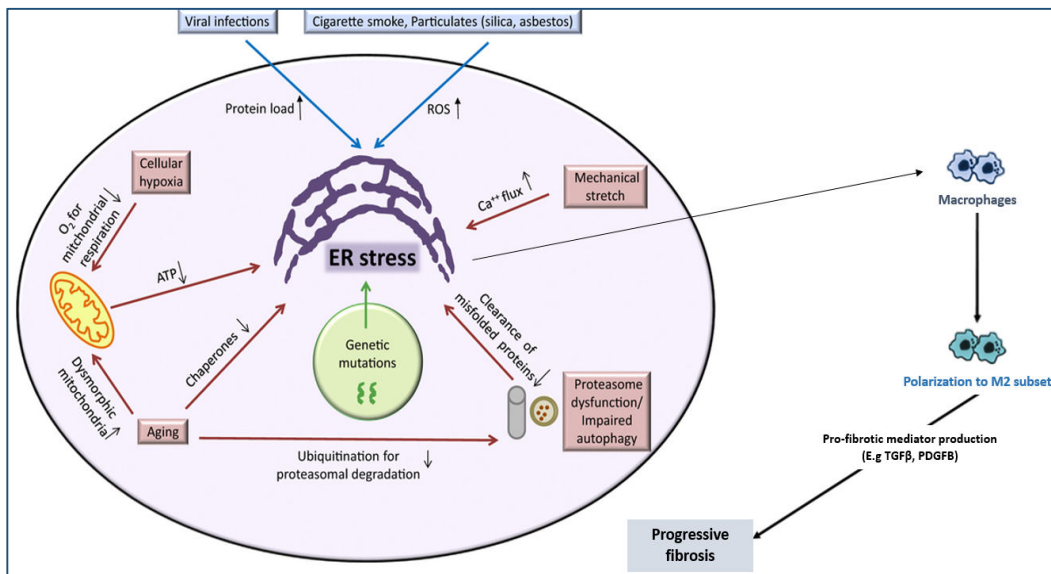
**Figure 25 :** *Interaction des SWCNT avec la membrane mitochondriale* [136].

#### 4.1.2.2 Stress du réticulum endoplasmic

Comme la mitochondrie, le réticulum endoplasmique est un organe vital pour la cellule impliquée dans les modifications post-traductionnelles des protéines et responsable de leur bon repliement. On parle de stress du réticulum endoplasmique (RE) quand un grand nombre de protéines est mal replié. Ce stress peut conduire à la mort cellulaire. Au niveau des poumons, un stress du RE peut aboutir au développement d'une fibrose. En effet, ce stress et le mauvais repliement de la protéine UPR ont été liés au développement d'une fibrose en agissant sur la régulation de l'apoptose, des cellules épithéliales alvéolaires AEC, de la transition épithélio-mésenchymateuse, de la différenciation des myofibroblastes et de la polarisation des macrophages M2 [137]. Long et al. ont montré que les MWCNT fonctionnalisés (fonctions Hydroxyle et carboxyle) et non fonctionnalisés conduisent à l'accumulation des lipides dans les macrophages THP-1 et les cellules épithéliales bronchiques humaines à la suite d'un stress du RE [138]. Ce stress a été accompagné d'une augmentation de l'expression des récepteurs Scavenger impliqués dans la phagocytose et d'une légère cytotoxicité. De même, il a été montré qu'une des chaperonnes du RE, HSPA5, marqueur clé du stress de celui-ci, est élevé de 20% après exposition de cellules HepG2 à des SWCNT fonctionnalisés [139].

Toutefois, des liens ont été établis entre les propriétés physiques et chimiques des NTC et l'induction d'un stress du RE. Il a été prouvé que des NTC de faible diamètre comme DDIT3 et XBP-1s induisent une surexpression plus importante des gènes liés au stress du RE que des NTC de diamètre plus grand pour les cellules HUVECS [140]. Long. et al ont montré, avec les mêmes cellules, que les nanotubes les plus longs induisent une surexpression plus significative du gène DDIT3 [141].

Les NMC influent aussi la synthèse des protéines ribosomales. On voit que les nanotubes fonctionnalisés avec un petit diamètre (9.5 nm) induisent une dérégulation importante des gènes codant les protéines ribosomales des monocytes et des lymphocytes T par rapport à des nanotubes de diamètre plus grand (20-30 nm) [142],[143]. L'OG entraîne une diminution de production des protéines ribosomales dans les macrophages RAW 264.7 ce qui affecte la croissance cellulaire [144]. Au niveau mécanistique, ces NMC pourraient influencer les synthèses protéiques par les voies mTOR/eIF4/p70S6K qui sont impliquées dans la régulation de la synthèse des ribosomes [145]. MTORC1 (mechanistic target of rapamycin kinase) active la synthèse des protéines en phosphorylant les régulateurs clés de la traduction de l'ARNm et de la synthèse des ribosomes parmi lesquels EIF4EBP1 (eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein) et p70S6K (ribosomal protein S6 kinase beta-1) [146]. Peu d'études ont montré l'effet des NMC sur ces voies de signalisation mais en 2017 il a été montré que les NTC recouverts de zinc induisent une surexpression significative des protéines impliqués dans ces voies.

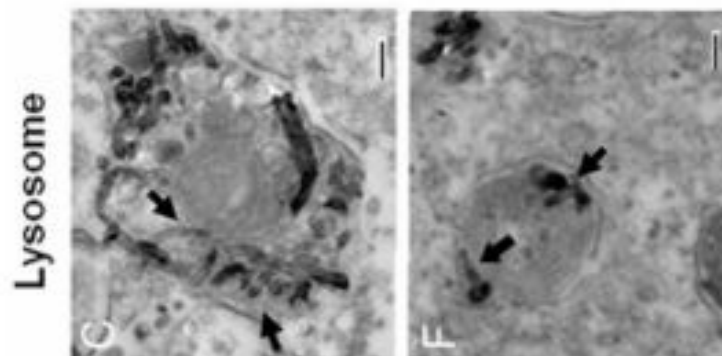


**Figure 26:** Les sources du stress du réticulum endoplasmique et son effet sur les macrophages [137].

(Modifiée)

### 4.1.2.3 Stress lysosomal

Le stress lysosomal est l'un des mécanismes les plus importants de la nanotoxicité. Les NMC s'accumulent dans les lysosomes de différents types cellulaires parmi lesquelles on trouve les macrophages [127] et conduisent à ce stress qui influencera l'avenir de la cellule. Aussi l'évaluation de ce stress est-elle d'une grande importance pour la détermination de la toxicité de ces NM.



**Figure 27 : Caractérisation par TEM de la distribution des MWCNT dans les lysosomes des macrophages [127].**

Les NTC perméabilisent la membrane lysosomale des macrophages humains car leur internalisation crée une tension membranaire, ce qui conduit à une certaine toxicité [147]. Cette perméabilisation est plus importante quand ces nanotubes sont fonctionnalisés avec des charges positives. On parle dans ce cas de l'hypothèse « Proton Sponge » qui a été mise en évidence avec les NP de polystyrène puis avec les NTC [148]. En fait, les amines à la surface des nanotubes fonctionnalisés jouent le rôle d'un tampon et entraînent une activité excessive de la pompe à protons et un gonflement osmotique. L'OG conduit aussi à la perméabilisation de la membrane lysosomale. En fait, ce dernier s'accumule dans les lysosomes, perméabilise la membrane lysosomale, entraîne une accumulation des autophagosomes et réduit l'autophagie des macrophages péritonéaux murins [149]. Autre que « Sponge effect », la perméabilisation de la membrane lysosomale par les NMC pourrait provenir du stress oxydant qu'ils génèrent. Mais c'est aussi par accumulation des NMC dans les lysosomes que peut être expliqué l'effet des NM sur les lysosomes. L'apparition d'une surcharge qui empêche la fusion de cet organite avec les différents compartiments cellulaires et abouti à l'accumulation de vacuoles. Il en résulte soit une cytotoxicité soit un blocage de l'autophagie soit une induction de l'inflammation après activation de l'inflammasome NLPR3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing), par la Cathepsine-B qui avait été libérée du fait de la perméabilisation de la membrane lysosomale [150].

Le stress lysosomal montre bien que les caractéristiques physiques et chimiques des NMC contrôlent leur interaction avec les organites cellulaires. Il a déjà été évoqué le fait qu'il est fonctionnalisation-dépendant. D'après Cohignac et al., les NTC et non les NP sphériques ciblent les lysosomes des macrophages murins RAW264.7, contribuant à un stress à leur niveau et bloquant l'autophagie [151]. Il y a donc aussi un effet forme. Pour leur part, Zhu et al., ont identifié dans des hépatocytes AML12, un seuil critique du rapport longueur / largeur qui représente une transition de biologiquement souple à rigide, et ils identifient ainsi un ensemble de NMC susceptibles d'induire une perméabilité des lysosomes [152]. Finalement, les contaminations des NMC par les métaux après leur passage dans les lysosomes où ils sont libérés par acidité du milieu lysosomal pouvant modifier la toxicité cellulaire de ces NMC [153].

#### **4.1.2.4 Lésions de l'ADN**

Kim et al., ont identifié des lésions de l'ADN, dans des lymphocytes isolés du sang périphérique humain, après exposition à des NTC [154]. Migliore et al, ont montré que ces NTC induisent des lésions de l'ADN en particulier du fait d'une production d'ERO [155]. L'exposition à des MWCNT de cellules souches embryonnaires de souris multiplie par deux le risque de mutations[156]. Comme tous les évènements clés évoqués ci-dessous, les lésions de l'ADN observées sont liées aux caractéristiques physiques et chimiques de ces nanotubes avec en particulier un effet taille et un effet forme. En effet les MWCNT longs et épais ont induit des dommages d'ADN plus importants, que les SWCNT [157]. L'OG induit aussi des altérations de l'ADN dans les cellules HEK293T et induit une activation de la voie BER (base excision repair) impliquée dans la régulation de la survenue de ces lésions [158]. Le NC interagit avec l'ADN selon un mode de liaison électrostatique et aboutit à un changement de sa structure.

#### **4.1.2.5 Effet sur le cytosquelette**

Le rassemblement des NTC perturbe le maintien de la structure cellulaire, la transduction de force, le trafic intracellulaire et la cytocinétique. Un tel effet sur le cytosquelette a été mis en évidence par une dérégulation de la synthèse de certaines protéines (Myosine, Kératine, Annexin A1, Annexin A5, Calmoduline..) liées à ce dernier après exposition des cellules HepG2 à des SWCNT et à l'OG [159], [160]. Les NTC induisent des réarrangements du cytosquelette des macrophages, mais sur d'autres types cellulaires, comme les fibroblastes, ils altèrent les filaments d'actine [161], [162]. Il a été montré que l'exposition des macrophages à des SWCNT induit une diminution de leur capacité à ingérer des cellules apoptotiques. Les auteurs relient cela au fait que les NTC induisent une désorganisation du cytosquelette, ce qui ne permet plus à la cellule de gérer une phagocytose adéquate [163] comme cela est observé avec les particules ultrafines de NC [164].

### 4.1.3 Evènements clés

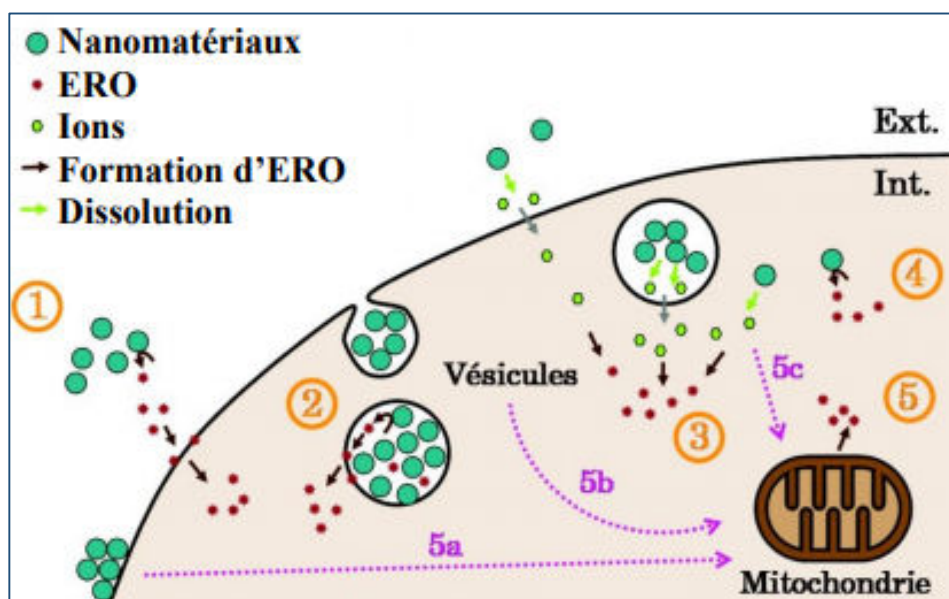
L'exposition au non soi comme les NMC déclenche une cascade biologique qui relie un évènement clé initiateur comme la déstabilisation des lysosomes ou l'oxydation de la membrane cellulaire à des évènements clés comme le stress oxydant, la mort cellulaire, la réaction inflammatoire et la mise en œuvre de l'immunité innée.

#### 4.1.3.1 Stress oxydant

Le stress oxydant provient du déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes des cellules. Les NM contribuent à ce stress par différents mécanismes. Ils peuvent générer des ERO à leur surface de manière intrinsèque ou conduire à la production d'ERO après leur interaction avec des organites cellulaires tels que les mitochondries. Ainsi, les ions superoxydes ( $O_2^{\bullet-}$ ) provenant notamment de la chaîne respiratoire ou de mécanismes enzymatiques, se convertissent par des mécanismes de dismutation en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) qui diffuse à travers les membranes cellulaire et nucléaire, réagissent avec le fer lié à l'ADN et génère des radicaux hydroxyles ( $\bullet OH$ ) par des réactions de type Fenton.  $\bullet OH$  est une espèce très réactive et attaque non seulement l'ADN conduisant à différents types de lésions, mais aussi les protéines et les lipides altérant leur fonctionnement.

- $2 O_2^{\bullet-} + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$  (réaction de dismutation)
- $Mn^{n+} + H_2O_2 \rightarrow M^{(n+1)+} + \bullet OH + OH^-$  (réaction de type Fenton, M représentant un métal de transition).

Un autre mécanisme par lequel ces NM produisent ce stress est la perturbation des mécanismes antioxydants en inhibant les enzymes anti-oxydantes ce qui résulte en l'accumulation d'ERO endogènes [165], [166].

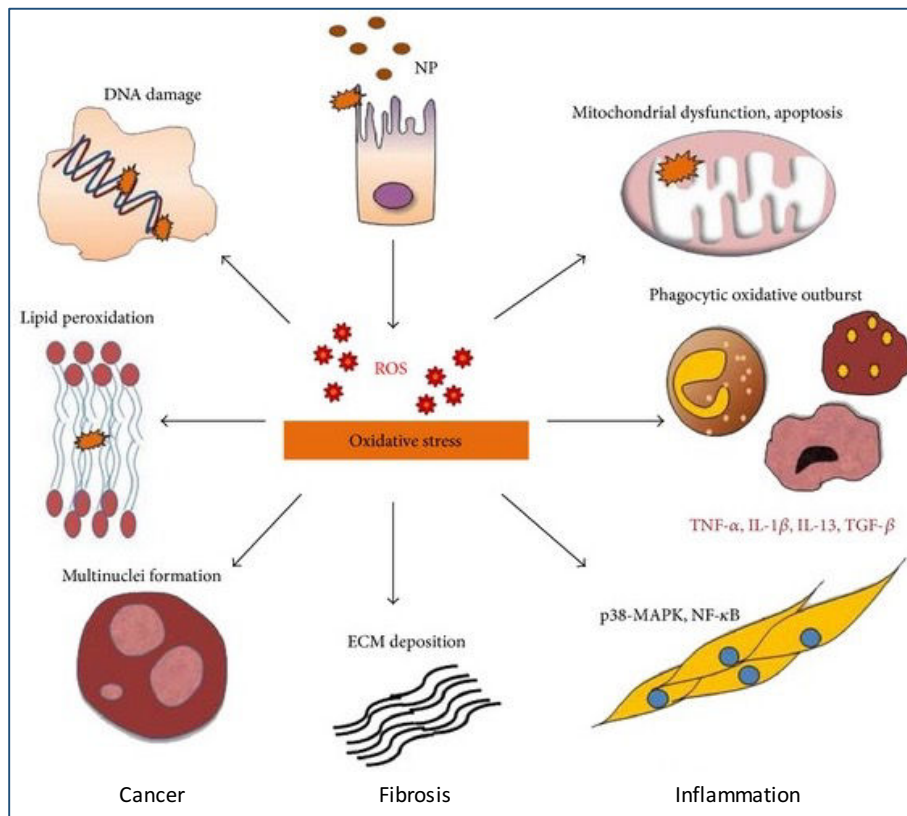


**Figure 28:** Différents mécanismes pouvant entraîner la formation d'ERO intracellulaires par les NM. 1: formation d'ERO extracellulaires; 2: formation d'ERO dans les vésicules; 3: dissolution des NM; 4: directement par les NM libres dans le cytoplasme; 5: Formation d'ERO par les mitochondries en réponse à l'interaction cellulaire avec les NM.

Les NTC, NC et l'OG induisent un stress oxydant dans différentes lignées cellulaires [167], [168]. Ce stress oxydant peut être par des dysfonctionnements mitochondriaux [169]. Par contre, l'exposition des cellules épithéliales de poumons à des SWCNT génère des ERO d'une manière dose-dépendante sans implication des mitochondries, mais plutôt du fait d'une diminution du taux des enzymes SOD-1 et SOD-2 impliqués dans la défense contre le stress oxydant. L'utilisation d'antioxydants diminue la production d'ERO [170]. De même pour Srivastava et al., le stress oxydant induit par des MWCNT sur des cellules cancéreuses humaines A549 n'est pas corrélée à un stress mitochondrial [171]. Le pourcentage de métaux qui contaminent ces NM lors de la synthèse aussi bien que les différents groupes réactifs présents à leur surface joueraient un rôle dans l'induction de ce stress. Il a été montré par Pulskamp et al., une augmentation dose- et temps-dépendante d'ERO intracellulaires en présence de NTC non purifiés dans les macrophages de rat NR8383 et les cellules humaines de poumon A549 alors que l'incubation avec les SWCNT purifiés (par traitement à l'acide) n'a aucun effet [172]. Toutefois, chez les macrophages, une autre source d'ERO est représentée par l'activité NADPH oxydase en réponse à l'ingestion d'agents comme les NMC [168]. Par conséquent, sachant que l'internalisation des NMC par les macrophages dépend de leur caractéristiques physiques et chimiques, la

génération d'ERO qui en résulte pourrait varier également en fonction de ces caractéristiques. Ainsi, Long et al., ont montré que les MWCNT les plus longs diminuent le plus le taux de glutathion intracellulaire, ce qui suggère que la mise en jeu des mécanismes de défense contre les ERO dépend de la longueur des NTC [141].

Il existe donc plusieurs mécanismes de perturbation de l'équilibre d'oxydo-réduction par les NMC qui sembleraient être dépendants des caractéristiques de ces derniers. Quant aux conséquences de ce stress, il pourrait conduire à la biodégradation de ces NMC [173], à l'activation de certaines voies impliquées dans l'inflammation comme MAPK, AP-1, NF- $\kappa$ B et Akt qui sont associées à la prolifération cellulaire ou à la progression tumorale *in vitro* [174] ainsi qu'à diverses atteintes cellulaires (Figure 29) notamment les lésions de l'ADN.



**Figure 29:** Différentes expressions de la toxicité des NM liées au stress oxydant [169].

## Mort cellulaire

Les mécanismes de mort cellulaire induits par les NMC sont variés. On peut citer la nécrose, la nécroptose, l'apoptose ou l'autophagie. En fait, ils résultent soient du stress oxydant, des dommages à l'ADN ou des dysfonctionnements mitochondriaux produits par les NMC présentés ci-dessus. Ils peuvent également survenir *via* l'altération des voies impliquées dans ces mécanismes par ces NMC. Zhou et al., ont démontré que les MWCNT pristines ou fonctionnalisés induisent une apoptose dans les cellules épithéliales A549 qui est cependant plus importante avec les nanotubes fonctionnalisés. Mais à des concentrations élevées, cette apoptose n'est pas retrouvée, mais elle est remplacée par une nécrose. Ces différents mécanismes de mort cellulaires dépendent donc non seulement des caractéristiques physiques et chimiques des NTC mais aussi de la dose d'exposition [175]. De plus, ils pourraient également dépendre du modèle cellulaire. Par exemple, l'OG induit une activation d'apoptose ERO dépendante pour les cellules murines K<sub>7</sub>M<sub>2</sub> et une autophagie pour les cellules humaines MG-63 [176]. L'OG peut induire également une nécrose. Qu et al, ont montré que l'OG interagit avec le récepteur TLR4 des macrophages HEK293T et qu'il induit des dommages du cytosquelette et un stress oxydant qui conduisent à la mort de ces cellules par nécrose[177]. Selon eux, l'interaction avec le récepteur TLR4 est le mécanisme moléculaire essentiellement responsable du déclenchement de la nécrose. Mais, d'autres études ont montré que le NC et les MWCNT induisent une pyroptose, mécanisme de mort programmée dépendant principalement de l'activation de l'inflammasome et de la caspase1 des macrophages alvéolaires primaires humains, des macrophages RAW264.7 et des cellules épithéliales bronchiales humaines [178], [179].

D'un autre côté, les NMC peuvent perturber et/ou inhiber le déroulement de ces mécanismes. Par exemple, il a été montré que l'exposition à des SWCNT induit une résistance à l'apoptose des cellules épithéliales humaines BEAS-2B en raison d'une altération de la voie de récepteurs de mort accompagnée d'une surexpression de la protéine inhibitrice FLIP (FLICE-like inhibitory protein). Le mécanisme de résistance induit par ces SWCNT pourrait être à l'origine de la transformation néoplasique et du développement du cancer [180]. Les différents mécanismes d'activation ou de blocage de l'autophagie par les NMC, sans et avec évaluation du flux autophagique sont résumés dans le tableau [98].



**Tableau 3 : Effets des NP sur l'autophagie sans et avec évaluation du flux autophagique [98].**

	NM	Taille (nm)	Modèle expérimental	Principaux résultats
<b>Sans évaluation du flux autophagique</b>	COOH-SWCNT	4-5 × 550	Cellules A549 Poumons de souris Balb/c exposées par instillation intrachéale	Augmentation de la formation d'autophagosomes via la voie Akt -TSC2 -mTOR et <sup>TM</sup> de la mort cellulaire autophagique seulement avec COOH -SWCNT
	OG de deux tailles différentes	350 et 2400	Cellules RAW264.7	Augmentation de la formation d'autophagosomes, probablement régulée via la voie de signalisation des TLR
<b>Avec évaluation du flux autophagique</b>	SWCNT fonctionnalisés et OG	1-2 nm de diamètre	Macrophages péritonéaux de souris Kunming	Augmentation de la formation d'autophagosomes avec diminution du flux autophagique, déstabilisation de la membrane lysosomale
	MWCNT fonctionnalisés (TMWCNT) ou non (PMWCNT) avec un groupement acide	PMWCNT : 13,5 x 7710 TMWCNT : 7,5 x 567,4	Poumons de souris C57BL/6 exposées par instillation intratrachéale unique	Augmentation de la formation d'autophagosomes avec ( du flux autophagique seulement avec PMWCNT

**Abréviations:** PMWCNT, pristine MWCNT; TMWCNT, treated MWCNT.

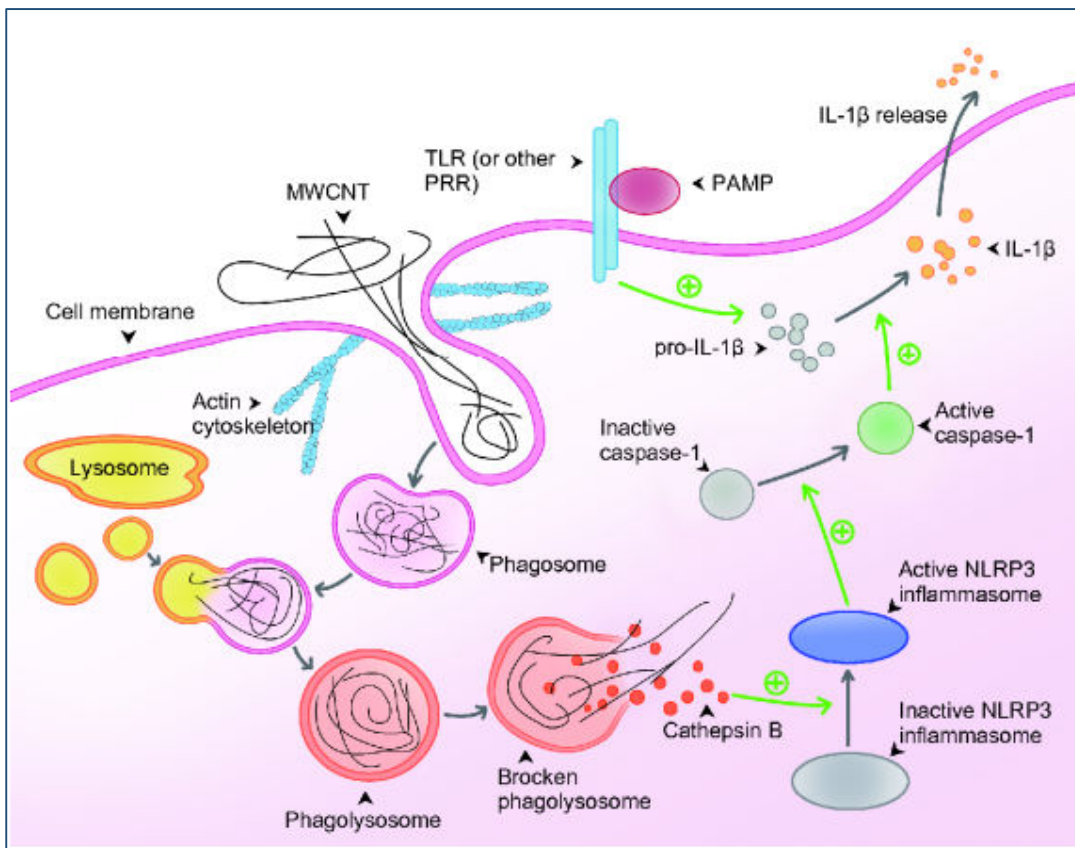
### 4.1.3.2 Réaction inflammatoire

L'inflammation est une réaction spécifique en réponse à une stimulation par un agent pathogène, un corps étranger comme les NM ou par des signaux endogènes après lésions tissulaires. *In vitro*, la production et la sécrétion des médiateurs inflammatoires comme TNF- $\alpha$ , Il-1 $\beta$ , Il-6, et Il-8 témoigne de l'induction de l'inflammation. Classiquement, cette production entraîne le recrutement et l'activation de cellules inflammatoires et aboutit à une inflammation aiguë [181]. Les NMC y compris les NTC, NC et OG, déclenchent une réaction inflammatoire [182] [183] en fonction de leurs caractéristiques physiques et chimiques [117]. Ainsi il existe une relation entre la taille des NTC (longueur et diamètre) et leur activité pro-inflammatoire [184]. Sweeney et al., ont trouvé que les MWCNT les plus longs (environ 20  $\mu\text{m}$ ) induisent une sécrétion d'interleukines (Il-6 et Il-8) plus importante que celle des MWCNT les plus courts (environ 0.6  $\mu\text{m}$ ) par les macrophages alvéolaires humaines primaires [185]. La forme influence l'activité inflammatoire et les NTC rigides et longs favorisent la réaction inflammatoire plus que les NTC courbés dans un modèle de monocytes humains différenciés en macrophages [186]. Selon Zhang et al., la fonctionnalisation des MWCNT détermine avec un groupement carboxyle une réaction pro-inflammatoire des macrophages RAW264.7 par activation des voies de signalisation MAPK et NF $\kappa$ B, qui à leur tour conduisent à une surexpression d'Il-1, Il-6, TNF $\alpha$  [59].

Le processus inflammatoire dépend aussi du type cellulaire. Les macrophages jouent un rôle important dans la réponse inflammatoire induite par les NMC. Ils peuvent initier des réponses inflammatoires. Après une exposition aux NMC, les macrophages apparaissent en premier sur le site, au tout début de l'inflammation (que l'exposition soit par inhalation ou par injection intrapéritonéale) et sécrètent des chimiokines, telles que l'Il-33, la Ccl2 / 7 et l'Il-12, ce qui contribue au recrutement d'autres cellules immunitaires et la production d'autres cytokines [187],[188]. Quoiqu'une étude récente par Chen et al., a montré des résultats différents [189]. Les macrophages alvéolaires isolées de souris C57BL/6 exposées par instillation intratrachéale à des NP de carbone, n'étaient pas impliqués dans l'induction de l'inflammation aiguë car ils n'ont pas montré une signature inflammatoire, alors que les cellules alvéolaires épithéliales type 2 semblent être le contrôleur de cette inflammation sachant qu'elles ont induit le plus la sécrétion de CXCL [189].

Autrement, l'activation de l'inflammasome par les NMC est un événement clé qui pourrait conduire au développement d'une inflammation chronique [190] ou d'une fibrose [191]. L'inflammasome NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3) est le complexe le plus étudié, car il répond aux différents agents pathogènes, aux signaux de danger endogènes et à des stimuli environnementaux. Dans un processus non exposé, ce complexe est auto-réprimé dans le cytoplasme, mais lors d'une stimulation il s'active et

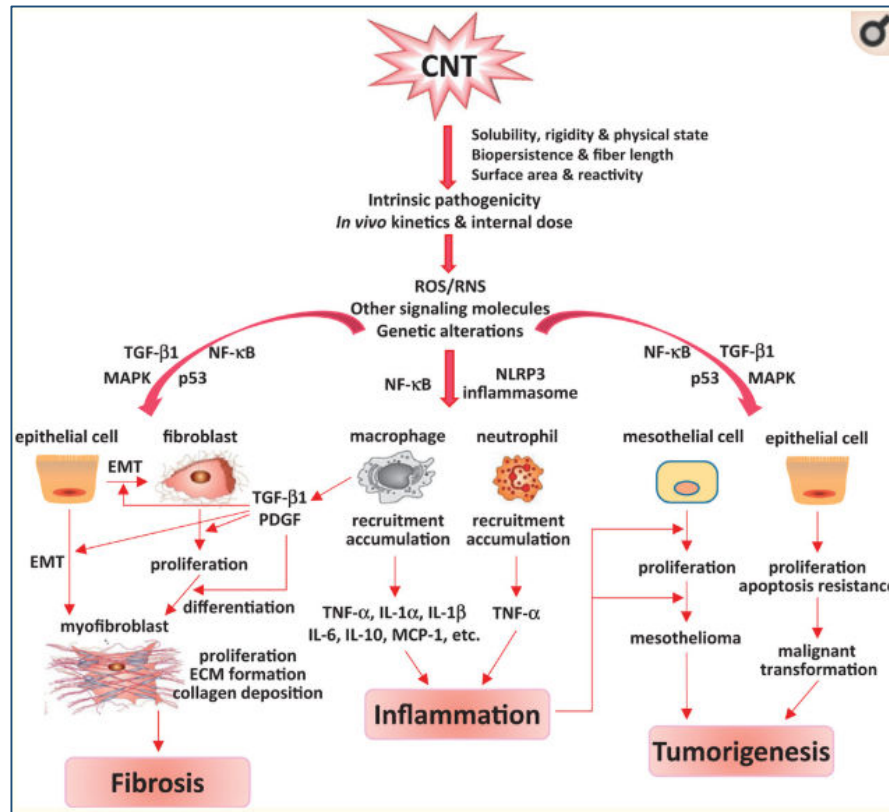
s'oligomérisent. Il y a alors recrutement de l'ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD), une protéine adaptatrice, et de la procaspase-1 pour former l'inflammasome NLRP3. Ensuite, NLRP3 clive la procaspase-1 en caspase-1 active, qui convertit à son tour par clivage les cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et IL-18 en leurs formes actives et sécrétées. Finalement, ces cytokines actives dans l'espace extracellulaire propagent la réponse inflammatoire. Cette activation du complexe NLRP3 est MWCNT taille-dépendante. Elle augmente avec l'augmentation du diamètre et de la longueur des MWCNT dans les cellules THP-1 [192]. Au contraire pour l'OG, l'activation de l'inflammasome est indépendante de la taille des feuillets d'OG [193].



**Figure 30 : Mécanisme possible de production d'IL-1 $\beta$  médié par NLRP3, et induit par les MWCNT [117]**

## 4.2 Toxicité animale

Les évènements clé déclenchés au niveau cellulaire, aboutissent à un AO qui se définit comme un effet toxique mesurable et observable au niveau de l'organisme. On parle alors de la toxicité animale. Plusieurs modèles animaux sont utilisés pour les études de la toxicité des NMC. Ces études utilisent différentes voies d'exposition : inhalation, instillation intratrachéale, injection intrapéritonéale, injection intraveineuse. Les résultats de ces études sont parfois contradictoires. Matsumoto et al., ont alimenté des rats avec des MWCNT ou des SWCNT et n'ont pas observé de toxicité même aux doses les plus fortes (50 mg/kg de poids corporel et 200 mg/kg de poids corporel/ par jour pendant 28 jour avec une période de récupération de 14 jours). Ils ont supposé que les NTC s'agrègent et sont excrétés via les fèces [194]. Par contre, d'autres études confirment l'induction de divers AO après exposition au NMC. Gellért Gerencsér et al., ont identifié des lésions de l'ADN des macrophages et des lymphocytes des rats après ingestion de MWCNT à une dose de 50 mg/kg par semaine pendant 90 jours [195]. Parmi les AO qui sont principalement associés à l'exposition aux NMC, au niveau des poumons, on trouve l'inflammation, la fibrose et les tumeurs des voies aériennes [95] , [196], [197],[198].

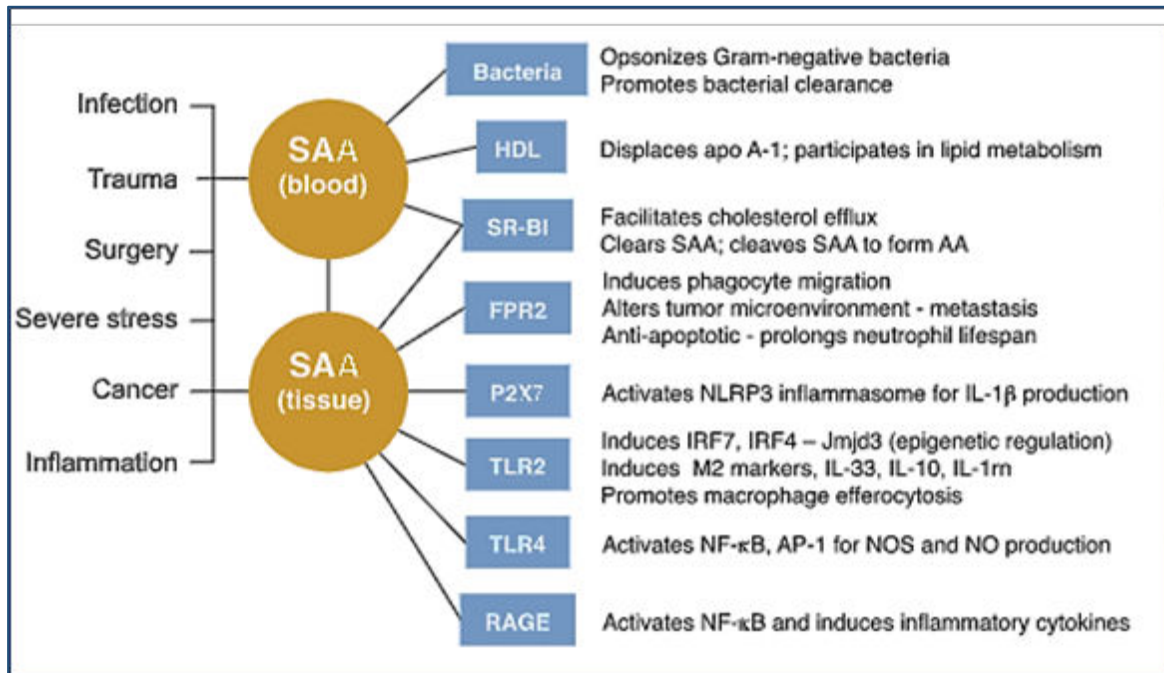


**Figure 31 :** Mécanismes de survenue d'une inflammation, d'une fibrose et d'une tumorigenèse [181].

#### 4.2.1 Inflammation

Plusieurs études ont montré l'induction d'une inflammation aiguë et/ou chronique, *in vivo*, après exposition à des NMC [199], [200]. On parle d'une inflammation aiguë lorsqu'il y a une infiltration rapide de polynucléaires neutrophiles et de macrophages au site de déposition des NM accompagnée d'une production élevée de médiateurs pro-inflammatoires et d'une inflammation chronique lorsqu'il y a un entretien de la réaction inflammatoire avec persistance de cellules inflammatoires après plusieurs jours conduisant en quelques semaines au développement d'une fibrose et de granulomes. Le passage d'une inflammation aiguë à une inflammation chronique n'est pas, pour le moment, bien compris. Bourdon et al., ont démontré que les NP de carbone induisent une inflammation qui a persisté 28 jours chez les souris après instillation intratrachéale [201]. Cette inflammation a été accompagnée d'une augmentation du taux d'ARNm de Saa3 (Serum Amyloid A3, Pseudogene) [202] dans les poumons. Poulsen et al., ont aussi trouvé que les MWCNT induisent une augmentation des protéines SAA3 dans les poumons des souris C57BL/6J et ils ont mis en évidence une corrélation entre SAA3 et l'afflux de neutrophiles. Ils en ont conclu que cette augmentation de

taux de protéines SAA3 était liée à la dose et à la teneur en Mn, Mg et Co. Comme les protéines de la famille des SAA contrôle l'inflammation et la différenciation des macrophages, les NMC en perturbant la synthèse favorise la réaction inflammatoire en augmentant son expression, et impacte la réponse immunitaire [203], [204].



**Figure 32:** Induction de la Production des protéines de la famille des SAA et conséquences de leurs interactions avec leurs récepteurs [204].

#### 4.2.2 Fibrose

La fibrose est une accumulation excessive de la matrice extracellulaire (MEC) consécutive à des signaux inflammatoires et de fibrinogènes. Normalement, les lésions sont accompagnées d'un processus inflammatoire de cicatrisation afin de les atténuer, d'éliminer les agents pathogènes et de réparer le tissu lésé. Mais suite à des dérégulations au niveau du système de réparation, ou à une induction d'inflammation continue, une fibrose se développe. L'inflammation, l'absence de mort des cellules épithéliales alvéolaires, l'enrichissement en fibroblastes et myofibroblastes, l'épaississement des septums alvéolaires, l'augmentation du dépôt de la MEC fibreuse, l'expression accrue des marqueurs protéiques de fibrose et la formation de foyers fibreux et de granulomes épithélioïdes ont été identifié comme étant des signes d'induction de fibrose par les NTC [205]. Il a été démontré par Shvedova et al., que les SWCNT induisent des effets pulmonaires inhabituels chez des souris C57BL/6J exposées par aspiration pharyngée, associant une inflammation aiguë importante

avec une apparition précoce et progressive d'une fibrose et des granulomes [206]. Plus récemment, Dong et al., ont associé la fibrose à l'inflammation induite par les MWCNT chez les mêmes souris exposées par aspiration bucco-pharyngée, suivant un mécanisme dépendant de la polarisation et l'activation des monocytes provenant de la moelle osseuse, et des macrophages résidents [207]. Une autre étude a montré des lésions d'inflammation chronique chez des souris qui ont persisté pour plusieurs semaines après l'exposition aux NTC [208]. Ils ont également trouvé que les macrophages alvéolaires de ces souris ont été polarisés suite à cette exposition et qu'ils ont acquis un phénotype profibrotique, mis en évidence par une augmentation de l'expression de Col IV, MMP-12, TIMP-2 et TIMP-3. Selon Cesta, le développement d'une fibrose pulmonaire après exposition aux NTC serait dû aux polysaccharides qui amplifient la production de PDGF-AA par les macrophages alvéolaires NR8383 [209], ce phénomène n'est pas observé avec le NC.

Dans la mesure où le processus inflammatoire et le développement d'une fibrose sont associés et que les caractéristiques physiques et chimiques des NMC impactent la réaction inflammatoire, l'existence de liens entre la fibrose et les propriétés des NMC semble logique. Ces liens paraissent dans certaines études, seules les fibres de CNT longues induisent des réponses inflammatoires et fibreuses importantes ainsi que la formation de granulomes du mésothélium pariétal. La réactivité de surface interviendrait aussi, et les MWCNT revêtus d'Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> induisent chez la souris une fibrose moins importante que celle observée avec des MWCNT non revêtus [210].

### 4.2.3 Cancérogenèse

Le développement des mésothéliomes, consécutif à l'exposition à des NTC pourrait provenir d'effets directs sur les cellules mésothéliales. Les macrophages ont également un rôle dans ce phénomène. Nagai et al., ont identifié la présence d'une inhibition de l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs Cdkn2a / 2b dans les mésothéliomes induits par les MWCNT, similaire à celle observée dans les mésothéliomes induits par les fibres d'amiante. Ils ont également montré que tous les MWCNT étaient phagocytés par les macrophages RAW264.7 avec formation locale de granulomes accompagnée d'une surexpression des gènes d'Il-1 $\beta$  et d'Il-6. Ils ont mis en évidence l'importance du diamètre dans l'induction d'une inflammation et d'une cancérogenèse [211]. Donaldson et al., ont plutôt évoqué l'effet de la longueur et de la rigidité et montrent que la rétention de ces nanotubes dans la plèvre pariétale conduit à une inflammation et à une pathologie pleurale telle que le mésothéliome [212]. Pour Rittinghausen et al., c'est plutôt la forme qui serait importante, car les MWCNT de forme aiguille induisent des mésothéliomes avec une fréquence plus élevée et une apparition plus précoce que ceux qui sont courbés [213].

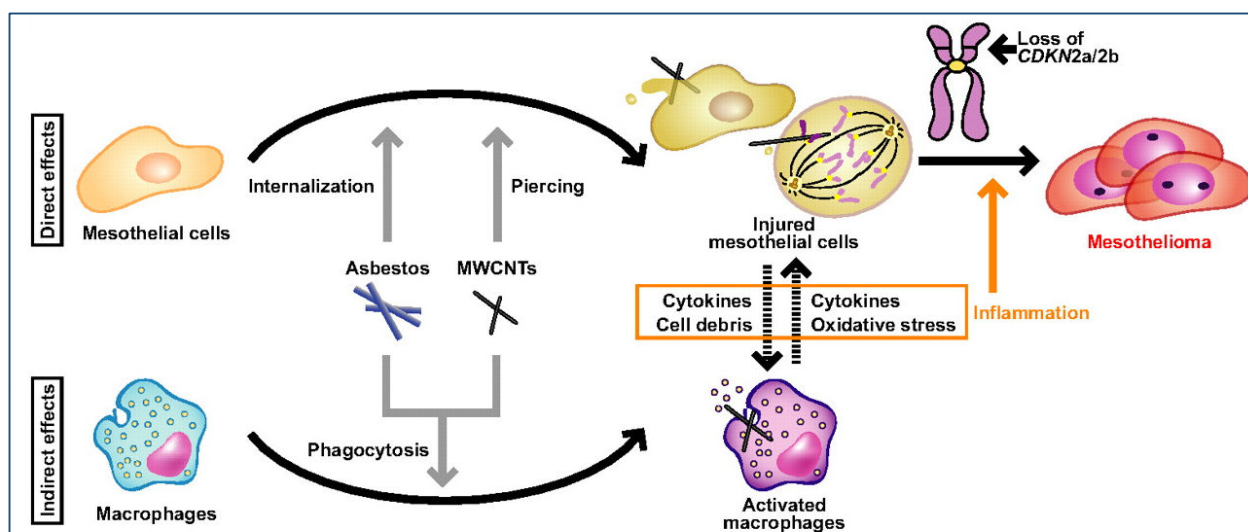


Figure 33 : L'implication des macrophages dans le développement des mésothéliomes [211].

### 4.3 Toxicité humaine

Les études chez l'homme sont difficiles et complexes à réaliser. Des épisodes de toxicité aiguë sont observés surtout en milieu professionnel, lors d'exposition accidentelle à une forte concentration de NM. Sinon seules des études épidémiologiques permettent des conclusions sur des expositions au long cours et les conséquences sur l'organisme. En fin de compte, les résultats obtenus chez l'animal peuvent servir d'alerte et amener à des mesures de protection ou de retrait de NM selon le principe de précaution.

## 5 Règlementation

Devant la nécessité de prendre en compte les risques liés à une exposition prolongée à ces particules nanométriques, une prise de conscience semble émerger avec la volonté de plusieurs pays de mettre en place une méthode d'étude, de référencement et d'évaluation de la toxicité des NP afin d'aboutir à une législation, devenue indispensable, afin de protéger la population et les travailleurs du risque d'exposition aux NM.

Aucun pays n'a pour le moment mis en place de réglementation spécifique pour l'utilisation de NM, et seules quelques recommandations existent, pour un nombre limité de nanoobjets, en fait les plus produits définissant des limites des concentrations admissibles auxquelles les travailleurs peuvent être exposés. Mais chaque pays définit ses propres normes et de grandes différences existent entre eux. En France, il n'existe actuellement pas de réglementation spécifique pour les NM mais ils sont considérés comme des substances chimiques et par conséquent ils suivent la réglementation en matière de prévention du risque chimique,



prévue par le Code du travail (article L.4121-2) en fonction de leur composition. En 2005, l'ANSES, a débuté une synthèse des connaissances scientifiques et techniques des NM manufacturés afin de proposer des pistes prioritaires pour la réalisation d'études et de recherches fin d'évaluer les risques sanitaires en milieu professionnel et pour la population générale [214]. En 2008, l'Agence a testé les méthodologies classiques d'évaluation des risques sur 4 produits parmi les 246 de grande consommation disponibles sur le marché français et contenant des NM manufactures. Ces études ont suggéré la possibilité de risques pour la santé mais l'insuffisance des connaissances n'a pas permis d'évaluer correctement ce risque. Face à cette incertitude, en 2012, l'ANSES a mis en place un groupe d'experts permanent dédié à l'actualisation des connaissances des enjeux sanitaires et environnementaux liés à l'exposition aux NM. Aussi en 2012, le décret n° 2012-232 a défini les substances à l'état nanoparticulaire, et a précisé une limite (100 grammes par an et par substance) à partir de laquelle une déclaration annuelle doit être faite auprès de l'ANSES, déclaré comme étant l'organisme responsable de la gestion de ces données transférées par voie électronique : <https://www.r-nano.fr> [215].

Concernant les NMC, en novembre 2007, l'Agence a initié une étude d'évaluation des risques liés au GRAPHISTRENGTH C100 réalisée dans le cadre du programme de recherche et développement « GENESIS »[45]. L'objet de ce programme, était la mise en place d'une filière industrielle de matériaux structurés à l'échelle nanométrique basés sur des formulations intégrant des NTC avec une évaluation des risques sanitaires et environnementaux liés aux NTC produits. Le projet a fourni un état de l'art sur l'impact des NTC sur la santé et l'environnement et en conséquence l'ANSES a établi des recommandations publiées le 26 avril 2012 afin de réduire, d'une part l'exposition des consommateurs aux produits contenant des NTC manufacturés et, d'autre part, la dissémination des NTC dans l'environnement. En février 2006, le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a publié les résultats des réévaluations du potentiel cancérigène du NC et des NTC multifeuilletts[216]. Il a confirmé leur classement établi en 1996 comme cancérigène possibles (catégorie 2B).

Au niveau européen, REACH (REACH, *Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*), règlement européen prenant en charge la protection de la santé et de l'environnement est responsable de l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques. REACH n'a pas de règles spécifiques aux NM, et de fait, actuellement, ces derniers suivent les règles appliquées aux molécules chimiques. Selon cette réglementation, la circulation des molécules potentiellement dangereuses exige un enregistrement nécessitant des données sur les dangers et les risques des molécules enregistrés. Toutefois, la

réglementation REACH est critiquée car elle manque d'une définition claire des NM, et elle ne prend pas en compte l'effet de la taille ou de l'aire de surface spécifique des NM. Donc un groupe d'experts des États membres de l'UE, le Competent Authorities sub-group on nanomaterials (CASG) a été mis en place afin d'organiser l'identification des NM, de leur donner une définition claire et de les classer séparément des molécules chimiques pour bien mettre en évidence une législation qui leur est propre [217]. Dans un même temps, en Janvier 2012, l'ECHA (European chemical Agency), a mis en place un groupe le GAARN (Group Assessing Already Registered Nanomaterials) pour parvenir à un consensus, dans un cadre informel, sur les bonnes pratiques d'évaluation et de gestion de la sécurité des NM dans le cadre du règlement REACH [218].

Aux États-Unis, les agences qui s'occupent de l'identification et du control des substances toxiques sont : l'Environmental Protection Agency (EPA), en charge de l'environnement général, et fbs (OSHA), en charge des milieux professionnels. Cette dernière dispose de l'appui d'un organisme scientifique spécifique pour élaborer des normes de santé-sécurité : le National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). Le rapport CIB (Current Intelligence Bulletin 65), établie par NIOSH, reprends-les données des études menées sur les animaux et les données de toxicité après exposition à des nanotubes et des nanofibres de carbone, afin d'évaluer quantitativement le risque et de déterminer les valeurs limites d'exposition. Pour les NTC, il n'y a pas des effets observés chez les animaux (No observed adverse effect level : NOAEL) pour de  $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  de carbone élémentaire en masse respirable pendant 8 heures considéré comme temps moyen pondéré (Time-weighted average : TWA). De ce fait, la limite d'exposition recommandée (recommended exposure limit : REL) est de  $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , 8h TWA (NIOSH 2011) [219],[220]. Cependant, il est recommandé de rester à des concentrations inférieures à cette limite car dans un environnement de travail, d'autres sources de carbone élémentaire qui peuvent interférer avec la détermination de la dose d'exposition aux NTC. Pour le NC, la limite d'exposition permise (permissible exposure limit : PEL), est de  $3500 \mu\text{g}/\text{m}^3$  mais elle n'est pas encore déterminée pour les NTC[221]. Or on ne peut pas extrapoler le risque d'exposition aux NTC en se référant à cette dose car la forme tubulaire du carbone est plus active. Au Japon, une étude publiée en 2015 propose une limite d'exposition professionnelle de  $0.03 \text{ mg}/\text{m}^3$ , en se basant sur des données obtenues après instillation et inhalation de NTC à des rats à différentes doses et différents temps [222].

**Tableau 4 : limites d'exposition proposées sur le lieu de travail pour différents NM (toutes les données se réfèrent à la concentration par mètre cube, sauf indication contraire).**

NM	BSI (Angleterre)	IFA (Allemagne)	DMSAE (Hollande)	NIOSH (USA)	SWA (Australie)	AIST (Japon)	KML (Corée)
NTC rigides, biopersistants	10 <sup>4</sup> f	10 <sup>4</sup> f	10 <sup>4</sup> f	0.007 mg	10 <sup>5</sup> f	0.03 mg	
NTC exclus explicitement des effets amiante		4×10 <sup>7</sup> p	4×10 <sup>7</sup> p				
NC	0.066×WEL 2×10 <sup>7</sup> p	4×10 <sup>7</sup> p	4×10 <sup>7</sup> p		3 mg		3.5 mg

**Abréviations:** BSI, British Standard Institute; IFA, Institut für für Auslandsbeziehungen; DMSAE, Dutch Minister of Social Affairs and Employment; NIOSH, US National Institute for Occupational Safety and Health; SWA, Safe Work Australia; AIST, Advanced Industrial Science and Technology; KML, Korean Ministry of Labour; WEL: work exposure limit.

## 6 Synthèse du chapitre

Dans ce chapitre, les différentes propriétés physiques et chimiques des différentes formes nanométriques du carbone qui sont à la base de leur utilisation croissante dans de multiples domaines, ont été présentés. Leur marché se développe et l'exposition humaine à ces nanostructures devient très importante surtout par inhalation car c'est la voie principale d'entrée de ces NMC, d'où l'importance de l'étude de leur effet en particulier sur le système respiratoire.

Des modèles cellulaires et animaux ont montré leur pouvoir toxique. L'évolution actuelle fait que les modèles animaux sont de moins en moins utilisés et tolérés et des substituts existent qui, bien qu'imparfaits, se rapproche des conditions *in vivo* (co-cultures cellulaires, systèmes ALI...). Les NMC peuvent être internalisés, ils interagissent avec les systèmes membranaires et les organites cellulaires. Ils provoquent dans les cellules des stress : mitochondriaux, lysosomaux et autres qui déclenchent des réponses cellulaires tels que le stress oxydant et la réaction inflammatoire. La réponse cellulaire aux différents NMC n'est pas univoque et varie avec les caractéristiques physicochimiques des particules comme la taille, la forme (tube, feuillet...), la composition chimique, la fonctionnalisation... Ces éléments sont des déterminants de toxicité. La compréhension des liens entre ces différents descripteurs et leur toxicité permet de mieux estimer les risques liés à une exposition et de mettre en œuvre des procédés de production plus sûrs. Le développement des analyses transcriptomiques et protéomiques a permis de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu par l'organisme en réaction à une exposition à ces NMC. Aussi bien dans les réponses précoces que tardives et en tachant de se rapprocher des expositions en particulier professionnelles : doses subtoxiques, administrées au long cours avec des études à des temps précoces et tardifs. Le but étant alors de comprendre non seulement les réactions immédiates, aiguës (réaction inflammatoires, production d'ERO) mais aussi de suivre l'évolution dans le temps avec la survenue de pathologies liées à ces NMC (fibroses, cancérogenèse). Quelques NMC sont considérés comme cancérogènes possibles du fait de l'apparition de phénomènes néoplasiques chez l'animal.

Jusqu'à ce jour, il n'existe pas de réglementation adaptée à la fabrication et l'usage des NM en général. Des réglementations existes mais elles sont limitées à un seul pays et présentent des discordances parfois importantes d'un pays à l'autre. C'est pourquoi la génération de données importantes, partagées par le milieu scientifique avec des études de toxicité *in vitro*, *in vivo* et *in silico* devrait permettre d'aboutir à terme à une meilleure estimation du risque d'exposition aux NM en mettant en place des algorithmes d'étude de toxicité commun à tous des NM matériaux et par la suite à la mise en place d'une réglementation adéquate afin de

garantir la protection de la santé humaine et de l'environnement. Ais la réglementation doit aussi prendre en compte le risque environnemental posé par la dissémination de ces nano-objets.



### III. Objectifs de l'étude

---

L'objectif de cette thèse est d'étudier l'effet de l'exposition de macrophages aux différents NMC sur leur transcriptome principalement et sur le protéome pour certains d'entre eux. Les NMC étudiés étaient le NC, l'OG mais principalement les NTC. Nous avons choisi une lignée de macrophages alvéolaires de rat, les cellules NR8383 car l'inhalation est la voie d'exposition principale à ces NMC et car ces cellules sont impliquées dans la défense immunitaire. Secondairement, une autre lignée monocytaire-macrophagique provenant d'un patient présentant une leucose, cellules THP-1, a été utilisée après différenciation en macrophages afin de comparer la réaction de ces différents modèles de macrophages vis-à-vis des mêmes NMC.

Dans notre travail, les macrophages ont été exposés à des doses sub-toxiques et pour une durée courte afin de déterminer les événements moléculaires initiateurs et les réponses primaires et précoces directement liés à l'exposition aux NMC. Nous avons développé des études comparatives pour essayer de suggérer des liens entre les caractéristiques physiques et chimiques des NM et leurs mécanismes de toxicité. On a ainsi mis en évidence un effet taille, un effet diamètre, un effet fonctionnalisation et un effet forme qui sont connus comme étant les déterminants majeurs de la toxicité des NMC. Un autre de nos objectifs était de mettre en évidence l'effet corona.

Cette étude a servi aussi à la génération d'une base de données importante qui servira à alimenter un logiciel type QSAR prédictif de toxicité dans le cadre de Smartnanotox.





### IV. Méthodologie de travail

---

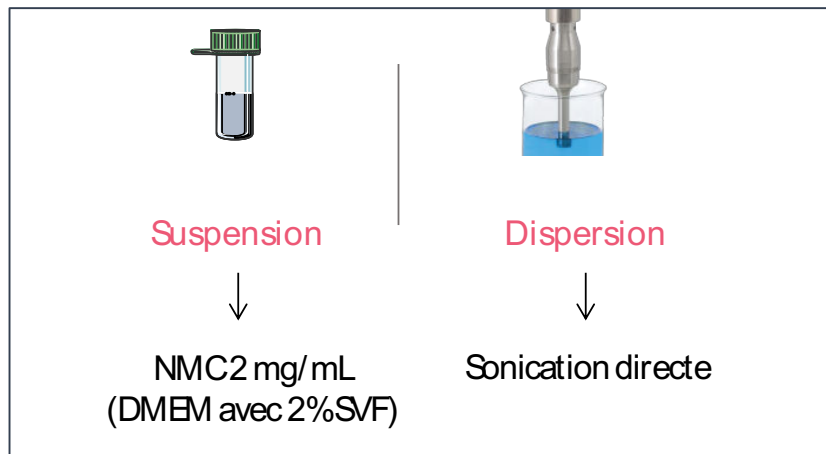


Afin de parvenir à la réalisation des objectifs développés dans le chapitre précédent, la méthodologie de travail décrite ci-dessous a été mise en œuvre. Durant ce travail, trente NMC ont été étudiés (Ann.1). Les protocoles utilisés sont détaillés dans chaque étude.

## 1 Caractérisation des NMC

### 1.1 Dispersion des NMC

Nous avons commencé par l'optimisation du protocole de dispersion par ultra-sons pour chaque NMC. Nous avons utilisé une solution de dispersion DMEM avec 2% SVF et une sonde plongeante. A chaque fois nous avons varié les paramètres de sonication : taille de la sonde, durée et amplitude de sonication (Ann.1)



**Figure 34 : Dispersion des NMC.**

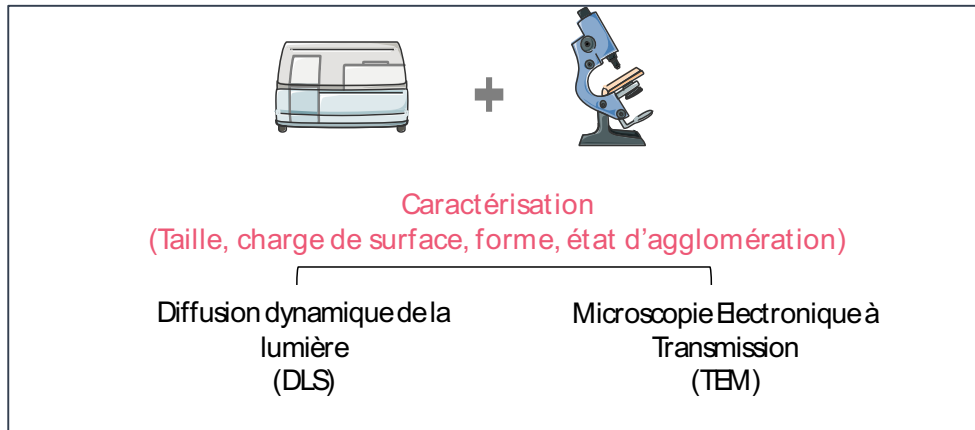
### 1.2 Diffusion dynamique de la lumière

La taille des NMC, leur charge de surface et l'homogénéité des solutions, ont été déterminées par DLS. Nous avons mesuré leur diamètre hydrodynamique (Z-average), le potentiel zêta et l'indice de polydispersité de chaque solution (Pdi). Une solution est considérée homogène pour un Pdi < 0.3

**Principe :** les particules immergées dans un fluide sont soumises à un mouvement aléatoire, qu'on appelle mouvement brownien. Un faisceau laser incident va traverser la suspension de particules, et diffuser dans toutes les directions. La partie du signal lumineux diffusée est collectée sur un détecteur à un angle donné. Le coefficient de diffusion calculé à partir du signal optique recueilli par le détecteur permet le calcul du diamètre hydrodynamique en appliquant la relation de Stokes-Einstein.

### 1.3 Microscopie électronique à transmission

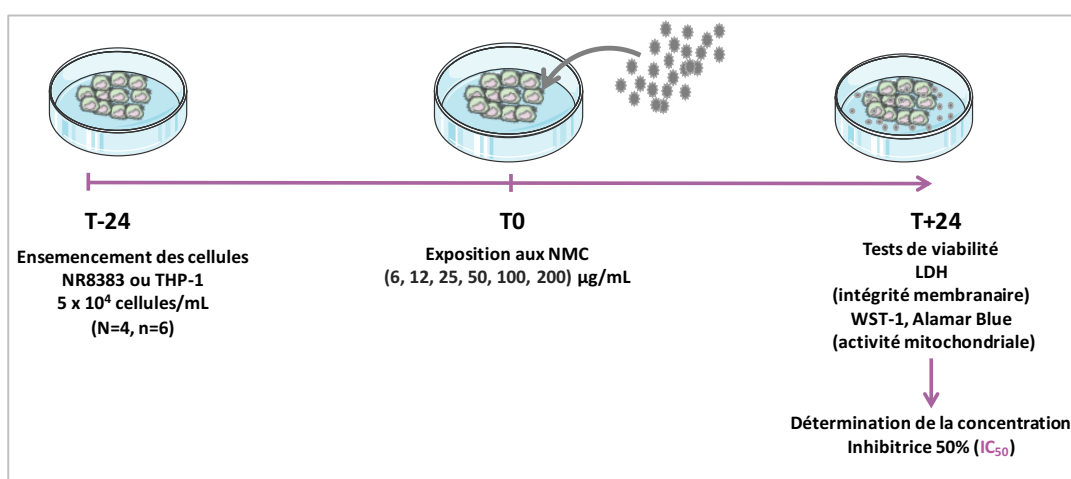
La forme de nos NMC, leur état d'agglomération et leur taille (diamètre et longueur), ont été déterminés par microscopie électronique de transmission.



**Figure 35 : Caractérisation des NMC par DLS et TEM.**

## 2 Evaluation de la cytotoxicité des NMC

Trois tests de cytotoxicité ont été réalisés pour chaque NMC : les tests WST-1 et Alamar Blue qui étudient l'activité mitochondriale et le test LDH qui étudie l'intégrité membranaire. Les tests de viabilité sont précédés par une exposition des cellules de 4 h ou 24 h aux NMC.



**Figure 36 :** Exposition des cellules aux NMC pour la réalisation des tests de cytotoxicité.

## 2.1 WST-1

Ce test mesure l'activité métabolique totale de la succinate déshydrogénase des cellules vivantes par un dosage colorimétrique. La réduction du sel de tétrazolium (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tétrazolium) de couleur rouge entraîne la formation de cristaux de formazan de couleur jaune (figure 8). L'absorbance est lue à 560 nm. Par conséquent, la quantité de formazan formé est directement liée au nombre de cellules métaboliquement actives dans la culture [223].

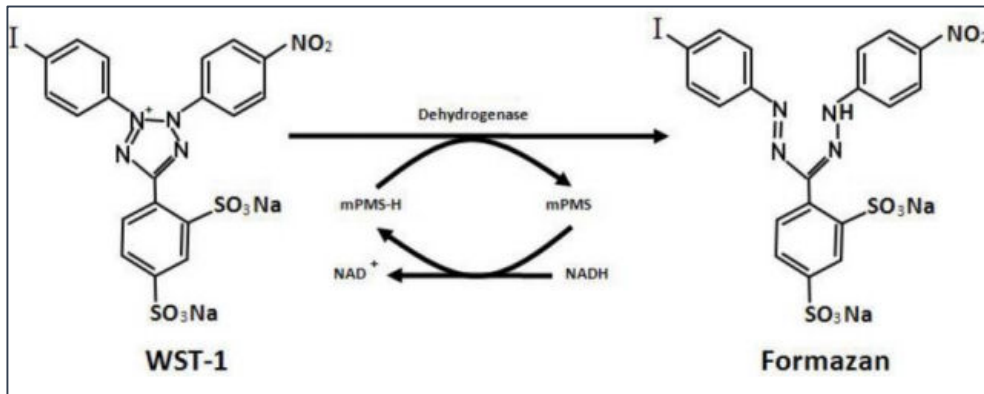


Figure 37 : Principe du test WST-1 [223].

**MPMS (1-methoxy-5-methyl-phenazinium methyl sulfate):** accepteur d'électrons intermédiaire; **NADH:** cofacteur de l'enzyme succinate déshydrogénase.

## 2.2 Alamar Blue

Ce test est basé sur une réaction d'oxydo-réduction. La résazurine qui est de couleur bleue va diffuser dans les cellules vivantes par diffusion passive où elle est réduite par les enzymes mitochondriales (NADH et NADPH déshydrogénases) en résorufine qui est un composé rouge (figure 9). Cette réduction est mesurée par fluorométrie à 590 nm. Par conséquent, la quantité de résorufine, produit fluorescent, est proportionnelle au nombre de cellules vivantes [224].

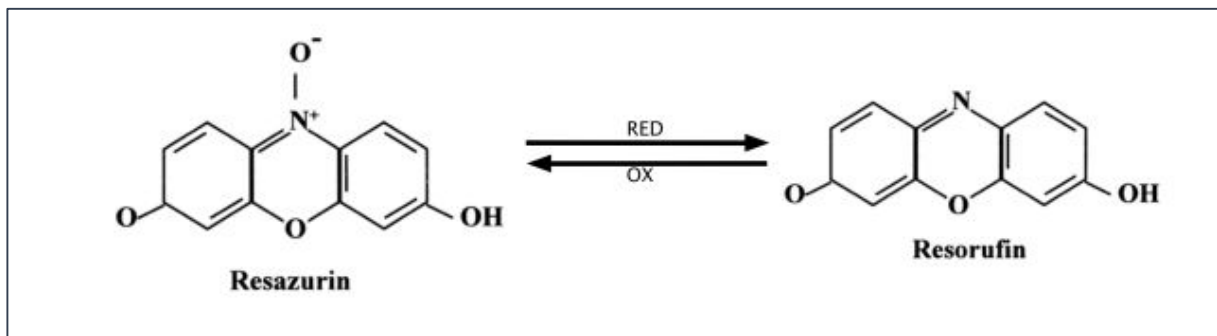


Figure 38 : Principe du test de l'Alamar Blue (O'Brien et al., 2001).

## LDH

Ce test mesure l'intégrité membranaire des cellules par la mesure de l'activité lactase déshydrogénase (LDH). La mort cellulaire se traduit par une perte de l'intégrité membranaire ce qui entraîne une libération dans le milieu de culture de la LDH. Par conséquent, la quantité de LDH libérée dans le milieu est proportionnelle à la mort cellulaire. L'activité de cette enzyme est mesurée par colorimétrie: la LDH catalyse la déshydrogénation du lactate en pyruvate en réduisant le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) en NADH. Ce dernier réduit le tétrazolium en formazan quantifié par absorbance à 492nm [225], .

### 2.3 Tests statistiques

Pour l'étude statistique des résultats de ces trois tests, nous avons utilisé le test « Analyse de variance » (ANOVA) avec l'approximation de Tukey Kramer. P value choisie <0.0001.

## 3 Approches omiques

Parmi la liste de NMC, sept ont été choisis (Core liste, Ann.2) pour les études omiques. Les cellules ont été exposées à des doses sub-toxiques de NMC pendant 4h pour la transcriptomique et pour 24h pour la protéomique. Pour la protéomique, nous avons préparé les culots et les surnageants qui ont été techniques par l'un de nos partenaires en Irlande (UCD) et les résultats bruts nous ont été communiqués pour analyse.

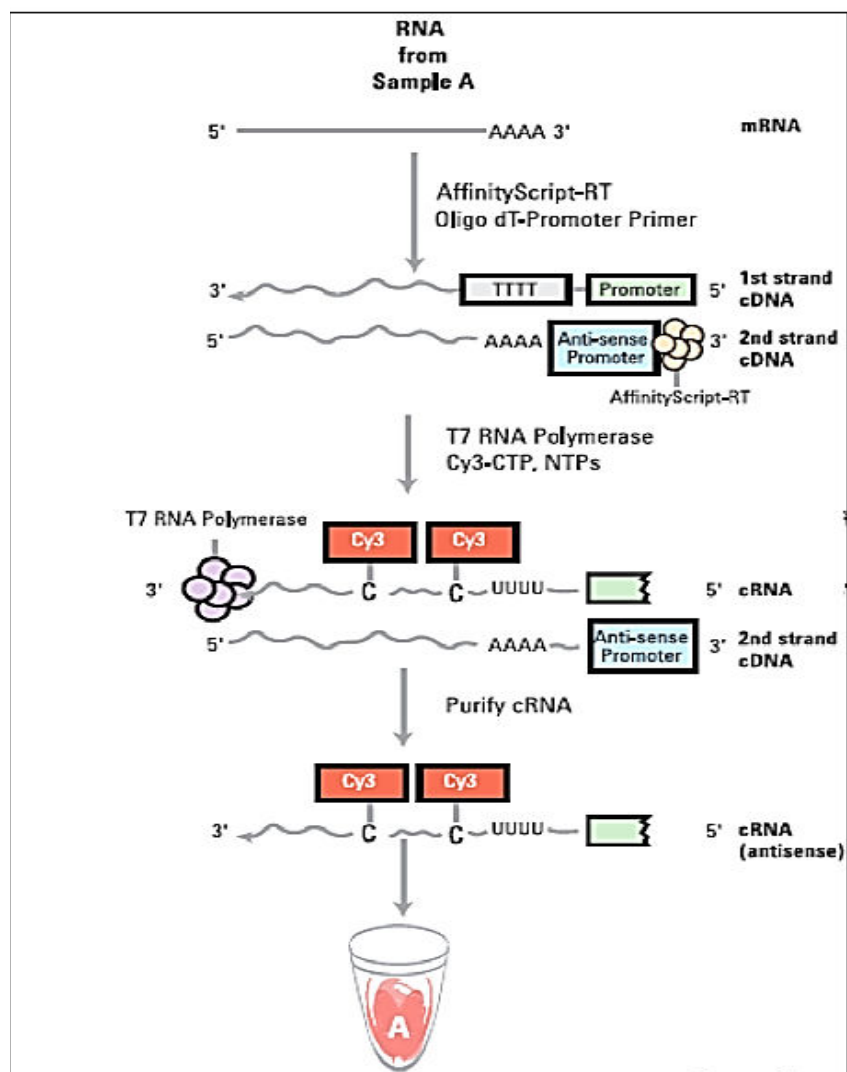
### 3.1 Transcriptomique

La transcriptomique permet l'étude du transcriptome qui est l'ensemble des ARN (messagers, ribosomiques, de transfert et autres espèces d'ARN) issus de la transcription du génome. Elle fournit alors le niveau d'expression de dizaines de milliers de gènes présents, à un instant donné, dans une population cellulaire, un organe ou un tissu. Elle est utilisée en toxicologie pour les analyses d'expression différentielle surtout afin de déterminer les réponses cellulaires à un toxique suite à un traitement et les mécanismes impliqués. Elle est considérée comme l'une des meilleures approches utilisées en toxicologie. Cette analyse a recours soit à la technologie des puces d'ADN soit au séquençage deuxième génération.

La technique des puces à ADN est basée sur le principe d'hybridation. Une biopuce, est le siège de milliers de copies d'une même sonde correspondant à de courtes séquences d'ADN simple brin, spécifiques d'un ARN donné et donc d'un gène donné fixées en rangées ordonnées sur un support rigide (verre ou nylon) de petite taille (quelques cm<sup>2</sup>).

Cette technique se comporte quatre étapes principales : une transcription inverse, une synthèse d'ARN marqué, une hybridation sur puce et une extraction des données. Après extraction des ARN, les ADN complémentaires (ADNc) correspondant sont synthétisés grâce à l'enzyme AffinityScriptRT. Puis l'enzyme T7 ARN-polymerase ADN dépendante et la Cyanine 3 sont ajoutées dans le milieu réactionnel afin de permettre la synthèse, l'amplification et le marquage par incorporation de fluorochromes des ARNc complémentaires. Ces ARNc sont ensuite purifiés et déposés sur des puces à ADN ou ils s'hybrident spécifiquement à la sonde d'ADN correspondants. Ensuite, après acquisition des images d'hybridation, ces dernières seront converties en valeurs numériques par un logiciel d'analyse d'image qui mesure l'intensité de la fluorescence. Celle-ci reflète alors le niveau d'expression dans l'échantillon initial de chacun des gènes représentés sur la puce. On parvient ainsi à quantifier l'expression individuelle de l'ensemble des gènes présents dans les échantillons témoins d'une part et dans les échantillons traités d'autre part. Ainsi, en faisant le rapport des niveaux d'expression exposé/témoin, on peut ainsi identifier les gènes dont l'expression est modifiée [91].





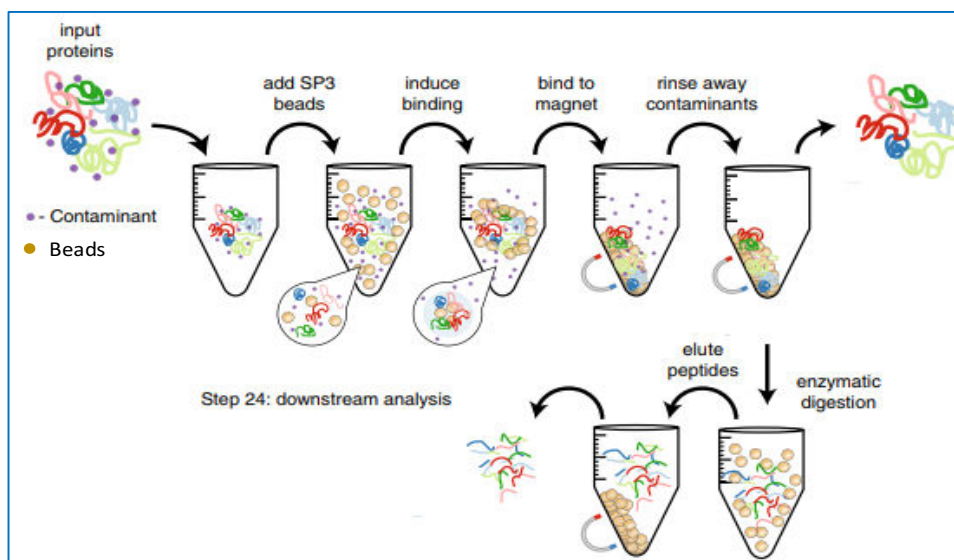
**Figure 39 :** Le principe de la transcriptomique [91].

### 3.2 Protéomique

La protéomique permet la mesure de l'altération de l'expression des protéines totales des cellules et/ou de leurs surnageants suite à leur exposition au NM. Il fournit plus d'informations claires sur les réponses cellulaires que la régulation génique.

Pour l'étude de la corona et des surnageants, la méthode de préparation d'échantillons assistée par filtre (FSAP) a été réalisée. FSAP utilise des concentrateurs d'ultrafiltration centrifuges pour éliminer les détergents, scinder les protéines et isoler des fractions peptidiques pures qui seront ensuite analysés par chromatographie en milieu liquide couplée à un spectromètre de masse. Cette méthode est utilisée pour le

clivage de protéines avec différentes protéinases, soit avec des enzymes simples, soit dans un mode de digestion multienzyme successive comme dans notre cas. Pour les lysats de cellules, la méthode SP3, single-pot, solid-phase-enhanced sample-preparation, a été appliquée. C'est une approche utilisant des billes paramagnétiques pour le traitement rapide, robuste et efficace d'échantillons de protéines destinés à l'analyse protéomique. SP3 utilise un mécanisme d'interaction hydrophile pour l'échange ou l'élimination des composants utilisés avant l'analyse protéomique pour la lyse cellulaire, la solubilisation des protéines et la digestion enzymatique, par exemple, détergents, sels, tampons, acides et solvants. Le protocole SP3 comprend des étapes de liaison non sélective aux protéines et de rinçage, favorisé par l'utilisation de la capture par solvataion à l'éthanol à la surface des billes hydrophiles et l'élué du matériau purifié en milieu aqueux. Dès que les échantillons sont prêts, ils sont analysés par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse. Enfin les protéines seront identifiées et quantifiées en utilisant le logiciel Maxquant [226].



**Figure 40 : Les différents étapes de la préparation des échantillons de protéines suivant la méthode SP3 [226, p.].**

### 3.3 Analyses bioinformatiques

Les tests omiques génèrent une quantité de données importante d'où la nécessité du recours aux outils bioinformatiques adaptés afin d'en simplifier la gestion, l'intégration et le traitement des données. Les données de la transcriptomique ont déposées dans des bases de données publiques : GEO, *Gene Expression Omnibus*, du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) ou ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) en respectant les lignes directrices regroupées sous le terme de MIAME, *Minimum information about a microarray experiment*, qui décrivent le minimum d'informations indispensables à fournir lors de la réalisation d'une expérience de puces à ADN. Pour les expériences de protéomiques, une norme similaire a également été développée dénommée MIAPE, *Minimum information about a proteomics experiment*.

Après normalisation des données extraites, celles-ci sont interprétées à l'aide d'outils d'analyse plus poussées tels que DAVID, IPA, KEGG, PANTHER, Reactome, Gene ontology et STRING sont utilisés. Dans cette étude l'analyse de la transcriptomique et de la protéomique a été faite principalement par IPA, DAVID et STRING. IPA (Qiagen), *Ingenuity pathway analysis*, est un logiciel payant qui sert à l'identification de nouvelles cibles ou de nouveaux biomarqueurs candidats dans le contexte des systèmes biologiques. David (NCBI), *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*, est un logiciel gratuit, qui permet d'extraire systématiquement la signification biologique de grandes listes de gènes et de protéines. Finalement STRING, *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*, qui est aussi gratuit montre les interactions protéine-protéine connues et prédites aussi bien que les associations directes (physiques) et indirectes (fonctionnelles) obtenues à partir de prédiction informatique, du transfert de connaissance entre organismes et des interactions provenant d'autres bases de données [91].

## 4 Autres techniques

Afin de valider quelques endpoints, des tests simples ont été réalisés. L'étude de la morphologie cellulaire après exposition aux NMC a été faite par coloration GIEMSA, l'étude de l'expression des cytokines, de la caspase 3 et de la cathepsine a été réalisée par des trousse Elisa. Nous avons étudié aussi les mécanismes de mort cellulaire par marquage Annexin V /iodure de propidium en cytométrie de flux. Le niveau d'expression de certains gènes a été déterminé par RT-PCR.



# CHAPITRE V

---

## V. Résultats

---



Les NMC se diffèrent par leurs caractéristiques physiques et chimiques ce qui est à l'origine de leur différente toxicité. Afin de déterminer le rôle des propriétés physiques et chimiques dans la détermination de la réponse toxique, nous avons réalisé des analyses comparatives en essayant dans la plupart des cas de ne varier qu'un seul paramètre physico-chimique entre les NM étudiés pour voir s'il y a une différence dans la toxicité, notamment au niveau d'expression des gènes, qui pourrait être imputée à ce facteur, tout en utilisant le même modèle cellulaire et les études transcriptomiques comme approche principale. Nous avons également étudié la toxicité induite par les mêmes NMC sur deux types cellulaires différents pour déterminer si ces modèles réagissent différemment. Les résultats sont présentés sous forme de cinq études. La première est une étude globale où sont comparés plusieurs états du carbone qui diffèrent par plusieurs caractéristiques. La deuxième s'est concentrée sur le facteur taille comprenant le diamètre et la longueur. Ensuite, dans le troisième, nous nous sommes intéressés par l'effet de la fonctionnalisation. La quatrième étude compare la réaction de deux modèles cellulaires à deux NTC et la dernière analyse le facteur forme.

Pour toutes ces analyses, la première partie consiste en des études de cytotoxicité. Pour chaque NM, nous avons commencé par les tests WST-1 et Alamar Blue qui nous ont fourni une information sur l'activité mitochondriale et par extension la viabilité cellulaire. Nous avons pu alors déterminer, en nous basant sur les résultats du test WST-1, que nous estimons être le test le plus fiable car il montre le moins d'interaction avec les NP, la concentration inhibitrice ( $IC_{50}$ ) pour chaque NM. Aussi nous nous sommes intéressés à déterminer si ces NM endommageaient la membrane cellulaire par le test LDH. La gamme de doses utilisée pour les expositions aux NMC pour ces trois tests était de 0 à 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Pour permettre la comparaison avec les autres travaux du Consortium, ces doses massiques sont converties à des doses par aire de surface spécifique (surface NM/surface cellule) lors de l'expression des résultats de cytotoxicité, sachant que la surface spécifique de chaque NM a été déterminée par nos partenaires en appliquant la méthode Brunauer, Emmett et Teller. Le temps d'exposition utilisé pour ces tests était de 24 h et dans certaines études nous avons ajouté un deuxième temps d'exposition de 4h.

# 1 Etude comparative entre quatre composés carbonés : NC, OG, SWCNT et MWCNT

## 1.1 Introduction

Dans la première étude, on a comparé quatre états différents de carbone, le NC (Printex-90) qui sont des NP de carbone sphériques de diamètre égal à 14 nm, l'OG (NRCWE-058) qui sont des nanotubes de diamètre 53 nm et longueur égale à 3 µm environ, des SWCNT (NRCWE-051) qui ont une longueur comprise entre 5 et 30 µm et un diamètre égal à 2 nm environ et enfin des MWCNT ayant une longueur de 520 nm et de diamètre égal à 20 nm. Le modèle cellulaire choisi est les cellules NR8383 qui sont des macrophages alvéolaires de rat sachant que l'inhalation est la première voie d'exposition aux NMC et que les macrophages sont la première ligne de défense contre le non-soi. L'objectif de cette étude était de déterminer lequel de ces NM induisait le plus de cytotoxicité du stress oxydant, une réponse inflammatoire ou des dysfonctionnements mitochondriaux. Ces événements clés sont importants dans la détermination du destin d'une cellule, d'un tissu voire d'un organisme. Après les études de cytotoxicité, nous avons étudié l'expression de quelques gènes par PCR après exposition des cellules pour 4 h à des doses égales à  $IC_{50/4}$  et  $IC_{50}$  de chaque NM. Nous avons retenu ces deux doses, car la première est une dose sub-toxique  $IC_{50/4}$  et nous sommes intéressé par les événements moléculaires initiaux induits par ces NM et non pas les réponses secondaires, et la seconde pour évaluer s'il y a un effet dose. Les gènes choisis sont impliqués dans la mort cellulaire, tels que *Casp 8* et *Pdcd4* impliqués dans l'induction de l'apoptose, et *Bcl2* impliqué dans son inhibition. Aussi, nous avons choisi des gènes d'intérêt codant pour des protéines intervenant dans l'inflammation comme *Il-6*, *Il-1β*, *Tnfα* et *Nfkβ*, dans le stress oxydant comme *Ncf*, et dans le stress mitochondrial comme *Opa*, qui représentent les événements clés qui nous intéressent. L'intérêt donc de cette étude multi factorielle était d'avoir des idées sur le potentiel toxique de chaque état de carbone et d'essayer d'établir des hypothèses sur des liens éventuels qui pourraient lier ce potentiel toxique aux caractéristiques physiques et chimiques d'un NM.



## 1.2 Résumé des principaux résultats

Parmi les quatre NM étudiés, celui qui est le plus toxique est l'OG ( $IC_{50} = 10 \text{ cm}^2/\text{cm}^2$ ). Ensuite il y a le MWCNT ( $IC_{50} = 104 \text{ cm}^2/\text{cm}^2$ ). Ce résultat est en accord avec les résultats d'expression des gènes car parmi les quatre NM testés, seuls ces deux seulement ont induit une surexpression significative des gènes *Opa/Sdha* impliqués dans le stress mitochondrial. Toutefois, tous les NMC induisent une réponse inflammatoire ce qui est consistant avec les données de la littérature. Cependant, l'OG semble avoir le potentiel inflammatoire le plus important, d'après les résultats portant sur la surexpression des gènes *Tnfa*, *Nfkβ* et *Il-6*. Concernant les mécanismes de mort cellulaire, ce sont les MWCNT qui induisent le plus de l'autophagie ainsi que l'indique la surexpression de gène *Atg2*.

## 1.3 Conclusion

L'inflammation semble être la réponse cellulaire commune à tous les NMC et les caractéristiques physiques et chimiques de ces NM contrôlent le degré de leur potentiel inflammatoire. Par exemple, selon cette étude, le nanotube le plus long produit plus d'inflammation que celui qui est plus court et l'OG semble avoir le potentiel inflammatoire le plus important en comparaison avec les autres formes de carbone étudiés. Cette étude a aussi montré que les MWCNT induisent un stress mitochondrial important et ils pourraient conduire à une autophagie. Pour les NP sphériques, leur mécanisme de toxicité semble être stress oxydant dépendant.

**Cette étude a fait l'objet de la publication suivante qui a été soumise dans Food and Chemical Toxicology.**

## 1.4 Article I

Manuscript Number:

Title: Carbon-based nanomaterials induce inflammation and autophagy in rat alveolar macrophages

Article Type: Full Length Article

Keywords: Carbon nanomaterial; cytotoxicity; inflammation; gene expression; oxidation; mitochondrial dysfunction

Corresponding Author: Professor Luc FERRARI,

Corresponding Author's Institution: Université de Lorraine

First Author: Sara Nahle

Order of Authors: Sara Nahle; Ramia Safar; Zahra Doumandji; Bertrand Rihn; Olivier Joubert; Luc FERRARI

Abstract: Nowadays, carbon based nanosensors and nanocomposites are used for smart food packaging due to their distinctive characteristics that should improve the quality and safety of food products. But, the use of carbon nanomaterials (CNM), raise some questions of safety. Indeed, these CNM are released in the environment mainly after degradation and combustion of food waste, thus the exposure to these CNM become important especially via the respiratory system. So, CNM present a risk for consumers, because of their tiny size and their physical and chemical properties different from those at the macro-scale.

In order to discuss the potential risks, we study the cytotoxicity and propose some mechanisms of toxicity for different CNM: carbon black (CB), graphene oxide (GO), single walled carbon nanotube (SWCNT) and multi walled carbon nanotube (MWCNT) using an alveolar macrophages, NR8383 cell line. We compare the expression of a panel of genes implicated in toxicity mechanisms such as inflammation (Nfkb, Tnf- $\alpha$ , Il-6, and Il-1 $\beta$ ), oxidative burst (Ncf1), mitochondrial dysfunctions (Opa) and cell death (Pdcd4, Bcl-2, and Casp-8).

According to results, GO was the most toxic. Different CNM contributed to distinctive responses but all of them induced inflammation.

Suggested Reviewers: Guillaume Garcon PhD  
Professor, Faculty of Pharmacy of Lille  
Guillaume.Garcon@univ-lille2.fr  
good knowledge of toxicological models

Yann Landkocz PhD  
Associate professor, Université Cote d'Opale  
yann.landkocz@univ-littoral.fr  
Knowledge of nanoparticles toxicity models and studies

Christelle Monteil PhD  
Professor, Université de Rouen  
christelle.monteil@univ-rouen.fr

good knowledge of nanoparticules toxicity

Edmond Creppy PhD  
Professor, Université de Bordeaux  
edmond.creppy@u-bordeaux.fr  
good knowledge of cellular models

Ajay V Singh  
Max Planck Institute for Intelligent Systems  
avsingh@is.mpg.de  
published recently : Review of emerging concepts in nanotoxicology:  
opportunities and challenges for safer nanomaterial design.

Opposed Reviewers:

Dear Editor,

I am pleased to submit the paper by Nahlé and coworkers entitled "**Carbon-based nanomaterials induce inflammation and autophagy in rat alveolar macrophages**". This paper provide new data concerning the effect of some food packaging additives, carbon nanomaterials. We provide data that suggested that if these nanomaterials can all induce inflammation in macrophages, the mechanisms involved depend of the shape and structure of the nanomaterial.

I hope this paper will be found suitable for Food and Chemical Toxicology.

Yours sincerely

Luc Ferrari

PharmD, PhD, Professor of toxicology

Institut Jean Lamour

UMR 7198 CNRS-Université de Lorraine

2 allée André Guinier - Campus Artem

F-54011 Nancy Cedex

**Carbon-based nanomaterials induce inflammation and autophagy in rat alveolar macrophages.**

Sara Nahle<sup>1</sup>, Ramia Safar<sup>2</sup>, Zahra Doumandji<sup>1</sup>, Bertrand Rihn<sup>1</sup>, Olivier Joubert<sup>1</sup>, Luc Ferrari<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Nanomatériaux et Santé, Institut Jean Lamour UMR 7198 CNRS-Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France.

<sup>2</sup> Nutrition, genetics and exposure of environmental risk, INSERM 1256, Université de Lorraine, F-54505 Vandoeuvre-Les-Nancy, France.

\* corresponding author

**Keywords:** Carbon nanomaterial, cytotoxicity, inflammation, gene expression, oxidation, mitochondrial dysfunction.

## Abstract

Nowadays, carbon based nanosensors and nanocomposites are used for smart food packaging due to their distinctive characteristics that should improve the quality and safety of food products. But, the use of carbon nanomaterials (CNM), raise some questions of safety. Indeed, these CNM are released in the environment mainly after degradation and combustion of food waste, thus the exposure to these CNM become important especially via the respiratory system. So, CNM present a risk for consumers, because of their tiny size and their physical and chemical properties different from those at the macro-scale.

In order to discuss the potential risks, we study the cytotoxicity and propose some mechanisms of toxicity for different CNM: carbon black (CB), graphene oxide (GO), single walled carbon nanotube (SWCNT) and multi walled carbon nanotube (MWCNT) using an alveolar macrophages, NR8383 cell line. We compare the expression of a panel of genes implicated in toxicity mechanisms such as inflammation (*Nfkb*, *Tnf- $\alpha$* , *Il-6*, and *Il-1 $\beta$* ), oxidative burst (*Ncf1*), mitochondrial dysfunctions (*Opa*) and cell death (*Pdcd4*, *Bcl-2*, and *Casp-8*).

According to results, GO was the most toxic. Different CNM contributed to distinctive responses but all of them induced inflammation.

**Carbon-based nanomaterials induce inflammation and autophagy in rat alveolar macrophages.**

Sara Nahle <sup>1</sup>, Ramia Safar <sup>2</sup>, Zahra Doumandji <sup>1</sup>, Bertrand Rihn<sup>1</sup>, Olivier Joubert <sup>1</sup>, Luc Ferrari <sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Nanomatériaux et Santé, Institut Jean Lamour UMR 7198 CNRS-Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France.

<sup>2</sup> Nutrition, genetics and exposure of environmental risk, INSERM 1256, Université de Lorraine, F-54505 Vandoeuvre-Les-Nancy, France.

\* corresponding author

**Keywords:** Carbon nanomaterial, cytotoxicity, inflammation, gene expression, oxidation, mitochondrial dysfunction.

**Abstract**

Nowadays, carbon based nanosensors and nanocomposites are used for smart food packaging due to their distinctive characteristics that should improve the quality and safety of food products. But, the use of carbon nanomaterials (CNM), raise some questions of safety. Indeed, these CNM are released in the environment mainly after degradation and combustion of food waste, thus the exposure to these CNM become important especially via the respiratory system. So, CNM present a risk for consumers, because of their tiny size and their physical and chemical properties different from those at the macro-scale.

In order to discuss the potential risks, we study the cytotoxicity and propose some mechanisms of toxicity for different CNM: carbon black (CB), graphene oxide (GO), single walled carbon nanotube (SWCNT) and multi walled carbon nanotube (MWCNT) using an alveolar macrophages, NR8383 cell line. We compare the

1 expression of a panel of genes implicated in toxicity mechanisms such as inflammation (*Nfkb*, *Tnf- $\alpha$* , *Il-6*, and  
2 *Il-1 $\beta$* ), oxidative burst (*Ncf1*), mitochondrial dysfunctions (*Opa*) and cell death (*Pdcd4*, *Bcl-2*, and *Casp-8*).  
3  
4

5 According to results, GO was the most toxic. Different CNM contributed to distinctive responses but all of  
6 them induced inflammation.  
7  
8  
9

10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



## 1 Introduction

The use of nanotechnology in food packaging called Nano-packaging is growing because nanomaterials improve the quality of food products (1). Among these nanomaterials, CNM are becoming increasingly used and are considered promising in this field, they are used principally as nanocomposites in food covering. CNM have been chosen for several reasons: their mechanical and thermal properties as well as their barrier properties, e.g. strength and flexibility(1, 2).In addition, CNM have antimicrobial activity (3, 4), and are obtained at reduced cost (5), they are also biodegradable (6). However, studies have shown a release of CNT into the environment. This occurs mainly following the combustion of nanocomposites waste or their degradation at the end-life. Also, there was a percentage of CNT release during nanocomposites production process (7, 8). So workers especially in the production, recycling and waste treatment facilities are exposed to these CNM, although information regarding their toxic potential is still restricted, which make the investigation in this area of high interest.

Among CNM, CB, GO and CNT are the most used. CB, the most widespread form, generated by the incomplete combustion of petroleum products, is applied as reinforcing material, added to rubber, to high pressure hoses and plastics and as coloring agent for printing inks, resin coloring and paints. CB particles have crystalline structure, providing an excellent electric conductivity, so it is used also as conductive filler when mixed to adhesives, pastes and film (9). GO, another form of CNM, produced through graphite treatment with strong oxidants following Brodie, Staudenmaier or Hummers methods (10) is known for its antimicrobial properties (11). It can be a semiconductor or insulator depending on his oxygen functionalities (12). Its controllable electronic and optical properties enable its use in wide range of applications: nanocomposite materials, polymer composite materials, energy storage, biomedical applications, and catalysis (13). Also CNT, cylinder fabricated of rolled up graphene sheet, by chemical vapor deposition technique, laser-ablation technique and carbon arc-discharge technique, are used in nanocomposites and biomedical applications due to their high aspect ratio, electrical and thermal conductivity, in addition to strength and elasticity (14).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Regarding their toxicity, CB, waste extract induced ROS generation and cell death in HepG2, MRC-5 and MDA-MB-231 human cell lines (15). Also Jong et al., find similar results with CB nanoparticles in other cell models: A-10, primary rat aortic smooth muscle cells and ECV304, human umbilical vein endothelial cell line (16). Although CB is not a direct genotoxicant or reproductive toxicant, it has been shown to induce inflammation and oxidative stress in lungs that may be the basis of a secondary genotoxic mechanism (17). It also induce inflammation in liver (18). For GO, Yuzen et al., found induction of a dose dependent cytotoxicity in RPMI 8226 cells and links this cytotoxicity to oxidative stress production (19). Other studies shown also significant loss of cell viability and cell proliferation, on TM3 and TM4 (20), HEK 293T (21) and hCorECs cells (22) and connect that to oxidative DNA damage induction. However, Ahlinder et al., reveal the opposite, no cytotoxicity after exposure to GO in A549 cells (23). For CNT, singlewalled and multiwalled ones, studies showed induction of inflammation, oxidative stress, DNA damage and fibrosis *in vitro* (24) and *in vivo* (25). Also they induced cell death by apoptosis (26) or by autophagy (27). However, other studies underlined their proliferative induction capacity as it was the case in et Jie et al. who worked on primary mouse lung fibroblasts cells (28) or demonstrated that CNT did not induce cytotoxicity as it was seen with U937 cells (29).

Toxicity mechanisms, cell death or proliferation depends on CNM shape, length, specific surface, agglomeration, functionalizing and their other physical and chemical properties. So we are interested by studying the responses of NR8383 cells to these four different types of CNM in order to link between certain key event of their toxicity mechanism induced and their characteristics. Indeed, most of nanoparticles are released mainly in air, the major route of exposure, then they are inhaled and trapped principally in the pulmonary alveolar region of rats, where they are principally in contact with macrophages, the first line of immune defense (30). So NR8383, macrophage alveolar cell line, was chosen as an interesting model for this comparison. The main goal of this study is in the comparison between different carbon states using this macrophage model.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Cell culture

NR8383 cells, alveolar macrophage cell line, were purchased from American Type Culture Collection (ATCC® CRL2192™; Manassas; USA). Cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose (DMEM; Sigma Aldrich, Saint-Louis, USA) supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin, 2% L-glutamine and 0.25 µg/mL of amphotericin B (FBS; Sigma Aldrich, Saint-Louis, USA) (31). Cells were grown at 37 °C under 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere and it was passed every 3 days.

### 2.2 Materials dispersion and characterization

Four different, commercially available and well characterized CNM: SWCNT/NRCWE-051, MWCNT/NRCWE-040, GO/NRCWE-058 obtained from National Research Centre for the Working Environment (NRCWE, Denmark) and CB/Printex-90 obtained from Joint Research Center (JRC, Belgium) were examined in this study. CNM were dispersed in DMEM high glucose medium supplemented with 2% FBS at 2 mg/ml. The parameters of sonication (probe diameter, time and amplitude) were optimized for each of these CNM (Table 1). After, we measure size and polydispersity index in medium by dynamic light scattering (DLS; Malvern Nano ZS, Malvern Inc., UK) which were performed in triplicate at 25 °C.

Transmission electron microscopy (TEM) was done for all CNM except GO, a drop of CNM suspension was deposited onto a carbon-coated copper grid. Sample were negatively stained by uranyl acetate (3%) in deionized water after drying. Preparations were observed using a CM12 Microscope (Philips, The Netherlands) operated at 80 kV. CNM diameters were determined on 114 round objects.

### 2.3 Evaluation of cell viability

#### 2.3.1 Cell treatment

1 NR8383 cells were seeded in 96-well plates with  $5 \times 10^3$  cells per well per 100  $\mu\text{l}$ . After overnight incubation,  
2 plates were centrifuged (800 $\times$ g, 10 min), and the medium with FBS was removed. Fresh medium without FBS,  
3  
4 with each of CNM (0 to 268  $\text{cm}^2/\text{cm}^2$ ; CNM surface/cell surface) were added and cells were incubated for 24 h.  
5  
6 CNM solutions concentrations correspond to masse concentrations of 6, 12.5, 25, 50, 100 and 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Six  
7  
8 wells were used per culture condition, and experiments were repeated four times (32).  
9  
10

### 11 12 13 14 15 16 **2.3.2 Viability assays**

17  
18 Cellular viability or activity was performed as already described (32, 33). Briefly, after 24 h, cell viability was  
19  
20 checked using Alamar blue and WST-1 assays, also the membrane integrity was studied using LDH test (Roche;  
21  
22 Boulogne; France). These tests were performed according to manufacturer's protocols. Absorbance was  
23  
24 measured at 450 and 490nm with reference wavelengths of 690 and 620 nm, respectively for WST-1 and LDH  
25  
26 assays using iMark™ Microplate Reader (BIO-RAD Laboratories, Osaka, Japan). For Alamar Blue test, the  
27  
28 fluorescence signal is measured at excitation/emission wavelengths of 570/600 nm using a spectrofluorimeter  
29  
30 FP-8300 Irm microplate reader (JASCO, Lisses, France).  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39

### 40 **2.4. mRNA Extraction**

41  
42 Cells were plated onto Petri dishes ( $5 \times 10^5$  cells), and then CNM exposure was performed for 4 h at different  
43  
44 concentrations ( $\text{IC}_{50/4}$  and  $\text{IC}_{50}$  corresponding to each CNM). The cells were collected into a 15mL tube and  
45  
46 centrifuged at 500 g for 5 min. After removal of the supernatant, 1 ml of TRIzol® reagent (OMEGA Bio-Tek,  
47  
48 Guang zhou, China) was added. After overnight incubation at  $-80^\circ\text{C}$ , 200 $\mu\text{l}$  of chloroform was added, vortexed  
49  
50 for 15 seconds and allowed to stand on ice for 10 minutes. The resulting mixture was centrifuged at 12000 g  
51  
52 for 15 minutes at room temperature (RT). The transparent upper phase was transferred, before adding 500  $\mu\text{l}$   
53  
54 of isopropanol. The mixed samples were allowed to stand for a further 12 minutes at room temperature. The  
55  
56 tubes were then centrifuged at 12000 g for 20 minutes at  $4^\circ\text{C}$ , the supernatant removed and the RNA pellet  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 washed in 1 ml of 80 % ethanol. The resulting samples were then vortexed briefly, centrifuged at 9000 g for 5  
2 minutes and the RNA pellet air-dried for 10 minutes. The RNA was then suspended in 30µl DEPC-treated water  
3 and stored at -80 C until required for quantification and RT-PCR.  
4  
5

6  
7 RNA purity was assessed using the BioSpec-nano Spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). Also, RNA  
8 degradation was checked by RNA 6000 Nano Reagents Kit using the Bioanalyzer™ 2100 (Agilent Technologies,  
9 Waldbron, Germany)(32, 33).  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17

## 18 **2.5 cDNA Synthesis and gene expression analysis by real-time PCR (qRT-PCR)**

19 The complementary DNA (cDNA) synthesis was carried out with 100 ng of total RNA using the iScript™ cDNA  
20 Synthesis Kit (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) following the manufacturer's protocol. The cDNA samples  
21 were stored at -20 C until required for RT-PCR. Gene expressions were determined by qRT-PCR with the iQ™  
22 SYBR Green® Supermix in a CFX Connect™ Real-Time system (BIO-RAD Laboratories, Singapore). Briefly, 4 µL of  
23 each cDNA sample was amplified in a PCR reaction (final volume of 20 µL) containing 10µL of PCR reagent and  
24 300 nM of each primers (Table 1). For all the samples, the following conditions were used: an initial heat-  
25 denaturing step at 95°C for 5min followed by 40 cycles of 60°C for 1min and 95 °C for 1s. Three independently  
26 samples for each gene were prepared for amplifications. Normalization was performed by comparison to the  
27 housekeeping gene RPL13. Fold changes (FC) of gene expression were calculated by 2-ΔΔCt method (Peirson  
28 et al. 2003)(32).  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48

## 49 **2.6 Statistical analysis**

50 For viability tests (N which represent the number of biological replicates is four; n which represent the number  
51 of technical replicates is 6), statistical differences were determined by one-way analysis of variance (ANOVA)  
52 followed by Dunnett's test, using the RLPlot software™. Regarding qRT-PCR (N=3; n=2), FC were calculated by  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

the ratio exposed/unexposed cells, and results were expressed as means  $\pm$  SE. Statistical differences between control and exposed cells were determined by ANOVA followed by Tukey-Kramer test.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## 3 Results

### 3.1 Nanoparticle characterization

The mean hydrodynamic diameter of our CNM and their polydispersity index as determined by DLS from three independent preparations were shown in table 2. TEM images show different CNM dispersed in medium (Figure 1).

### 3.2 Cell viability

According to WST-1 test, more than 50 % of viability cell reduction was observed after 24h of exposure to 5  $\text{cm}^2/\text{cm}^2$  of GO (Figure 2). While in the case of CNT exposure the viability of NR8383 cells decreased in a dose-dependent manner down to 50 % of the Control after exposure to 134  $\text{cm}^2/\text{cm}^2$  of SWCNT and 90  $\text{cm}^2/\text{cm}^2$  of MWCNT. For CB 40% of cell viability reduction was observed after cell exposure to the highest concentration 178  $\text{cm}^2/\text{cm}^2$ . Inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) for each CNM were calculated based on Reed–Muench method using WST-1 results and summarized in table 2.

In parallel, Alamar Blue test gave similar results in the case of CNT exposure. But, for CB, which is not showing toxicity with Wst-1 test, it gave cell viability reduction down to 50% of the control after exposure at 44.5  $\text{cm}^2/\text{cm}^2$  also for GO which is seems to be very toxic according to WST-1 test; it Did not show a high toxicity with Alamar Blue test.

With LDH test, an interaction with GO and SWCNT was observed (data not shown). We found a significant increase in LDH release after exposure to 44.5  $\text{cm}^2/\text{cm}^2$  of MWCNT and 89  $\text{cm}^2/\text{cm}^2$  of CB (Figure 3).

### 3.3 Gene expression analysis

1  
2  
3 For CB, a significant overexpression of genes related to inflammation, NFKB, IL1B and TNFA was observed  
4  
5 **(Table 3)**. Also NCF, a gene of oxidative burst, was overexpressed. A slight overexpression of apoptotic gene  
6  
7 Casp8 and pro-apoptotic gene PDCD4 were observed with decrease of BCL2 expression.  
8  
9

10  
11 Also, for GO, NCF gene was overexpressed (Table 3). We have also a significant increase of NFKB, TNFA and  
12  
13 autophagic gene ATG2. Il6 gene was exclusively overexpressed with GO. A slight overexpression of OPA gene  
14  
15 related to mitochondrial function was observed.  
16  
17

18  
19 Similar as GO, MWCNT induce an overexpression of TNFA and ATG2 genes but in contrary it decreases IL6  
20  
21 expression (Table 3). SWCNT induce under expression of all genes except TNFA which is highly overexpressed  
22  
23 and NFKB (Table 3).  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



#### 4 Discussion

NR8383 macrophages respond differently when they are exposed to each of CNM studied either in term of viability or gene expression. This cell response variation is due to different physicochemical properties: form (tube/spherical), structure (amorphous/crystalline), specific surface and oxidation state.

Concerning the cytotoxicity of studied nanomaterials. GO is the most toxic between them according to WST-1 results (Table 1), the less toxic being SWCNT (Table.1). This result is consistent with Xiaoyong et al. ones (34) showing that GO was more toxic than CNT. This may be linked to the high density of GO oxygen group that undergoes an oxidative stress as it was concluded by Soumen et al. (35). This is probably cell modle dépendent, while Chen et al, found that GO has moderate toxicity while MWCNT exhibit a strong inhibition of cell proliferation in human bone marrow neuroblastoma cell line and human epithelial carcinoma cell line (36). However, CB has a low toxicity on NR8383 cells, this is a similar result to the one obtained by Hui Yang et al. (37) in their study on primary mouse embryo fibroblast. Our finding confirm that nanoparticles with spherical shape are less cytotoxic then none spherical shape which can be related to the limited percentage of facets that decrease nanoparticles reactivity (38).

Otherwise, differences between WST-1 and Alamar Blue results (Figure 2) can be explain by optical interferences between CNM and fluorescence signal. CNM prevent transmitted/emitted light from reaching the detector and thus decrease the signal (39). However, for GO we have opposite results, and an underestimation of its toxicity could result from an adsorption of dyes into their surface (40). According to LDH test, only MWCNT and CB induce membrane damage (Figure 3). MWCNT were shorter than SWCNT and GO, which could explain their ability to induce more membrane damage. Jie Meng (41) working on blood cells exposed to CNT of different size also found this.

We studied a panel of genes related to critical events leading to toxicity. Regarding gene expression, between all CNM studied, CB and GO were the only ones that provoked an overexpression of *Ncf* gene related to oxidative burst (Table 3). This result was consistent with other studies showing an increase of intracellular ROS production after THP-1 cells exposure to CB (42) and BEAS-2B, A549 lung cells exposure to GO (43). For GO,

1 studies argue the increase of mitochondrial ROS generation and mitochondrial respiration to the fixation of GO  
2 at cell membrane or to the direct access to the mitochondria where it acts like a quinone and participates  
3 directly in redox reactions (44, 45). This explanation was supported by the observed increase of *Opa1* gene  
4 (FC= 2.5) related to mitochondrial dysfunctions and WST-1 results. So, GO lead to cytotoxicity by producing an  
5 oxidative burst and mitochondrial impairment. For CB, oxidative stress can be associated with two factors:  
6 specific surface and their uptake by cells (46). It has high specific surface and is suitable for cell uptake unlike  
7 SWCNT with important length. *Ncf* gene was underexpressed with CNT but in our previous study (47), it was  
8 overexpressed when NR8383 cells were exposed to SWCNT (NRCWE-055) and MWCNT (NM403).  
9 Nevertheless, these latter had different characteristics then those of CNT used in this study. Therefore,  
10 oxidative stress generated by CNM is shape independent.

11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24 However, in response to oxidative stress produced after exposure to GO, NR8383 cells respond by an  
25 overexpression of *Il-6* (FC=3.49) in order to minimize this stress. Our results also showed an increase of *Atg2*  
26 gene (FC=3.59), suggesting an *Il-6* linked autophagy to antioxidant response (48). Also, *Atg2* overexpression  
27 can be due to *Tnfa* overexpression (FC=197,07) (49). This latter promote inflammation. Increase of *Tnfa* was  
28 also seen in other study, *in vitro* with NR8383 cells and *in vivo* (50) after exposure to GO. Likewise, for  
29 MWCNT, we found also this correlation between *Atg2* and *Tnfa*. However, with SWCNT, the increase of *Tnfa*  
30 was accompanied with an increase of *Nfkb* gene (FC=3.49) not *Atg2* gene. Given the length of SWCNT, this  
31 result was expected, as if it was the case with long fiber inducing inflammatory response via overexpression of  
32 *Tnfa* and *NF-KB* (51). This inflammation is a result of frustrated phagocytose due to the length of SWCNT  
33 studied (5-30  $\mu\text{m}$ ) and lead to cytotoxicity length dependent (52). Finally, *Il1b* was only upregulated after  
34 exposure to CB. According to Fernando et al. study, carbon spheres induce *Il1b* secretion inflammasome  
35 dependent without presence of any sign of toxicity(53).  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## 5 Conclusion:

1  
2  
3 Our results confirm that each of physico- chemical parameter influence a particular key event in the cell  
4 leading to a specific response. For CB, shape controls Il-1B secretion. For GO, oxygen groups lead to oxidative  
5 stress production and mitochondrial dysfunctions and thus undergoes cytotoxicity. For CNT, important length  
6 could lead to frustrated phagocytosis. In addition, our result confirm that IL-6 link autophagy to anti-oxidant  
7 response.  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18

## 6 Acknowledgements:

19 The authors would like to acknowledge Jaafar Ghanbaja for transmission electron microscopy images  
20 and Smartnanotox partners for nanomaterial characterization. This work has received funding from  
21 the European Union's Horizon 2020 research (SmartNanotox project, grant agreement: 686098 ) and  
22 innovation program.  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## 7 References

1. Chaudhry Q, Scotter M, Blackburn J, Ross B, Boxall A, Castle L, et al. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. *Food Addit Contam Part A*. 2008 Mar;25(3):241–58.
2. Honarvar Z, Hadian Z, Mashayekh M. Nanocomposites in food packaging applications and their risk assessment for health. *Electron Physician*. 2016 Jun 25;8(6):2531–8.
3. Sekhon BS. Food nanotechnology – an overview. *Nanotechnol Sci Appl*. 2010 May 4;3:1–15.
4. Kuswandi B. Environmental friendly food nano-packaging. *Environ Chem Lett*. 2017 Jun;15(2):205–21.
5. Agriopoulou S. Nanotechnology in Food Packaging. 2016 Oct 14;
6. Pathakoti K, Manubolu M, Hwang H-M. Nanostructures: Current uses and future applications in food science. *J Food Drug Anal*. 2017 Apr;25(2):245–53.
7. Velichkova H, Kotsilkov S, Ivanov E, Kotsilkova R, Gyoshev S, Stoimenov N, et al. Release of carbon nanoparticles of different size and shape from nanocomposite poly(lactic) acid film into food simulants. *Food Addit Contam Part Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2017 Jun;34(6):1072–85.
8. Kotsilkov S, Ivanov E, Vitanov NK. Release of Graphene and Carbon Nanotubes from Biodegradable Poly(Lactic Acid) Films during Degradation and Combustion: Risk Associated with the End-of-Life of Nanocomposite Food Packaging Materials. *Mater Basel Switz*. 2018 Nov 22;11(12).
9. Perrott GSJ, Thiessen R. Carbon Black—Its Properties and Uses. *J Ind Eng Chem*. 1920 Apr;12(4):324–31.
10. Zhu Y, Murali S, Cai W, Li X, Suk JW, Potts JR, et al. Graphene and Graphene Oxide: Synthesis, Properties, and Applications. *Adv Mater*. 2010 Sep 15;22(35):3906–24.
11. He Z-Y, Wei X-W, Wei Y-Q. Recent Advances of Nanostructures in Antimicrobial Therapy. In: *Antimicrobial Nanoarchitectonics* [Internet]. Elsevier; 2017 [cited 2019 Feb 15]. p. 167–94. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323527330000070>
12. Inagaki M, Kang F. Engineering and Applications of Carbon Materials. In: *Materials Science and Engineering of Carbon: Fundamentals* [Internet]. Elsevier; 2014 [cited 2019 Feb 15]. p. 219–525. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128008584000036>
13. Ray SC. Application and Uses of Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide. In: *Applications of Graphene and Graphene-Oxide Based Nanomaterials* [Internet]. Elsevier; 2015 [cited 2019 Feb 15]. p. 39–55. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323375214000029>
14. Eatemadi A, Daraee H, Karimkhanloo H, Kouhi M, Zarghami N, Akbarzadeh A, et al. Carbon nanotubes: properties, synthesis, purification, and medical applications. *Nanoscale Res Lett*. 2014;9(1):393.

15. Zhen X, Ng WC, Fendy, Tong YW, Dai Y, Neoh KG, et al. Toxicity assessment of carbon black waste: A by-product from oil refineries. *J Hazard Mater.* 2017 Jan;321:600–10.
16. Lee J-G, Noh W-J, Kim H, Lee M-Y. Generation of Reactive Oxygen Species Contributes to the Development of Carbon Black Cytotoxicity to Vascular Cells. *Toxicol Res.* 2011 Sep 1;27(3):161–6.
17. Chaudhuri I, Fruijtier-Pöllöth C, Ngiewih Y, Levy L. Evaluating the evidence on genotoxicity and reproductive toxicity of carbon black: a critical review. *Crit Rev Toxicol.* 2018 Feb 7;48(2):143–69.
18. Zhang R, Zhang X, Gao S, Liu R. Assessing the in vitro and in vivo toxicity of ultrafine carbon black to mouse liver. *Sci Total Environ.* 2019 Mar;655:1334–41.
19. Yuzhen W, Shaoling W, Xindong Z, Zhan S, Li D, Aihua S. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on human RPMI 8226 cells. *Biomed Mater Eng.* 2014;(6):2007–2013.
20. Gurunathan S, Kang M-H, Jeyaraj M, Kim J-H. Differential Cytotoxicity of Different Sizes of Graphene Oxide Nanoparticles in Leydig (TM3) and Sertoli (TM4) Cells. *Nanomaterials.* 2019 Jan 22;9(2):139.
21. Jia P-P, Sun T, Junaid M, Yang L, Ma Y-B, Cui Z-S, et al. Nanotoxicity of different sizes of graphene (G) and graphene oxide (GO) in vitro and in vivo. *Environ Pollut.* 2019 Apr;247:595–606.
22. Wu W, Yan L, Wu Q, Li Y, Li Q, Chen S, et al. Evaluation of the toxicity of graphene oxide exposure to the eye. *Nanotoxicology.* 2016 Oct 20;10(9):1329–40.
23. Ahlinder L, Henych J, Lindström SW, Ekstrand-Hammarström B, Stengl V, Österlund L. Graphene oxide nanoparticle attachment and its toxicity on living lung epithelial cells. *RSC Adv.* 2015;5(73):59447–57.
24. Liu Y, Zhao Y, Sun B, Chen C. Understanding the Toxicity of Carbon Nanotubes. *Acc Chem Res.* 2013 Mar 19;46(3):702–13.
25. Kobayashi N, Izumi H, Morimoto Y. Review of toxicity studies of carbon nanotubes. *J Occup Health.* 2017;59(5):394–407.
26. Naserzadeh P, Ansari Esfeh F, Kaviani M, Ashtari K, Kheirbakhsh R, Salimi A, et al. Single-walled carbon nanotube, multi-walled carbon nanotube and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles induced mitochondria mediated apoptosis in melanoma cells. *Cutan Ocul Toxicol.* 2018 Apr 3;37(2):157–66.
27. Tsukahara T, Matsuda Y, Haniu H. The Role of Autophagy as a Mechanism of Toxicity Induced by Multi-Walled Carbon Nanotubes in Human Lung Cells. *Int J Mol Sci.* 2014 Dec 23;16(1):40–8.
28. Dong J, Ma Q. TIMP1 promotes multi-walled carbon nanotube-induced lung fibrosis by stimulating fibroblast activation and proliferation. *Nanotoxicology.* 2017 Jan 2;11(1):41–51.
29. De Nicola M, Mirabile Gattia D, Bellucci S, De Bellis G, Micciulla F, Pastore R, et al. Effect of different carbon nanotubes on cell viability and proliferation. *J Phys Condens Matter.* 2007 Oct 3;19(39):395013.
30. Oberdörster G, Castranova V, Asgharian B, Sayre P. Inhalation Exposure to Carbon Nanotubes (CNT) and Carbon Nanofibers (CNF): Methodology and Dosimetry. *J Toxicol Environ Health Part B.* 2015 May 19;18(3–4):121–212.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
31. Ronzani C. Biodistribution et toxicité respiratoires des nanotubes de carbone chez la souris normale et dans un modèle murin d'asthme allergique [Thèse de doctorat]. [2009-....., France]: Université de Strasbourg; 2012.
32. Eidi H, Joubert O, Némès C, Grandemange S, Mograbi B, Foliguet B, et al. Drug delivery by polymeric nanoparticles induces autophagy in macrophages. *Int J Pharm*. 2012 Jan;422(1–2):495–503.
33. Ronzani C, Safar R, Diab R, Chevrier J, Paoli J, Abdel-Wahhab MA, et al. Viability and gene expression responses to polymeric nanoparticles in human and rat cells. *Cell Biol Toxicol*. 2014 Jun 1;30(3):137–46.
34. Zhang X, Hu W, Li J, Tao L, Wei Y. A comparative study of cellular uptake and cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes, graphene oxide, and nanodiamond. *Toxicol Res*. 2012;1(1):62.
35. Das S, Singh S, Singh V, Joung D, Dowding JM, Reid D, et al. Oxygenated Functional Group Density on Graphene Oxide: Its Effect on Cell Toxicity. Part Part Syst Charact. 2013 Feb;30(2):148–57.
36. Chen L, Hu P, Zhang L, Huang S, Luo L, Huang C. Toxicity of graphene oxide and multi-walled carbon nanotubes against human cells and zebrafish. *Sci China Chem*. 2012 Oct;55(10):2209–16.
37. Yang H, Liu C, Yang D, Zhang H, Xi Z. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *J Appl Toxicol*. 2009 Jan;29(1):69–78.
38. Pal S, Tak YK, Song JM. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Mar 15;73(6):1712–20.
39. Breznan D, Das D, MacKinnon-Roy C, Simard B, Kumarathasan P, Vincent R. Non-specific interaction of carbon nanotubes with the resazurin assay reagent: Impact on in vitro assessment of nanoparticle cytotoxicity. *Toxicol In Vitro*. 2015 Feb;29(1):142–7.
40. Doak SH, Griffiths SM, Manshian B, Singh N, Williams PM, Brown AP, et al. Confounding experimental considerations in nanogenotoxicology. *Mutagenesis*. 2009 Jul 1;24(4):285–93.
41. Meng J, Cheng X, Liu J, Zhang W, Li X, Kong H, et al. Effects of Long and Short Carboxylated or Aminated Multiwalled Carbon Nanotubes on Blood Coagulation. Lam W, editor. *PLoS ONE*. 2012 Jul 10;7(7):e38995.
42. Cao Y, Roursgaard M, Danielsen PH, Møller P, Loft S. Carbon Black Nanoparticles Promote Endothelial Activation and Lipid Accumulation in Macrophages Independently of Intracellular ROS Production. Maya-Monteiro CM, editor. *PLoS ONE*. 2014 Sep 3;9(9):e106711.
43. Mittal S, Kumar V, Dhiman N, Chauhan LKS, Pasricha R, Pandey AK. Physico-chemical properties based differential toxicity of graphene oxide/reduced graphene oxide in human lung cells mediated through oxidative stress. *Sci Rep*. 2016 Dec;6(1):39548.
44. Duch MC, Budinger GRS, Liang YT, Soberanes S, Urich D, Chiarella SE, et al. Minimizing Oxidation and Stable Nanoscale Dispersion Improves the Biocompatibility of Graphene in the Lung. *Nano Lett*. 2011 Dec 14;11(12):5201–7.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
45. Loor G, Kondapalli J, Schriewer JM, Chandel NS, Vanden Hoek TL, Schumacker PT. Menadione triggers cell death through ROS-dependent mechanisms involving PARP activation without requiring apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2010 Dec;49(12):1925–36.
  46. Hussain S, Boland S, Baeza-Squiban A, Hamel R, Thomassen LCJ, Martens JA, et al. Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: Role of particle surface area and internalized amount. *Toxicology*. 2009 Jun;260(1–3):142–9.
  47. Nahle S, Safar R, Grandemange S, Foliguet B, Lovera-Leroux M, Doumandji Z, et al. Single wall and multiwall carbon nanotubes induce different toxicological responses in rat alveolar macrophages. *J Appl Toxicol*. 2019 May;39(5):764–72.
  48. Marasco MR, Conteh AM, Reissaus CA, Cupit JE, Appleman EM, Mirmira RG, et al. Interleukin-6 Reduces  $\beta$ -Cell Oxidative Stress by Linking Autophagy With the Antioxidant Response. *Diabetes*. 2018 Aug;67(8):1576–88.
  49. Yuan Y, Ding D, Zhang N, Xia Z, Wang J, Yang H, et al. TNF- $\alpha$  induces autophagy through ERK1/2 pathway to regulate apoptosis in neonatal necrotizing enterocolitis model cells IEC-6. *Cell Cycle*. 2018 Jun 3;17(11):1390–402.
  50. Ma J, Liu R, Wang X, Liu Q, Chen Y, Valle RP, et al. Crucial Role of Lateral Size for Graphene Oxide in Activating Macrophages and Stimulating Pro-inflammatory Responses in Cells and Animals. *ACS Nano*. 2015 Oct 27;9(10):10498–515.
  51. Ye J, Shi X, Jones W, Rojanasakul Y, Cheng N, Schwegler-Berry D, et al. Critical role of glass fiber length in TNF- $\alpha$  production and transcription factor activation in macrophages. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. 1999 Mar;276(3):L426–34.
  52. Boyles MSP, Young L, Brown DM, MacCalman L, Cowie H, Moisala A, et al. Multi-walled carbon nanotube induced frustrated phagocytosis, cytotoxicity and pro-inflammatory conditions in macrophages are length dependent and greater than that of asbestos. *Toxicol In Vitro*. 2015 Oct;29(7):1513–28.
  53. Andón FT, Mukherjee SP, Gessner I, Wortmann L, Xiao L, Hultenby K, et al. Hollow carbon spheres trigger inflammasome-dependent IL-1 $\beta$  secretion in macrophages. *Carbon*. 2017 Mar;113:243–51.

**Table 1:** Physical and chemical characteristics given by the provider (length, diameter and specific surface), dispersion conditions, DLS measurements and inhibitory concentration  $IC_{50}$  calculated according to WST-1 test by Reed and Muench formula for CNM studied (Printex-90, NRCWE-040, NRCWE-051 and NRCWE-058).

NM	Length	Diameter (nm)	Specific surface ( $m^2/g$ )	Dispersion conditions			DLS measurement		Viability
				Probe (mm)	Sonication time (min)	Amplitude	Z-average	Pdi	$IC_{50}$ WST-1 ( $cm^2/cm^2$ )
<b>PRINTEX-90 CB</b>	-	14	295	11	6	10	$164.6 \pm 61.3$	0.191	low toxicity
<b>NRCWE-040 MWCNT</b>	520 nm	20	150	11	15	10	$217.2 \pm 55.2$	0.383	104
<b>NRCWE-051 SWCNT</b>	5-30 $\mu m$	1-2	443	5	20	10	$1959 \pm 56.9$	0.5	120
<b>NRCWE-058 GO</b>	2-3 $\mu m$		275	5	6	30	$401 \pm 23.5$	0.5	10

Low toxicity mean that CNM have an  $IC_{50}$  greater than the highest concentration used in the test.

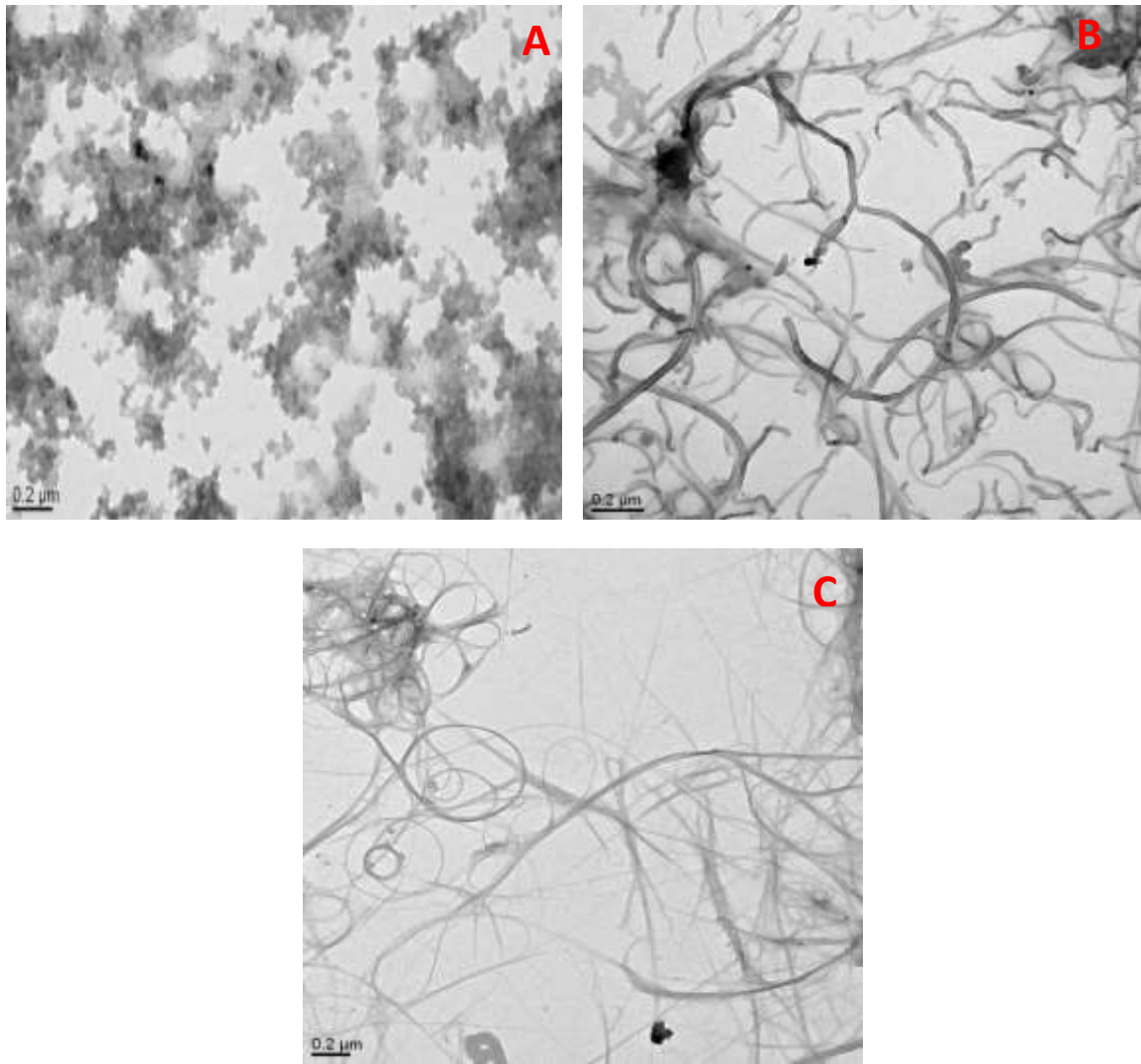


**Table 2:** Primer sequences for all genes assessed. RPL13 was used as an internal control to normalized each result.

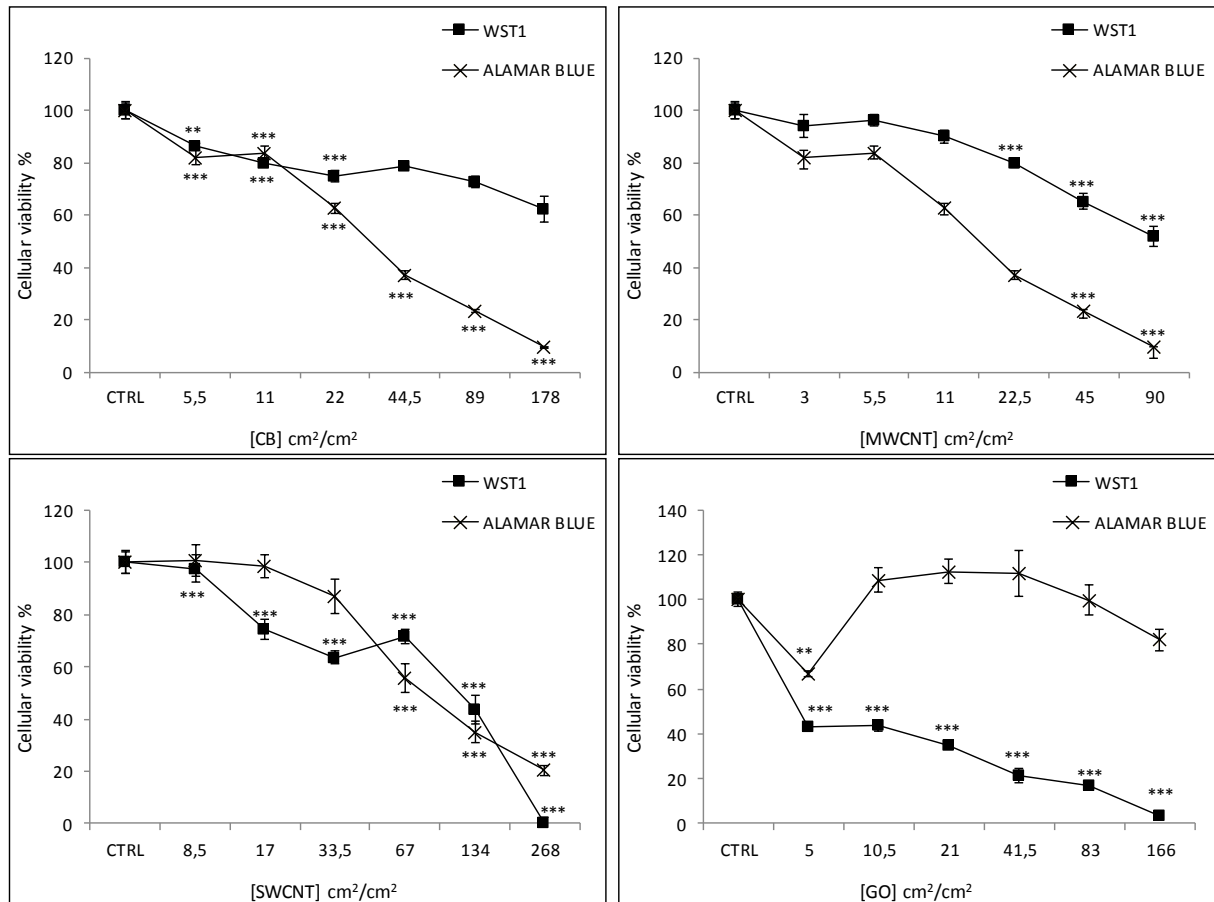
Gene	Sequence
<i>RPL13</i> (internal control)	F: 5'-CCCTCCACCCTATGACAAGA-3' R: 5'-GGTACTTCCACCCGACCTC-3'
<i>Ncf1</i>	F: 5'-CTTGTAATTCCCGCATTGCT-3' R: 5'-GCCTCGTATGTCTTTGATGC-3'
<i>Nfkb</i>	R: 5'-GCCTCGTATGTCTTTGATGC-3' F: 5'-TTCGGAAGTGGGCAAATGTT-3'
<i>Tnfa</i>	F: 5'-TAGCCCATGTTGTAGCAAACC-3' R: 5'-GATGGCAGAGAGGAGGTTGA-3'
<i>Il1B</i>	F: 5'-AGCAGCTTTCGACAGTGAGG-3' R: 5'-AAAGAAGGTGCTTGGGTCCT-3'
<i>Il6</i>	F: 5'-TAGTCCTTCCACCCAACTTCC-3' R: 5'-GGTTTGCCGAGTAGACCTCA-3'
<i>Atg1</i>	F: 5'-CTTGTAATTCCCGCATTGCT-3' R: 5'-GCCTCGTATGTCTTTGATGC-3'
<i>Atg2</i>	F: 5'-CTTGTAATTCCCGCATTGCT-3' R: 5'-GCCTCGTATGTCTTTGATGC-3'
<i>Pdcd4</i>	F: 5'-CTTGTAATTCCCGCATTGCT-3' R: 5'-GCCTCGTATGTCTTTGATGC-3'
<i>Bcl2</i>	F: 5'-CTTGTAATTCCCGCATTGCT-3' R: 5'-GCCTCGTATGTCTTTGATGC-3'
<i>Casp8</i>	F: 5'-GGTGTGCCCGTGTGGCAGT-3' R: 5'-GGCCACCAATCGTGGTGCT-3'
<i>Sdha</i>	F: 5'-GAGGATTGTGGCCTTCTTTG-3' R: 5'-GCATCCCAGCCTCCGTTAT-3'
<i>Opa1</i>	F: 5'-TCCTGTGCATTCAAGATGGA-3' R: 5'-GAGCTTTCATTGGGAAGAGC-3'

**Table 3:** Variation of gene expression after exposure of NR8383 rat cells to each CNM. PCR were performed as described in material and methods. IC<sub>50/4</sub> and IC<sub>50</sub> are expressed as cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>, and came from Table 2 except for CB where IC<sub>50/4</sub> = 44.5 and IC<sub>50</sub> = 178 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>. Results were presented as fold change as compared to control ± SE using ANOVA followed by Tukey-Kramer method ; a: gene overexpressed P value <0.001, b: gene overexpressed P value <0.01, d: gene underexpressed P value <0.001, e: gene underexpressed P value <0.01.

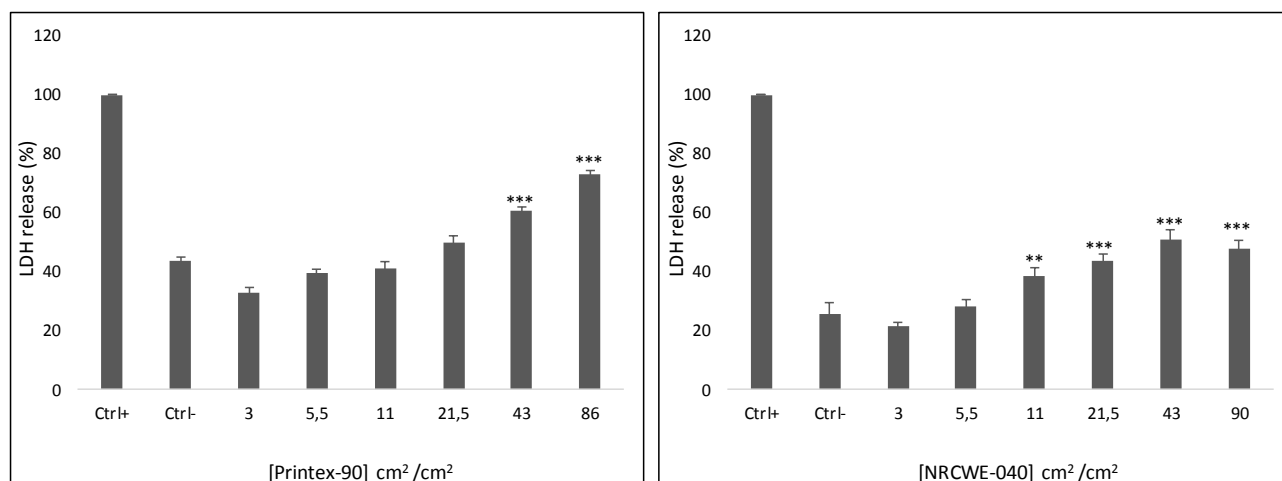
Key events	Genes	CB		MWCNT		SWCNT		GO	
		IC <sub>50/4</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>50/4</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>50/4</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>50/4</sub>	IC <sub>50</sub>
Inflammation	Tnfa	1,45 ± 0.27	1,84 ± 0.34	1,62 ± 0.4	7,43 ± 0.17 <sup>a</sup>	10,48 ± 0.23 <sup>a</sup>	20,40 ± 0.92 <sup>a</sup>	19,34 ± 1.14 <sup>a</sup>	197,07 ± 4.26 <sup>a</sup>
	Nfkb	4,29 ± 0.58 <sup>a</sup>	1,64 ± 0.33 <sup>a</sup>	0,5 ± 0.71	1,2 ± 0.18	1,15 ± 0.12	2,6 ± 0.33 <sup>a</sup>	1,05 ± 0.2	1,94 ± 0.14 <sup>a</sup>
	Il6	0,01 ± 0.03 <sup>d</sup>	0,08 ± 0.1 <sup>d</sup>	0,05 ± 0.05 <sup>d</sup>	0,12 ± 0.05 <sup>d</sup>	0,45 ± 0.07 <sup>e</sup>	0,85 ± 0.19	1,10 ± 0.31	3,49 ± 0.55 <sup>a</sup>
	Il1b	2,90 ± 0.21 <sup>a</sup>	6,30 ± 0.61 <sup>a</sup>	2,80 ± 0.48 <sup>a</sup>	1,03 ± 0.2	0,78 ± 0.1 <sup>e</sup>	0,38 ± 0.11	1,14 ± 0.01	1,92 ± 0.29 <sup>a</sup>
Oxidative burst	Ncf1	5,11 ± 0.58 <sup>a</sup>	3,85 ± 0.31 <sup>a</sup>	0,74 ± 0.32	0,53 ± 0.14	0,35 ± 0.24 <sup>d</sup>	0,40 ± 0.04 <sup>d</sup>	1,13 ± 0.12	2,14 ± 0.33 <sup>a</sup>
Mitochondrial dysfunctions	Sdh a	1,45 ± 0.11 <sup>b</sup>	1,19 ± 0.16	2,30 ± 0.47 <sup>a</sup>	0,89 ± 0.28	0,68 ± 0.12	0,10 ± 0.21	0,004 ± 0.02	0,01 ± 0.02 <sup>a</sup>
	Opa 1	1,33 ± 0.18	1,08 ± 0.08	1,56 ± 0.46	1,08 ± 0.16	0,97 ± 0.1	0,78 ± 0.04	1,43 ± 0.23	2,52 ± 0.15 <sup>a</sup>
Cell death	Casp8	1,12 ± 0.14	1,42 ± 0.15	1,11 ± 0.2 <sup>b</sup>	0,75 ± 0.15	0,23 ± 0.1	0,25 ± 0.04	0,96 ± 0.14	2,08 ± 0.41 <sup>a</sup>
	Bcl2	0,35 ± 0.1 <sup>d</sup>	0,28 ± 0.1 <sup>d</sup>	0,28 ± 0.13 <sup>e</sup>	0,64 ± 0.16	0,11 ± 0.07	0,08 ± 0.09	0,59 ± 0.16	1,99 ± 0.17
	Pdc d4	1,01 ± 0.19	1,39 ± 0.08	1,29 ± 0.37	1,52 ± 0.32	0,43 ± 0.11 <sup>d</sup>	0,34 ± 0.07 <sup>d</sup>	1,37 ± 0.2	0,85 ± 0.23
	Atg 1	1,28 ± 0.12 <sup>b</sup>	1,29 ± 0.08 <sup>b</sup>	0,73 ± 0.03 <sup>e</sup>	0,54 ± 0.11 <sup>d</sup>	0,47 ± 0.17	1,26 ± 0.22	0,58 ± 0.1	1,54 ± 0.2
	Atg 2	0,47 ± 0.05 <sup>e</sup>	0,30 ± 0.13 <sup>d</sup>	10,80 ± 0.15 <sup>a</sup>	4,56 ± 0.36 <sup>a</sup>	0,51 ± 0.17	0,62 ± 0.24	2,19 ± 0.48 <sup>a</sup>	3,59 ± 0.63 <sup>a</sup>



**Figure 1:** Transmission electron microscopy for CB (A), MWCNT (B) and SWCNT (C).



**Figure 2:** Cytotoxicity of CNM on NR8383 cells. The toxicity was evaluated with WST-1 and Alamar Blue tests as described in material and methods. Data represents the means  $\pm$  SD of three independent experiments. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 vs non-treated cells, ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test.



**Figure 3:** LDH release measurement after exposure to CNM on NR8383 cells according to material and methods. For SWCNT and MWCNT, an interaction with LDH reagent was revealed and did not allow correct data (data not shown). Printex-90 means CB, NRCWE means GO. Data represents the means  $\pm$  SD of three independent experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs non-treated cells. ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test.

**Declaration of interests**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

## 2 Etude comparative entre un SWCNT et MWCNT : effet taille

### 2.1 Introduction

Dans la deuxième étude, nous avons comparé deux NTC de tailles différentes. Le facteur variable est donc la taille, mais ici celle-ci concerne non seulement la longueur mais aussi le diamètre. Nous avons retenu un MWCNT avec un diamètre de 12 nm et une longueur d'environ 400 nm (NM403) et un SWCNT avec un diamètre de 1 à 2 nm et une longueur de 1-3  $\mu\text{m}$  (NRCWE-055). Il s'agit donc d'une comparaison entre un nanotube épais et court et un nanotube fin et long. Le modèle cellulaire retenu est les macrophages alvéolaires du rat, cellules NR8383. L'objectif est de déterminer l'effet de la taille sur la cytotoxicité, et l'induction de l'inflammation ou du stress oxydant. Cette étude nous permet d'envisager quelques relations entre les caractéristiques physiques et chimiques de nos NM et leurs mécanismes de toxicité. Dans ce cas précis, nous avons retenu deux temps d'exposition (4 et 24 h) pour les études de cytotoxicité. Après les études de cytotoxicité, nous nous sommes intéressés à l'identification du type de mort cellulaire par cytométrie en flux en utilisant un marquage Annexin V/Iodure de propidium. Cette approche nous permet de déterminer s'il s'agit d'une apoptose ou d'une nécrose. Les expositions aux NM étaient faites pour 4 et 24 h à des doses choisies à partir des résultats des tests de cytotoxicité. Ensuite, nous avons étudié l'expression de certains gènes par PCR après exposition des cellules pour 4 h à des doses égales aux  $IC_{50/4}$  et  $IC_{50}$  de chaque NM calculés en nous basant sur les résultats du test WST-1. Le même panel de gènes utilisé dans l'étude précédente a été utilisé dans cette étude : *Casp 8*, *Pdcd4*, *Bcl2*, *Atg1* et *Atg2* impliqués dans la mort cellulaire, *Il-6*, *Il-1 $\beta$* , *Tnfa* et *Nfkb*, impliqués dans l'inflammation, *Ncf* impliqué dans le stress oxydant, et enfin *Opa* et *Sdha* impliqués dans le stress mitochondrial. Un test Caspase 3 a été fait également pour savoir si l'exposition aux NTC pour 24h à  $IC_{50/4}$  et  $IC_{50}$  induit une augmentation de la synthèse de cette protéine impliquée dans l'apoptose.

### 2.2 Résumé des principaux résultats

Dans cette étude, nous avons montré que le MWCNT plus épais et plus court induit plus de cytotoxicité que le SWCNT plus long et plus mince, pour les cellules NR8383 ( $IC_{50(NM403)} = 4.1 \text{ cm}^2/\text{cm}^2 < IC_{50(NRCWE-055)} = 44 \text{ cm}^2/\text{cm}^2$ ). Nous avons également observé que le type de mort cellulaire diffère entre les deux, nous avons retrouvé une induction de nécrose dans le cas du MWCNT et une induction d'apoptose dans le cas du SWCNT. Cette apoptose a été mise en évidence par la surexpression du gène *Casp 8*, la sous expression du gène anti-apoptotic *Bcl2* et par le marquage Annexin V qui était positif. Selon nos résultats, le MWCNT (NM403) induit une augmentation d'expression des gènes liés à l'inflammation (*Tnfa*, *Nfkb* et *Il-1 $\beta$* ), ce qui produit une

augmentation d'expression du gène lié au stress oxydant (*Ncf*). Par conséquent, l'inflammation et le stress oxydant conduisent la cellule à la mort par nécrose. Concernant le SWCNT(NRCWE-055), celui-ci induit une augmentation de l'expression du gène lié au stress mitochondriale (*Opa*) au contraire du MWCNT. Ce stress mitochondrial aboutit à un stress oxydant démontré par la surexpression du gène *Ncf* conduisant à une activation de *Nfkβ*. Ce dernier stimule l'apoptose des cellules exposés au SWCNT. Ensuite les cellules apoptotiques vont stimuler un mécanisme anti-inflammatoire ce qui explique la sous-expression des gènes liés à l'inflammation (*Tnfa*, *Il-6* et *Il-1β*)

### 2.3 Conclusion

Cette étude est cohérente avec les résultats de la littérature puisque que les NMC testés induisent un stress oxydant. Nous avons observé que les deux NTC induisent une mort cellulaire quelle que soit leur taille mais chacun agit selon un mécanisme de toxicité différent. Les nanotubes les plus épais ont des potentiels inflammatoires et oxydatifs plus importants. La limite de ce travail est que cette étude compare deux nanotubes un mono feuillet et un multi feuillet qui n'ont pas seulement des diamètres différents mais aussi des longueurs différentes et ne prend en compte que quelques gènes. Donc afin de mieux connaître l'effet du diamètre, une autre étude (quatrième) comparant deux nanotubes de longueurs similaires mais de diamètres différents et comportant plus d'éléments d'analyse a été faite afin d'affiner les conclusions de cette approche.

**Cette étude a fait l'objet de la publication suivante qui a été acceptée dans Journal of Applied Toxicology.**

### 2.4 Article II



## Single wall and multiwall carbon nanotubes induce different toxicological responses in rat alveolar macrophages

Sara Nahle, Ramia Safar, Stéphanie Grandemange, Bernard Foliguet, Mélanie Lovera-Leroux, Zahra Doumandji, Alain Le Faou, Olivier Joubert, Bertrand Rihn, Luc Ferrari

► **To cite this version:**

Sara Nahle, Ramia Safar, Stéphanie Grandemange, Bernard Foliguet, Mélanie Lovera-Leroux, et al.. Single wall and multiwall carbon nanotubes induce different toxicological responses in rat alveolar macrophages. *Journal of Applied Toxicology*, Wiley, 2019, 39 (5), pp.764-772. 10.1002/jat.3765 . hal-01986763

**HAL Id: hal-01986763**

**<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01986763>**


Submitted on 30 Jan 2019

**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.

## RESEARCH ARTICLE

# Single wall and multiwall carbon nanotubes induce different toxicological responses in rat alveolar macrophages

Sara Nahle  | Ramia Safar | Stéphanie Grandemange | Bernard Foliguet |  
Mélanie Lovera-Leroux | Zahra Doumandji | Alain Le Faou | Olivier Joubert |  
Bertrand Rihn | Luc Ferrari

Toxicology and Molecular Biology, Institute Jean Lamour UMR 7198 du CNRS, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France

**Correspondence**

Sara Nahle, Toxicology and Molecular Biology, Institute Jean Lamour UMR 7198 du CNRS, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France.

Email: sara.nahle@univ-lorraine.fr

**Abstract**

Human exposure to airborne carbon nanotubes (CNT) is increasing because of their applications in different sectors; therefore, they constitute a biological hazard. Consequently, developing studies on CNT toxicity become a necessity. CNTs can have different properties in term of length, size and charge. Here, we compared the cellular effect of multiwall (MWCNTs) and single wall CNTs (SWCNTs). MWCNTs consist of multiple layers of graphene, while SWCNTs are monolayers. The effects of MWCNTs and SWCNTs were evaluated by the water-soluble tetrazolium salt cell proliferation assay on NR8383 cells, rat alveolar macrophage cell line (NR8383). After 24 hours of exposure, MWCNTs showed higher toxicity (50% inhibitory concentration [IC<sub>50</sub>] = 3.2 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>) than SWCNTs (IC<sub>50</sub> = 44 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>). Only SWCNTs have induced NR8383 cells apoptosis as assayed by flow cytometry using the annexin V/IP staining test. The expression of genes involved in oxidative burst (*Ncf1*), inflammation (*Nfkb*, *Tnf-α*, *Il-6* and *Il-1β*), mitochondrial damage (*Opa*) and apoptotic balance (*Pdcd4*, *Bcl-2* and *Casp-8*) was determined. We found that MWCNT exposure predominantly induce inflammation, while SWCNTs induce apoptosis and impaired mitochondrial function. Our results clearly suggest that MWCNTs are ideal candidates for acute inflammation induction. In vivo studies are required to confirm this hypothesis. However, we conclude that toxicity of CNTs is dependent on their physical and chemical characteristics.

**KEYWORDS**

apoptosis, in vitro, inflammation, multiwall carbon nanotubes, MWCNT, oxidative stress, rat macrophages cell line NR8383, single wall carbon nanotubes, SWCNT

## 1 | INTRODUCTION

Handling the matter in the range of 1-100 nm allows creating tools and materials with varied physicochemical properties and distinctive features such as firmness, flexibility, opacity, reflexivity, magnetism or antimicrobial activity.

For example, carbon nanotubes (CNTs) offer a huge potential in nano-electronics as semiconductors (Lefebvre et al., 2017). Their high thermal conductivity (Monea et al., 2017), resistance and intrinsic mechanical properties (Dresselhaus, Dresselhaus, Charlier, & Hernández, 2004) such as high tensile strength and flexibility, make them ideal for numerous applications in the biomedical domain, for

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2019 The Authors Journal of Applied Toxicology Published by John Wiley & Sons Ltd

instance drug delivery (Assali, Zaid, Abdallah, Almasri, & Khayyat, 2017; Khan et al., 2017; Samadishadlou et al., 2017). CNTs have been widely explored in structural polymer nanocomposites, conductive adhesives, fire retardant plastics, Li-ion battery electrodes and metal matrix composites (Madian et al., 2017; Messina et al., 2016). This brings millions of nanomaterials to the consumer market (Pitkethly, 2004). Consequently, human concerns on the toxicological risks associated with nanoparticle exposure increase.

Indeed, CNTs induce adverse effects, particularly on the respiratory tract, which constitutes the main route for penetration of these nanomaterials. They cause inflammatory, immunologic and fibrogenic effects in rodent lungs (Duke et al., 2017; Qin et al., 2017). Furthermore, key events shown on a cellular level, with NR8383 cells reveal that CNTs play a vital role in cell growth inhibition, production of reactive oxygen species (Fujita et al., 2015) and decrease of the mitochondrial membrane potential (Pulskamp, Diabaté, & Krug, 2007).

However, like other nanomaterials, the physical characteristics of CNTs are very important determinants of their toxicity.

For example, shorter single wall CNTs (SWCNTs) induce greater pulmonary toxicity than longer SWCNTs after intratracheal instillation in rats (Ema et al., 2017). Another study indicates that the longest CNTs were more potent than shorter ones for the production of pro-inflammatory cytokines in the mouse macrophage cell line J774A.1 (Boyles et al., 2015). Therefore, these findings point out that the pulmonary toxicity caused by CNTs is length dependent. Fujita et al. (2015) studied the effect of the CNT size on pulmonary toxicity and showed that longer SWCNTs in thick bundles induce cellular responses in alveolar macrophages and acute lung inflammation, shortly after inhalation, compared to the shortest ones in thin bundles. Moreover, the toxicity of CNTs is also impacted by chemical determinants as metal impurities (Ge et al., 2012) or CNT functionalization (Allegrì et al., 2016).

In this context, it was quite interesting to compare the toxicity imposed by CNTs of varied morphology: multiwall short and thick CNTs (MWCNT/NM403 (Poulsen et al., 2016; Vales, Rubio, & Marcos, 2016) and single wall long and thin (SWCNT/NRCWE-055). To the best of our knowledge, this is the first report describing the toxicity of this kind of nanotubes, on NR8383 cells. We chose certain genes that are involved in inflammation, oxidative stress, mitochondrial damage and cell death, to determine precisely the key events of CNT toxicity. In conclusion, we suggested that the type of cell death plays a vital role in the induction of acute inflammation.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Cell culture

NR8383 cells, a rat alveolar macrophage cell line, were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium high glucose (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich), 100 U/mL penicillin and 100 g/mL streptomycin, 4 mM L-glutamine and 0.25 µg/mL of

amphotericin B. Cells were grown at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and split every 3 days.

### 2.2 | Materials dispersion and characterization

MWCNT/NM403 were provided by the Joint Research Center, Belgium and SWCNT/NRCWE-055 by the National Research Centre for the Working Environment (NRCWE), Denmark. CNTs were suspended at 2 mg/mL concentration in DMEM high glucose medium with 2% FBS and sonicated in 5 mL volume, on ice, for 15 minutes, with a Vibra Cell™ Sonicator (20 W; VWR, England, UK) using an 11 mm probe, operated at 10% amplitude.

Size, polydispersity index and zeta potential of CNTs were measured by dynamic light scattering (DLS) with a Malvern Nano Zetasizer (Malvern Inc., Malvern, Worcs, UK), in a cell culture medium (2% FBS). The CNT concentration retained for DLS measurement was 200 µg/mL.

For transmission electron microscopy, a drop of CNT suspension was deposited on to a carbon-coated copper grid. After drying, the sample was negatively stained by uranyl acetate (3%) in deionized water. Preparations were observed under a CM12 microscope (Philips, Amsterdam, The Netherlands) operated at 80 kV. CNT diameters were determined on 114 round objects.

### 2.3 | Viability tests

#### 2.3.1 | Cell treatment

For the viability tests, NR8383 cells were seeded on to a 96-well plate ( $5 \times 10^5$  cells/well). After 24 hours, the medium was replaced with 100 µL of CNT solutions at different concentrations 2.5, 5, 10, 20, 40 and 80 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup> (nanoparticle surface/cell surface) for MWCNT/NM403 and 9, 19, 38, 75, 150 and 300 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup> for SWCNT/NRCWE-055 in DMEM without FBS and without phenol red. These concentrations correspond to mass concentrations of 6, 12.5, 25, 50, 100 and 200 µg/mL respectively. Cells were incubated for 4 and 24 hours, respectively.

#### 2.3.2 | Water-soluble tetrazolium salt assay

The test was performed according to the manufacturer's recommendations using water-soluble tetrazolium salt assay cell proliferation reagent (Roche, Boulogne, France). Absorbance was measured at 450 nm using an iMarK™ microplate reader (Bio-Rad Laboratories, Osaka, Japan). Unexposed cells served as the reference value defining 100% cellular viability.

#### 2.3.3 | Alamar Blue assay

After exposure, 10 µL of Alamar Blue® Reagent (Roche) was added directly to each well. The plates were incubated at 37°C for 3 hours. Fluorescence was measured at excitation/emission wavelengths of 570/600 nm using a FP-8300 Irm spectrofluorometer (Jasco, Lisses, France).

### 2.3.4 | Lactate dehydrogenase assay

The test was conducted following the manufacturer's instructions using the lactate dehydrogenase (LDH) cytotoxicity detection kit. LDH activity in the supernatant was quantified using an iMark™ Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories) at 490 nm wavelength and 630 nm as the reference wavelength.

### 2.3.5 | Flow cytometry analysis

NR8383 cells were plated on to six-well culture plates ( $25 \times 10^4$  cells/well), and then exposed to CNTs (2.5, 5, 10, 20 and 40  $\text{cm}^2/\text{cm}^2$  for MWCNT/NM403 and 4.5, 9, 19, 38, 75 and 150  $\text{cm}^2/\text{cm}^2$  for SWCNT/NRCWE-055) for 4 and 24 hours. Then, cells were harvested and washed twice in phosphate-buffered saline. They were suspended and stained using annexin V and fluorescein isothiocyanate (FITC) apoptosis detection kit (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Briefly, cells were suspended with  $1 \times$  binding buffer at a concentration of  $2 \times 10^5$  cells per 100  $\mu\text{L}$ . Five  $\mu\text{L}$  of FITC annexin V and 5  $\mu\text{L}$  propidium iodide (PI) were added to each solution and incubated for 20 minutes at room temperature (25°C) in the dark. Then, 200  $\mu\text{L}$  of  $1 \times$  binding buffer were added just before analysis by flow cytometry. A total of 10 000 cells by point were analyzed by fluorescence-assisted cell sorting flow cytometry at an excitation wavelength of 488 nm and emission wavelengths of 530 nm for FITC fluorescence and 610 nm for PI fluorescence. The percentage of viable ( $\text{PI}^-$ , annexin $^-$ ), apoptotic ( $\text{PI}^-$ , annexin $^+$ ) and necrotic cells ( $\text{PI}^+$ , annexin $^+$ ) were evaluated with CellQuestPro software (BD, Heidelberg, Germany). Since double labeling was performed, compensation was set using macrophages stained either with PI or with FITC-conjugated annexin V.

### 2.3.6 | Caspase-3 enzyme assay

Nr8383 cells were cultured ( $5 \times 10^5$ /Petri dish) and exposed to CNTs (5, 10, 20  $\text{cm}^2/\text{cm}^2$  for MWCNT/NM403 and 4.5, 9, 19, 38  $\text{cm}^2/\text{cm}^2$  for SWCNT/NRCWE-055) for 24 hours. Activity of caspase-3 (CASP3) enzyme was determined using the EnzChek CASP3 fluorometric assay kit (molecular probes) with some modifications. In brief, cells were pelleted by centrifugation at 500 g for 5 minutes, washed twice with phosphate-buffered saline and incubated in 50  $\mu\text{L}$  lysis buffer on ice for 30 minutes. The lysate was centrifuged at 5000 g for 5 minutes, and then 50  $\mu\text{L}$  of supernatant was added to 50  $\mu\text{L}$  of the reaction mixture and incubated for 30 minutes at room temperature. Fluorescence of the reaction mixture was measured at excitation/emission wavelengths of 430/535 nm using the FP-8300 Irm spectrofluorometer (Jasco).

### 2.3.7 | RNA extraction

After NR8383 cells treatment for 4 hours with the  $\text{IC}_{50}$  and  $\text{IC}_{50/4}$  of each CNT, cells were lysed by adding 1 mL of Trizol Extraction Reagent (OMEGA Bio-Tek, Guang zhou, China), followed by the addition of 200  $\mu\text{L}$  of chloroform (Carlo Erba reagents, Normandie, France). Samples were centrifuged at 800 g for 15 minutes and

500  $\mu\text{L}$  of isopropanol (Carlo Erba reagents) was added to 350  $\mu\text{L}$  of supernatant. The precipitates were subjected to two washing steps using ethanol 80% and incubated for 10 minutes at 60°C to remove ethanol, followed by dissolution in 35  $\mu\text{L}$  RNase-free water.

RNA purity was assessed using a BioSpec-nano spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). In addition, the integrity of RNA was checked by RNA 6000 Nano Reagents Kit using Bioanalyzer™ 2100 (Agilent Technologies, Waldbron, Germany).

### 2.3.8 | Reverse transcription and quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction

For complementary DNA (cDNA) conversion, the iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) was used according to the manufacturer's instructions. cDNA was stored at -20°C for later use. A mixture consisting of diluted cDNA, iQ™ SYBR Green® Supermix (Bio-Rad, France) and primer (Eurogentec, Marnes-la-Coquette Angers, France) for each gene was amplified by CFX Connect™ Real-Time system (Bio-Rad Laboratories, Singapore). For all the samples, an initial heat-denaturing step at 95°C for 5 minutes was followed by 40 cycles of 60°C for 1 minute and 95°C for 1 second. Gene expression levels were normalized by comparison to the ribosomal protein L13 (RPL13) housekeeping gene. Fold changes of gene expression were calculated by  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  method.

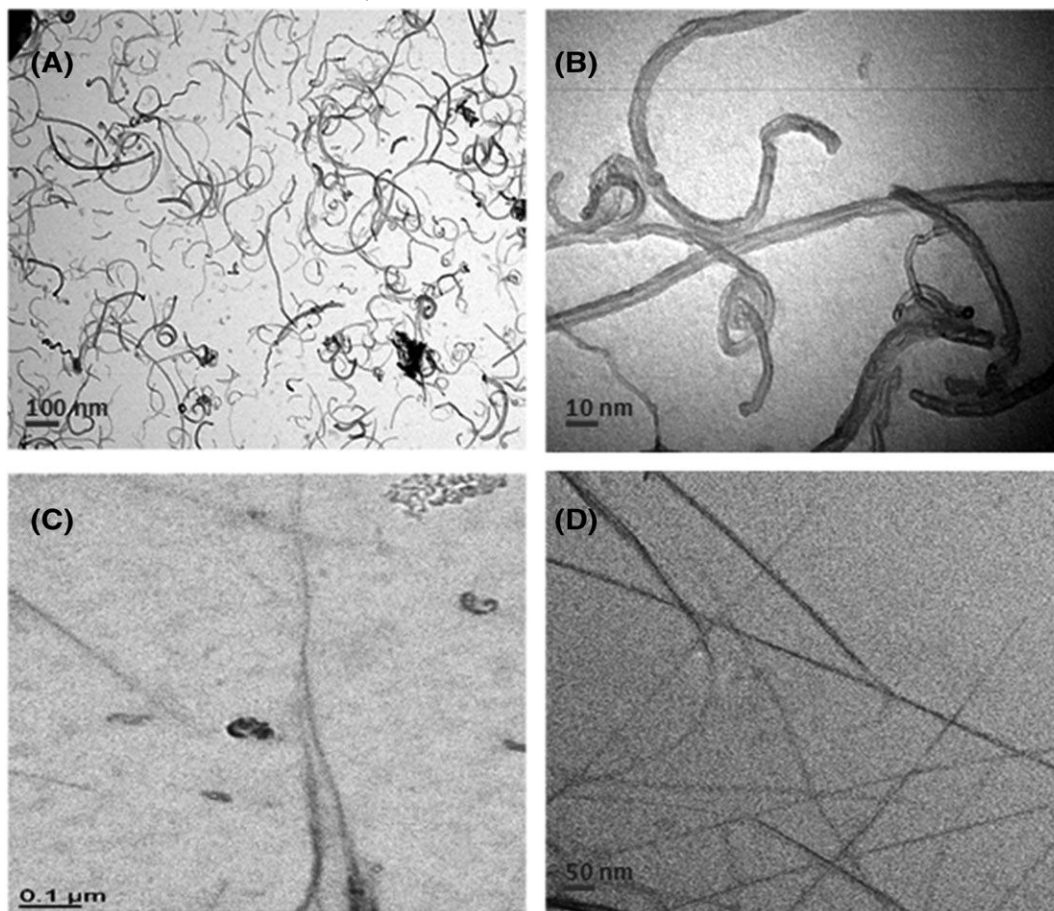
## 2.4 | Statistical analysis

For viability tests the number of biological replicates ( $N$ ) was four, the number of technical replicates ( $n$ ) was six. Statistical differences were determined by an ANOVA one-way analysis of variance followed by Dunnett's test, using RLPLOT software. Regarding quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction ( $N = 3$ ;  $n = 2$ ), fold changes was calculated by the ratio of exposed/unexposed cells, and results were expressed as means  $\pm$  SE. Statistical differences between control and exposed cells were determined by ANOVA followed by the Tukey-Kramer method.

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Carbon nanotube physicochemical properties

The specific surface given by the provider was 135  $\text{m}^2/\text{g}$  for MWCNT/NM403 and 436  $\text{m}^2/\text{g}$  for SWCNT/NRCWE-055, as assessed by Brunauer-Emmett-Teller. The mean hydrodynamic diameter, determined by DLS from three independent preparations, was  $217.2 \pm 70.3$  nm for MWCNT/NM403 and  $601.7 \pm 90.4$  nm for SWCNT/NRCWE-055 with a polydispersity index of  $0.383 \pm 0.013$  and  $0.849 \pm 0.025$ , respectively. The length calculated by transmission electron microscopy was  $300 \pm 90$  nm for MWCNT/NM403 and  $2 \pm 1$   $\mu\text{m}$  for SWCNT/NRCWE-055 (Figure 1). Both CNTs displayed a zeta potential of  $-13.005 \pm 0.025$  mV.



**FIGURE 1** Transmission electron microscopy. A, B, Multiwall carbon nanotubes/NM403. C, D, Single wall carbon nanotubes/NRCWE-055

### 3.2 | Exposure to carbon nanotubes induced dose-dependent cytotoxicity in NR8383 cells

In NR8383 cells, according to the water-soluble tetrazolium salt assay test, 50% and 30% of cell death were observed respectively for the lowest doses, 2.5 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup> of MWCNT/NM403 and 9 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup> of SWCNT/NRCWE-055, after 24 hours of exposure. They decreased afterwards in a dose-dependent manner with only a slight difference between the results for both exposure times (4 and 24 hours). The IC<sub>50</sub> was determined as 3.2 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup> for MWCNT/NM403 and 44 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup> for SWCNT/NRCWE-055.

We obtained similar results with the Alamar Blue test with small differences due to the sensibility of each test. The corresponding IC<sub>50</sub> were 4.1 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup> for MWCNT/NM403 and 41.2 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup> for SWCNT/NRCWE-055 (Figure 2).

As far as the LDH test is concerned, there is a slightly significant increase (up to 30% compared to the negative control) after 24 hours of exposure to MWCNT/NM403 at high doses (10–80 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>).

### 3.3 | Single wall carbon nanotube-induced apoptosis

Flow cytometry analysis, assayed by the FITC annexin V antibody is shown in Figure 3. Annexin V-FITC<sup>+</sup> and PI<sup>-</sup> stain, in the lower-right quadrant, indicates the presence of apoptotic cells. Apoptosis

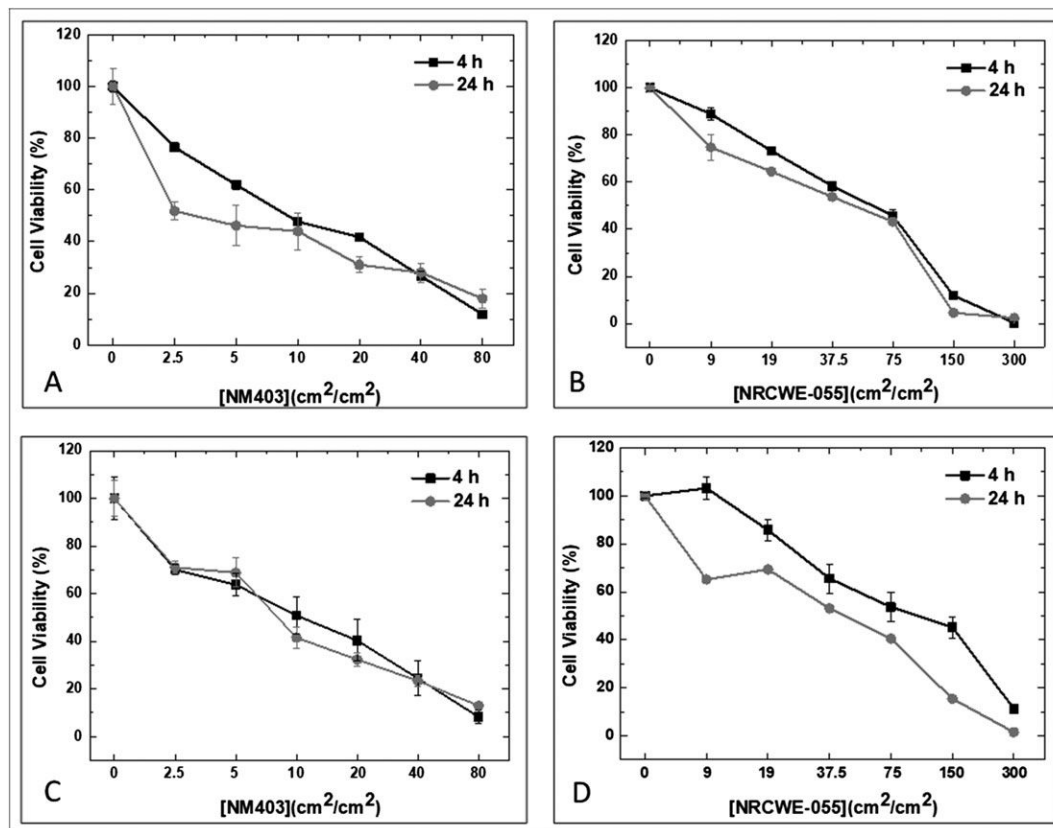
increased from the lowest concentration of SWCNT/NRCWE-055 (9 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>) to the highest concentration (75 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>). For MWCNT/NM403, no such staining could be observed.

### 3.4 | No caspase-3 activation

Activation of the CASP3 pathway is a hallmark of apoptosis. However, in our study, CASP3 activation was not observed for any doses of MWCNT/NM403 and SWCNT/NRCWE-055 (data not shown).

### 3.5 | Gene expression analysis

A difference in gene expressions was observed with MWCNT/NM403 and SWCNT/NRCWE-055 (Table 1). For MWCNT/NM403, the *Tnf-α* and *Il-1β* genes related to inflammation were overexpressed after cell treatment while they were underexpressed in case of SWCNT. On the contrary, genes related to apoptosis (*Casp8*) or mitochondrial damage (*Opa*) were overexpressed after treatment with SWCNT/NRCWE-055 but not with MWCNT/NM403. Other genes, *Nfkb* and *Il-6* related to inflammation, *Ncf1* related to oxidative burst and *Bcl-2* and *Pdcd4* related to apoptosis, were similarly expressed, at low and high MWCNT/NM403 doses.



**FIGURE 2** Cytotoxicity of carbon nanotubes on NR8383 cells. Toxicity was evaluated with two tests. A, C, Water-soluble tetrazolium salt assay test. B, D, Alamar Blue test. NR8383 cells were exposed to multiwall carbon nanotubes/NM403 (range 0–80  $\text{cm}^2/\text{cm}^2$ ) and to single wall carbon nanotubes/NRCWE-055 (range 0–300  $\text{cm}^2/\text{cm}^2$ ). Data represent the means  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. non-treated cells. ANOVA was followed by Dunnett's multiple comparison test

## 4 | DISCUSSION

As we discussed at the beginning, in vivo studies have shown that CNTs induce immunologic and inflammatory responses. What seems promising, is to study the capacity of the in vitro model to predict the induction of these events. Hereby, we analyzed the expression of genes that play a major role in inflammation, oxidative burst, mitochondrial stress and cell death, following the exposure to two types of CNTs of different sizes: SWCNT/NRCWE-055 (thin and long) and MWCNT/NM403 (thick and short) on NR8383 cells. Macrophages (i.e., NR8383) are primary defenders against nanoparticles and principal actors for regulating the inflammatory response.

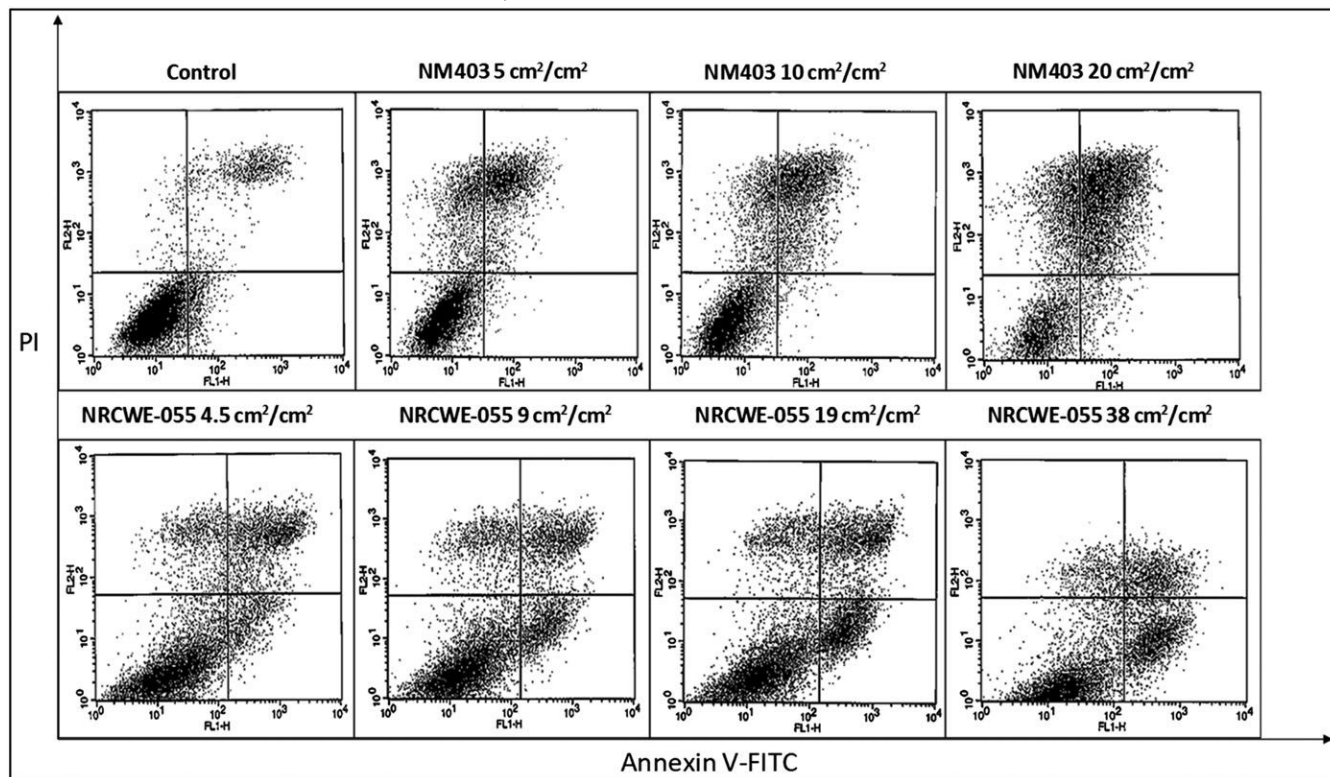
Indeed, a 30% decrease of cell viability in NR8383 was observed 24 hours after treatment with 150  $\text{cm}^2/\text{cm}^2$  of SWCNT/NRCWE-055. Fujita et al., reported similar data after 24 hours treating NR8383 cells with SWCNTs at the same dose (Fujita et al., 2015). Consequently, our results are in concordance with those of Fujita et al. However, for MWCNT/NM403, this was not the case. The literature reveals that MWCNTs do not produce a decrease in cell viability, which does not suit our results (Pulskamp et al., 2007). This variation may be due to differences in diameter of MWCNTs used in that study (30–50 nm), compared to MWCNT/NM403 we used (12 nm) in our study.

Overall, viability tests showed that MWCNT/NM403 are more cytotoxic than SWCNT/NRCWE-055. This confirms the hypothesis that thick nanomaterials are more toxic (Mrakovcic, Meindl, Leitinger, Roblegg, & Fröhlich, 2015).

CNTs are frequently reported to induce oxidative stress in lung cells (He, Young, Fernback, & Ma, 2012; Wang et al., 2016). Our results confirm that both SWCNTs and MWCNTs stimulate reactive oxygen species production at  $\text{IC}_{50}$  by superoxide bursts due to *Ncf* overexpression (Table 1).

However, at lower doses ( $\text{IC}_{50/4}$ ), the *Ncf* gene was significantly overexpressed only after treatment with SWCNT/NRCWE-055. The overexpression of the *Ncf* gene at this concentration was accompanied by an overexpression of the *Opa* gene suggesting that SWCNT/NRCWE-055 induces mitochondrial damage. Park et al. (2014) demonstrated that SWCNTs produced reactive oxygen species in RAW264.7 macrophages and caused the lower production of ATP by damaging the mitochondrial function (Park et al., 2014). We therefore confirmed that SWCNT/NRCWE-055 induces oxidative stress and impairs mitochondria (He et al., 2012).

With MWCNT/NM403, no differential expression of *Opa* gene was observed, which is consistent with the Ghanbari et al. study. The latter also showed that MWCNTs produce less mitochondrial damage to cells than SWCNTs (Ghanbari et al., 2017), which coincides with our results (Supporting information).



**FIGURE 3** Flow cytometry results of the annexin V-FITC and PI assay. Cells stained with annexin V-FITC<sup>+</sup> and PI<sup>+</sup> show up in the upper right quadrant. Cells stained with annexin V-FITC<sup>+</sup> and PI<sup>-</sup> show up in the lower right quadrant, whereas cells stained with annexin V-FITC<sup>-</sup> and PI<sup>-</sup> show up in the lower left quadrant. A, Control group with no treatment. B, C, NR8383 cells exposed to multiwall carbon nanotubes/NM403 or single wall carbon nanotubes/NRCWE-055, respectively, for 24 h. FITC, fluorescein isothiocyanate; PI, propidium iodide

**TABLE 1** Variation of gene expression after 4 h exposure of NR8383 cells to MWCNT/NM403 and SWCNT/NRCWE-055 (IC<sub>50/4</sub> and IC<sub>50</sub>). Results were presented as fold change as compared to the control ± SE using ANOVA followed by Tukey-Kramer method

Genes	Fold change							
	MWCNT/NM-403				SWCNT/NRCWE-055			
	IC <sub>50/4</sub>	P value	IC <sub>50</sub>	P value	IC <sub>50/4</sub>	P value	IC <sub>50</sub>	P value
<i>Ncf1</i>	1.53 ± 0.2	NS	2.94 ± 0.1	<0.05	1.93 ± 0.3	<0.05	1.7 ± 0.1	<0.05
<i>Opa</i>	0.81 ± 0.1	<0.05	1.13 ± 0.1	NS	2.78 ± 0.3	<0.05	2.52 ± 0.2	NS
<i>Nfkb</i>	1.77 ± 0.3	NS	2.13 ± 0.3	NS	3.02 ± 0.3	NS	2.18 ± 0.2	NS
<i>Tnfα</i>	3 ± 0.2	<0.01	1.81 ± 0.2	<0.05	0.34 ± 0.1	<0.001	0.6 ± 0.1	<0.01
<i>Il6</i>	0.2 ± 0.04	<0.001	0.43 ± 0.1	<0.01	0.13 ± 0.1	<0.001	0.05 ± 0.1	<0.001
<i>Il-1β</i>	1.81 ± 0.1	<0.01	4.51 ± 0.3	<0.05	0.48 ± 0.1	<0.05	0.87 ± 0.1	NS
<i>Pdcd4</i>	0.62 ± 0.1	<0.05	0.64 ± 0.1	<0.05	0.65 ± 0.1	<0.05	0.71 ± 0.1	<0.05
<i>Bcl2</i>	0.31 ± 0.1	<0.05	0.7 ± 0.2	NS	0.36 ± 0.1	<0.01	0.26 ± 0.1	0.001
<i>Casp8</i>	0.54 ± 0.1	<0.05	0.74 ± 0.1	NS	2.11 ± 0.2	<0.05	1.16 ± 0.1	NS

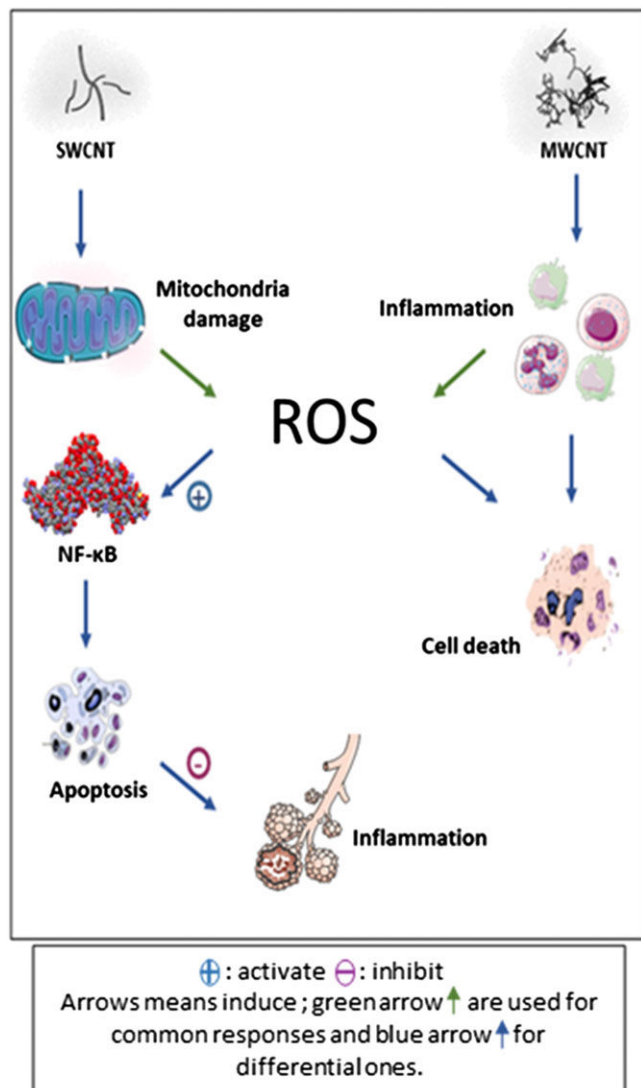
MWCNT, multiwall carbon nanotube; NS, not significant; SWCNT, single wall carbon nanotube. Grey box, upregulated gene; white box, downregulated.

Previous studies have demonstrated that SWCNTs induce inflammation on NR8383 cells (Fujita et al., 2015), THP-1 and BEAS-2B cell lines (Wang et al., 2016). However, we did not find similar results with SWCNT/NRCWE-055.

On the other hand, MWCNT/NM403 induced an overexpression of *Tnf-α* and *Il-1β*. Therefore, MWCNTs induce inflammation as already assessed by the cDNA microarray (Table 1) (Hirano, Kanno, & Furuyama, 2008).

We can suggest the following hypothesis: MWCNTs lead to ROS production by inducing inflammation (Girardello, Baranzini, Tettamanti, de Eguileor, & Grimaldi, 2017) while SWCNTs enhance oxidative stress through mitochondrial damage as discussed earlier. (He et al., 2012).

In MWCNT/NM403-exposed cells, the flow cytometry experiment did not bring out any apoptosis characteristics, either at the protein level (CASP3), or at the mRNA level (*Casp8*). Both apoptosis-related



**FIGURE 4** Schematic representation of two different pathways induced by SWCNT and MWCNT. MWCNT, multiwall carbon nanotube; NF- $\kappa$ B, nuclear factor kappaB; ROS, reactive oxygen species; SWCNT, single wall carbon nanotube [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

genes (*Casp8* and *Pdcd4*) were slightly underexpressed. Otherwise, LDH release reveals NR8383 cell necrosis after 24 hours of exposure to MWCNTs (Chan, Moriwaki, & De Rosa, 2013). A few in vitro studies on cytotoxic effects of MWCNTs have been conducted. Indeed, Pulskamp et al. (2007) reported the absence of apoptosis after exposure to MWCNTs with similar characteristics to the ones we used in our study (Pulskamp et al., 2007). Likewise, Hirano et al. (2008) demonstrated the absence of apoptosis in J774.1 murine macrophage after treatment with MWCNTs. In another study, CASP3/7 were evaluated, and no activation in RAW 264.7 macrophages was reported after treatment with MWCNTs (Sohaebuddin, Thevenot, Baker, Eaton, & Tang, 2010). The occurrence of apoptosis in NR8383 cells exposed to SWCNT/NRCWE-055, shown by annexin V/IP staining, is supported by the overexpression of *Casp8*, as well as the expression of *Bcl-2*, both favoring apoptosis. The same response has been described with fibroblasts exposed to SWCNTs, which died by apoptosis (Cicchetti, Divizia, Valentini, & Argentin, 2011). In NR8383 cells, apoptosis caused by

SWCNT/NRCWE-055 is CASP3 independent, as it did not trigger any significant synthesis of CASP3 protein.

However, apoptosis activation may be related to the presence of oxidative stress mediated by *Nfkb* expression in SWCNT/NRCWE-055-exposed cells. Indeed, this gene plays a crucial role in apoptosis activation, as proposed by Ravichandran and coworkers (Ravichandran et al., 2010). Consequently, SWCNT/NRCWE-055 induced the apoptosis via *Nfkb* signaling.

Thus, the fact that SWCNT/NRCWE-055 induced the apoptosis explained the absence of any inflammatory response after exposure to these SWCNTs. It is known that apoptotic cells stimulate an anti-inflammatory response that could explain the underexpression of genes coding for proinflammatory cytokines such as *Il-6*, *Il-1 $\beta$*  and *Bcl-2* as suggested by Szondy et al. (Szondy, Sarang, Kiss, Garabuczi, & Köröskényi, 2017). This phenomenon was previously seen in RAW 264.7 macrophages, which, exposed to 0.1 mg/mL SWCNT for 6 hours, produced fewer proinflammatory cytokines: interleukins 1 $\beta$  and 10, tumor necrosis factor- $\alpha$  and transforming growth factor- $\beta$ 1 (Shvedova et al., 2005). Therefore, SWCNT/NRCWE-055 induced apoptosis by activating *Nfkb*, which regulates NR8383 inflammatory response.

## 5 | CONCLUSION

While both MWCNT/NM403 and SWCNT/NRCWE-055 are cytotoxic, the former induces 13 times less cytotoxic effect than the latter ( $IC_{50} = 3.2 \text{ cm}^2/\text{cm}^2 < IC_{50} = 44 \text{ cm}^2/\text{cm}^2$ ). Both induced oxidative bursts but in a different way. For MWCNT, it is related to an inflammatory response, while it seems to be related to a mitochondrial dysfunction in the case of SWCNT (Figure 4). With SWCNT/NRCWE-055, oxidative stress leads to apoptosis through *Nfkb* induction. Apoptotic cells then stimulate an anti-inflammatory response. Thus, despite a common chemical composition, notwithstanding the possible contamination (e.g., metal), the difference between both CNTs is related, on the one hand, to their specific surface property (increased in MWCNTs vs. SWCNTs), and on the other hand, to their different length property (higher for SWCNTs). We suggest the presence of a relationship between cell death pathways, CNT physicochemical characteristics, and induction of acute inflammation in vivo. Further studies will be done in this sector.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge Justine Paoli for kind assistance with electron microscopy imaging and Smartnanotox partners for nanomaterial characterization. This work has received funding from the European Union's Horizon 2020 research (SmartNanotox project) and innovation program.

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest to report.



## ORCID

Sara Nahle  <https://orcid.org/0000-0001-9853-709X>

## REFERENCES

- Allegri, M., Perivoliotis, D. K., Bianchi, M. G., Chiu, M., Pagliaro, A., Koklioti, M. A., ... Charitidis, C. A. (2016). Toxicity determinants of multi-walled carbon nanotubes: The relationship between functionalization and agglomeration. *Toxicology Reports*, 3, 230–243. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2016.01.011>
- Assali, M., Zaid, A. N., Abdallah, F., Almasri, M., & Khayyat, R. (2017). Single-walled carbon nanotubes-ciprofloxacin nanoantibiotic: strategy to improve ciprofloxacin antibacterial activity. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 6647–6659. <https://doi.org/10.2147/IJN.S140625>
- Boyles, M. S. P., Young, L., Brown, D. M., MacCalman, L., Cowie, H., Moiala, A., ... Stone, V. (2015). Multi-walled carbon nanotube induced frustrated phagocytosis, cytotoxicity and pro-inflammatory conditions in macrophages are length dependent and greater than that of asbestos. *Toxicology In Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 29(7), 1513–1528. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.06.012>
- Chan, F. K.-M., Moriwaki, K., & De Rosa, M. J. (2013). Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 979, 65–70. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-290-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-290-2_7)
- Cicchetti, R., Divizia, M., Valentini, F., & Argentin, G. (2011). Effects of single-wall carbon nanotubes in human cells of the oral cavity: genocytotoxic risk. *Toxicology In Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 25(8), 1811–1819. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.09.017>
- Dresselhaus, M. S., Dresselhaus, G., Charlier, J. C., & Hernández, E. (2004). Electronic, thermal and mechanical properties of carbon nanotubes. *Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences*, 362(1823), 2065–2098. <https://doi.org/10.1098/rsta.2004.1430>
- Duke, K. S., Taylor-Just, A. J., Ihrie, M. D., Shipkowski, K. A., Thompson, E. A., Dandley, E. C., ... Bonner, J. C. (2017). STAT1-dependent and -independent pulmonary allergic and fibrogenic responses in mice after exposure to tangled versus rod-like multi-walled carbon nanotubes. *Particle and Fibre Toxicology*, 14(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s12989-017-0207-3>
- Ema, M., Takehara, H., Naya, M., Kataura, H., Fujita, K., & Honda, K. (2017). Length effects of single-walled carbon nanotubes on pulmonary toxicity after intratracheal instillation in rats. *The Journal of Toxicological Sciences*, 42(3), 367–378. <https://doi.org/10.2131/jts.42.367>
- Fujita, K., Fukuda, M., Endoh, S., Maru, J., Kato, H., Nakamura, A., ... Honda, K. (2015). Size effects of single-walled carbon nanotubes on in vivo and in vitro pulmonary toxicity. *Inhalation Toxicology*, 27(4), 207–223. <https://doi.org/10.3109/08958378.2015.1026620>
- Ge, C., Li, Y., Yin, J.-J., Liu, Y., Wang, L., Zhao, Y., & Chen, C. (2012). The contributions of metal impurities and tube structure to the toxicity of carbon nanotube materials. *NPG Asia Materials*, 4(12), e32. <https://doi.org/10.1038/am.2012.60>
- Ghanbari, F., Nasarzadeh, P., Seydi, E., Ghasemi, A., Taghi Joghataei, M., Ashtari, K., & Akbari, M. (2017). Mitochondrial oxidative stress and dysfunction induced by single- and multiwall carbon nanotubes: A comparative study. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 105(7), 2047–2055. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36063>
- Girardello, R., Baranzini, N., Tettamanti, G., de Eguileor, M., & Grimaldi, A. (2017). Cellular responses induced by multi-walled carbon nanotubes: in vivo and in vitro studies on the medicinal leech macrophages. *Scientific Reports*, 7(1), 8871. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09011-9>
- He, X., Young, S.-H., Fernback, J. E., & Ma, Q. (2012). Single-walled carbon nanotubes induce fibrogenic effect by disturbing mitochondrial oxidative stress and activating NF- $\kappa$ B signaling. *Journal of Clinical Toxicology*, (Suppl 5). <https://doi.org/10.4172/2161-0495.S5-005>
- Hirano, S., Kanno, S., & Furuyama, A. (2008). Multi-walled carbon nanotubes injure the plasma membrane of macrophages. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 232(2), 244–251. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.06.016>
- Khan, A. S., Hussain, A. N., Sidra, L., Sarfraz, Z., Khalid, H., Khan, M., ... Rehman, I. U. (2017). Fabrication and in vivo evaluation of hydroxyapatite/carbon nanotube electrospun fibers for biomedical/dental application. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 80, 387–396. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.109>
- Lefebvre, J., Ding, J., Li, Z., Finnie, P., Lopinski, G., & Malenfant, P. R. L. (2017). High-purity semiconducting single-walled carbon nanotubes: a key enabling material in emerging electronics. *Accounts of Chemical Research*, 50(10), 2479–2486. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00234>
- Madian, M., Ummethala, R., Naga, A. O. A. E., Ismail, N., Rümmele, M. H., Eychmüller, A., & Giebler, L. (2017). Ternary CNTs@TiO<sub>2</sub>/CoO nanotube composites: improved anode materials for high performance lithium ion batteries. *Materials (Basel, Switzerland)*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/ma10060678>
- Messina, E., Leone, N., Foti, A., Di Marco, G., Riccucci, C., Di Carlo, G., ... Gucciardi, P. G. (2016). Double-wall nanotubes and graphene nanoplatelets for hybrid conductive adhesives with enhanced thermal and electrical conductivity. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(35), 23244–23259. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b06145>
- Monea, B. F., Ionete, E. I., Spiridon, S. I., Leca, A., Stanciu, A., Petre, E., & Vaseashta, A. (2017). Single wall carbon nanotubes based cryogenic temperature sensor platforms. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 17(9). <https://doi.org/10.3390/s17092071>
- Mrakovcic, M., Meindl, C., Leitinger, G., Roblegg, E., & Fröhlich, E. (2015). Carboxylated short single-walled carbon nanotubes but not plain and multi-walled short carbon nanotubes show in vitro genotoxicity. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 144(1), 114–127. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu260>
- Park, E.-J., Zahari, N. E. M., Kang, M.-S., Lee, S. j., Lee, K., Lee, B.-S., ... Kim, J.-H. (2014). Toxic response of HIPCO single-walled carbon nanotubes in mice and RAW264.7 macrophage cells. *Toxicology Letters*, 229(1), 167–177. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.06.015>
- Pitkethly, M. J. (2004). Nanomaterials—the driving force. *Materials Today*, 7(12, Supplement), 20–29. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(04\)00627-3](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(04)00627-3)
- Poulsen, S. S., Jackson, P., Kling, K., Knudsen, K. B., Skaug, V., Kyjovska, Z. O., ... Vogel, U. (2016). Multi-walled carbon nanotube physicochemical properties predict pulmonary inflammation and genotoxicity. *Nanotoxicology*, 10(9), 1263–1275. <https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1202351>
- Pulskamp, K., Diabaté, S., & Krug, H. F. (2007). Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicology Letters*, 168(1), 58–74. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.11.001>
- Qin, Y., Li, S., Zhao, G., Fu, X., Xie, X., Huang, Y., ... Lai, Z. (2017). Long-term intravenous administration of carboxylated single-walled carbon nanotubes induces persistent accumulation in the lungs and pulmonary fibrosis via the nuclear factor- $\kappa$ B pathway. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 263–277. <https://doi.org/10.2147/IJN.S123839>
- Ravichandran, P., Baluchamy, S., Sadanandan, B., Gopikrishnan, R., Biradar, S., Ramesh, V., ... Ramesh, G. T. (2010). Multiwalled carbon nanotubes activate NF- $\kappa$ B and AP-1 signaling pathways to induce apoptosis in rat lung epithelial cells. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 15(12), 1507–1516. <https://doi.org/10.1007/s10495-010-0532-6>
- Samadishadlou, M., Farshbaf, M., Annabi, N., Kavetsky, T., Khalilov, R., Saghfi, S., ... Mousavi, S. (2017). Magnetic carbon nanotubes:

- preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 1–17. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1389746>
- Shvedova, A. A., Kisin, E. R., Mercer, R., Murray, A. R., Johnson, V. J., Potapovich, A. I., ... Baron, P. (2005). Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 289(5), L698–L708. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00084.2005>
- Sohaebuddin, S. K., Thevenot, P. T., Baker, D., Eaton, J. W., & Tang, L. (2010). Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Particle and Fibre Toxicology*, 7, 22. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-22>
- Szondy, Z., Sarang, Z., Kiss, B., Garabuczi, É., & Köröskényi, K. (2017). Anti-inflammatory mechanisms triggered by apoptotic cells during their clearance. *Frontiers in Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00909>
- Vales, G., Rubio, L., & Marcos, R. (2016). Genotoxic and cell-transformation effects of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) following in vitro sub-chronic exposures. *Journal of Hazardous Materials*, 306, 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.12.021>
- Wang, X., Mansukhani, N. D., Guiney, L. M., Lee, J.-H., Li, R., Sun, B., ... Nel, A. E. (2016). Toxicological profiling of highly-purified metallic and semiconducting single-walled carbon nanotubes in the rodent lung and *E. coli*. *ACS Nano*, 10(6), 6008–6019. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b01560>

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

**How to cite this article:** Nahle S, Safar R, Grandemange S, et al. Single wall and multiwall carbon nanotubes induce different toxicological responses in rat alveolar macrophages. *J Appl Toxicol.* 2019;1–9. <https://doi.org/10.1002/jat.3765>

### **3 Etude comparative entre trois MWCNT de tailles similaires mais fonctionnalisés différemment : effet fonctionnalisation**

#### **3.1 Introduction**

La fonctionnalisation des NTC correspond à l'ajout d'un groupe fonctionnel comme l'hydroxyle, le carboxyle ou l'amine aux nanotubes lors de leur synthèse. Ces modifications de surface élargissent leur champ d'application mais elles jouent aussi sur leur biocompatibilité. De ce fait, nous visons dans cette étude à comprendre l'effet de cette fonctionnalisation sur la toxicité induite par les NTC dans les cellules NR8383. Nous avons choisi trois MWCNT avec des tailles et des diamètres similaires : le premier est non fonctionnalisé (NM403), le deuxième est anionique, avec un groupement carboxyle (NRCWE-042) et le troisième est cationique, avec un groupement amine (NRCWE-049). Après les études de cytotoxicité à 4 et 24 h nous avons réalisé les études de transcriptomique après 4h d'exposition des cellules NR8383, à IC<sub>50/4</sub> de chaque nanotube. Cela nous permet d'évaluer si suite à l'exposition à ces trois nanotubes et il existe des différences dans l'expression de gènes qui pourraient être fonctionnalisation dépendantes. D'une autre manière, nous souhaitons déterminer le mécanisme de toxicité de chaque NTC, les comparer et déduire les liens entre la fonction/charge et la toxicité. Enfin, une étude protéomique a été réalisée, en partenariat avec des membres dublinois du consortium (UCD), pour valider certains évènements clés. Cette étude comprend également une étude de la corona des NTC dans le milieu d'exposition pour savoir si la fonctionnalisation change la constitution de cette dernière et si cette corona a un rôle dans la détermination de la toxicité.

#### **3.2 Résumé des principaux résultats**

Nous avons démontré que les MWCNT induisent tous une cytotoxicité mais la fonctionnalisation avec un groupe carboxyle atténue cette dernière. Aussi d'après l'étude d'expression des gènes, nous avons montré que tous les MWCNT induisent une inflammation mais suivant des mécanismes de toxicité différents. Pour celui qui n'est pas fonctionnalisé (NM403), il y a une inhibition de la voie BRACA1 impliquée dans la réparation des dommages de l'ADN suite à l'exposition, ainsi qu'une altération des voies impliquées dans la réponse aux dommages de l'ADN. En plus, NM403 active la voie NRF2, qui est une voie de réponse au stress oxydant ce qui prouve que ce nanotube induit un stress oxydant. Ce stress peut être aussi à la base de l'endommagement d'ADN déjà cité. Toutefois, le stress oxydant aussi bien que les dommages de l'ADN conduisent à la mort cellulaire observée. Les débris cellulaires qui en résultent favoriseraient alors l'apparition d'une inflammation

surtout en présence d'un stress oxydant. Pour les deux autres NTC, qui sont fonctionnalisés, la réponse toxique est mTOR dépendante. Mais chacun agit différemment sur mTOR. Le nanotube cationique (NRCWE-049) déstabilise les lysosomes et induit alors d'une part, une inhibition de mTOR qui entraîne une activation de l'autophagie, et d'autre part une activation de l'inflammasome. Par conséquent, l'activation de l'inflammasome et l'autophagie aboutissent à l'induction d'une inflammation. Concernant le nanotube anionique (NRCWE-042), ce dernier active mTOR et conduit à une augmentation de la traduction. Cette augmentation de traduction active notamment la signalisation *via* les interférons, favorisant ainsi l'induction de l'inflammation. Enfin ce nanotube provoque aussi une surexpression du gène Tlr2 ce qui conduit également à une induction d'inflammation. Selon les résultats de la protéomique, pour le nanotube non fonctionnalisé (NM403), nous avons pu identifier une augmentation de la synthèse des protéines impliqués dans la réponse inflammatoire et d'autres liés à l'endommagement de l'ADN. Nous avons validé l'induction d'inflammation par l'évaluation de la production des cytokines. En ce qui concerne la corona, nous n'avons pas mis en évidence de différence quel que soit le nanotube. Ceci suggère que les différences entre les réponses toxiques induites par ces différents nanotubes ne sont pas corona-dépendantes.

### 3.3 Conclusion

Selon cette étude, nous avons pu confirmer que la fonctionnalisation est l'un des déterminants de toxicité importants. Nous avons identifié des réponses communes comme le stress ribosomal, la désorganisation du cytosquelette et l'inflammation. Ces réponses peuvent être liées aux caractéristiques communes que partagent ces nanotubes notamment la taille (longueur et diamètre). Tandis que la différence des réponses cellulaires post-exposition dépend de la présence de la fonctionnalisation et aussi de sa nature. La fonctionnalisation oriente la réponse cellulaire sur une voie mTOR dépendante. Si elle confère une charge positive au nanotube, on a une inhibition de mTOR et ensuite une autophagie, si elle confère une charge négative, il s'agit plutôt d'une activation associée à une perturbation de l'homéostasie protéique.

**Cette étude a fait l'objet de la publication suivante qui a été soumise dans Nanobiotechnology.**

### 3.4 Article III

# Journal of Nanobiotechnology

## Gene expression profiling of alveolar macrophages exposed to non-functionalized, anionic or cationic multi-walled carbon nanotubes shows three different mechanisms of toxicity

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Full Title:</b>	Gene expression profiling of alveolar macrophages exposed to non-functionalized, anionic or cationic multi-walled carbon nanotubes shows three different mechanisms of toxicity
<b>Article Type:</b>	Research
<b>Section/Category:</b>	Nanotoxicology
<b>Funding Information:</b>	H2020 European Research Council (686098) <span style="float: right;">Not applicable</span>
<b>Abstract:</b>	<p>Functionalized multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) have become the focus of increased research interest, particularly in their application as tools in different areas, such as the biomedical field. Despite the benefits associated with functionalization of MWCNT, particularly in overcoming issues relating to solubility, several studies have demonstrated that these functionalized nanoparticles display different toxicity profiles. For this study, we aim to compare NR8383 cells responses to three well-characterized MWCNT with varying functional groups. This study employed cytotoxicity assays, transcriptomics and proteomics to assess their toxicity using NR8383 rat alveolar macrophages as an in vitro model. The study findings indicated that all MWCNT altered ribosomal protein translation, cytoskeleton arrangement and induced pro-inflammatory response. Only functionalized MWCNT alter mTOR signaling pathway in conjunction with increased Lamtor gene expression. Furthermore, the type of functionalization was also important, with cationic MWCNT activating the transcription factor EB and inducing autophagy while the anionic MWCNT altering eukaryotic translation initiation factor 4 (EIF4) and phosphoprotein 70 ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) signaling pathway as well as upregulation Tlr2 gene expression. This study proposes that MWCNT toxicity mechanisms are functionalization dependent and provides evidence that inflammatory response is a key event of carbon nanotubes toxicity.</p>
<b>Corresponding Author:</b>	Luc Ferrari Institut Jean Lamour Nancy, Lorraine FRANCE
<b>Corresponding Author E-Mail:</b>	luc.ferrari@univ-lorraine.fr
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Institut Jean Lamour
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Sara Nahle
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	<p>Sara Nahle</p> <p>Hilary Cassidy</p> <p>Mélanie Lovera-Leroux</p> <p>Reuben Mercier</p> <p>Zahra Doumandji</p> <p>David Gomez Matallanas</p>

	Bertrand Rihn
	Olivier Joubert
	Luc Ferrari
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Opposed Reviewers:</b>	
<b>Additional Information:</b>	
<b>Question</b>	<b>Response</b>
<p><b>Is this study a clinical trial?</b></p> <hr/> <p>A clinical trial is defined by the World Health Organisation as 'any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes'.</p>	No
<p>Are you submitting this manuscript to a special series or article collection?</p>	No

[Click here to view linked References](#)

1           **Gene expression profiling of alveolar macrophages exposed to non-functionalized, anionic or**  
2           **cationic multi-walled carbon nanotubes shows three different mechanisms of toxicity.**

3  
4  
5 Sara Nahle <sup>1</sup>, Hilary Cassidy <sup>2</sup>, Mélanie Lovera-Leroux <sup>1</sup>, Reuben Mercier<sup>1</sup>, Zahra Doumandji <sup>1</sup>,  
6  
7 David Matallanas <sup>2</sup>, Bertrand Rihn<sup>1</sup>, Olivier Joubert <sup>1</sup>, Luc Ferrari <sup>1\*</sup>.

8  
9  
10 <sup>1</sup>Nanomaterials and Health, Team 403, Institute Jean Lamour UMR 7198 du CNRS, Université de  
11  
12 Lorraine, F- 54000 Nancy, France.

13  
14  
15 <sup>2</sup> Systems Biology Ireland, School of Medicine, University College Dublin, Belfield, Dublin 4,  
16  
17 Ireland.

18  
19  
20  
21 **Corresponding authors:** Luc FERRARI; tel: 03 72 74 26 93; mail: [luc.ferrari@univ-lorraine.fr](mailto:luc.ferrari@univ-lorraine.fr)

22  
23  
24  
25  
26 **Abstract**

27  
28  
29  
30 Functionalized multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) have become the focus of increased  
31  
32 research interest, particularly in their application as tools in different areas, such as the biomedical  
33  
34 field. Despite the benefits associated with functionalization of MWCNT, particularly in overcoming  
35  
36 issues relating to solubility, several studies have demonstrated that these functionalized nanoparticles  
37  
38 display different toxicity profiles. For this study, we aim to compare NR8383 cells responses to three  
39  
40 well-characterized MWCNT with varying functional groups. This study employed cytotoxicity  
41  
42 assays, transcriptomics and proteomics to assess their toxicity using NR8383 rat alveolar  
43  
44 macrophages as an *in vitro* model. The study findings indicated that all MWCNT altered ribosomal  
45  
46 protein translation, cytoskeleton arrangement and induced pro-inflammatory response. Only  
47  
48 functionalized MWCNT alter mTOR signaling pathway in conjunction with increased *Lamtor* gene  
49  
50 expression. Furthermore, the type of functionalization was also important, with cationic MWCNT  
51  
52 activating the transcription factor EB and inducing autophagy while the anionic MWCNT altering  
53  
54 eukaryotic translation initiation factor 4 (EIF4) and phosphoprotein 70 ribosomal protein S6 kinase  
55  
56 (p70S6K) signaling pathway as well as upregulation *Tlr2* gene expression. This study proposes that  
57  
58  
59

60  
61  
62  
63  
64  
65

26  
1  
27  
3  
4  
28  
6  
7  
29  
9  
10  
11  
30  
12  
13  
14  
31  
15  
16  
17  
32  
18  
19  
20  
33  
22  
23  
34  
25  
26  
35  
28  
29  
36  
31  
32  
37  
34  
35  
38  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
40  
43  
44  
45  
41  
46  
47  
48  
42  
50  
51  
43  
53  
54  
44  
56  
57  
45  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

MWCNT toxicity mechanisms are functionalization dependent and provides evidence that inflammatory response is a key event of carbon nanotubes toxicity.



46 **1. Introduction**

1  
47 Carbon nanotubes (CNT) are increasingly used in different sectors including the biomedical one due  
3  
48 to their distinctive properties. In the last few years, 736 metric tons of these CNT, were used for  
5  
49 energy and environmental applications, with these figures constantly increasing over time [1]. The  
6  
50 global market of CNT is estimated to grow from USD 4.55 billion in 2018 to an estimated USD 9.84  
8  
51 billion by 2023 [2]. Thus, exposure to CNT has become a major environmental issue and a potential  
10  
52 human health risk. The main route by which CNT enter the environment is through biomechanical  
12  
53 degradation or combustion of nanocomposites-based products leading to air contamination [3], [4].  
14  
54 Additionally, CNT can be used in water treatment to remove organic, inorganic and biological  
16  
55 pollutants from water which could potentially pollute aquatic ecosystems [5]. Furthermore, through  
17  
56 irrigation CNT can enter land to soil leading to plants contamination and subsequent incorporation  
18  
20  
57 into food chain and accumulation in water waste [6]. Currently, protective measures taken in  
21  
22  
58 response to potential CNT exposure are limited to specific equipment for workers with little progress  
23  
24  
59 reported on an environmental scale.  
25  
26  
27  
28  
29  
30

31  
60 Recently, several studies have focused on carbon nanotubes functionalization. It has been  
32  
33  
61 demonstrated that carboxyl and amino groups can be added endowing the CNT with new  
34  
35  
62 characteristics and subsequently making them suitable for more applications [7]. Carboxylic  
36  
37  
63 functionalization increases the solubility of CNT in comparison to non-functionalized pristine CNT  
38  
39  
64 thus aiding in developing nanocomposites of high quality and distinctive optical properties [8].  
40  
41  
65 Moreover, it enhances the CNT electrical conductivity and thermal stability to obtain, for example,  
42  
43  
44  
66 a better conductive cotton textile [9]. Carboxylated CNT are suggested to be used in different  
45  
46  
67 products ranging for biomedical and therapeutic applications, such as gene delivery, cancer diagnosis  
47  
48  
68 and vaccination [10], [11], [12]. Likewise, amino-functional groups anchored to CNT also enable  
49  
50  
69 numerous applications because of their specific chemical characteristics such as high electron  
51  
52  
70 donation capacities and enhanced nucleophilicity. These amino-CNT are used for biosensor  
53  
54  
71 fabrication, electrocatalysts and nanocomposites preparation, and metal ions absorption [13].  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

72 Additionally, it has been shown that the attachment of amino-functional groups to CNT can promote  
1 CNT uptake by cells, which has led to the potential use of functionalized CNT as drugs carriers.  
3  
4 Given the variety of applications that functionalized CNT possess, studies have been conducted to  
5 understand the impact of this functionalization on their toxicity. Zhou et al., demonstrated that COOH  
6 functionalizing reduced CNT cytotoxicity in human lung cancer cells (A549), in comparison to the  
7 pristine form, proposing that carboxyl group increased their degree of aggregation [14]. This decrease  
8 in CNT toxicity following carboxyl functionalization has been confirmed by several studies  
9 performed in A549 human lung cancer cells [17] and RAW264.7 macrophages [18, 19]. Studies have  
10 hypothesized that this decrease can be related to the increase of NPs aggregation [17, 18], or to the  
11 increase of CNT biodegradability [19]. Furthermore, Jang *et al.* demonstrated that carboxylate CNT  
12 trap toxic lead ions which reduce their cytotoxicity induced in *Daphnia magna* [15]. However, it is  
13 important to note that there are contradictory reports, with a study by Cinzia *et al.* showing that  
14 carboxyl functionalization induced a toxic response in BEAS-2B cells, with increased inflammatory  
15 response and cytotoxicity in comparison to pristine CNT exposure. This finding is supported by other  
16 studies showing that carboxylic functionalization enhanced CNT cytotoxicity in HUVEC [16] and  
17 H596 cells [17],[18] and increased DNA damage resulting in apoptosis and cell death in MCF-7 cell  
18 line [19], [20]. Importantly, the possible relevance of CNT amino functionalizing is characterized  
19 worse. To date, it has been reported that there is no difference in cytotoxicity induced in fibroblasts  
20 between amino functionalized and pristine CNT [21]. There might even be a mitigation of the toxicity  
21 induced by pristine CNT in Raw264.7 macrophages and PC12 cells [22]. Given the different  
22 endpoints which seems to be particular to each cell type and suggesting that macrophages could be  
23 more sensitive than other cells like epithelial ones, it would be interesting to focus on how  
24 functionalizing is critical for phagocytic cells. It is clear that functionalization could be one of the  
25 most relevant determinants of CNT toxicity and reinforces the urgent need for further investigations  
26 into the toxic effect of these functionalized CNT. Among all types of CNT, we can also distinguish  
27 monolayer CNT, called single walled carbon nanotubes (SWCNT) and multilayer CNT, called multi  
28 walled carbon nanotubes (MWCNT). In this study we focus on understanding the toxicity  
29 mechanisms caused by differential functionalization among three MWCNT: NM403 (non-

functionalized pristine), NRCWE-042 (anionic, functionalized -COOH) and NRCWE-049 (cationic, functionalized -NH<sub>2</sub>). Most of inhaled nanoparticles are trapped in the pulmonary alveolar region of rats, and they are principally in contact with macrophages, the first and primary cell types that process nanoparticles, mediating host inflammatory and immunological biological responses [23], [24]. Therefore, it was interesting to use NR8383 rat alveolar macrophage cell line for this study. These cells have been commonly used to predict CNT effects in the respiratory tract [25], [26] but to our knowledge, it is the first use aiming to study CNT functionalization effects. In addition, taking into consideration the similarity of rat and human genome, these data focusing on genes expression variation due to carbon nanotubes exposure, can be concluding for humans.

## 2. Experimental

### 2.1. Cell culture

NR8383 rat alveolar macrophages were purchased from American Type Culture Collection (ATCC® CRL2192™; Manassas; USA). Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM, high glucose [27], [28] (Sigma-Aldrich; St. Louis; USA), supplemented with 15 % Fetal Bovine Serum, FBS (Sigma-Aldrich; St. Louis; USA), 100 U/ml penicillin and 100 g/ml streptomycin, 4 mM L-glutamine and 0.25 µg/mL of amphotericin B (Sigma-Aldrich; St. Louis; USA). Cells were cultured at 37°C in humidified chamber with 5% CO<sub>2</sub>. NR8383 cells were passaged every 3 days.

### 2.2. Nanomaterial dispersion and characterization

#### 2.2.1. Nanomaterials

NM403 were obtained from Joint Research Centre, JRC, (Italy) while NRCWE-042 and NRCWE-049 were obtained from the National Research Centre for the Working Environment, NRCWE, (Denmark) *via* SmartNanoTox project partners. The physical and chemical properties and purity percentage of these MWCNT are indicated in **Table 1**. The MWCNT were suspended in DMEM medium supplemented with 2% FBS at a concentration of 2mg/mL and sonicated with probe

sonicator cooled on ice water (Philip Harris Scientific; Lichfield; UK) using different dispersion settings as it shown in **Table 1**. Preliminary experiments showed that the stability of the preparation was up to 48 h . All experiments were realized immediately after sonication to ensure a good dispersion of the MWCNT.

Name	MWCNT type	Length <sup>a</sup> (nm)	Diameter <sup>a</sup> (nm)	Specific surface <sup>a</sup> (cm <sup>2</sup> /cm) <sup>2</sup>	Probe (mm)	Amplitude	Time (min)	Z- average <sup>b</sup> (nm)	Zeta Potential	Pdi <sup>b</sup>	Purity (%) <sup>c</sup>
NM403	Pristine	400	12	135	11	10	15	217.2 ± 70.3	-13.005 ± 0.025	0.383 ±0.013	>90
NRCWE-042	Functionalized -COOH	723	21	141	5	30	15	210.5 ± 45.2	-28.125 ± 0.307	0.279 ±0.019	>95
NRCWE-049	Functionalized -NH2	731	14	199	5	30	20	210.4 ± 81.3	+7.021 ± 0.563	0.466 ±0.025	>99

**Table 1:** Dispersion conditions and MWCNT properties provided by supplier (a) and measured using DLS (b), in addition to purity retrieved from literature (c)[29].

### 2.2.2. Particle size and Zeta potential

The measurements of hydrodynamic diameter average, polydispersity index, PDI, and zeta potential of the nanomaterials with the principle of dynamic light scattering, DLS, were performed with Malvern Nano Zetasizer (Malvern Inc.; Worcs; UK). MWCNT concentration retained for DLS measurement was 200 µg/ml.

### 2.2.3. TEM characterization

143 For transmission electron microscopy, TEM, 50  $\mu\text{l}$  of CNT (NRCWE-042 and NRCWE-049)  
144 suspension was deposited onto a carbon-coated copper grid. After drying, the sample was negatively  
145 stained by uranyl acetate (3%) in deionized water. Preparations were observed using a CM12  
146 Microscope (Philips; Amsterdam; The Netherlands) operated at 80 kV. CNT diameter was  
147 determined by observing 114 particles for each MWCNT. Representative TEM images for NM403  
148 have been shown in a previous study [30]

### 149 2.3. Cytotoxicity Assay

#### 150 2.3.1. Viability test (WST-1)

151 WST-1 assay was performed as previously described [30]. Briefly, NR8383 cells were seeded in 96  
152 well-plate with  $5 \times 10^3$  cells/100  $\mu\text{l}$ /well and were grown at 37 °C under a 5 %  $\text{CO}_2$  atmosphere in  
153 humidified incubator overnight. The following day the plate was centrifuged (800  $\times g$ , 10 minutes)  
154 and the medium was removed. Following this, the cells were exposed for 24h to different  
155 concentrations of carbon nanotubes 6.25, 12.5, 25, 50, 100 and 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  that correspond  
156 respectively to 2.5, 5, 10, 20, 40, 80  $\text{cm}^2/\text{cm}^2$  (NP surface/Cell surface) for NM403; 3, 5.5, 11, 21.5,  
157 43, 86  $\text{cm}^2/\text{cm}^2$  for NRCWE-042 and 4, 7.5, 15, 30, 60, 120  $\text{cm}^2/\text{cm}^2$  for NRCWE-049. These  
158 exposures were performed in DMEM media without FBS. The cells were then incubated with 5  $\mu\text{L}$   
159 of WST-1 Cell Proliferation Reagent (Roche; Boulogne; France) for 2 hours at 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ . The  
160 absorbance was measured using iMark™ Microplate Reader (BIO-RAD Laboratories; Osaka;  
161 Japan) at 450 nm. Based on WST-1 results, the inhibitory concentration,  $\text{IC}_{50}$ , was calculated  
162 according to Reed and Muench formula [31].

#### 163 2.3.2. Lactate dehydrogenase (LDH) cytotoxicity assay

164 The assay was performed using the LDH Cytotoxicity Detection Kit (Roche; Boulogne; France).  
165 Cells were seeded in 96 well-plate with 5000 cells/100 $\mu\text{l}$ /well and treated in the same manner as  
166 described for the viability assays. The assay was conducted following the manufacturer instructions.  
167 A lysis solution of 10% triton serves as positive control. LDH activity in the supernatant was  
168 quantified using an iMark™ Microplate Reader (BIO-RAD Laboratories; Osaka; Japan) at 490 nm

wavelength and 630 nm as reference wavelength. Medium and lysates were used as negative and positive control, respectively.

#### 2.4. RNA Extraction

RNA extraction was performed as previously described [32]. Briefly, following NR8383 cells exposure for 4 hours to  $\frac{1}{4}$  IC<sub>50</sub> of each MWCNT (0.8 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup> for NM403, 6.8 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup> for NRCWE-042 and 1.2 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup> for NRWE-049), supernatants were collected for cytokine array assay and the membranes were disrupted by adding 1 ml of Trizol Extraction Reagent (OMEGA Bio- Tek; Guangzhou; China), followed by the addition of 200  $\mu$ L of chloroform (Carlo Erba reagents; Normandie; France). Samples were centrifuged at 800 g for 15 minutes. Then, 500  $\mu$ L of Isopropanol (Carlo Erba reagents; Normandie; France) were added to 350  $\mu$ L of supernatant. The precipitates were subjected to 2 washing steps with 80% ethanol and incubated for 10 minutes at 60°C to remove ethanol, followed by dissolution in 35  $\mu$ L RNase-free water. All RNA samples were of high purity and integrity, as demonstrated by A260/A280 ratios greater than 2 as displayed by BioSpec-nano Spectrophotometer (SHIMADZU; Kyoto; Japan), RNA integrity numbers were above 9.0 checked by RNA 6000 Nano Reagents Kit using Bioanalyzer™ 2100 (Agilent Technologies; Waldbron; Germany).

#### 2.5. Microarray hybridization

Microarray were prepared as previously described [33]. Briefly, 100 ng of RNA from each sample was labeled with cyanine 3-CTP using Low Input Quick Amp Labeling assay™ (Agilent Technologies; Waldbron; Germany) according to the manufacturer's protocol. Labeled cRNAs were purified and hybridized onto Agilent G4853A SurePrint G3 Rat version 3 GE 8\*60K microarrays (Agilent Technologies; Waldbron; Germany) allowing a full coverage of the rat transcriptome. Microarray slides were scanned on an Agilent G2505C microarray scanner™ with a 3 $\mu$ m resolution.

## 2.6. Pathway analysis of microarray data

### 2.6.1. Gene Expression Omnibus (GEO) database

Raw intensity data were extracted using Agilent Feature Extraction Software version 11.0. Experiments were performed according to MIAME standards [34]. This data have been uploaded to the NCBI Gene Expression Omnibus database [35].

### 2.6.2. GeneSpring

Microarray data were normalized by means of ANOVA unequal variance [36] using GeneSpring software version 11.0 (Silicon Genetics; Redwood City; California). Genes that met criteria of  $p < 0.001$  and  $\geq 1.5$ - fold change (FC) of expression were considered as differentially expressed at a significant level.

### 2.6.3. Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

The data was analyzed by Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Ingenuity Systems, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)), which predicts canonical pathways which are changing based on gene expression ( $FC > 1.5$ ;  $FC > 3$ ;  $FC > 6$ ), as well as identifying upstream regulators which drive changes in gene expression. Finally, IPA can identify diseases or functions related to these gene changes. Venn diagrams were created comparing the significant genes across the three different treatment groups (NM403, NRCWE-042 and NRCWE-049). The data was also analyzed using DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray analysis (<https://david.ncifcrf.gov/>) and String (<https://string-db.org/>), which creates functional protein association networks.

## 2.7. Proteomic Analysis

In order to know if genes expression variations due to CNT exposure will be extrapolated also at the protein level, thus modifying cell final phenotype, a proteomic analyses was performed. Principally, proteomic data was used to validate certain transcriptomic endpoints (such persistence of

inflammatory response or DNA damage) after 24h taking onto consideration the duration of translation process.

### 2.7.1. *Single-pot solid-phase-enhanced sample preparation (SP3) for whole cell proteomics*

The so called SP3 method was employed to analyze the NR8383 macrophage cells global proteome [37]. Both hydrophobic and hydrophilic Sera-Mag Speed Bead Magnetic carboxylate modified particles were employed in a 1:1 (v/v), (GE Healthcare; Illinois; USA), preparing the beads for use by rinsing them in MS water (Fisher Scientific, Cat # 10777404) twice before final reconstitution in a volume of MS water equal to the starting volume [37]. The reconstituted beads can be stored at 4 °C until required. The SP3 digest was performed according to the protocol of Hughes. In brief, cell pellets were resuspended in 100 µl lysis buffer: 6M urea, 2M thiourea, 50mM MOPS. The lysates were reduced and alkylated in 5 µl 0.2M 1,4-dithiothreitol (DTT) (Sigma Aldrich, St. Louis; USA) and 5µl of 0.4M iodoacetamide (IAA) (Sigma Aldrich, St. Louis; USA), respectively. After reduction and alkylation, 100% acetonitrile (Sigma Aldrich, St. Louis; USA ) was added to each sample to a final concentration of 70% acetonitrile. Next, 10 µL of the prepared bead mix was added to the lysate and samples were rotated at room temperature for 18 minutes. Subsequently, beads were immobilized by incubation on a DynaMag-2™ stand (Thermo Fisher,Oslo; Norway) for two minutes. The supernatant was discarded, and the beads were washed with 70% (v/v) ethanol, and 100% acetonitrile. Beads were resuspended in 50 µl of 50 mM ammonium bicarbonate (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) (Sigma Aldrich, CAT # 09830-500G), supplemented with sequence grade trypsin (Promega; Madison WI; USA) at an enzyme-to-protein ration of 1:25 (w/v). After overnight hydrolysis at 37 °C, the beads were vortexed gently and an additional 8 µl of the prepared bead slurry was added to each sample and rotated for 18 min atRT. The beads were immobilized by incubation on a DynaMag-2™ stand, washed once with 50mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> and 100% acetonitrile. Peptides bound to the beads were eluted using MS grade water with intermittent vortexing for 5 minutes, centrifuged at 15,000 rcf at 4 °C for 15 minutes. The beads were immobilized and the supernatant containing purified peptides was transferred into MS vials and acidified by adding 2 µl of acetic acid. Samples were stored at 4 °C until analysis by mass spectrometry.



### 2.7.2. *Filter Aided Sample Preparation (FASP) of supernatants for proteomics*

Supernatants were obtained from experiments exposing NR8383 cells to the three different MWCNT. Protein content was determined using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific; Waltham, USA). Filter-aided sample preparation, FASP, was performed as previously described [38]. Briefly, 50 µg protein was reduced by adding DTT to a final concentration of 0.1 M DTT. Samples were mixed with 8 M urea in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.9 (UA buffer) and loaded onto ultracentrifugation units of nominal molecular weight cutoff 10.000 (Sartorius Stedim Biotech; Gottingen; Germany). Traces of detergents were removed by washing the samples twice with UA buffer. Proteins were alkylated with iodoacetamide prepared in UA buffer and the samples were incubated in the dark at room temperature for 20 minutes. The filter units were washed twice with 50 mM, NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, and the filter units were transferred to fresh collection tubes. Proteins were hydrolysed overnight at 37 °C using sequence grade trypsin (Promega, Madison WI, USA) at an enzyme-to-protein ratio of 1:50 (w/w). Peptides were recovered by centrifuging the filter units, then washing the filters once with 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> and repeating the centrifugation, combining the flow-throughs. The samples were measured on a NanoDrop 2000 spectrophotometer™ to calculate the protein concentrations. Twenty µg of the tryptic digests were loaded separately and desalted on C18 Stage tip as described by Rappsilber [39]. Following elution of the peptides from the Stage tip the samples were lyophilized in a CentriVap Concentrator with open caps for approximately 10-15 minutes, until approximately 5 µl volume remained. The remaining sample was resuspending in trifluoroacetic acid, TFA, solution. The sample was placed in mass spectrometry vials and stored at 4 °C until analysis by mass spectrometry.

### 2.7.3. *Mass Spectrometry Settings*

Each treatment was run with four biological replicates which were then run with two technical replicates on a Thermo Scientific Q Exactive mass spectrometer connected to a Dionex Ultimate 3000 (RSLCnano™) chromatography system. Each sample was loaded onto a fused silica emitter (75 µm ID), pulled using a laser puller, Sutter Instruments P2000™ (Novato; CA; USA), packed with Reprosil Pur™ (Dr Maisch, Ammerbuch-Entringen, Germany), C18 (1.9 µm; 12 cm in length)

reverse phase media and were separated by an increasing acetonitrile gradient over 90 minutes at a flow rate of 250 nL/min direct into a Q-Exactive MS. The MS was operated in positive ion mode with a capillary temperature of 320 °C, and with a potential of 2300 V applied to the frit. All data was acquired while operating in automatic data dependent switching mode. A high resolution (70,000) MS scan (300-1600 m/z) was performed using the Q Exactive™ to select the 12 most intense ions prior to MS/MS analysis using high-energy collision dissociation, HCD.

#### 2.7.4. Maxquant analysis of mass spectrometry data

Proteins were identified and quantified by MaxLFQ [Cox 2014] by searching with the MaxQuant version 1.5. Modifications included C carbamylation (fixed) and M oxidation (variable). The resulting data was then analysed using online platforms such as String and PANTHER.

#### 2.8 Cytokine array:

In order to verify the induction of inflammation by these MWCNT, at a protein level, a cytokine array was prepared. Supernatants from exposed cells stored at -80°C were analysed using Proteome Profiler Rat XL Cytokine array™ (R&D Systems Europe, Abingdon, UK) according to manufacturer's instructions. The supernatants corresponding to cells exposed to the ¼ IC50 of each MWCNT as well as a negative control (unexposed cells) were analysed. This corresponds to 0.8 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup> for NM403, 6.8 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup> for NRCWE-042 and 1.2 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup> for NRCWE-049. Briefly, after blocking the membrane, supernatants (four biological replicates are pooled to get enough signal) were incubated with the membrane for 2 hours at room temperature under smooth agitation. After washing, the membrane was incubated with a mixture of diluted biotinylated antibodies for 1 hour at room temperature under smooth agitation. After washing, the membrane was incubated with a solution of diluted streptavidin-horseradish Peroxydase for 30 minutes at room temperature under smooth agitation. Finally, after washing, a mixture of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and luminol was added for chemiluminescence reaction. Revelation was performed on a ChemiDoc Touch™ (BioRad, Strasbourg, France). Densitometric analysis was performed on ImageLab™ (BioRad, Strasbourg, France).

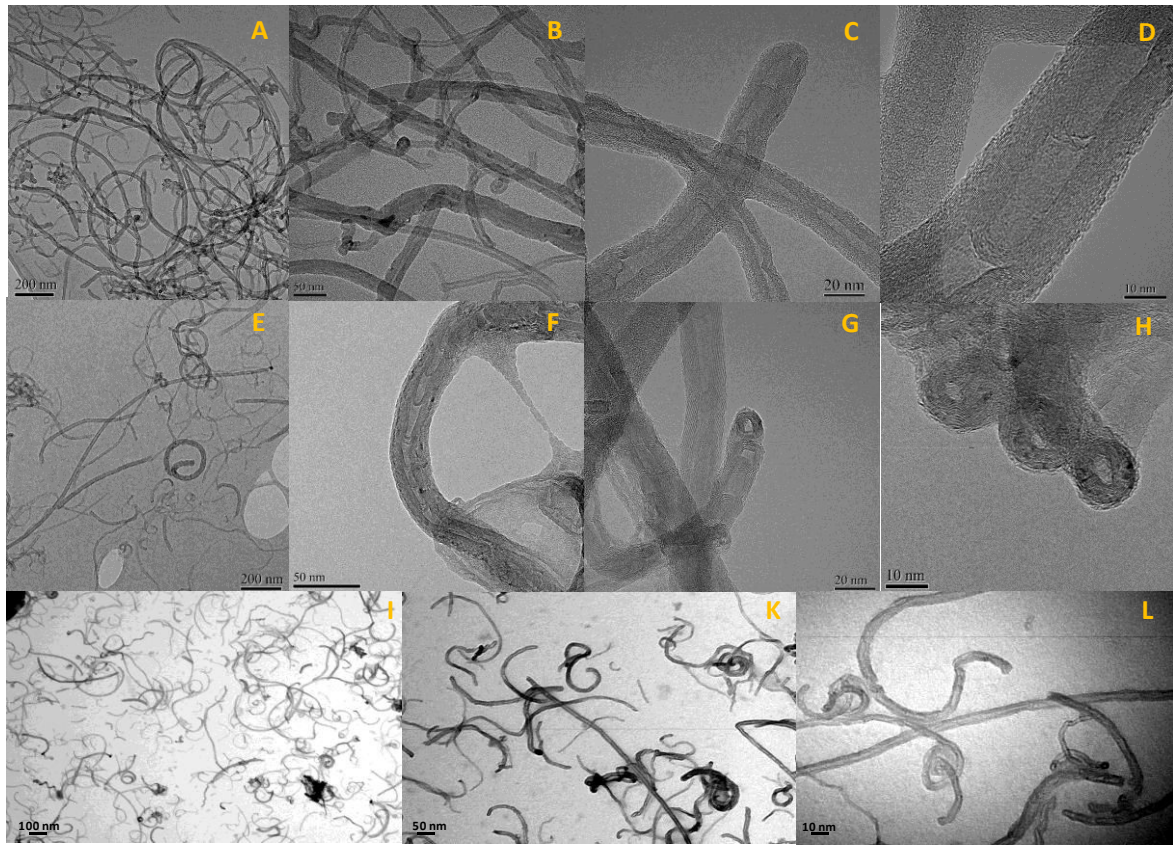
300  
1  
2  
301  
3  
4  
302 2.7.5. *Statistical Analysis*  
5  
6  
7

303 Four biological replicates were used for each experiment. Statistical differences were determined by  
8  
9  
304 one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey–Kramer test (Dunnett’s test) for cell  
10  
11  
305 viability.  
12  
13  
14

15  
306 **3. Results**  
16  
17

18  
307 3.1. Nanoparticle characterization  
19  
20

21  
308 MWCNT mean hydrodynamic diameters, zeta potential and polydispersity index, determined by  
22  
23  
309 DLS were shown in **Table 1**. All MWCNT studied in the media with 2% FBS displayed similar Z-  
24  
25  
310 average. The length calculated by TEM was  $750 \pm 150$  nm for NRCWE-042 and  $600 \pm 100$  nm for  
26  
27  
311 NRCWE-049 and  $300 \pm 90$  nm for NM403 [30] (**Figure 1**).  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



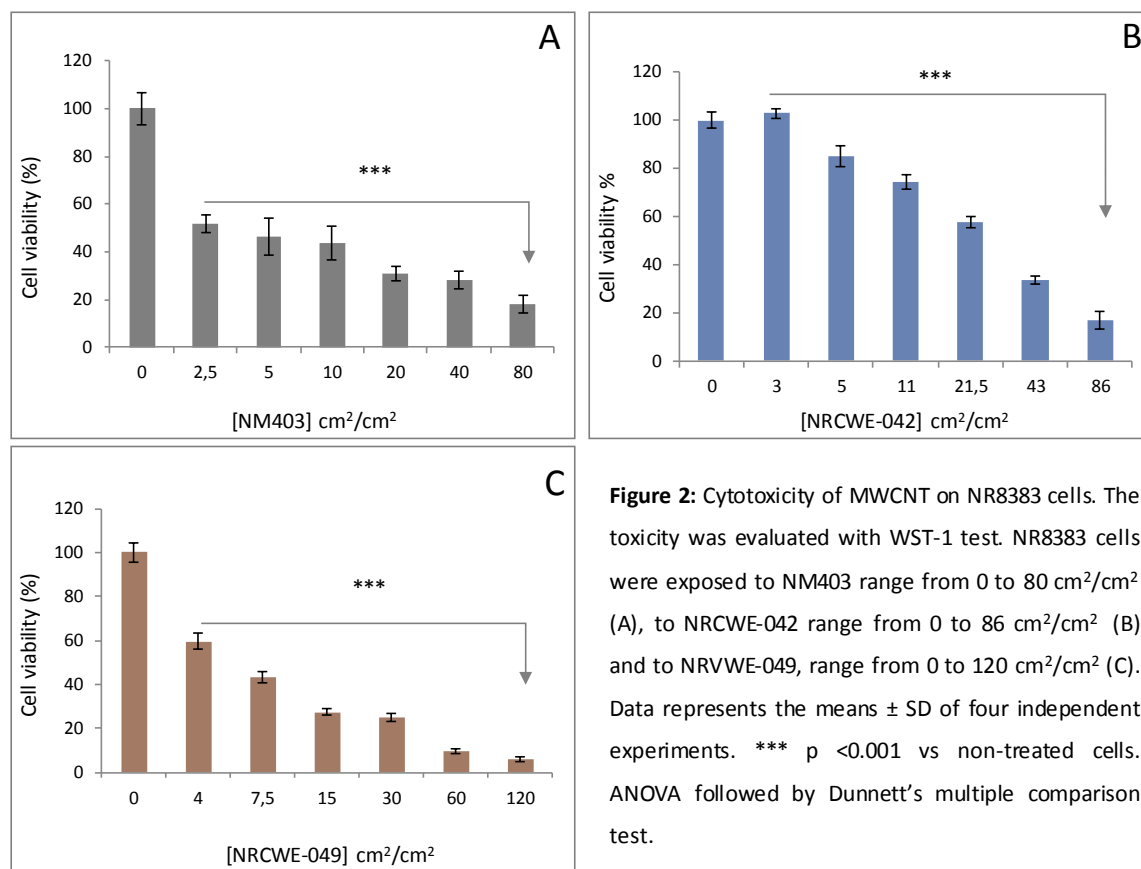
**Figure 1:** Transmission electron microscopy for NRCWE-042 (A, B, C, D), NRCWE-049 (E, F, G and H) and NM403 (I, K and L).

### 3.2. Cell viability

The half maximal inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) were calculated with WST-1 assay,  $IC_{50}$  of NM403, the non-functionalized MWCNT, and the amino-group functionalized CNT NRCWE-049 were found to be similar,  $3.2 \text{ cm}^2/\text{cm}^2$  and  $4.8 \text{ cm}^2/\text{cm}^2$ , respectively. However, the  $IC_{50}$  for the carboxylated CNT (NRCWE-042) was shown to be much higher at  $27.2 \text{ cm}^2/\text{cm}^2$  (**Figure 2**). The  $IC_{50}$  determined in this assay were utilized to calculate the doses to be employed in the transcriptomics study, which was set at  $\frac{1}{4} IC_{50}$ .

Assessment of cytotoxicity by means of the LDH assay showed that only NM403 induced loss of NR8383 cell membrane integrity following a 24 hour exposure period. A significant increase of 12.5

325 % and 20 % of LDH release was evidenced respectively at 10 and 20  $\text{cm}^2/\text{cm}^2$  doses (**data not**  
326 **shown**).

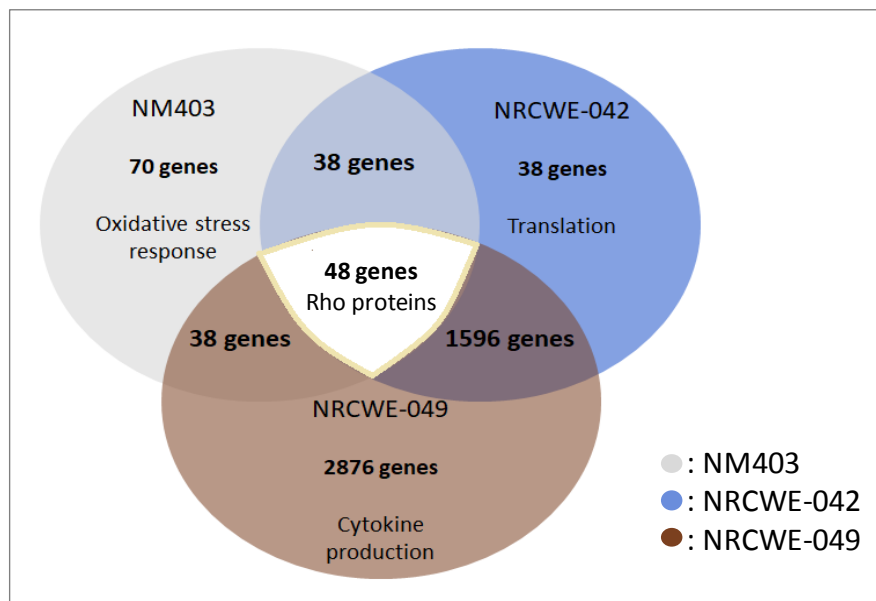


**Figure 2:** Cytotoxicity of MWCNT on NR8383 cells. The toxicity was evaluated with WST-1 test. NR8383 cells were exposed to NM403 range from 0 to 80  $\text{cm}^2/\text{cm}^2$  (A), to NRCWE-042 range from 0 to 86  $\text{cm}^2/\text{cm}^2$  (B) and to NRCWE-049, range from 0 to 120  $\text{cm}^2/\text{cm}^2$  (C). Data represents the means  $\pm$  SD of four independent experiments. \*\*\*  $p < 0.001$  vs non-treated cells. ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test.

### 3.3. Transcriptomic Study

330 In order to study gene expression variation after exposure to the functionalized MWCNT and to  
331 understand toxicity mechanism induced by these CNT, a transcriptomic study was performed. The  
332  $\text{IC}_{50}$  determined according to WST-1 assay were utilized to determine the dose to be employed in the  
333 transcriptomics study, namely at  $\frac{1}{4} \text{IC}_{50}$ , a subtoxic dose that allowed to study the primary responses  
334 directly related to the exposure to these CNT, and in order to identify initiating key events leading to  
335 their toxicity. Transcriptomic analysis showed significant genes expression modifications following  
336 exposure to each of these 3 nanoparticles with significant variations between them (**Figure 3**).

Functionalized NRCWE-049 and NRCWE-042 provoked a higher number of deregulated genes compared to non-functionalized NM403: respectively 6049 > 3388 > 245 genes at a FC cut-off level of 1.5.



**Figure 3:** Venn diagrams based on transcriptomic analysis results showing the number of common genes dysregulated (46) after NR8383 cells exposure to three MWCNT and the number of genes specific to each exposure at fold change,  $FC \geq 1.5$  (70 for NM403, 38 for NRCWE-042 and 2876 for NRCWE-049). The main biological process (Gene ontology) common a specific for MWCNT studied were presented (DAVID analysis).

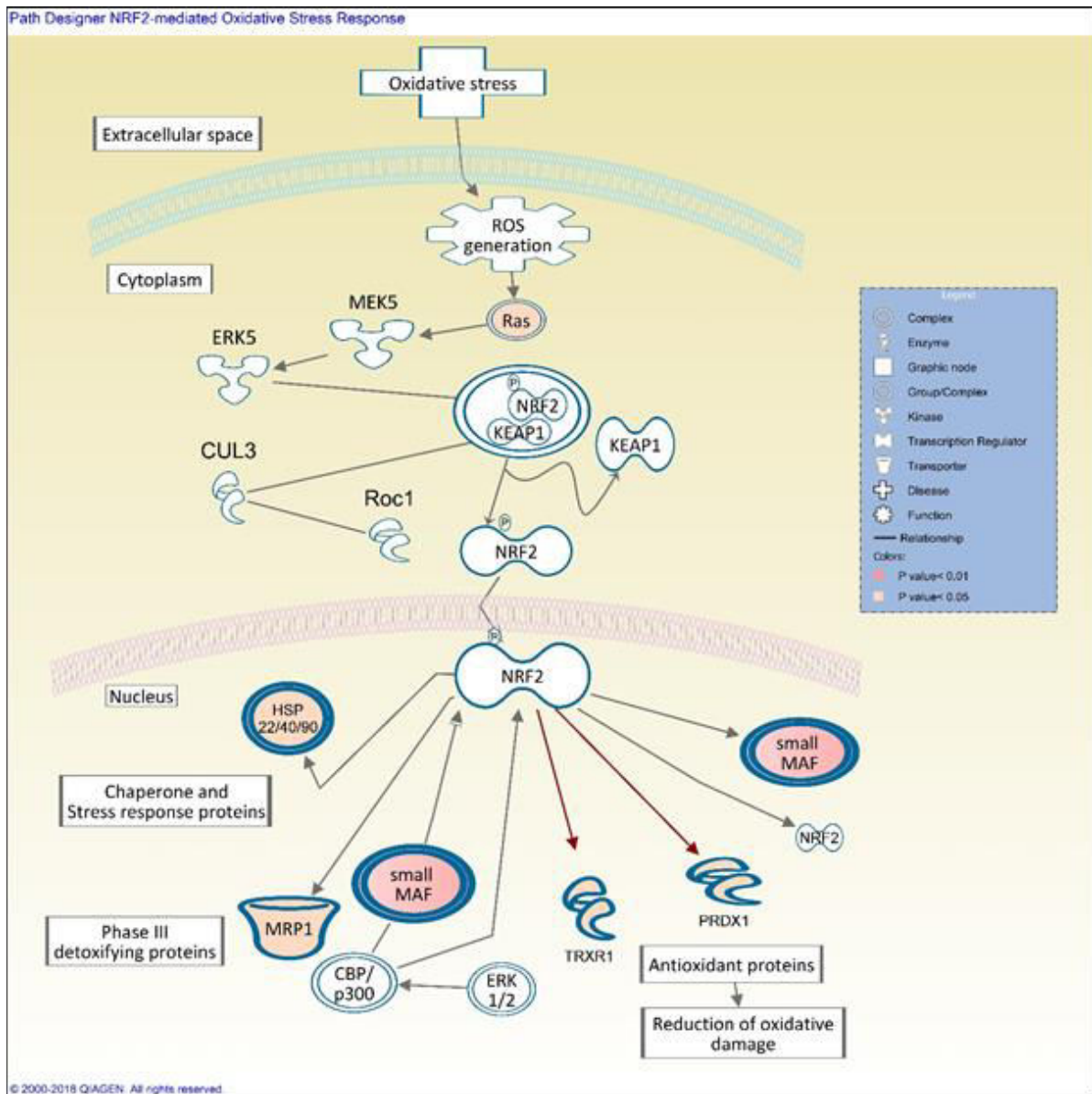
Common Pathways	Differentially regulated Pathways		
	NM403	NRCWE-042	NRCWE-049
No common pathway between 3 MWCNT	Role of Brca1 in DNA damage	Common	
	Atm signaling	Mitochondrial dysfunction	
	Vitamin-C Transport	EIF2 signaling	
	Cell cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation	Sirtuin signaling	
		Oxidative phosphorylation	

	Nrf2 mediated oxidative stress response	Different	
		Regulation of eIF4 and p70S6K signaling	mTOR signaling

No common deregulated pathway was identified for the three MWCNT based on Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software (**Table 2**). Pathways presented in this table and discussed in this study were the top enriched group of genes.

**Table 2:** Gene expression analysis by IPA software at  $FC \geq 1.5$  and P value  $< 0.001$  showing the top canonical pathways for each of MWCNT studied. Transcriptomic study was performed using NR8383 cells exposed to  $\frac{1}{4}$   $IC_{50}$  of each MWCNT for 4h (N, number of biological replicates=4). The table shows common and differentially regulated pathways between three CNT.

For NM403, the nuclear factor erythroid 2–related factor 2 (NRF2) oxidative stress response pathway (**Figure 4**) was activated and the breast cancer gene 1 (*Brcal*) involved in DNA damage response pathway was inhibited (**Ann.1**).

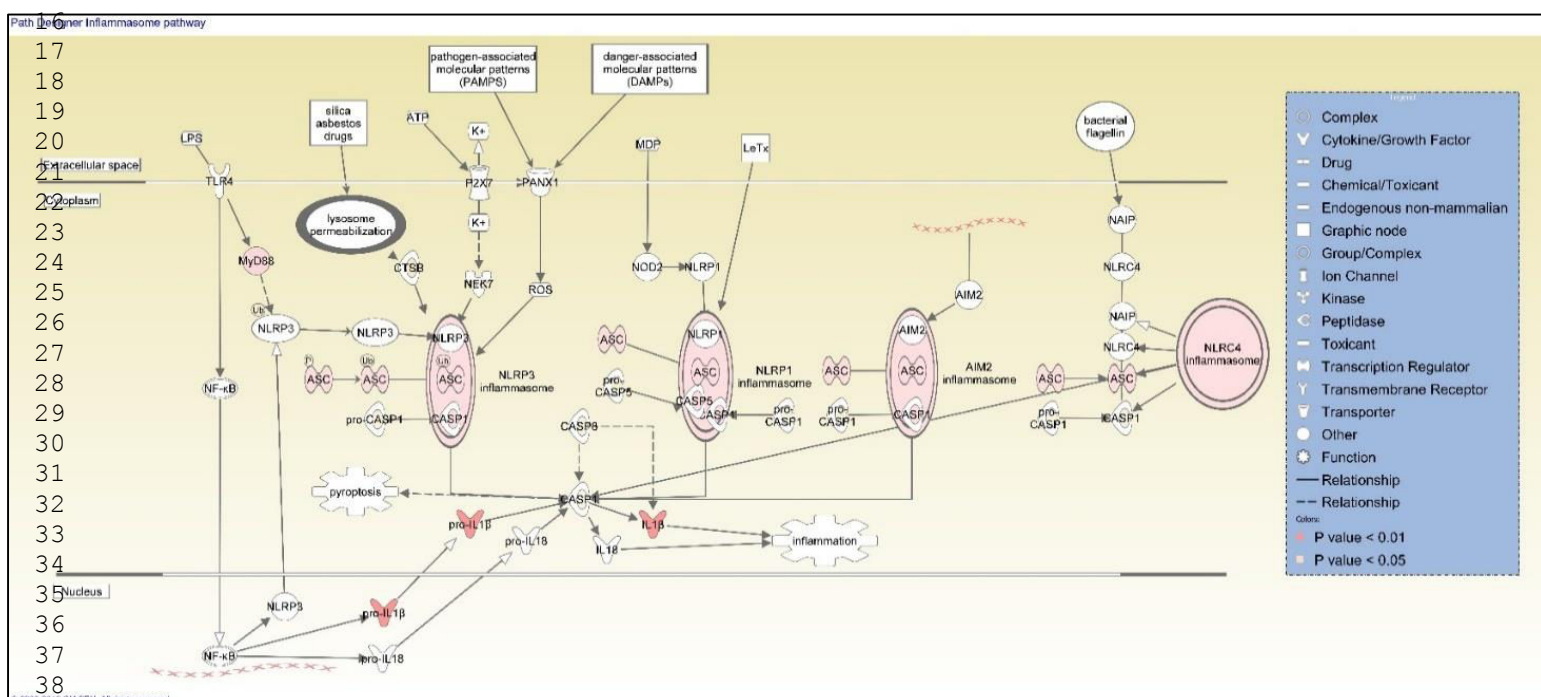


**Figure 4:** Gene expression analysis by IPA software ( $FC \geq 1.5$  and  $P \text{ value} < 0.001$ ) showing nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) oxidative stress response path design activated in NR8383 cells after exposure to  $\frac{1}{4}$   $IC_{50}$  of NM403 for 4h. Only upregulated genes implicated in this pathway are shown. Double bold line means that we have a complex.

The top five canonical pathways commonly dysregulated in response to NRCWE-042 and NRCWE-049 ( $FC \geq 1.5$ ) included namely mitochondrial dysfunctions, eukaryotic initiation factor-2 (EIF2) signaling, sirtuin signaling and oxidative phosphorylation (**Table 2**). For NRCWE-049, inflammasome activation was identified among the top five canonical pathways (**Figure 5**).



366 The DAVID database was also used to analyze gene expression data that does not give information  
 367 on pathway relationship analyzed using IPA software but instead reveals significant clusters of genes.  
 368 From the DAVID analysis, among 48 common genes (Figure 3, Diagram 2, FC ≥ 1.5) the main  
 369 cluster was related to positive regulation of Rho protein signal transduction. Genes which were  
 370 differentially expressed between the three MWCNT were related to (i) oxidative stress response or  
 371 drug transmembrane transport for NM403, (ii) positive regulation of cytokine production for  
 372 NRCWE-049 and (iii) translation for NRCWE-042 (FC ≥ 1.5).



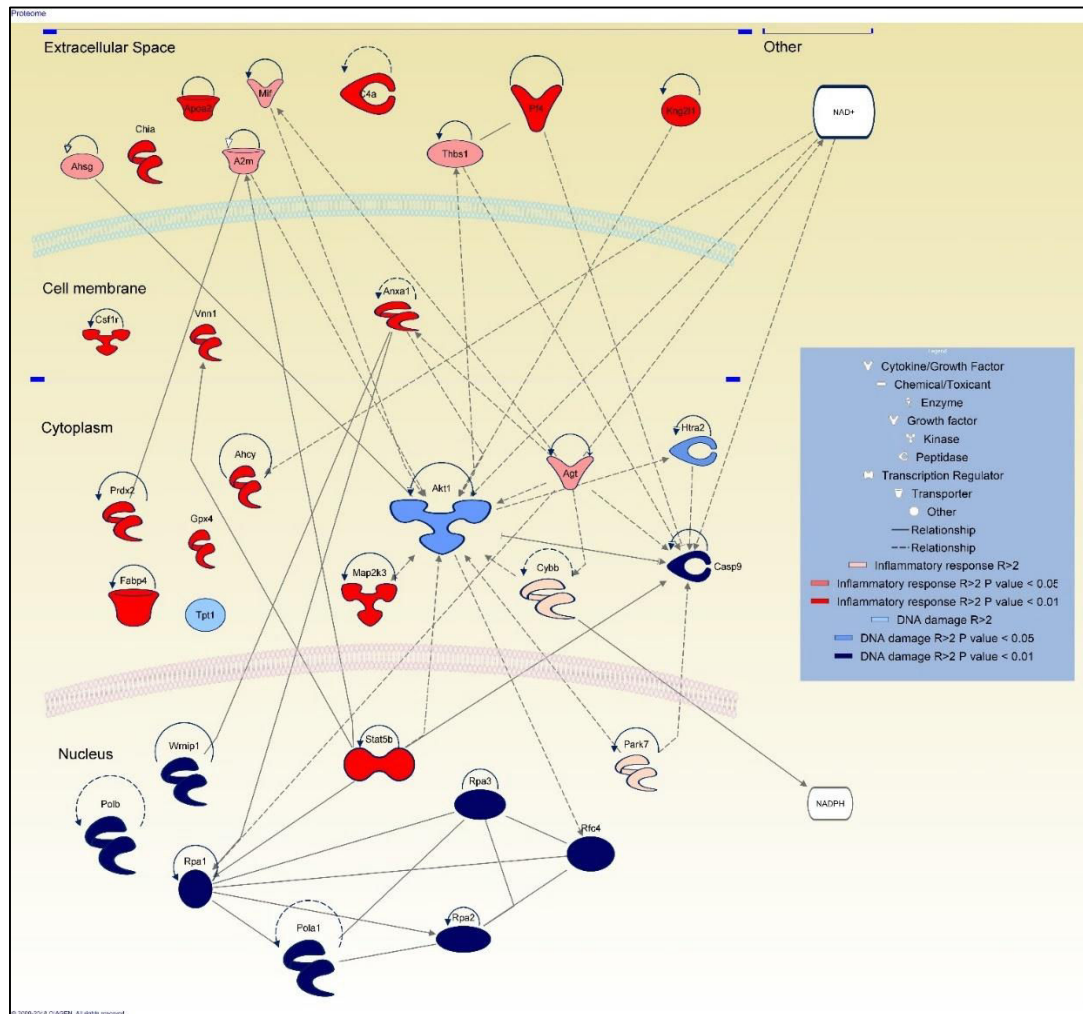
374 **Figure 5:** Inflammasome path as represented by IPA software (FC ≥ 1.5 and P value < 0.001) showing  
 375 upregulated genes after NR8383 cells exposure to ¼ IC<sub>50</sub> of NRCWE-049 for 4h.

### 376 3.4. Proteomic Study

#### 377 3.4.1. Whole Proteome analysis

378 In order to gain a better understanding of the effects of CNT exposure on the macrophage cells the  
 379 cytotoxicity and transcriptomics analysis was supplemented by a proteomic study. The analysis  
 380 indicated that the pathways identified in the transcriptomic analysis for NM403 were also shown to  
 381 be relevant by proteomic analysis. NM403 whole proteome and secretome study showed an increase

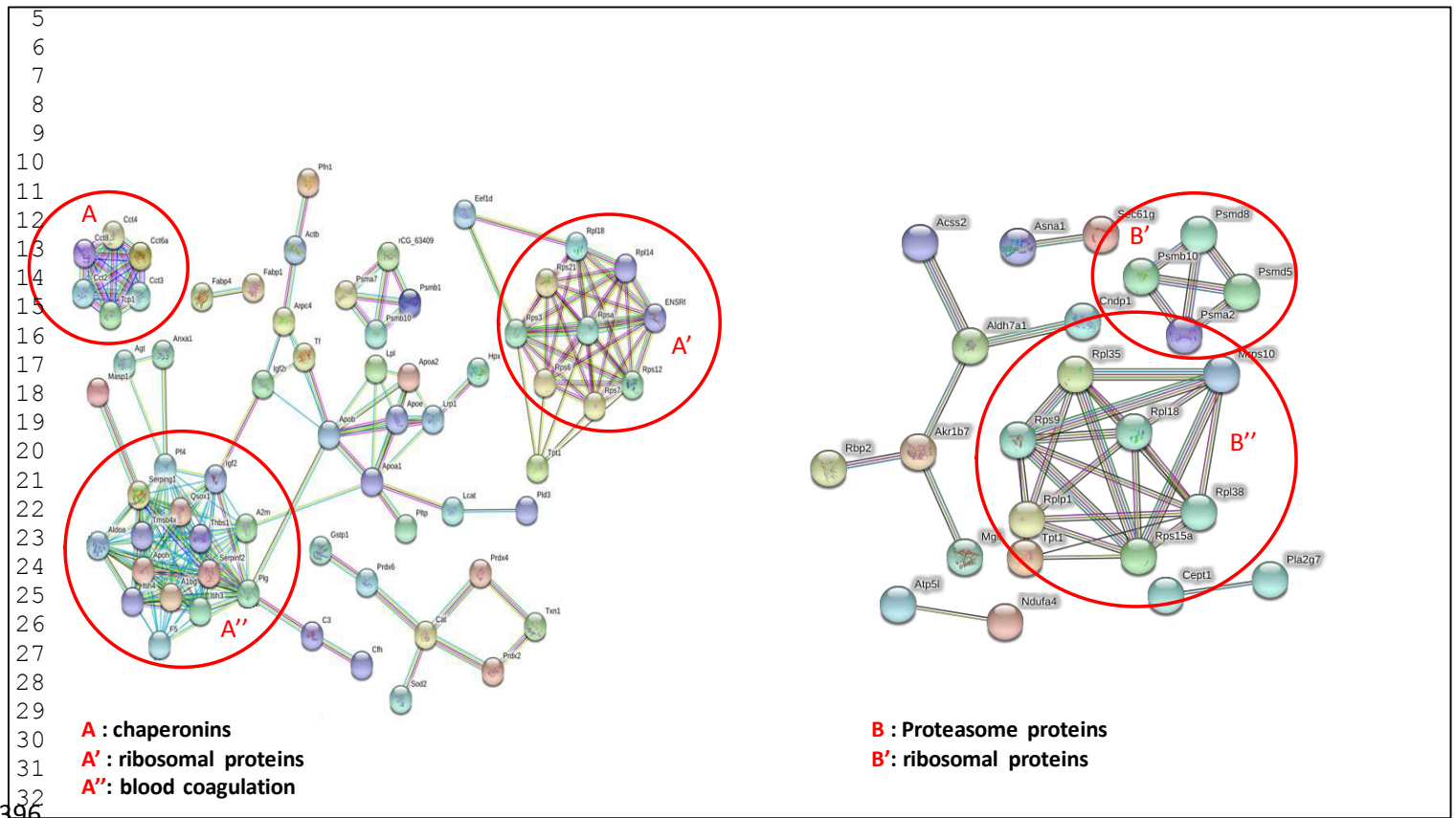
in protein synthesis related to inflammatory response, acute inflammation, chronic inflammation and DNA damage (**Figure 6**).



**Figure 6:** Supernatant and whole cell lysate proteins analyzed by IPA software. The stringency was fixed to R >2, show proteins which were implicated in DNA damage and inflammatory response. Proteomic study was performed using NR8383 cells exposed to 1/4 IC<sub>50</sub> of NM403 for 24h (N=4).

Vimentin was the most highly produced protein detected in the NR8383 cells supernatant. String analysis was performed at a high confidence setting using only the proteins identified in the supernatant which were shown to be increased two-fold greater in CNT exposed macrophages in comparison to the control cells (R>2). This analysis indicated the presence of several different subgroups within the protein network including chaperonins, *i.e.* CCT4, CCT8, CCT3; ribosomal proteins, *i.e.* RPS3, RPS12, RPL18; and blood coagulation proteins (**Figure 7**). Ribosomal proteins

were also observed to be increased in the whole cell proteomics analysis ( $R > 2$ ) in addition to proteasome proteins, *i.e.* PSMA2, PSMD8, PSMD5 (**Figure 7**).

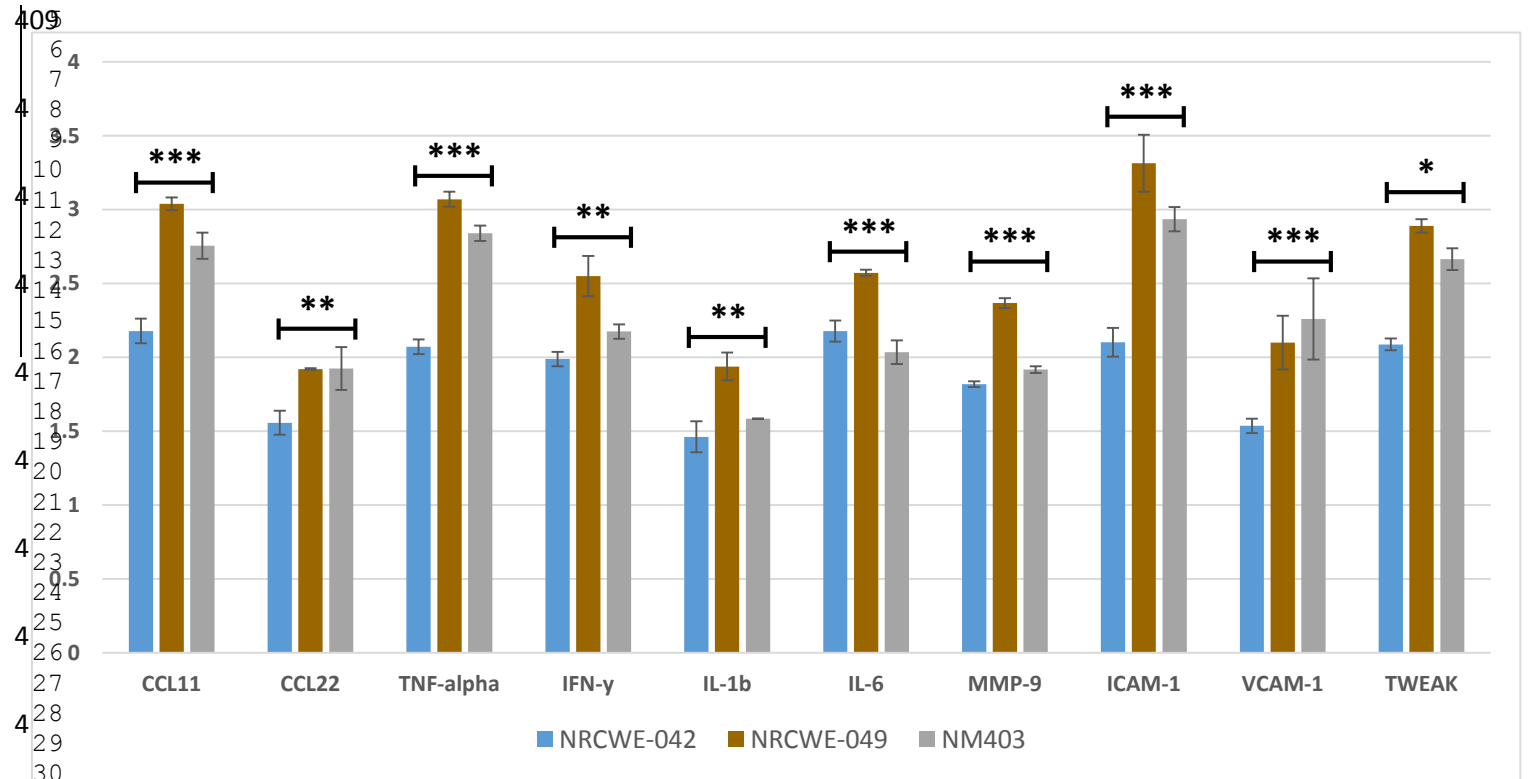


**Figure 7:** Supernatant and whole cell lysate proteins analysed by String database performed at high confidence ( $R > 2$ ) show main protein clusters: chaperonins, ribosomal protein, proteasome and blood coagulation proteins. Proteomic study was performed using NR8383 cells exposed to  $\frac{1}{4}$   $IC_{50}$  of NM403 for 24h (N=4).

### 3.5 Cytokine array

An analysis of 79 cytokine expression shows a global augmentation in the expression of different cytokines already expressed in our control. This result is observed after NR8383 exposure to each MWCNT. A group of the most produced cytokines was involved in inflammatory response and has been presented in figure 8 of which: CCL11, CCL22, IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ . By the way MMP-9, ICAM-1 and VCAM-1 were also overexpressed. Regarding results specific to each MWCNT used, a lower cytokine secretion level is observed for cells exposed to NRCWE-042

compared to NRCWE-049 or NM403. Cells exposed to NRCWE-049 gives highest cytokine secretion level for most of the studied cytokines.



**Figure 98:** Densitometric analysis relative to control of a group of proinflammatory cytokines (*CCL11*, *CCL22*, *TNF-alpha*, *IFN $\gamma$* , *IL-1b*, *IL-6*, *MMP-9*, *ICAM-1* and *VCAM-1*) from supernatant of cells exposed to  $\frac{1}{4}$ IC50 NRCWE-042, NRCWE-049 or NM403. TWEAK, a cytokine that could play a role in autophagy induction has been added. Densitometric analysis are compared to the control. Means are represented  $\pm$  SE. Statistics performed by ANOVA are only indicatives.

#### 4. Discussion

Each MWCNT studied employed in this study had similar Z-averages ( $212.7 \pm 65.6$ ) in DMEM medium supplemented with 2% FBS. It is well known that functionalized MWCNT agglomerate due to interactions with proteins [40], therefore both NRCWE-042 and NRCWE-049 required higher sonication amplitude to produce an adequately dispersed solutions (**Table 1**). The study shows that the carboxyl-MWCNT NRCWE-042 was less toxic than the pristine one NM403 and the amino-MWCNT one NRCWE-049 (**Figure 2**). These findings are in agreement with by Seyed Yazdan Madani *et al.*, demonstrated that HT29 cells exposed to carboxylic CNT expressed higher viability

431 than those exposed to pristine CNT [41]. This may be due to their interaction with acidic proteins,  
432 forming important aggregates which mitigate their toxicity [40]. Also, it can be due to a smaller  
433 diameter of pristine MWCNT NM403 and amino-MWCNT NRCWE-049 compared to the one of  
434 carboxyl-MWCNT NRCWE-042 [42]. For amino functionalization, studies have demonstrated no  
435 significant variation in toxicity in comparison to the pristine CNT form [21]. Also, a study by Loos  
436 *et al* demonstrated enhanced toxicity associated with CNT when functionalized with an amino group  
437 in comparison to a carboxyl group [43]. Therefore, it can be concluded that functionalization nature  
438 performed will have a significant impact on downstream toxicity. However, it is also important to  
439 note that the observed toxicity appears to be linked to the chosen *in vitro* model, as a work reported low  
440 levels of toxicity in PC12 cells in response to amino-MWCNT [22], in contrast to the high toxicity  
441 observed in three leukemia cell lines, THP-1, U-937 and HL-60, where the amino-CNT prevented  
442 cell proliferation [43]. As regards the pristine NM403, the cytotoxicity observed may be a result of  
443 short length compared to both NRCWE-042 and NRCWE-049 ones [44].

#### 444 *Common toxicity mechanism of MWCNT*

445 Functionalized MWCNT gene expression analysis highlighted an overexpression of genes  
446 related to inflammatory processes, including: *Cxcl2, Ccr12, Il6r, Il10ra, Il17re and Ilf2* for NRCWE-  
447 049 and *Ccl2 and Ccl4* for NM403, and *Irak2, Il7r, Il1b, Il1a, Socs3 and Ifit3* for NRCWE-042. For  
448 NM403, only proteomics analysis identified inflammatory proteins (**Figure 6**), including Anxa1,  
449 ApoA2, c4A, Chia, Gpx4, Kng211, MAP2K3, Prdx2, Stat5B and Vnn1 that were overexpressed  
450 ( $p < 0.01$ ) and A2m, Agt, Ahsg, Mif and Thbs1 ( $> two-fold$  increase,  $p < 0.05$ ). These findings are  
451 consistent with a previous study of our team that showed an overexpression of *TNFA* and *Il1b* in  
452 response to exposure to pristine MWCNT NM403 [30]. Otherwise, according to results obtained by  
453 cytokine assay, these cytokines were also secreted by rat alveolar macrophages NR8383 exposed to  
454  $\frac{1}{4}$   $IC_{50}$  of each MWCNT. Expression level augmentation has notably been observed for  
455 proinflammatory cytokines such as CCL11 and CCL22 (**Figure 9**) which are different chemokines  
456 needed to recruit cells populations from immune system [45].  $IFN\gamma$  and  $TNF\alpha$  also showed an  
457 increase in expression level, which are well known proinflammatory cytokines. However, a lower  
458  
459  
460  
461  
462  
463  
464  
465

458 increase of proinflammatory cytokine secretion was observed when cells were exposed to NRCWE-  
1 042 comparing to NRCWE-049 or NM403. This result is consistent with previous experiments  
459 3 underlining a lower toxicity of -COOH functionalized MWCNT. Therefore this study provides  
460 5 evidence that both functionalized and non-functionalized MWCNT induce inflammatory response,  
461 7 in agreement with a study by Pescatori *et al.* [46]. In addition to inflammatory processes, exposure  
462 8 of NR8383 rat alveolar macrophage cells to every MWCNT results in the deregulation of Rho  
463 10 proteins coding genes (**Figure 3**) and tubulin genes according to gene expression data (*Tuba1a*,  
464 12 *Tuba4a*, *Tubb6* and *Tubb2b*). Proteomic analysis confirmed the transcriptomics finding for pristine  
465 14 MWCNT NM403, identifying increased protein expression of proteins involved in Tubulin proteins  
466 16 synthesis, *i.e.* *Tubb4b*, *Tubb5a*, *Tub1ab*, as well as chaperonin proteins which are responsible for  
467 18 proper tubulin actin folding [47], *i.e.* *Cct2*, *Cct3*, *Cct4*, *Cct8*, showing that MWCNT may induce  
468 20 cytoskeleton disorganization (**Figure 7**). Interestingly, the actin cytoskeleton pathway was shown to  
469 22 be the most deregulated pathway in response to the NRCWE-049 according to gene expression  
470 24 analysis. It can be proposed from these findings that the needle-like shape of NRCWE-049 induces  
471 26 cytoskeleton effect as it has been shown that cationic MWCNT's positive charge promote their  
472 28 internalization, thus eliciting more damage to cytoskeleton than the pristine or anionic MWCNT [48].  
473 30  
474 32

#### 474 36 *Common mechanism of functionalized MWCNT (ER) stress*

475 38 Exposure to pristine MWCNT NM403 was shown to result in the dysregulation of ribosomal genes  
476 40 and lead to the unprogrammed synthesis of ribosomal proteins (**Figure 7**). Consequently, NM403  
477 42 induced endoplasmic reticulum (ER) stress by disrupting ribosomal proteins homeostasis. For, an  
478 44 overexpression of several genes including *Grb2*, *Igf2bp2*, *Vegfb*, *Gfer* and *Pdgfa* indicated a  
479 46 dysregulation of mTOR pathway was observed only with functionalized MWCNT, NRCWE-042  
480 48 and NRCWE-049 [36]. Indeed these MWCNT induced ER stress as a result of these alterations in  
481 50 the mTOR signaling pathway. In addition, an overexpression of *Lamtor4* and ribosomal genes,  
482 52 including *Rpl39l*, *Rps27* and *Rps14*, following MWCNT exposure occurred. Indeed, NRCWE-042  
483 54 and NRCWE-049 overexpressed *Lamtor4*, a part of the Regulator-Rag complex involved in  
484 56 mTORC1 activation [49], [50], that in turn increases translation of mRNA associated to ribosomes  
485 58  
486 60  
487 62  
488 64  
489 65

485 [51]. Therefore this study proposes that all MWCNT studied induce ER stress, however, their  
1 functionalization provoked mTOR dependent ER stress. This finding is in agreement with a previous  
486 study published Lunova *et al.* [52].  
3  
487

#### 488 *Functionalization-dependent mechanisms*

##### 489 *Toxicity mechanism of non-functionalized MWCNT, NM403*

490 Exposure of NR8383 cells to pristine MWCNT NM403 only activated NRF2 pathway according to  
15 transcriptomic analysis (**Table 1**). NRF2 plays a role in maintaining the balance between oxidative  
491 stress and antioxidant defense activated by genes such as *Abcc1*, *Dnajc7*, *Maff*, *Mafg*, *Prdx1* and  
492 *Txnrd1*, of which expression was found to be upregulated. **Figure 4** shows the NRF2 pathway and  
19 highlights all those genes which were overexpressed following treatment. In addition, the Vitamin C  
493 transport pathway was shown to be dysregulated, in conjunction with the overexpression of the  
21 *Slc23a2* gene, both of which have been implicated in antioxidant response. Previously Vales *et al.*,  
22 showed increased ROS production after exposure of BEAS-2B cells to the same nanomaterial [45].  
494 Taken together, we conclude that pristine MWCNT NM403 induced ROS generation, which  
23 subsequently leads to the activation of the NRF2 response pathway. It should be mentioned that ROS  
24 generation can result from the percentage of impurities present in this CNT (Al, Mg, Na, Mn and Co)  
495 which is the highest between studied MWCNT as it has been shown previously [53].  
26  
496  
28  
497  
29  
30  
498  
31  
499  
32  
33  
500  
34  
501  
35  
502  
36  
503  
37  
504  
38  
505  
39  
506  
40  
507  
41  
508  
42  
509  
43  
510  
44  
511  
45  
512  
46  
513  
47  
514  
48  
515  
49  
516  
50  
517  
51  
518  
52  
519  
53  
520  
54  
521  
55  
522  
56  
523  
57  
524  
58  
525  
59  
526  
60  
527  
61  
528  
62  
529  
63  
530  
64  
531  
65

502 Pristine MWCNT NM403 exposure was also demonstrated to have a significant impact on DNA  
43 damage response signaling. Several pathways related to different factors of DNA damage response  
503 were shown to be dysregulated in response to NM403 exposure; including checkpoint kinases: CHK1  
45 and CHK2; cell cycle: G1/S checkpoint regulation; cell cycle: G2/M DNA damage; Ataxia  
504 telangiectasia-mutated protein kinase: ATM signaling, and DNA damage proteins e.g. Brca1 (**Table**  
51 **2**). Additionally, *Rad51*, which is known to be involved in DNA repair [54], was significantly  
52 overexpressed (FC=2.6). Furthermore, Brca1, a tumor suppressor, which is crucial for cell cycle  
505 checkpoints, DNA damage sensitivity and efficient ATM signaling [55], [56], which ensure high-  
53 fidelity HR repair [57], was inhibited (**Ann.1**). According to these results, NM403 seems to be an

inducer of DNA damage which can be connected to ROS generation induced by pristine MWCNT NM403 [58],[59].

Consequently, impairment of DNA damage repair mechanisms may lead to DNA damage accumulation, thus explaining the increased NR8383 cell death detected by LDH assay following exposure to pristine MWCNT NM403 [60]. Previous studies have indicated that DNA damage [61] and cell death [62] contribute to inflammatory response. Additionally, our analysis indicated that interferons, which are known to be involved in DNA damage [63] and the induction of inflammatory response [64], were dysregulated following exposure to the pristine MWCNT NM403. Therefore, it can be concluded that pristine MWCNT NM403 contributes to the onset of inflammation through the induction of DNA damage and cell death.

#### *Toxicity mechanism of cationic MWCNT, NRCWE-049*

Transcription factor EB (TFEB), protein coding gene which acts as a positive regulator of autophagy by promoting expression of genes involved in autophagy, was shown to be overexpressed only in response to the cationic MWCNT, NRCWE-049. This finding is supported by the activation of TFEB in the presence of cations [65]. Amino-MWCNT NRCWE-049 also increased expression of autophagy-related genes: *Atg9a*, *Atg2a*, *Atg16ll*, *Atg10l* and *Atg4d*, that can be linked to the activation of TFEB. Furthermore, NRCWE-049 was also shown to result in dysregulation of the mTOR pathway, which has recently been shown to promote autophagy [52]. Therefore, the findings from this study support an induction of autophagy by NRCWE-049. Another interesting result during cytokine proteomic analysis was about TWEAK expression levels. The later acting with others such as IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  could play a role in autophagy induction [66]. TWEAK expression level was found the highest in supernatants of cells exposed to amino-MWCNT NRCWE-049. This is a complementary fact explaining autophagy induction by amino-MWCNT NRCWE-049. May NRCWE-049, in a similar manner to other cationic CNT, induces the permeabilization of lysosomes through proton leaching, which is known as “Sponge Effect” [52], thereby preventing the anchoring of the mTORC1 complex to the lysosomal membrane. This would subsequently result in the inhibition of mTOR and the induction of autophagy, as proposed by Liu *et al.* [67], and could explain



538 the mitochondrial dysfunctions observed in response to these MWCNT (p value of mitochondrial  
1 dysfunction pathway was the highest with NRCWE-049, p=1.17E-25). Furthermore, NRCWE-049  
539 2 exposure contributed to inflammasome activation (**Figure 5**) which may result from lysosome  
3 4 destabilization and cause the release of these inflammatory mediators, including *Cxcl2*, *Ccl12*, *Cklf*,  
540 5 6  
541 6 7  
542 7 8  
543 8 9  
544 9 10  
545 10 11  
546 11 12  
547 12 13  
548 13 14  
549 14 15  
550 15 16  
551 16 17  
552 17 18  
553 18 19  
554 19 20  
555 20 21  
556 21 22  
557 22 23  
558 23 24  
559 24 25  
560 25 26  
561 26 27  
562 27 28  
563 28 29  
564 29 30  
565 30 31  
566 31 32  
567 32 33  
568 33 34  
569 34 35  
570 35 36  
571 36 37  
572 37 38  
573 38 39  
574 39 40  
575 40 41  
576 41 42  
577 42 43  
578 43 44  
579 44 45  
580 45 46  
581 46 47  
582 47 48  
583 48 49  
584 49 50  
585 50 51  
586 51 52  
587 52 53  
588 53 54  
589 54 55  
590 55 56  
591 56 57  
592 57 58  
593 58 59  
594 59 60  
595 60 61  
596 61 62  
597 62 63  
598 63 64  
599 64 65

#### 552 *Toxicity mechanism of anionic MWCNT, NRCWE-042*

553 Our transcriptomic analysis highlighted dysregulation of the mTOR and EIF4/p70S6K signaling  
35 36 pathways in response to NRCWE-042 exposure (**Table 2**). Moreover, the data highlighted an  
37 38 upregulation of ribosomal protein S6 genes, including *Rps6ka1*, *Rps6ka4*, *Mrps2* and *Mrps6*, as well  
39 40 as dysregulation of genes related to translation, such as *Eef1g*, *Eif1b*, *Eif6*, *Eif2s2*, *Eif1a*, *Eif4ebp1*,  
554 41 42  
555 42 43  
556 43 44  
557 44 45  
558 45 46  
559 46 47  
560 47 48  
561 48 49  
562 49 50  
563 50 51  
564 51 52  
565 52 53  
566 53 54  
567 54 55  
568 55 56  
569 56 57  
570 57 58  
571 58 59  
572 59 60  
573 60 61  
574 61 62  
575 62 63  
576 63 64  
577 64 65

565 identified, in order to alter mRNA translation through mTOR inhibition. As previously mentioned,  
1  
566 interferon signaling is linked to inflammatory response. Our results are comforting this observation  
3  
567 with the over-expression of the *Tlr2* gene (FC= 6.8) observed in response to NRCWE-042 exposure,  
5  
568 which is known to be implicated with interferon gamma signaling in inflammatory response  
6  
569 induction [72],[73], [74], [75]. Based on the findings of this study, NRCWE-042 triggers both  
8  
570 interferon and Tlr2 signaling to induce inflammatory response in NR8383 alveolar macrophage cells.  
10  
11  
12  
13

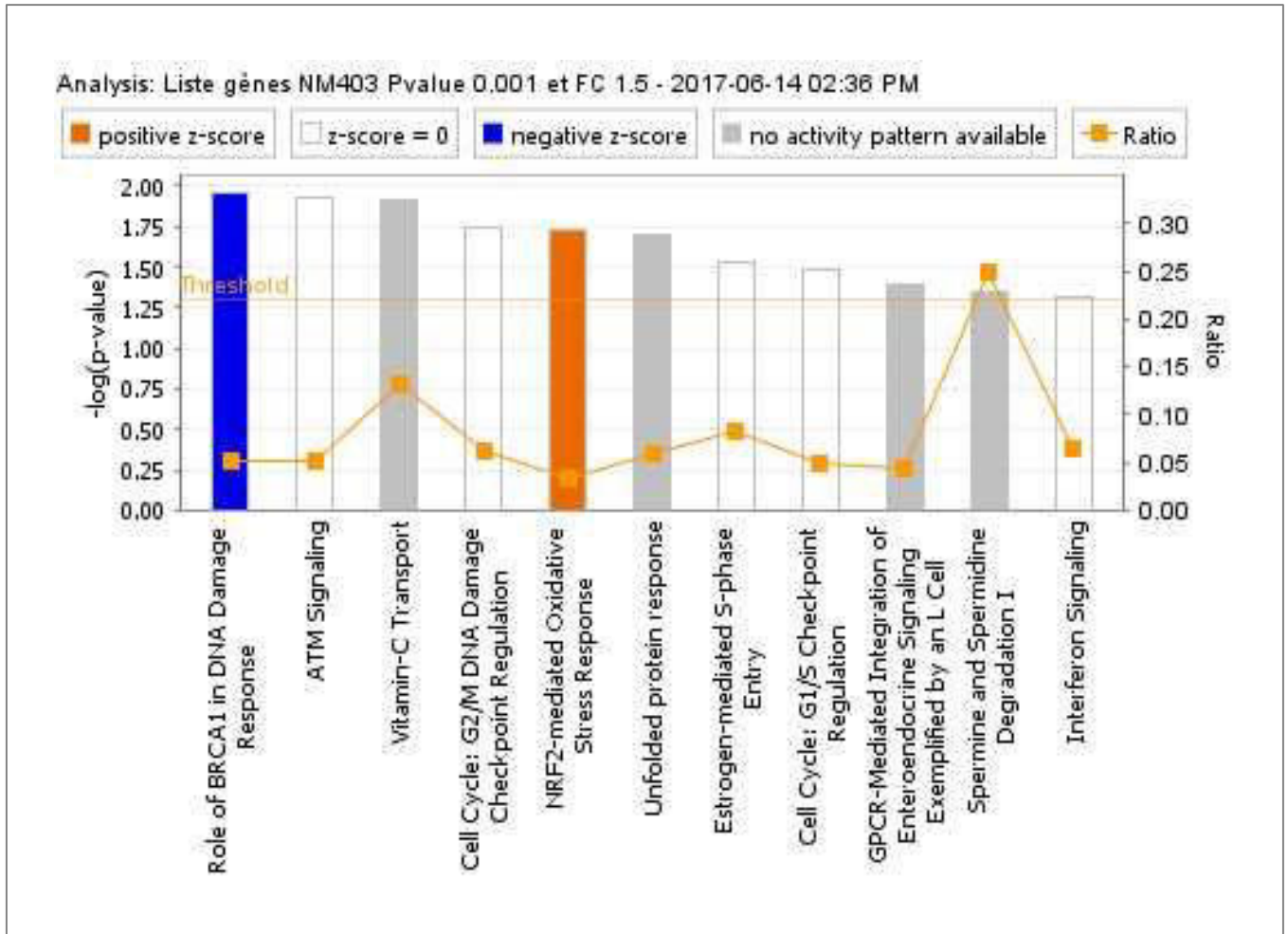
## 571 **5 Conclusion**

572  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
573 According to the presented results of this study, all three MWCNT lead to inflammatory response  
21  
22  
23  
574 and ER stress which could potentially be used as a biomarker of toxicity for all MWCNT. In contrast,  
24  
25  
575 lysosomal destabilization was shown to be a potential biomarker for the cationic MWCNT, NRCWE-  
26  
27  
576 049. Interestingly, the type of functionalization alters the response of macrophages to MWCNT,  
28  
29  
577 inducing mTOR dependent signaling pathways which can result in either autophagy or enhanced  
30  
31  
578 translation depending on the MWCNT charge (**Figure 10**). This study by combining transcriptomic  
32  
33  
579 and proteomic screenings provide better understanding of functionalized CNT toxicity mechanisms  
34  
35  
580 in rat alveolar macrophages, which can be also concluding for humans who are repeatedly exposed  
36  
37  
581 to CNT, especially workers in factories. It is also important to move toward safer CNT design.  
38  
39  
40  
41  
42  
43

## 582 **6 Acknowledgements**

583  
44  
45  
46  
584 The authors would like to acknowledge Smartnanotox partners for nanomaterial characterization.  
47  
48  
585 This work has received funding from the European Union's Horizon 2020 research (SmartNanotox  
49  
50  
586 project, grant number: 686098) and innovation program. The authors also thanks Jafaar Ghanbaja  
51  
52  
587 for its valuable help with electronic microscopy experiments.  
53  
54  
55  
588  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

7 Appendix



**Ann.1:** Gene expression analysis by IPA software at  $FC \geq 1.5$  and  $P \text{ value} < 0.001$  showing canonical pathways of NM403. Transcriptomic study was performed using NR8383 cells exposed to  $\frac{1}{4}IC_{50}$  of NM403 for 4h. N, number of biological replicates, was equal to four.

## 8 References

- [1] R. Das, B.F. Leo, F. Murphy, The Toxic Truth About Carbon Nanotubes in Water Purification: a Perspective View, *Nanoscale Res. Lett.* 13 (2018) 183. doi:10.1186/s11671-018-2589-z.
- [2] Globe Newswire: Carbon Nanotubes Market By Product Type, Method And Application - Global Industry Analysis And Forecast To 2022.
- [3] E.J. Petersen, L. Zhang, N.T. Mattison, D.M. O'Carroll, A.J. Whelton, N. Uddin, T. Nguyen, Q. Huang, T.B. Henry, R.D. Holbrook, K.L. Chen, Potential Release Pathways, Environmental Fate, And Ecological Risks of Carbon Nanotubes, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 9837–9856.
- [4] S. Kotsilkov, E. Ivanov, N.K. Vitanov, Release of Graphene and Carbon Nanotubes from Biodegradable Poly(Lactic Acid) Films during Degradation and Combustion: Risk Associated with the End-of-Life of Nanocomposite Food Packaging Materials, *Mater. Basel Switz.* 11 (2018).
- [5] V.K.K. Upadhyayula, S. Deng, M.C. Mitchell, G.B. Smith, Application of carbon nanotube technology for removal of contaminants in drinking water: A review, *Sci. Total Environ.* 408 (2009) 1–13.
- [6] G. Chen, J. Qiu, Y. Liu, R. Jiang, S. Cai, Y. Liu, F. Zhu, F. Zeng, T. Luan, G. Ouyang, Carbon Nanotubes Act as Contaminant Carriers and Translocate within Plants, *Sci. Rep.* 5 (2015) 15682.
- [7] M. Karimi, N. Solati, M. Amiri, H. Mirshekari, E. Mohamed, M. Taheri, M. Hashemkhani, A. Saeidi, M.A. Estiar, P. Kiani, A. Ghasemi, S.M.M. Basri, A.R. Aref, M.R. Hamblin, Carbon nanotubes part I: preparation of a novel and versatile drug-delivery vehicle, *Expert Opin. Drug Deliv.* 12 (2015) 1071–1087.
- [8] Y.-P. Sun, K. Fu, Y. Lin, W. Huang, Functionalized Carbon Nanotubes: Properties and Applications, *Acc. Chem. Res.* 35 (2002) 1096–1104.
- [9] M.J. Rahman, T. Mieno, Conductive Cotton Textile from Safely Functionalized Carbon Nanotubes, *J. Nanomater.* (2015).
- [10] Y. Hwang, S.-H. Park, J.W. Lee, Applications of Functionalized Carbon Nanotubes for the Therapy and Diagnosis of Cancer, *Polymers.* 9 (2017) 13.
- [11] M. Prato, K. Kostarelos, A. Bianco, Functionalized carbon nanotubes in drug design and discovery, *Acc. Chem. Res.* 41 (2008) 60–68.
- [12] S. Vardharajula, S.Z. Ali, P.M. Tiwari, E. Eroğlu, K. Vig, V.A. Dennis, S.R. Singh, Functionalized carbon nanotubes: biomedical applications, *Int. J. Nanomedicine.* 7 (2012) 5361–5374.
- [13] Yaghoubi A. and Ramazani A., Synthesis of Amino-functionalized Carbon Nanotubes and their Applications, *Curr. Org. Chem.* 22 (2018) 1505-1522.
- [14] L. Zhou, H.J. Forman, Y. Ge, J. Lunec, Multi-walled carbon nanotubes: A cytotoxicity study in relation to functionalization, dose and dispersion, *Toxicol. In Vitro.* 42 (2017) 292–298.
- [15] M.-H. Jang, Y.S. Hwang, Effects of functionalized multi-walled carbon nanotubes on toxicity and bioaccumulation of lead in *Daphnia magna*, *PLoS ONE.* 13 (2018) 3: e0194935.
- [16] D. Gutiérrez-Praena, S. Pichardo, E. Sánchez, A. Grilo, A.M. Cameán, A. Jos, Influence of carboxylic acid functionalization on the cytotoxic effects induced by single wall carbon nanotubes on human endothelial cells (HUVEC), *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA.* 25 (2011) 1883–1888.
- [17] S. Jain, Toxicity Issues Related to Biomedical Applications of Carbon Nanotubes, *J. Nanomedicine Nanotechnol.* 03 (2012) 5.
- [18] A. Magrez, S. Kasas, V. Salicio, N. Pasquier, J.W. Seo, M. Celio, S. Catsicas, B. Schwaller, L. Forró, Cellular Toxicity of Carbon-Based Nanomaterials, *Nano Lett.* 6 (2006) 1121–1125.
- [19] L. Zhou, Toxicity evaluation and medical application of multi-walled carbon nanotubes, (2015). <http://dspace.lib.cranfield.ac.uk/handle/1826/9262> (accessed November 19, 2018).

- 658 [20] C.L. Ursini, D. Cavallo, A.M. Fresegna, A. Ciervo, R. Maiello, S. Casciardi, F. Tombolini, G.  
659 Buresti, S. Iavicoli, Study of Cytotoxic and Genotoxic Effects of Hydroxyl-Functionalized  
660 Multiwalled Carbon Nanotubes on Human Pulmonary Cells, *J. Nanomater.* (2012).
- 661 [21] J. Azizian, H. Tahermansouri, E. Biazar, S. Heidari, D.C. Khoei, Functionalization of  
662 carboxylated multiwall nanotubes with imidazole derivatives and their toxicity  
663 investigations, *Int. J. Nanomedicine.* 5 (2010) 907–914.
- 664 [22] W. Chen, Q. Xiong, Q. Ren, Y. Guo, G. Li, Can amino-functionalized carbon nanotubes carry  
665 functional nerve growth factor?, *Neural Regen. Res.* 9 (2014) 285–292.
- 666 [23] C. Buzea, I.I. Pacheco, K. Robbie, Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity,  
667 *Biointerphases.* 2 (2007) MR17–MR71.
- 668 [24] M. Wiemann, A. Vennemann, U.G. Sauer, K. Wiench, L. Ma-Hock, R. Landsiedel, An in vitro  
669 alveolar macrophage assay for predicting the short-term inhalation toxicity of  
670 nanomaterials, *J. Nanobiotechnology.* 14 (2016) 16.
- 671 [25] K. Fujita, M. Fukuda, S. Endoh, J. Maru, H. Kato, A. Nakamura, N. Shinohara, K. Uchino, K.  
672 Honda, Size effects of single-walled carbon nanotubes on in vivo and in vitro pulmonary  
673 toxicity, *Inhal. Toxicol.* 27 (2015) 207–223.
- 674 [26] K. Pulskamp, S. Diabaté, H.F. Krug, Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but  
675 induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants, *Toxicol. Lett.*  
676 168 (2007) 58–74.
- 677 [27] X.-X. Kou, C.-S. Li, D.-Q. He, X.-D. Wang, T. Hao, Z. Meng, Y.-H. Zhou, Y.-H. Gan, Estradiol  
678 Promotes M1-like Macrophage Activation through Cadherin-11 To Aggravate  
679 Temporomandibular Joint Inflammation in Rats, *J. Immunol.* 194 (2015) 2810–2818.
- 680 [28] C. Ronzani, R. Safar, R. Diab, J. Chevrier, J. Paoli, M.A. Abdel-Wahhab, A. Le Faou, B.H. Rihn,  
681 O. Joubert, Viability and gene expression responses to polymeric nanoparticles in human  
682 and rat cells, *Cell Biol. Toxicol.* 30 (2014) 137–146.
- 683 [29] P. Jackson, K. Kling, K.A. Jensen, P.A. Clausen, A.M. Madsen, H. Wallin, U. Vogel,  
684 Characterization of genotoxic response to 15 multiwalled carbon nanotubes with variable  
685 physicochemical properties including surface functionalizations in the FE1-Muta(TM) mouse  
686 lung epithelial cell line: Functionalized MWCNT In Vitro, *Environ. Mol. Mutagen.* 56 (2015)  
687 183–203.
- 688 [30] S. Nahle, R. Safar, S. Grandemange, B. Foliguet, M. Lovera-Leroux, Z. Doumandji, A.L. Faou,  
689 O. Joubert, B. Rihn, L. Ferrari, Single wall and multiwall carbon nanotubes induce different  
690 toxicological responses in rat alveolar macrophages, *J. Appl. Toxicol.* 0 (n.d.).
- 691 [31] M.A. Ramakrishnan, Determination of 50% endpoint titer using a simple formula, *World J.*  
692 *Virol.* 5 (2016) 85–86. doi:10.5501/wjv.v5.i2.85.
- 693 [32] H. Eidi, O. Joubert, C. Némos, S. Grandemange, B. Mograbi, B. Foliguet, J. Tournebize, P.  
694 Maincent, A. Le Faou, I. Aboukhamis, B.H. Rihn, Drug delivery by polymeric nanoparticles  
695 induces autophagy in macrophages, *Int. J. Pharm.* 422 (2012) 495–503.
- 696 [33] R. Safar, Z. Doumandji, T. Saidou, L. Ferrari, S. Nahle, B.H. Rihn, O. Joubert, Cytotoxicity and  
697 global transcriptional responses induced by zinc oxide nanoparticles NM 110 in PMA-  
698 differentiated THP-1 cells, *Toxicol. Lett.* (2018).
- 699 [34] A. Brazma, Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME) – Successes,  
700 Failures, Challenges, *Sci. World J.* 9 (2009) 420–423.
- 701 [35] T. Barrett, R. Edgar, Mining Microarray Data at NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO)\*, in:  
702 *Gene Mapp. Discov. Expr.*, Humana Press, New Jersey, 2006: pp. 175–190.
- 703 [36] Y. Benjamini, Y. Hochberg, Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful  
704 Approach to Multiple Testing, *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 57 (1995) 289–300.
- 705 [37] C.S. Hughes, S. Foehr, D.A. Garfield, E.E. Furlong, L.M. Steinmetz, J. Krijgsveld, Ultrasensitive  
706 proteome analysis using paramagnetic bead technology, *Mol. Syst. Biol.* 10 (2014) 757–757.
- 707 [38] C. Ramus, A. Hovasse, M. Marcellin, A.-M. Hesse, E. Mouton-Barbosa, D. Bouyssié, S. Vaca,  
708 C. Carapito, K. Chaoui, C. Bruley, J. Garin, S. Cianférani, M. Ferro, A.V. Dorssaeler, O. Bulet-  
709 Schiltz, C. Schaeffer, Y. Couté, A. Gonzalez de Peredo, Spiked proteomic standard dataset for  
710

- 710 testing label-free quantitative software and statistical methods, *Data Brief.* 6 (2016) 286–  
711 294.
- 712 [39] J. Rappsilber, M. Mann, Y. Ishihama, Protocol for micro-purification, enrichment, pre-  
713 fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips, *Nat. Protoc.* 2 (2007)  
714 1896–1906.
- 715 [40] M. Allegri, D.K. Perivoliotis, M.G. Bianchi, M. Chiu, A. Pagliaro, M.A. Koklioti, A.-F.A.  
716 Trompeta, E. Bergamaschi, O. Bussolati, C.A. Charitidis, Toxicity determinants of multi-  
717 walled carbon nanotubes: The relationship between functionalization and agglomeration,  
718 *Toxicol. Rep.* 3 (2016) 230–243.
- 719 [41] S.Y. Madani, A. Mandel, A.M. Seifalian, A concise review of carbon nanotube’s toxicology,  
720 *Nano Rev.* 4 (2013).
- 721 [42] I. Fenoglio, E. Aldieri, E. Gazzano, F. Cesano, M. Colonna, D. Scarano, G. Mazzucco, A.  
722 Attanasio, Y. Yakoub, D. Lison, B. Fubini, Thickness of Multiwalled Carbon Nanotubes Affects  
723 Their Lung Toxicity, *Chem. Res. Toxicol.* 25 (2012) 74–82.
- 724 [43] C. Loos, T. Syrovets, A. Musyanovych, V. Mailänder, K. Landfester, T. Simmet, Amino-  
725 functionalized nanoparticles as inhibitors of mTOR and inducers of cell cycle arrest in  
726 leukemia cells, *Biomaterials.* 35 (2014) 1944–1953.
- 727 [44] M. Ema, H. Takehara, M. Naya, H. Kataura, K. Fujita, K. Honda, Length effects of single-  
728 walled carbon nanotubes on pulmonary toxicity after intratracheal instillation in rats, *J.*  
729 *Toxicol. Sci.* 42 (2017) 367–378.
- 730 [45] M. Rapp, M.W.M. Wintergerst, W.G. Kunz, V.K. Vetter, M.M.L. Knott, D. Lisowski, S.  
731 Haubner, S. Moder, R. Thaler, S. Eiber, B. Meyer, N. Röhrle, I. Piseddu, S. Grassmann, P.  
732 Layritz, B. Kühnemuth, S. Stutte, C. Bourquin, U.H. von Andrian, S. Endres, D. Anz, CCL22  
733 controls immunity by promoting regulatory T cell communication with dendritic cells in  
734 lymph nodes, *J. Exp. Med.* 216 (2019) 1170–1181.
- 735 [46] M. Pescatori, D. Bedognetti, E. Venturelli, C. Ménard-Moyon, C. Bernardini, E. Muresu, A.  
736 Piana, G. Maida, R. Manetti, F. Sgarrella, A. Bianco, L.G. Delogu, Functionalized carbon  
737 nanotubes as immunomodulator systems, *Biomaterials.* 34 (2013) 4395–4403.
- 738 [47] O. Llorca, J. Martín-Benito, M. Ritco-Vonsovici, J. Grantham, G.M. Hynes, K.R. Willison, J.L.  
739 Carrascosa, J.M. Valpuesta, Eukaryotic chaperonin CCT stabilizes actin and tubulin folding  
740 intermediates in open quasi-native conformations, *EMBO J.* 19 (2000) 5971–5979.
- 741 [48] A. Panariti, G. Miserocchi, I. Rivolta, The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior:  
742 disrupting or enabling functions?, *Nanotechnol. Sci. Appl.* 5 (2012) 87–100.
- 743 [49] Y. Yao, E. Jones, K. Inoki, Lysosomal Regulation of mTORC1 by Amino Acids in Mammalian  
744 Cells, *Biomolecules.* 7 (2017).
- 745 [50] L. Bar-Peled, L.D. Schweitzer, R. Zoncu, D.M. Sabatini, Ragulator is a GEF for the rag GTPases  
746 that signal amino acid levels to mTORC1, *Cell.* 150 (2012) 1196–1208.
- 747 [51] V. Iadevaia, X. Wang, Z. Yao, L.J. Foster, C.G. Proud, Evaluation of mTOR-regulated mRNA  
748 translation, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* 821 (2012) 171–185.
- 749 [52] M. Lunova, A. Prokhorov, M. Jirsa, M. Hof, A. Olžyńska, P. Jurkiewicz, Š. Kubinová, O. Lunov,  
750 A. Dejneka, Nanoparticle core stability and surface functionalization drive the mTOR  
751 signaling pathway in hepatocellular cell lines, *Sci. Rep.* 7 (2017) 16049.
- 752 [53] G. Vales, L. Rubio, R. Marcos, Genotoxic and cell-transformation effects of multi-walled  
753 carbon nanotubes (MWCNT) following in vitro sub-chronic exposures, *J. Hazard. Mater.* 306  
754 (2016) 193–202.
- 755 [54] S. Bhattacharya, K. Srinivasan, S. Abdisalaam, F. Su, P. Raj, I. Dozmorov, R. Mishra, E.K.  
756 Wakeland, S. Ghose, S. Mukherjee, A. Asaithamby, RAD51 interconnects between DNA  
757 replication, DNA repair and immunity, *Nucleic Acids Res.* 45 (2017) 4590–4605.
- 758 [55] S. Difilippantonio, A. Celeste, M.J. Kruhlak, Y. Lee, M.J. Difilippantonio, L. Feigenbaum, S.P.  
759 Jackson, P.J. McKinnon, A. Nussenzweig, Distinct domains in Nbs1 regulate irradiation-  
760 induced checkpoints and apoptosis, *J. Exp. Med.* 204 (2007) 1003–1011.

761  
762  
763  
764  
765  
766  
767  
768  
769  
770  
771  
772  
773  
774  
775  
776  
777  
778  
779  
780  
781  
782  
783  
784  
785  
786  
787  
788  
789  
790  
791  
792  
793  
794  
795  
796  
797  
798  
799  
800  
801  
802  
803  
804  
805  
806  
807  
808  
809  
810  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

- [56] C.-X. Deng, BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) 1416.
- [57] L. Feng, N. Li, Y. Li, J. Wang, M. Gao, W. Wang, J. Chen, Cell cycle-dependent inhibition of 53BP1 signaling by BRCA1, *Cell Discov.* 1 (2015) 15019.
- [58] J.S. Kim, K.S. Song, I.J. Yu, Multiwall Carbon Nanotube-Induced DNA Damage and Cytotoxicity in Male Human Peripheral Blood Lymphocytes, *Int. J. Toxicol.* 35 (2016) 27–37.
- [59] A. Manke, L. Wang, Y. Rojanasakul, Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity, *BioMed Res. Int.* 2013 (2013) 1–15.
- [60] A. Patlolla, B. Knighten, P. Tchounwou, Multi-Walled Carbon Nanotubes Induce Cytotoxicity, Genotoxicity And Apoptosis In Normal Human Dermal Fibroblast Cells, *Ethn. Dis.* 20 (2010) S1-65–72.
- [61] M. Luo, Z. Bao, F. Xu, X. Wang, F. Li, W. Li, Z. Chen, S. Ying, H. Shen, Unrepaired DNA damage in macrophages causes elevation of particulate matter- induced airway inflammatory response, *Aging.* 10 (2018) 549–560.
- [62] Y. Yang, G. Jiang, P. Zhang, J. Fan, Programmed cell death and its role in inflammation, *Mil. Med. Res.* 2 (2015) 12.
- [63] Q. Yu, Y.V. Katlinskaya, C.J. Carbone, B. Zhao, K.V. Katlinski, H. Zheng, M. Guha, N. Li, Q. Chen, T. Yang, C.J. Lengner, R.A. Greenberg, F.B. Johnson, S.Y. Fuchs, DNA-damage-induced type I interferon promotes senescence and inhibits stem cell function, *Cell Rep.* 11 (2015) 785–797.
- [64] X. Hu, L.B. Ivashkiv, Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases, *Immunity.* 31 (2009) 539–550.
- [65] W. Song, L. Popp, J. Yang, A. Kumar, V.S. Gangoli, L. Segatori, The autophagic response to polystyrene nanoparticles is mediated by transcription factor EB and depends on surface charge, *J. Nanobiotechnology.* 13 (2015).
- [66] J. Harris, Autophagy and cytokines, *Cytokine.* 56 (2011) 140–144.
- [67] H.-L. Liu, Y.-L. Zhang, N. Yang, Y.-X. Zhang, X.-Q. Liu, C.-G. Li, Y. Zhao, Y.-G. Wang, G.-G. Zhang, P. Yang, F. Guo, Y. Sun, C.-Y. Jiang, A functionalized single-walled carbon nanotube-induced autophagic cell death in human lung cells through Akt-TSC2-mTOR signaling, *Cell Death Dis.* 2 (2011) e159.
- [68] C. Pavan, B. Fubini, Unveiling the Variability of “Quartz Hazard” in Light of Recent Toxicological Findings, *Chem. Res. Toxicol.* 30 (2017) 469–485.
- [69] A. Michihara, K. Toda, T. Kubo, Y. Fujiwara, K. Akasaki, H. Tsuji, Disruptive Effect of Chloroquine on Lysosomes in Cultured Rat Hepatocytes, *Biol. Pharm. Bull.* 28 (2005) 947–951.
- [70] G. Thomas, M.N. Hall, TOR signalling and control of cell growth, *Curr. Opin. Cell Biol.* 9 (1997) 782–787.
- [71] H.B. Jefferies, S. Fumagalli, P.B. Dennis, C. Reinhard, R.B. Pearson, G. Thomas, Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k., *EMBO J.* 16 (1997) 3693–3704.
- [72] T. Weichhart, G. Costantino, M. Poglitsch, M. Rosner, M. Zeyda, K.M. Stuhlmeier, T. Kolbe, T.M. Stulnig, W.H. Hörl, M. Hengstschläger, M. Müller, M.D. Säemann, The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response, *Immunity.* 29 (2008) 565–577.
- [73] H.R. Turnquist, J. Cardinal, C. Macedo, B.R. Rosborough, T.L. Sumpter, D.A. Geller, D. Metes, A.W. Thomson, mTOR and GSK-3 shape the CD4+ T-cell stimulatory and differentiation capacity of myeloid DCs after exposure to LPS, *Blood.* 115 (2010) 4758–4769.
- [74] F.O. Martinez, S. Gordon, The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment, *F1000Prime Rep.* 6 (2014).

811  
812  
813  
814  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

[75] X. Su, Y. Yu, Y. Zhong, E.G. Giannopoulou, X. Hu, H. Liu, J.R. Cross, G. Rättsch, C.M. Rice, L.B. Ivashkiv, Interferon- $\gamma$  regulates cellular metabolism and mRNA translation to potentiate macrophage activation, *Nat. Immunol.* 16 (2015) 838–849.



## 4 Etude comparative entre deux NTC de tailles similaires mais de diamètres différents : effet diamètre

### 4.1 Introduction

Dans cette partie, afin de mieux comprendre le lien entre le diamètre et la toxicité, nous avons sélectionné deux nanotubes de longueurs similaires mais de diamètres différents : un mono feuillet d'un diamètre de 1 à 2 nm (NRCWE-055) et un multi feuillets d'un diamètre égal à 74 nm (NRCWE-006 connu sous le nom de Mitsui-007). Nous avons évalué leurs effets sur deux lignées cellulaires : les cellules NR8383 qui sont des macrophages alvéolaires du rat et les cellules THP-1 qui sont des monocytes provenant du sang périphérique des patients leucémiques qu'on différencie en macrophages suite au traitement avec du phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). L'objectif de l'utilisation de ces deux modèles est de comparer entre la réponse des macrophages humaines et celle des macrophages du rat. En plus, dans cette étude, nous avons employé deux protocoles de dispersion différents pour les NTC, le premier avec du sérum du vœu fœtal (P1) et le deuxième avec du surfactant humain et de l'albumine humaine (P2). Nous avons alors exposé les cellules THP-1 soit aux nanotubes dispersés selon le protocole P1, soit aux nanotubes dispersés selon le protocole P2, afin d'évaluer les différences dans la réponse cellulaire qui peut être due à la différence des coronas formées dans les 2 cas. Donc dans cette étude, trois objectifs sont mis en évidence, l'effet diamètre, l'effet du modèle cellulaire et aussi l'effet corona. Les études de cytotoxicité pour chaque lignée exposée aux nanotubes dispersés selon le protocole P1 pour 4 et 24 h et pour les cellules THP-1 exposés aux NTC dispersés selon le protocole P2 sont faites. Nous avons réalisé des études de transcriptomique : les cellules NR8383 et THP-1 sont alors exposées aux NTC dispersés selon le protocole P1 pour 4h. Pour le choix des doses, nous nous sommes basé sur les résultats du test WST-1. Pour le SWCNT NRCWE-055 qui a montré une cytotoxicité dose dépendante sur les cellules NR8383 seulement, on a choisi  $IC_{50/4}$  tandis que pour le MWCNT qui a une faible toxicité sur les deux lignées,  $IC_{50}$  de ce NM (Mitsui-007) était plus grande que la plus grande concentration utilisée dans le test, alors on a choisi la seule concentration qui nous a donné une baisse significative de viabilité pour les cellules NR8383 ( $11 \text{ cm}^2/\text{cm}^2$ ). On a appliqué les mêmes doses pour les deux lignées cellulaires afin de pouvoir les comparer. Après la réalisation de l'étude de l'expression des gènes, nous avons également réalisé une étude de protéomique, en collaboration avec notre partenaire de Dublin (Hilary Cassidy, David Matallanas). L'étude protéomique, réalisée après une durée d'exposition de 24h, englobe :

- une étude de la corona des deux nanotubes dispersés soit suivant le protocole P1 soit selon le protocole P2,
- l'étude du surnageant et du lysat des cellules THP-1 exposées à chacun des deux nanotubes dispersés soit selon le protocole P1 soit selon le protocole P2 aux mêmes doses choisies pour la transcriptomique,
- l'étude du surnageant et du lysat des cellules NR8383 exposées à chacun des deux nanotubes dispersés selon le protocole P1.

## 4.2 Résumé des principaux résultats

D'après cette étude, on a pu montrer que le SWCNT (NRCWE-055) ayant un diamètre de 1 à 2 nm a une cytotoxicité sur les cellules NR8383 ( $IC_{50} = 44 \text{ cm}^2/\text{cm}^2$ ) et non pas sur les cellules THP-1 donc les macrophages alvéolaires du rat semblent être plus endommagées que les macrophages du sang humaines. Pour le MWCNT (Mitsui-7) ayant un diamètre de 74 nm, pas de réduction significative de la viabilité même à la plus grande dose pour les deux lignées cellulaires. Cela peut être due à sa petite surface spécifique. Concernant la transcriptomique, la voie de signalisation Sirtuine aussi bien que la voie des dysfonctionnements mitochondriaux, de la phosphorylation oxydative sont dérégulés pour les deux types cellulaires et avec les deux NTC. Nous avons montré par les deux approches omiques qu'il y a une dérégulation de l'expression des protéines mitochondriales ribosomales également avec les 2 NTC pour les deux types cellulaires. La mitochondrie semble être la cible principale de ces NTC. Les analyses transcriptomiques ont montré une dérégulation des gènes impliqués dans l'épissage pour les cellules NR8383 exposées au SWCNT et une dérégulation de la traduction dans le cas des cellules THP-1 alors que pour les MWCNT, il y a une dérégulation de l'ubiquitination dans les deux cas. Quant aux résultats protéomiques, il y a principalement une perturbation du métabolisme lipidique pour les cellules NR8383 et les cellules THP-1 dans le cas d'exposition au MWCNT. Seules les cellules NR8383 ont montré une accumulation des lipides par coloration GIEMSA et la formation des syncytiums. En ce qui concerne les SWCNT, il y a une perturbation du métabolisme des ARN.

## 4.3 Conclusion

Dans cette étude, nous avons mis en œuvre une voie de signalisation liée à l'exposition au NTC qui n'est pas discutée à notre connaissance dans la littérature : la voie de signalisation des sirtuines. Une étude doses-réponses nous semble intéressante pour mieux comprendre l'implication de ces enzymes et leur rôle vis-à-vis de l'exposition aux NMC. La perturbation du métabolisme lipidique et la formation des syncytiums par les NTC sont des événements clés observés *in vitro* qui pourraient prédire la formation de granulomes *in vivo*.

Cette étude a fait l'objet de la publication qui est en cours de rédaction.

#### 4.4 Article IV

##### **Mitsui-7 induce lipid metabolism perturbation and syncytiums in rat alveolar macrophages.**

Sara Nahle, Hilary Cassidy, Halima Alem Marchand, David Gomez Matallanas, Bertrand Rihn, Olivier Joubert, Luc Ferrari.

##### **Abstract**

Several studies assess toxicity potential of carbon nanotubes (CNT) to humans and environment, by evaluating their effects in animal models and multiple cell lines. Mostly, results are difficult to compare and are sometimes contradictory due to different exposure conditions. Here, we compare two macrophages cell lines responses to CNT exposure: the NR8383 rat alveolar macrophages, and THP1, a human monocytic cell line differentiated with PMA to macrophages, using same exposure conditions. Both CNT chosen have similar length range (3-4  $\mu\text{m}$ ) but different diameters: single walled CNT (SWCNT) with 2 nm diameter and multi walled carbon nanotube (MWCNT) with 74 nm diameter. We used omics approaches to have a full picture of CNT effect on whole genome and proteome expression. Realizing that corona may have a role in CNT toxicity determination, we compare CNT corona and THP-1 cells proteome, after CNT dispersion in fetal bovine serum (FBS), or in human surfactant (HS). Our results show that Sirtuin signaling pathway is a major pathway related to CNT exposure in both cell models. CNT induce ribosomal mitochondrial proteins deregulation in both cell models. NR8383 cells were more influenced by both CNT then THP-1 cells. MWCNT induce lipid metabolism perturbation reticulum endoplasmic stress dependent, leading to foam cell and syncytia formation while SWCNT alter splicing and RNA metabolism. These findings show that mitochondria is CNT main target and MWCNT by disrupting lipid homeostasis and promoting giant cell formation could induce granuloma formation *in vivo*.

## 1. Introduction

Aside their applications in electronics, fabrics and energy storage, CNT are promising materials for biomedical field [1]. They showed a potential for uses in target drug delivery systems [2], [3]. Anticancer therapeutics based on mitochondria targeting are one of CNT probable applications due to their capacity to travel the mitochondria and their ability for drug delivery [4], [5]. Therefore, human exposure to these CNT, increasing daily, raises the public health concern regarding their toxicity potential especially in absence of safety measures managing their production and their uses. The NIOSH CIB, after reviewing animal and toxicological data related to CNT toxicity, proposed recommended exposure limit of 1 µg/m<sup>3</sup> for CNT but still need more studies and generation of an important CNT toxicity data set to conclude about their toxicity notably their chronic health effects, and the probable carcinogenic potential of some of them [6] that remain uncertainly until now.

However, Quin et al., showed CNT induce persistent inflammatory response, granuloma formation and pulmonary fibrosis in rats after intravenous injection [7]. Rahman et al, found inflammatory and pro-fibrotic response in mice via intratracheal instillations [8]. In their studies, Shvedova et al., report also the induction of acute inflammatory/cytokines response, granulomatous pneumonia and oxidative stress, by pharyngeal aspiration or inhalation in C57BL/6 mice [9],[10]. Oxidative stress, inflammatory reaction and pro-fibrotic markers expression were also found in vitro, in different cells models after CNT exposure [11], [12], [13]. Despite in vitro models limitations to reproduce the complexity of real exposure, they still provide information about molecular mechanisms, key events and toxicity pathways necessary to understand adverse outcome observed in vivo. Because inhalation is the principal route of CNT exposure and macrophages are the first line of immune defense against these nanomaterials, we choose rat alveolar macrophages, NR8383 cells, in absence of human alveolar macrophages cell line, to our knowledge. We use also human monocytic cell line THP-1 cell that we differentiate to macrophages using phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) in order to compare both macrophages reaction after exposure to CNT. We have 2 CNT with similar length (3-4 µm) but different diameters: one is a SWCNT with 2 nm diameter and the other one is a multi-walled CNT (MWCNT) with 74 nm diameter. Studies using these cell models, NR8383 and THP-1 cells, showed mainly oxidative stress induction and inflammatory response [14], [15], [16], [17], [18]. CA et al, found that MWCNT exposure induce lipid accumulation in THP-1 cells due to the reticulum endoplasmic stress they induce. To the best of our knowledge, no evidence about lipid accumulation in NR8383 cells [19].

Corona contribution in nanomaterial toxicity have been discussed in different studies [20], [21], [22], [23, p.]. To assess the role of corona in the determinism of CNT toxicity mechanism, we dispersed each CNT in FBS or in human surfactant, then we compare CNT corona and proteome of THP-1 cells exposed to each CNT. Human surfactant synthesized in the type II cells of the alveolus reduce surface tension and stabilize the alveoli [24], [25], [26]. It is a complex constituted mainly from lipids and a portion of proteins. Inhaled nanomaterials interact with surfactant acting like a barrier to reach alveolar region. Thus we will be able to determine the implication of human surfactant in CNT toxicity. Overall this study including a whole genome and proteome expression will import new findings about macrophages response to CNT, their physical and chemical characteristics effect on toxicity and the effect of their corona.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Multi-walled carbon nanotubes**

NRCWE-006 (called Mitsui-7) and NRCWE-055 were obtained from the National Research Centre for the Working Environment, NRCWE (Copenhagen, Denmark). CNT characteristics given by the provider, length, diameter and specific surface, measured by Brunauer, Emmett and Teller method, were represented in table 1.

### **2.2. Characterization of CNT**

Dry nanopowders were suspended in Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM, high glucose medium with 2% Fetal Bovine Serum, FBS (Sigma-Aldrich; St. Louis; USA) at 2 mg/ml. For some experiments, another dispersion solution was used: DMEM high glucose with 1% human surfactant, HS, and 1% Human albumin, HA (Sigma-Aldrich; St. Louis; USA) in order to compare the corona in both cases and to know if it has an influence on secretome. So, CNT were directly sonicated with a Vibra Cell™ Sonicator (VWR, England, UK) for 15 min at 10 % for NRCWE-055 and at 30% for Mitsui-7. After sonication, they were diluted to the desired concentrations in DMEM without FBS or HS and HA.

Dynamic Light Scattering, DLS: the average hydrodynamic size and the zeta potential of each CNT were determined by DLS on a ZetaSizer™ (Malvern, Worcs, UK). DLS characterization were done directly after suspension in cell media (with FBS or HA+HS), also at 4h and 24h later, at concentrations between 0 and 300 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup> (CNT surface/ Cell surface) for NRCWE-055 and between 0 and 16 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup> for NRCWE-066 (data not shown).

Transmission Electron Microscopy, TEM: the shape of CNT was characterized by TEM. A drop of aqueous suspension of each CNT was poured onto carbo-coated copper grid air dried for TEM observations using an ARM 200F microscope operated at 200 kV (Philips; Amsterdam; The Netherlands).

Semi Quantitative Elemental Analysis: the semi quantitative elemental analysis of the samples was carried out using a Bruker S8 Tiger wave length dispersive X-ray fluorescence (WDXRF) spectrometer. Rh was used as the source of radiation operating at 60 kV. Powdered samples of 2–5mg were placed on a XRF thin film (mylar sheet with a thickness of 6 lm), which was fixed in a 40 mm diameter sample cup (Fluxana, Kleve, Germany). The measurement time was 17 min. Results were manually post-processed for each element individually, to account for low concentrations and peak overlaps. Results are presented as normalized oxide weight percent in table 2.

Determination of ROS Generating Ability: the ability of CNT to generate ROS was assessed in material dispersions by Dichlorofluorescein (DCFH) oxidation assay as previously described [Jacobsen et al., 2008b]. Materials were dispersed in 10 mM Hank's buffered saline solution (HBSS, without phenol) by sonication as described above. A 20, 70-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Invitrogen) was hydrolyzed for 30 minutes with 0.01 NaOH to 20, 70 dichlorodihydrofluorescein (DCFH) and later diluted with HBSS to 0.04 mM. CNT dispersions were mixed with DCFH and when hydroxyl radicals were generated DCFH oxidized to fluorescent 20, 70-dichlorofluorescein (DCF). After 3h incubation, the DCF level in CNT suspensions was determined at 490 and 520 nm on a fluorescence spectrophotometer (Victor Wallac-2 1420, Perkin Elmer, Denmark). CNT were incubated at different concentrations (1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, and 200 mg/ml) in three replicates, with four negative controls per plate. Two materials were analyzed per plate.

### 2.3 Cell culture

NR8383 rat alveolar macrophages and THP-1 human monocytic leukemia cell lines were purchased from American Type Culture Collection (ATCC® CRL2192™; Manassas; USA). Both were cultured in DMEM [27] (Dulbecco's Modified Eagle's Medium- high glucose) supplemented with 15% heat-inactivated FBS, 100 U/ml penicillin and 100 g/ml streptomycin, 4 mM L-glutamine and 0.25 µg/mL of amphotericin B (Sigma-Aldrich; St. Louis; USA). Cells were incubate at 37°C in humidified chamber with 5% CO<sub>2</sub>. In all experiments, cells were seeded 24 h before exposure to CNT at a density of 5 x 10<sup>4</sup> cells/mL. THP-1 cells which are monocytic cells were always differentiated into macrophages with 20 ng/mL of Phorbol 12-Myristate 13-Acetate, PMA, for 24h[28].

### 2.4 Cell viability

Lactate dehydrogenase, LDH, leakage was analysed using the LDH assay (Roche; Boulogne; France) following manufacturer's instruction. Briefly, NR8383 cells and THP1 cells were seeded in 96-well plates and exposed to different concentrations (0-300 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup> for SWCNT, and 0-16 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup> for MWCNT, which correspond to 0-200 µg/ml). Concerning THP1 cells exposure, CNT were dispersed once using FBS as it was the case with NR8383 cells and another time using 1% HS+ 1% HA, in order to know if we will find any difference between cytotoxicity profile using these two different CNT dispersion solutions. After 24 h of exposure, plates were centrifuged at 800 xg for 10 min and 100 µl of each supernatant were transferred to a new 96-well plate with black bottom prefilled with 100 µL of the LDH reaction mixture. Cells were incubated for 30 min at room temperature, then, 50 µL of a stop solution was added and the absorbance was measured at 490 nm on an iMarK™ Microplate Reader (BIO-RAD Laboratories; Osaka; Japan). Unexposed cells and cells exposed to a lysis solution of 10% triton were used, respectively, as negative and positive control.

Mitochondrial activity was assessed using the WST-1 Cell Proliferation reagent (Roche; Boulogne; France), according to manufacturer's protocol. After 24 h of exposure, WST-1 reagent was added to each well. Cells were incubated at 37 °C for 2 h. The absorbance of the solution was determined iMarK™ Microplate Reader (BIO-RAD Laboratories; Osaka; Japan) at 450 nm. . Based on WST-1 results, the inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>, was calculated according to Reed and Muench formula [29]. Unexposed cells and cells exposed to 5 µl of DMSO were used, respectively, as negative and positive control.

## 2.5 RNA analysis and microarrays

RNA isolation and quantification: to evaluate gene expression, total RNA was isolated from NR8383 cells and THP1 cells exposed for 4h to MWCNT (1 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>) and SWCNT (11 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>) dispersed in FBS by using the Trizol Extraction Reagent (OMEGA Bio-Tek; Guang zhou; China). These doses were chosen based on WST-1 results with NR8383 cells, because with THP-1 cells IC<sub>50</sub> was higher than the highest dose used in the test, then we exposed THP-1 cells to the same doses in order to compare. Unexposed cells were used as control. So after cell lysis, 200 µl of chloroform was added (Carlo Erba reagents; Normandie; France). Samples were centrifuged at 800 g for 15 minutes. Then, 500 µL of Isopropanol (Carlo Erba reagents; Normandie; France) was added to 350 µL of supernatant. The precipitates were subjected to 2 washing steps with 80% ethanol and incubated for 10 minutes at 60°C to remove ethanol, followed by dissolution in 35 µL RNase-free water. RNA content was determined by measuring absorption at 260 nm using a BioSpec-nano Spectrophotometer (SHIMADZU; Kyoto; Japan). Optimal purity of RNA was ensured by obtaining an absorbance ratio A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> > 1.8. RNA integrity was checked by RNA 6000 Nano Reagents Kit using Bioanalyzer™ 2100 (Agilent Technologies; Waldbron; Germany). The RNA integrity number (RIN) score cut-off of 8 was used to determine whether the RNA integrity was qualified or not.

Microarray expression profiling: microarray experiments samples were prepared as previously described [27]. The cRNA synthesis from cDNA, Cy3-dye labelling, hybridization and washing steps were carried out with 100 ng of total RNA following the manufacturer's specifications using Low Input Quick Amp Labeling kits (Agilent Technologies; Waldbron; Germany). Microarray slides (Agilent Technologies; Waldbron; Germany) were scanned by Agilent G2505C DNA microarray scanner by setting: (i) one color scan channel for 8 x 60 k array slides, (ii) scan area of 61x21.6 mm, (iii) scan resolution of 3 µm, (iv) dye channel to Green, (v) Tiff file dynamic range of 20 bits and (vi) Green PMT to 100 %. The TIFF images files and the quantification of fluorescence signal were obtained using Agilent Feature Extraction software 183 version 11.0.1.1 to extract raw data and obtain QC reports.

Transcriptomics data analysis: based on QC reports, data validating quality control parameters were subject to percentile normalization using GeneSpring GX 13.0 software (Silicon Genetics; Redwood City; California). Genes were considered as differentially expressed with p-values < 0.001 and fold change, FC, values of > |1.5|. Statistical analysis was performed using Benjamini Hochberg False Discovery Rate. Statistically significant gene changes were analyzed in terms of their associated molecular/cellular functions and representation in canonical pathways using Ingenuity Pathway Analysis software, IPA (Qiagen Bioinformatics, 192 Redwood City,



USA). The data was also analyzed using DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray analysis (<https://david.ncicrf.gov/>) and String (<https://string-db.org/>), which creates functional protein association networks.

## 2.6 Protein analysis

Single-pot solid-phase-enhanced sample preparation for whole cell proteomics: single-pot solid-phase-enhanced sample preparation, SP3, using commercially available carboxylate-modified magnetic beads, was employed to analyze the NR8383 cells and THP-1 global proteome after exposure to each CNT dispersed in FBS at same doses used in transcriptomics. In addition, the THP-1 proteome was assessed for each CNT dispersed in 1% HS+ 1% HA. Briefly, cells were exposed for 24 h to MWCNT (1 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>) and SWCNT 055 (11 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>). Thereafter, cells lysis was performed in 6 M urea, 2 M thiourea and 50 mM MOPS containing lysis buffer. Samples were then reduced and alkylated by Dithiothréitol (DTT), and iodoacetamide (IAA), respectively. Both hydrophobic and hydrophilic Sera-Mag SpeedBead carboxylate-modified magnetic particles (GE Healthcare, Illinois, USA) were mixed in a 1:1 ratio and were added to each sample. Once immobilized by incubation on a DynaMag-2™ stand, proteins and peptides were rinsed with a combination of ethanol and acetonitrile mixture to efficiently remove contaminating agents. After rinsing, proteins and peptides from the magnetic beads were eluted using MS grade water (Fisher scientific, Oslo; Norway).

Filter Aided Sample Preparation of supernatants for proteomics: supernatants were obtained from experiments exposing NR8383 cells and THP1 cells to each CNT dispersed in FBS at same doses used in transcriptomics. Supernatant of THP-1 cells exposed to each CNT dispersed in in 1% HS+ 1% HA was also collected. Protein content was determined using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, USA). Filter-aided sample preparation, FASP, was performed as previously described. Briefly, after reducing 50 µg of protein by adding DTT, samples were mixed with 8 M urea in 0.1 M Tris-HCl. Proteins were alkylated with iodoacetamide and then digested overnight at 37 °C using sequence grade trypsin (Promega, Madison WI, USA) at an enzyme-to-protein ratio of 1:50 (w/w). Peptides were recovered by centrifuging the filter units, then washing the filters once with 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> and repeating the centrifugation, combining the flow-throughs. The samples were measured on a NanoDrop 2000 spectrophotometer to calculate the protein concentrations. 20 µg of the tryptic digests were loaded separately and desalted on C18 Stage tip as described by Rappsilber. Following elution of the peptides and lyophilization in a CentriVap Concentrator, the remaining sample was resuspending in trifluoroacetic acid, TFA, solution.

Mass Spectrometry Settings: each treatment was run with four biological replicates on a Thermo Scientific Q Exactive mass spectrometer connected to a Dionex Ultimate 3000 (RSLCnano) chromatography system. Each sample was loaded onto a fused silica emitter (75µm ID), pulled using a laser puller, Sutter Instruments P2000 (Novato; CA; USA), packed with ReproCil Pur (Dr Maisch, Ammerbuch-Entringen, Germany), C18 (1.9 µm; 12 cm in length) reverse phase media and were separated by an increasing acetonitrile gradient over 90 minutes at a flow rate of 250 nL/min direct into a Q-Exactive MS. The MS was operated in positive ion mode with a capillary temperature of 320 °C, and with a potential of 2300 V applied to the frit. All data was acquired while operating in automatic data dependent switching mode. A high resolution (70,000) MS scan (300-1600 m/z) was performed using the Q Exactive to select the 12 most intense ions prior to MS/MS analysis using high-energy collision dissociation, HCD.

Maxquant analysis of mass spectrometry data: proteins were identified and quantified by MaxLFQ [Cox 2014] by searching with the MaxQuant version 1.5 against the Homo Sapiens reference proteome database, which was obtained from Uniprot. Modifications included C carbamylation (fixed) and M oxidation (variable). The resulting data was then analysed using IPA and String platforms.

## **2.7 MGG staining (May-Grünwald Giemsa)**

NR8383 cells are cultured at 1 million cells per 20 ml in DMEM 2% FBS and then placed in an incubator at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. After 24 hours, these cells are scraped, flushed and harvested before being centrifuged (5 min to 130g). The next day, they were exposed at a dose of 1 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup> of MWCNT and 11 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup> of SWCNT for 4, 24h and 3 days. A control without CNT for each duration of exposure was also realized. And for each case, three replicates are tested. Cells are then recovered and centrifuged (5min to 130g), the pellets are resuspended in 500 µl of PBS and the suspensions are then spread on slides and allowed to dry for at least 30 min. Once dried, the slides are immersed in different dyes following the supplier's instructions (RAL 555 Kit, RAL Diagnostics Martillac, and France): 5s in a bath of fixation, then 5s in the eosine and finally 3s in the azure of methylene. The slides are then observed under optical microscope (x400 magnification).

### 3. Results

#### 3.1 Characterization of CNT

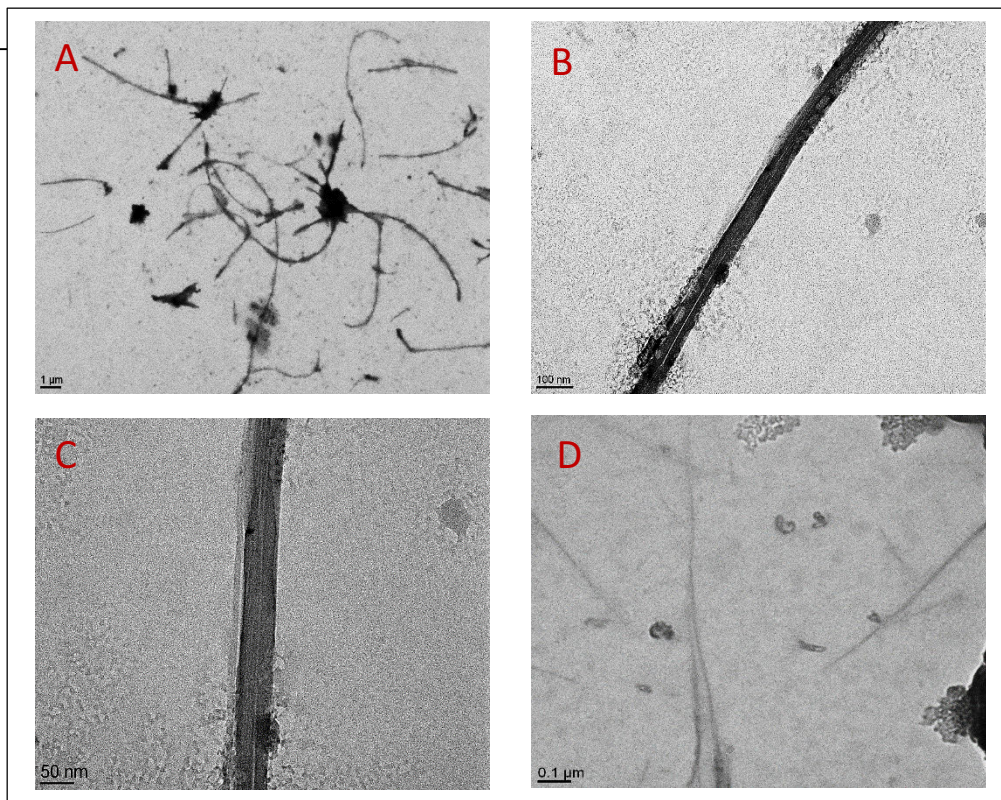
CNT length and structure were studied using TEM. Figure 1 display the structure of Mitsui-7 and NRCWE-055 suspended in media with 2% FBS post 15 min sonication. The length of MWCNT was approximately 4  $\mu\text{m}$  and the diameter of SWCNT was approximately 3  $\mu\text{m}$  (table 1). The percentage of impurities are listed in Table for both CNT. SWCNT contains higher percentage of metal in global as impurities compared to MWCNT (1.4 > 0.0004), especially iron and cobalt. Also it has higher ROS generation ability: slope fluorescein of MWCNT > SWCNT (table 2).

**Table 1:** Physical characteristics given by the provider (A), measured by electron microscopy (B) and DLS.

Name	Nanomaterial	Length ( $\mu\text{m}$ )		Diameter (nm)		Hydrodynamic diameter (nm)		Zeta potential		Surface area/BET ( $\text{m}^2/\text{g}$ )
		A	B	A	B	FBS	HS	FBS	HS	
NRCWE-006	MWCNT	5 $\pm$ 1	3 $\pm$ 2	74	65	557 $\pm$ 63	–	–	–	26
NRCWE-055	SWCNT	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	1-2	12	601 $\pm$ 90	–	-13.005 $\pm$ 0.025	–	453

**Table 2:** CNT metal impurities and calculated fluorescein slope.

Name	Fe2O3	CoO	Al2O3	MgO	Metal	Slope fluorescein/( $\text{cm}^2/\text{ml}$ )
NRCWE-006 MWCNT	0,08	0	0	0,013	0,00049	1301,92
NRCWE-055 SWCNT	4,386324	1,39	0,01	0,029449	1,401857	5570,96



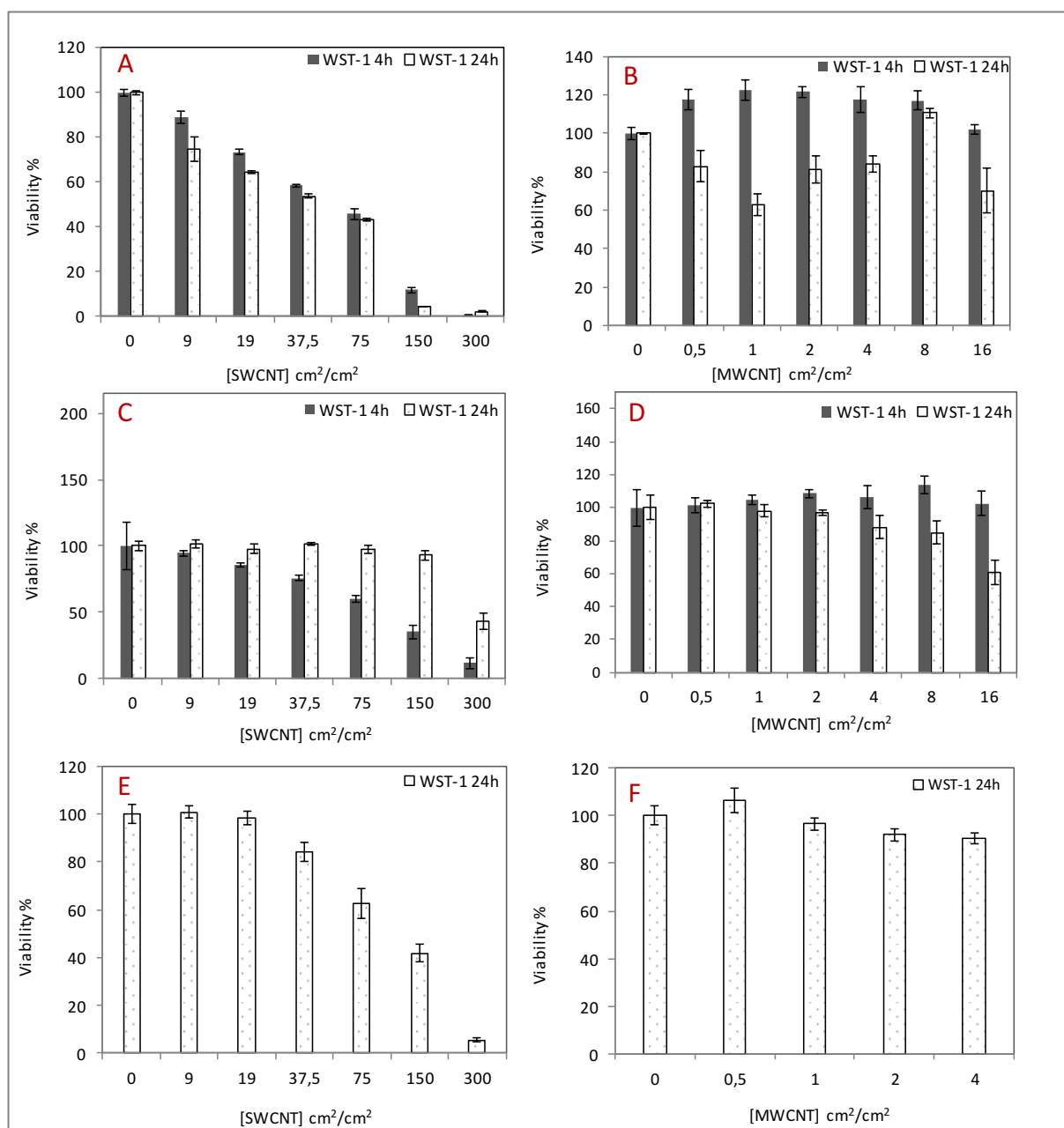
**Figure 1-** TEM images for MWCNT (a, b and c) and SWCNT (d) dispersed in DMEM High glucose with 2% FBS.

### 3.2 Cytotoxicity on NR8383 and THP1 cells

Cell viability of alveolar macrophages: As displayed in Fig.2, with increase in concentration of SWCNT and exposure duration (4–24 h), there was significant reduction in cell viability of rat alveolar macrophages (NR8383).  $IC_{50}$  for this SWCNT calculated at 24h was equal to  $44 \text{ cm}^2/\text{cm}^2$ .  $\frac{1}{4} IC_{50} = 11 \text{ cm}^2/\text{cm}^2$  was chosen for transcriptomic and proteomic studies in order to know the primary response of NR8383 cells to subtoxic dose of these CNT. Concerning MWCNT, no dose dependent cytotoxicity neither at 4 nor at 24h post exposure, the highest cell viability reduction was approximately 40% at  $1 \text{ cm}^2/\text{cm}^2$  after 24h exposure. Otherwise, there was a significant increase in cell viability at 0.5 and  $1 \text{ cm}^2/\text{cm}^2$  at 4h.  $IC_{50}$  for this MWCNT calculated at 24h was highest than the highest dose utilized in this test. Therefore, we choose  $1 \text{ cm}^2/\text{cm}^2$  as a dose for ulterior experiments since we had biological response at this concentration. In conclusion, we noted different toxicity effects of SWCNT and MWCNT on NR8383 cells, SWCNT was more cytotoxic to cells then MWCNT at tested concentrations.

Cell viability of THP-1 cells: no significant cytotoxicity induced by SWCNT dispersed in FBS except at the highest dose, we had approximately 60% of cell reduction at  $300 \text{ cm}^2/\text{cm}^2$ . Therefore, SWCNT dispersed in FBS induce less cytotoxicity on THP-1 cells than in NR8383 cells. Once SWCNT were dispersed in HS and HA, we had an increase in THP-1 cytotoxicity comparing with SWCNT dispersed in FBS,  $IC_{50}$  was equal to  $104 \text{ cm}^2/\text{cm}^2$ . Regarding MWCNT dispersed in FBS, no significant cytotoxicity in THP-1 cells, we have approximately 40% of cell reduction only at the highest dose  $16 \text{ cm}^2/\text{cm}^2$ . In addition, we do not have significant difference in cytotoxicity induced in THP-1 cells between MWCNT dispersed in HS and HA and MWCNT dispersed in FBS, except at the highest dose where we had significant decrease in cytotoxicity with MWCNT dispersed in HS and HA.

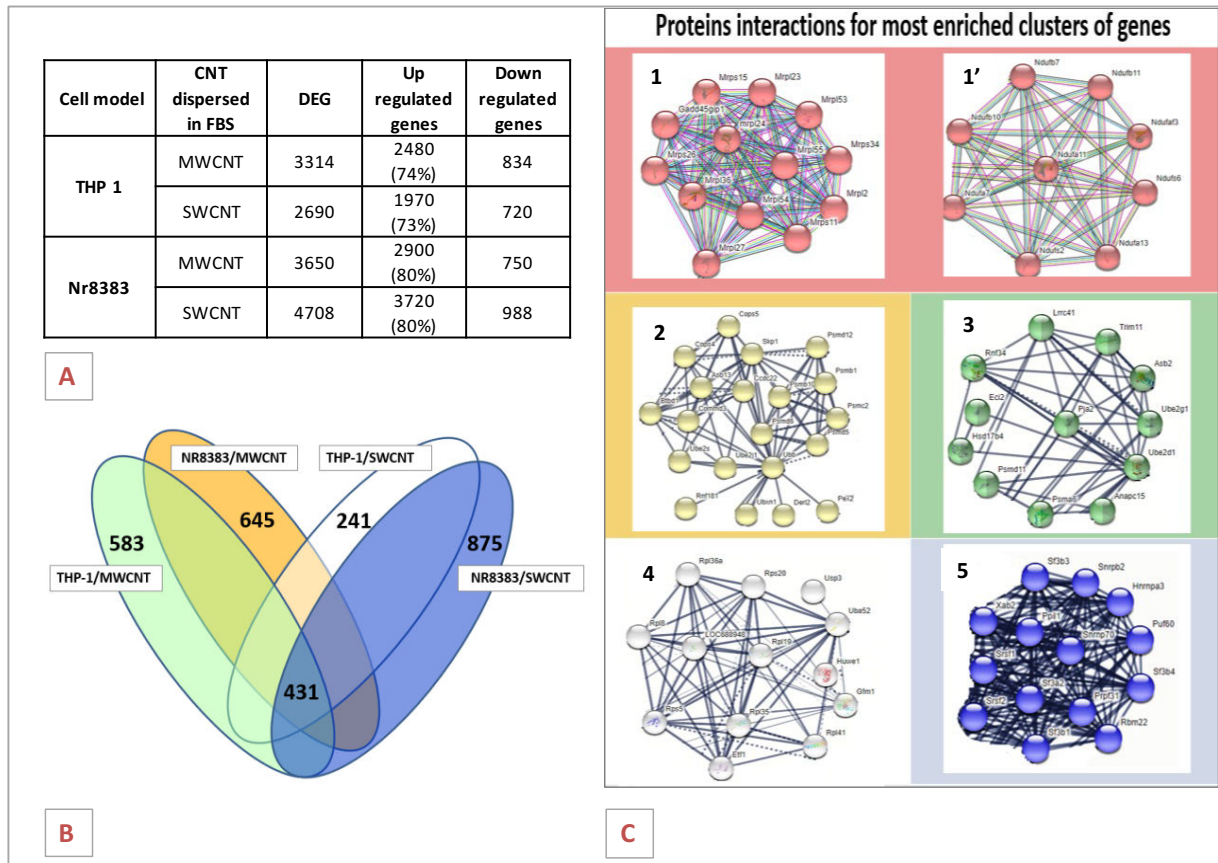
For both CNT in both cell model, we do not have a release of LDH (data not shown).



**Figure 2- Dose-dependent cytotoxicity: in NR8383 to SWCNT (A) and MWCNT (B) dispersed in FBS; in THP-1 cells exposed to SWCNT (C) and MWCNT (D) dispersed in FBS or to SWCNT (E) and MWCNT (F) dispersed in HS+HA. Results are mean  $\pm$  SE of the quadruplicate experiments,  $P < 0.001$ . The cytotoxicity was determined by WST-1 assay.**

### 3.3 Genome modulation

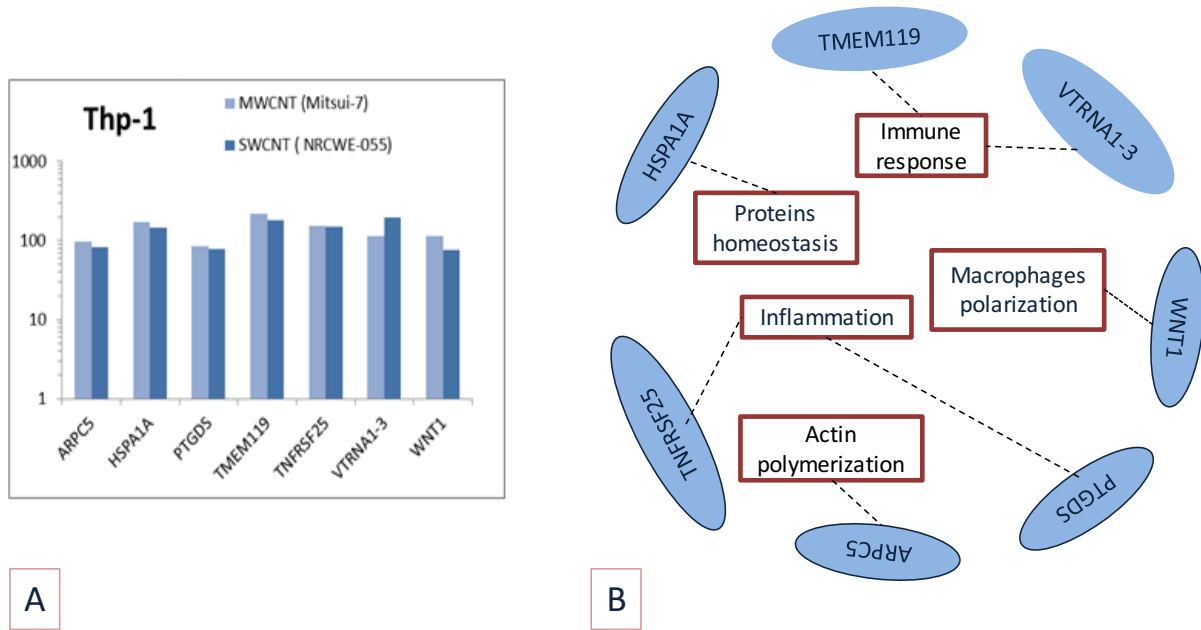
In order to investigate the impact of CNT exposure on rat and human macrophages genome, transcriptomics experiments were conducted. We are especially interested by the primary responses linked to sub-toxic doses of CNT exposure. We aimed to compare the effect of two CNT having similar length range but different diameter and metal impurities percentage, the SWCNT, NRCWE-055, had lower diameter and higher percentage of impurities comparing to the MWCNT, Mitsui-7. Exposure of macrophages, NR8383 and THP-1 cells, to CNT induce profound gene expression alteration. Both CNT induced higher gene expression variation in NR8383 cells comparing to THP-1 ones which correlates with cytotoxicity data. Interestingly, the number of differentially expressed genes (DEG) was higher in both cell types, when cells were exposed to SWCNT. 80 % of DEG were upregulated in THP-1 cells with both CNT while 73% to 74% of DEG were upregulated in NR8383 cells. We focus on the common changes in transcript expression induced by these MWCNT in both cell types, we have 431 common genes and a number of DEG unique to each exposure: 241 and 875 for SWCNT, 583 and 645 for MWCNT in THP-1 cells and NR8383 cells respectively. Interactions between the proteins encoded by these genes groups are shown in figure 3 (String analysis, p value=0.001, FC>1.5, high confidence). Common genes clusters were related to mitochondrial dysfunctions. The first one regroup a family of mitochondrial ribosomal proteins and the second one consists of ubiquinone oxidoreductase which are subunits of the mitochondrial membrane respiratory chain. Regarding the groups of DEG specific to each exposure, the main cluster related to SWCNT exposure on NR8383 cells was splicing activity while it was related to translation activity in THP-1 cells as it can be seen in figure 3. For MWCNT, their exposure was linked mainly in both cell models to post translational proteins modifications such as ubiquitination.



**Figure 3- Gene expression analysis after 4h exposure of NR8383 and THP-1 to SWCNT and MWCNT. (A) Table summarizing DEG, the upregulated and down regulated ones; (B) Venn diagram and (C) proteins interactions for most enriched clusters of genes: common between all exposures (1) mitochondrial ribosomal proteins, (1') subunits of the mitochondrial membrane respiratory chain; specific to MWCNT exposure in NR8383 cells (2) and THP-1 cells (3) proteins implicated in ubiquitination; specific to SWCNT exposure in THP-1 cells (4) proteins implicated in translation; and in NR8383 cells (5) proteins implicated in splicing.**

Otherwise, among the top ten of DEG upregulated ( $p$  value  $< 0.001$  and FC  $> 1.5$ ) for each exposure (Suppl.1), we can see that seven genes among those expressed in THP-1 cells are in common between both CNT (figure 4). Other DEG that were upregulated in both cell lines with both CNT were associated to inflammatory response: *Cxcl2*, *Ccl2* and *Tnfrsf25*, or macrophage polarization: *Tac4*, *Osm*, *Gdf15*, *Phf19*, *Wnt1* and *Csrnp1*. NR8383 exposure to SWCNT was characterized by such genes expression. However, among highly DEG, we revealed a transcriptomic proliferation signature with both CNT in both cell model. We found common DEG between both CNT, related to proliferation egg. *TIAM1*, *RASA1* and *PDGFRB* in THP-1 cells and others egg. *TP53INP1*, *Igf1*, *Mki67* and *Rictor* in NR8383 cells.

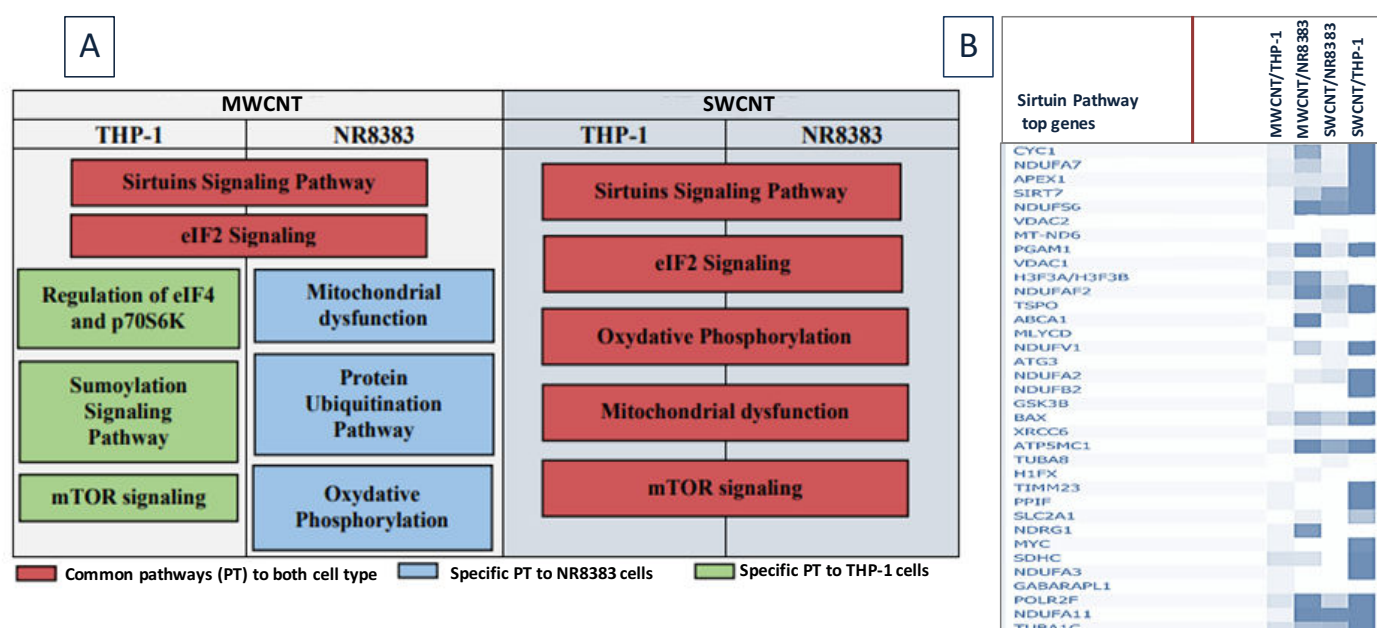




**Figure 4- FC of the common and highest overexpressed genes in THP-1 cells after exposure to MWCNT and SWCNT (A) and their associated molecular mechanisms (B).**

Regarding dysregulated pathways, we identified two common pathways deregulated with these CNT in both cell type, the “Sirtuin signaling pathway” and “Eif2 signaling pathway” (IPA analysis, p value=0.001, FC>1.5). The pathway with the most enriched group of genes was “Sirtuin signaling pathway”. The heat map showed genes expression levels belonging to this pathway for each exposure (figure 5). We can see that Sirtuin signaling pathway was more dysregulated in NR8383 cells than in THP-1 cells with both CNT. In NR8383 cells, SWCNT impact more this pathway than MWCNT (Overlay: 38.7% for SWCNT > 25.9% for MWCNT, P value:  $4.16^{-24}$  for SWCNT <  $5.97^{-11}$  for MWCNT) which is not the case in THP-1 cells.

As it was noticed previously, according to our analysis using String data base, mitochondrial perturbation was a common response to all of these exposures. This finding was also seen using IPA data base except for THP-1 cells exposure to MWCNT. SWCNT induce deregulation of mitochondrial dysfunctions pathway in both cell types, also MWCNT had this effect on NR8383 cells only. Therefore the mitochondria seems to be the common target of these CNT. The deregulation of “Mitochondrial dysfunctions pathway” was accompanied with the deregulation of “Oxidative phosphorylation pathway” (figure 5).

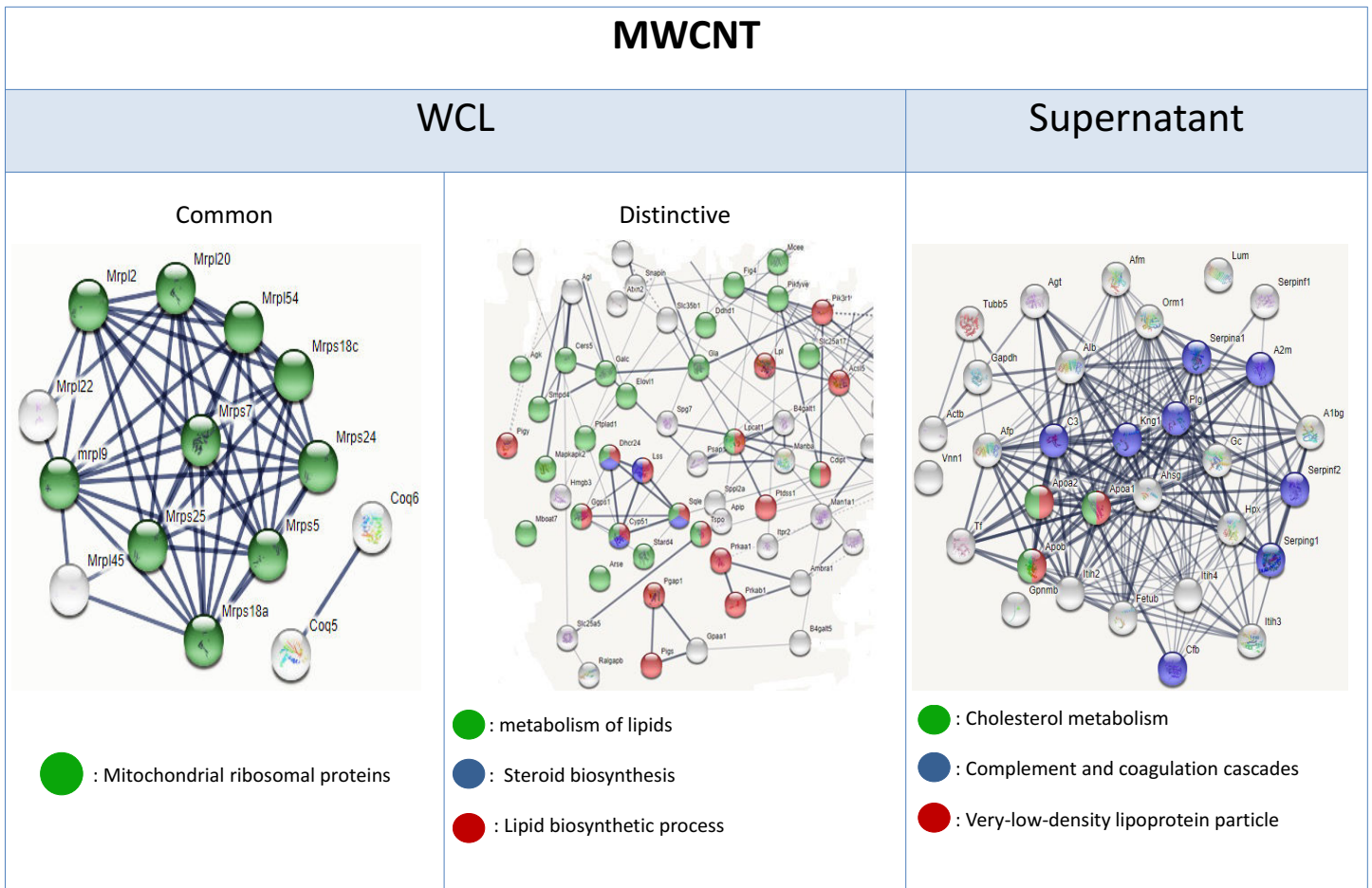


**Figure 5- Top five canonical pathway deregulated in NR8383 cells and THP-1 ones after exposure to MWCNT and SWCNT (A) and expression level of top Sirtuin signaling pathway genes deregulated in each exposure.**

### 3.4 Proteome modulation

In order to verify which genes expressions variations will lead to proteins modifications thus impacting macrophages responses, a proteomic screening was conducted. This allowed us also to know which kind of stress induced by this CNT initiated at 4h at gene expression level and persisting after 24h at protein level. We are especially interested by common genes and proteins expressed.

Starting by NR8383 exposure to MWCNT, we found in common between transcriptomic and proteomic data corresponding to whole cell lysate 142 DEP (differentially expressed proteins). The most significant cluster among them was related to ribosomal mitochondrial proteins (figure 6). The cluster related to proteins that are not expressed at gene levels are related to lipid metabolism (figure 6). Supernatant DEP are also related to lipid metabolism and to complement and coagulation cascades (figure 6).



**Figure 6- Main clusters of DEP: common with gene expression coding mitochondrial ribosomal proteins; distinctive/not found at gene expression level related to metabolism of lipids, steroid biosynthesis and lipid biosynthetic process, in WCL of NR8383 after exposure to MWCNT for 24h. Main cluster of DEP in supernatant of NR8383 after exposure to MWCNT for 24h related to cholesterol metabolism, complement and coagulation cascades and very-low-density lipoprotein particle.**

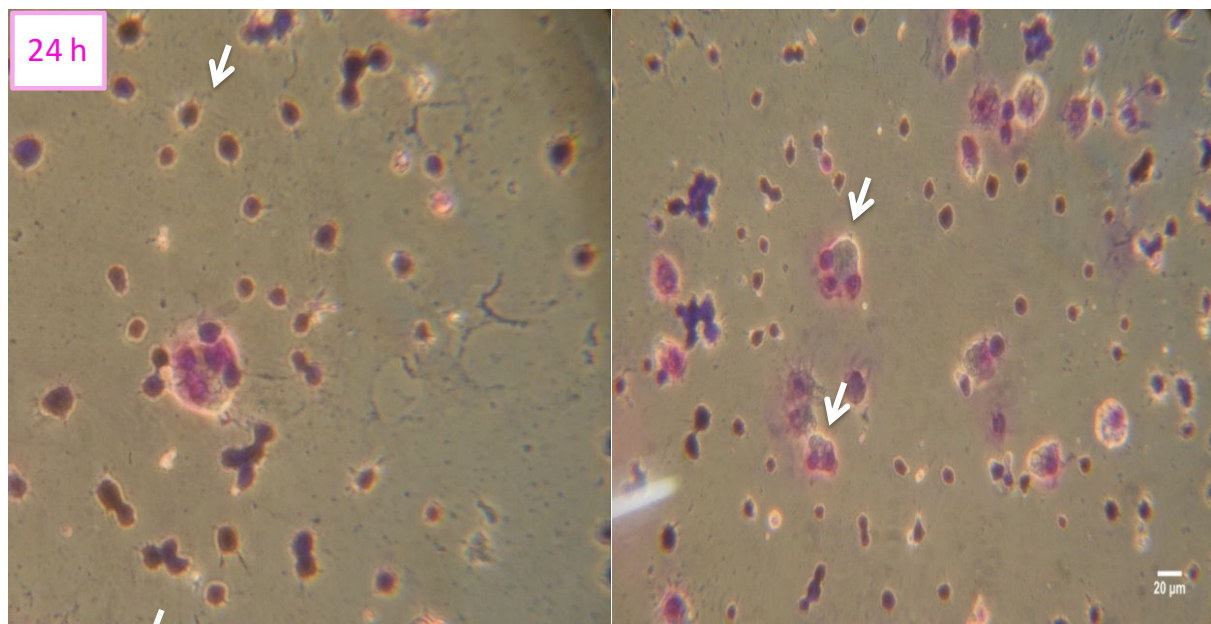
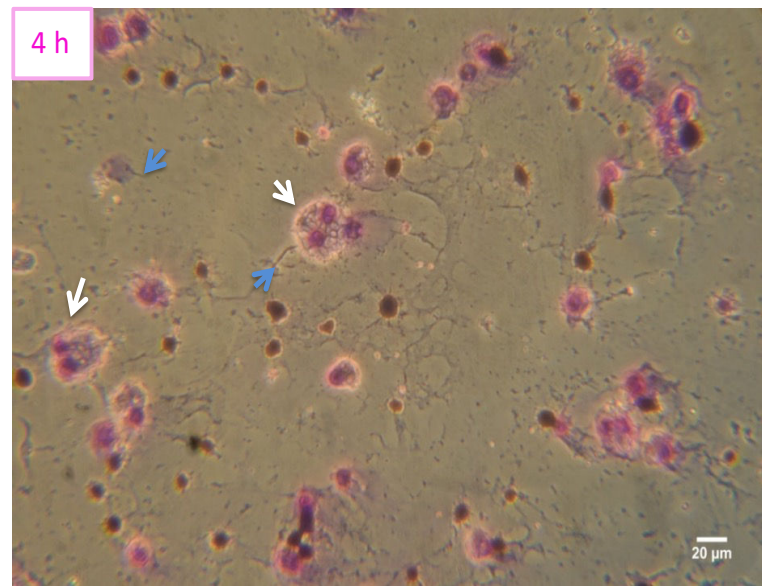
Regarding NR8383 exposure to SWCNT, common DEP were 190 (differentially expressed proteins) among them a cluster of proteins related to ribosomal mitochondrial proteins. The clusters of DEP that were not found at gene level were related to RNA metabolism and mitotic prometaphase. Similar to MWCNT, the supernatant DEP are related to complement and coagulation cascades (figure 7).



Both CNT dispersed in FBS or in LS induce the expression of proteins implicated in immune response, vesicle mediated transport and regulated exocytosis. WCL and supernatant of THP-1 cells after exposure to CNT dispersed in FBS show higher number of DEP than CNT dispersed in LS especially for SWCNT. WCL show DEP related to purine ribonucleotide binding with both CNT dispersed in FBS. For those dispersed in LS, we have DEP related to Syntaxin and SNARE binding for MWCNT and to mitochondria binding for SWCNT. For supernatant, in LS we have DEP related to a response to toxic substance with both CNT (Suppl.4 and Suppl.5).

### **3.5 NR8383 and THP-1 morphological study**

The images taken on all the slides observed under an optical microscope (at x100 or x400) show the presence of syncytia (white arrows) and foamy macrophages following exposure of NR8383 cells to MWCNT for 4 and 24h which was not found with SWCNT or in THP-1 cells . A syncytium is characterized by the presence of two or more nuclei within the cell.



**Figure 8-** Images of NR8383 cells stained according to MGG technique, after exposure for 4h and 24h to MWCNT at  $1 \text{ cm}^2 / \text{cm}^2$ . Syncytium are designated by white arrows and MWCNT nanotubes by blue arrows.

#### 4. Discussion:

In the present work we have performed a genome and proteome wide study on the effect of two types of CNT: SWCNT and MWCNT from similar length range, on two macrophages models: NR8383 and THP-1 differentiated with PMA. After assessing cytotoxicity study, we obtained higher cell reduction with SWCNT then MWCNT in both cell types. This result was found also by Jia et al., SWCNT induce higher cytotoxicity in alveolar macrophages then MWCNT [30]. Kumarathasan et al., showed positive correlation between surface area, metals content and cellular ATP which can explain our result: SWCNT which has higher surface area and metals content comparing to MWCNT undergoes higher mitochondrial damage according to WST-1 test [31]. Also, in Knirsh et al., study they show that metal content increase SWCNT toxicity in NR8383 cells using also WST-1 test [32]. This higher cytotoxicity of this SWCNT can be due also to its higher oxidative potential, as it was conclude by Kim et al [33]. Cytotoxicity increased when we dispersed these SWCNT with surfactant comparing to those dispersed in FBS especially at higher does. It may be due to the high dispersion of SWCNT in HS and albumin [34]. The cytotoxicity endpoints were steeper with NR8383 cells compared to THP-1 cells with both CNT. Both cell lines, besides originating from different species, have different phenotype, as THP-1 differentiated with PMA are adherent cells, whereas NR8383, monocyte-macrophage cell line [35], exhibit as 50 % of adherent and 50 % of non-adherent cells. Monocytes have showed higher uptake of monocrySTALLINE iron oxide (MION) particles then peritoneal macrophages which is attributed to the variant differentiation stage of the phagocytes [36]. Thus, we suggest that NR8383 cells were more damaged by these CNT because CNT uptake was higher in NR8383 cells then in THP-1 cells. Moreover, gene expression also was altered more in NR8383 cells then in THP-1 ones with both CNT which is consistent with cytotoxicity results.

Both CNT damage the mitochondria in both cell models, interestingly they alter mitochondrial ribosomal proteins (MRP) expression, which was not seen, to our knowledge, with CNT in previous studies. Mitoribosomes activity disruption undergoes oxidative phosphorylation impairment thus altering macrophages growth and differentiation [37]. So, it was evident that MWCNT/Mitsui-7 having the lowest cytotoxic effect on THP-1 cells comparing to his effect on NR8383 cells and to SWCNT exposures in both cell models, do not significantly disrupt mitochondrial and oxidative phosphorylation pathways in this cell model (Figure 5). Another common response to both CNT in both cell types was the dysregulation of Sirtuin signaling pathway. Some Sirtuin like SIRT3 are localized exclusively in mitochondria, SIRT3 can regulate characteristic mitochondrial processes like protein deacetylation. The perturbation of these actors undergoes mitochondrial dysfunctions, inflammation, oxidative stress and lipid accumulation. Therefore, we think that CNT by targeting the mitochondria stimulate Sirtuin signaling. To our knowledge, CNT exposure was never correlated with

Sirtuin pathway deregulation although these histone deacetylases may be an interesting regulator of CNT effects in macrophages especially that they are implicated in some key events and adverse outcome associated to CNT exposure like oxidative stress, acute and chronic inflammation, fibrosis and cancer.

In NR8383 cells, MWCNT stimulate ubiquitin proteasome activity, we have an overexpression of Psmc2, Psmd6, Ube2s... (Figure 3.2). This activation would be in response to reticulum endoplasmic stress (RES) as ubiquitination is required for efficient removal and degradation of misfolded proteins [38]. The dysregulation of mTOR, eif2 and Sirtuin signaling pathways in addition to overexpression of several ribosomal proteins Rps14, Rps27, Xbp-1 confirm the induction of RES after NR8383 exposure to MWCNT [39]. This result was found by Cao et al., they show that MWCNT induced RES in HUVECs cells [40] and in THP-1 cells [19]. In their first study they prove that RES was MWCNT diameter dependent and in their second study they associate that stress to lipid accumulation. This finding is consistent with our results. As we can see in figure 8, we have foamy macrophages after NR8383 exposure to MWCNT for 4 h and 24 h, using MGG staining.

At gene expression level, we have under expression of Abca1 gene that promote foam cell formation [41]. Also, whole cell lysate (WCL) proteome analysis of NR8383 cells exposed to MWCNT, showed lipid metabolism perturbation (figure 6), and cholesterol biosynthesis pathway deregulation (Suppl.4; Suppl.5). We found apolipoproteins in WCL and supernatant, ApoA1 and ApoA2, so it seems that alveolar macrophages by upregulation of apolipoproteins enhance cholesterol efflux from foam macrophages to reduce lipid accumulation [42]. All these findings indicate that MWCNT by damaging the reticulum endoplasmic function contribute to lipid metabolism perturbation and foam macrophages formation. Sirtuin are implicated also in lipid metabolism [43], [44], so the deregulation of this pathway could be a second reason of lipid metabolism perturbation or a response to control this perturbation. Sirt3 that inhibits lipid accumulation in macrophages as it was concluded by Sheng et al., was overexpressed according to our results, in NR8383 cells after 4 h exposure to MWCNT which confirm the possible role of these histone deacetylases in regulation of such stress. However, "Foamy macrophages" were found also by Fujita et al. who exposed NR8383 cells to CNT. In their study they found also granulomas formation when rats were exposed to same CNT [14]. So foamy macrophages formation is linked to granuloma development.



Otherwise NR8383 images taken after exposure to this MWCNT showed syncytia formation. A syncytium is a fusion of monocytes and macrophages that develops following infection [45]. We have also an overexpression of *Cd14* gene receptor which is also characteristic of these giant cells [46]. The formation of such syncytium is usually favored by the secretion of cytokines [45], [47],[48],[49]. Mitsui showed overexpression of inflammatory genes: *Ccl2*, *Ccl6*, *Nfil3*, *Ciapin1*, *Il-1b*, *Ilf3* at 4h, also we have inflammatory molecules in WCL: *Il7*, *Il1a*, and *Il7r*. So, MWCNT/Mitsui-7 by inducing an inflammatory reaction promote NR8383 macrophages and monocytes fusion thus forming giant cells with several nuclei (figure 8). Syncytia and foamy macrophages are characteristic of granuloma formation [45], [50], [51], [52], [53]. While referring to certain studies showing that Mitsui-7, the MWCNT we used, induce the formation granulomas in vivo [8], our results validate these observations by a simple in vitro test and reveals a key events that can lead to granulomas formation. As we can see in figure 3, we have a hormesis after 4h exposure to MWCNT [54]. Moreover, we reveal *Il-1a* in WCL of these cells, so we can conclude that MWCNT by inducing *Il1a* secretion promote macrophages proliferation and differentiation which gives them critical phagocytic functions and organize granuloma as it was demonstrated by Huaux et al. [55].

Similar responses are found in THP-1 cells after exposure to MWCNT, we have mitochondrial ribosomal proteins overexpression, Sirtuin signaling deregulation, reticulum endoplasmic dysfunction, and lipid metabolism perturbation but we did not found foamy macrophages or syncytia formation as it was the case with alveolar macrophages. Instead of that, we observed DEP related to regulated exocytosis and immune response in THP-1 cells. Also, we found DEP related to Syntaxin, SNARE binding and Response to a toxic, when MWCNT were dispersed in HS, whereas we found those related to purine binding when CNT were dispersed in FBS. Since Syntaxin, SNARE and Purine are implicated in macrophages polarization, we can suggest that THP-1 cells are activated and could initiate an effective immune response due to MWCNT exposure but following different signaling pathways depending on MWCNT corona [56],[57], [58], [59]. Otherwise, we may have also lysosomal exocytosis triggered by the overexpression of TFEB (FC=6) and SNARE complex formation, in the case of THP-1 cells exposed to MWCNT dispersed in HS, which maintain lipid homeostasis and prevent foamy macrophages formation [60]. A second reason of non-formation of these foamy macrophages in the case of THP-1 cells is macrophages differentiation state as it was conclude by Most et al. [45].

Regarding SWCNT, it induce, as MWCNT, deregulation of ribosomal proteins, mTOR, and eif2 pathways in NR8383 cells. We have also found in supernatant of NR8383 cells exposed to each one of these CNT, complement proteins contributing to inflammatory reaction [61], [62], [63].

But, SWCNT, unlike MWCNT, induce dose dependent cell death, splicing, RNA metabolism perturbation in NR8383 cells. Similar results were obtained by Ndika et al. : an altered spliceosome and ribosomal activities were identified after MRC9, A549 and human macrophages exposure to SWCNT [64] . Ndika relate these multiproteins complexes, reticulum endoplasmic and spliceosome, dysfunctions, to cytoskeleton damage induced by CNT. This can explain our results especially that certain genes *egg. Ckap5, Ckap2, Tuba1c, Tuba3a, Tpgs2, Myl4, Myo5a* and proteins Map1lc3b, Tbce, Myo5a, Rhot2 related to cytoskeleton were deregulated. However, spliceosome disruption can be due to SWCNT high metal impurities because spliceosome activity utilize catalytic metal ions [65]. Since we do not have this effect with our MWNT which have less impurities then SWCNT, this could be an explanation of the difference in response induced by these CNT. We can link also significant macrophages cell death after exposure to SWCNT to their effect on both ribosome and spliceosome, essential complexes for overall cellular homeostasis while with MWCNT, having an effect only in ribosome, that was not the case. Interestingly, our study, confirm Ndika et al. findings and support the potential of spliceosome and ribosome to be diagnostic markers of CNT exposure. Otherwise, SWCNT enhance NR8383 activation, we have an overexpression of *Tac4* [66], [67], *Gdf15* [68], *Cxcl2* [69], *Phf19* [70], *Osm* genes [71]. Serpin found in the supernatant confirm macrophages activation by SWCNT [72].

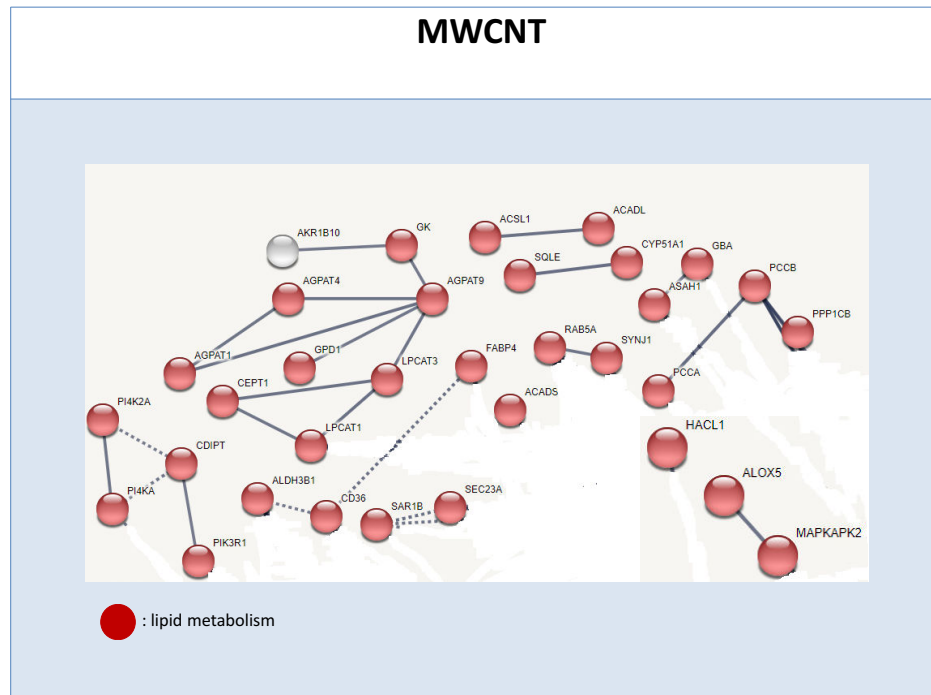
SWCNT do not undergo same effect in THP-1 cells comparing with NR8383 cells: neither cytotoxicity nor spliceosome dysfunction. Instead of that, we have deregulation of genes related to translation according to transcriptomic data. However, after 24h we do not found that at protein level, few proteins were in common with expressed genes as it was the case also with MWCNT. So, may THP-1 cells regulated proteins homeostasis after CNT exposure.

## 5. Conclusion

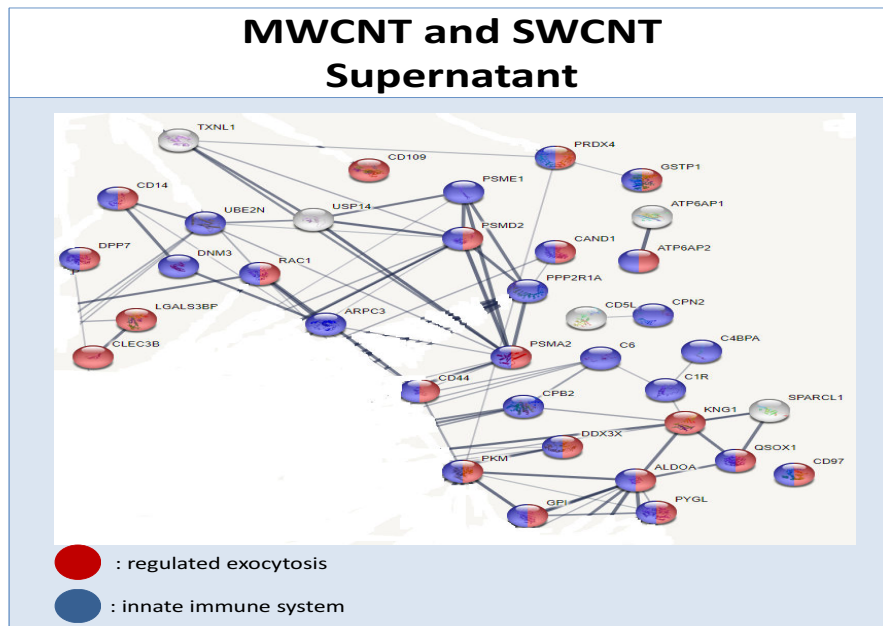
This study shows that CNT with similar length range undergo mitochondria and reticulum endoplasmic dysfunctions. We have common targets and common deregulated pathways in two different cell models which show the importance of length in determining CNT toxicity. However, some differences in cells' responses to each exposure have been revealed which is related to different physical and chemical characteristics of studied CNT, especially diameter and metal impurities. For MWCNT we have lipid metabolism perturbation reticulum endoplasmic dependent, in both cell lines but lipid accumulation was only seen with NR8383 cells. So, we suggest that regulated exocytosis observed in THP-1 cells may prevent foam cell formation. CNT corona seems to control this exocytosis which was Purine dependent when CNT were dispersed in FBS and SNARE/Syntaxin dependent when they were dispersed in HS. However, lipid accumulation was accompanied with syncytia formation, two key events of granuloma development that have been found with this MWCNT *in vivo*. Regarding SWCNT, metal impurities content lead to spliceosome disruption in NR8383 cells leading to cytotoxicity while no toxic effect in THP-1 ones. Finally, we conclude that SWCNT with smaller diameter induce cytotoxicity while MWCNT with higher diameter induce proliferation and have the ability for granuloma formation induction. Also, NR8383 macrophages are more damaged by CNT than differentiated THP-1 macrophages.

MWCNT (Mitsui-7)				SWCNT ( NRCWE-055)			
NR8383		Thp-1		NR8383		Thp-1	
Emp1	18,79	TMEM119	218.75	Tac4	46,52	VTRNA1-3	196.03
Rgcc	14,66	HSPA1A	172.30	Gdf15	18,81	TMEM119	178.69
Csrnp1	12,94	TNFRSF25	153.97	Cxcl2	17,84	TNFRSF25	148.93
Vom2r- ps135	11,43	VTRNA1-3	114.77	Cpa1	14,93	HSPA1A	146.95
Dusp2	11,32	WNT1	114.11	Phf19	14,66	ARPC5	82.69
S100a6	9,64	ARPC5	95.82	Osm	13,95	PTGDS	77.87
Cdc42ep2	9,13	PTGDS	84.53	Sohlh2	10,99	WNT1	75.11
Ccl2	8,96	Inc- AC006156.2- 6	67.54	Mafb	10,21	SNORA44	61.75
Hilpda	8,36	MFAP4	64.86	Ascl3	9,79	STATH	61.57
Jund	7,78	CSPG4	64.01	Myl4	9,60	Inc- KIAA0319L-1	60.80

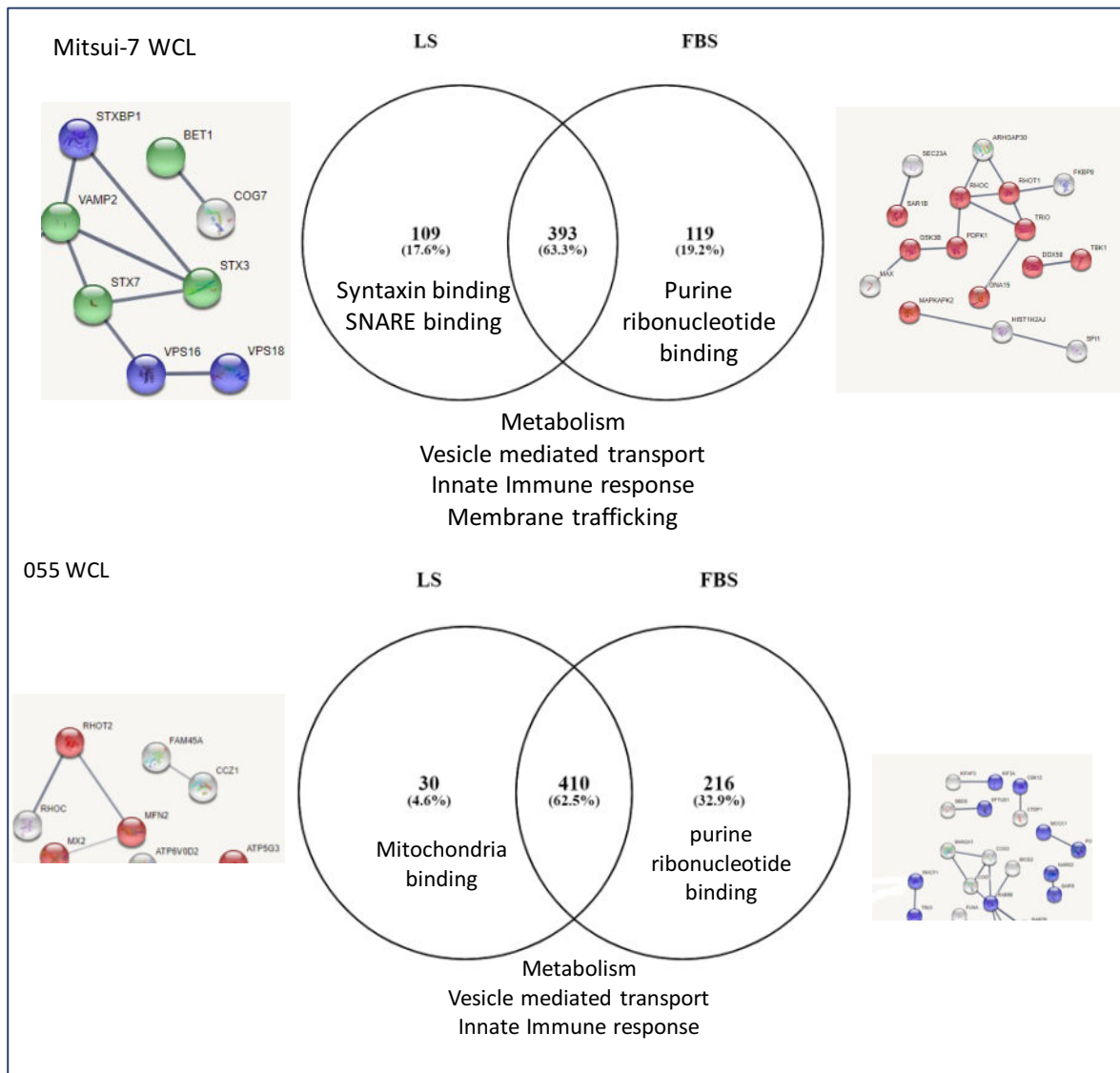
**Suppl.1-The top ten of DEG after NR8383 and THP-1 exposure to MWCNT and SWCNT for 4h.**



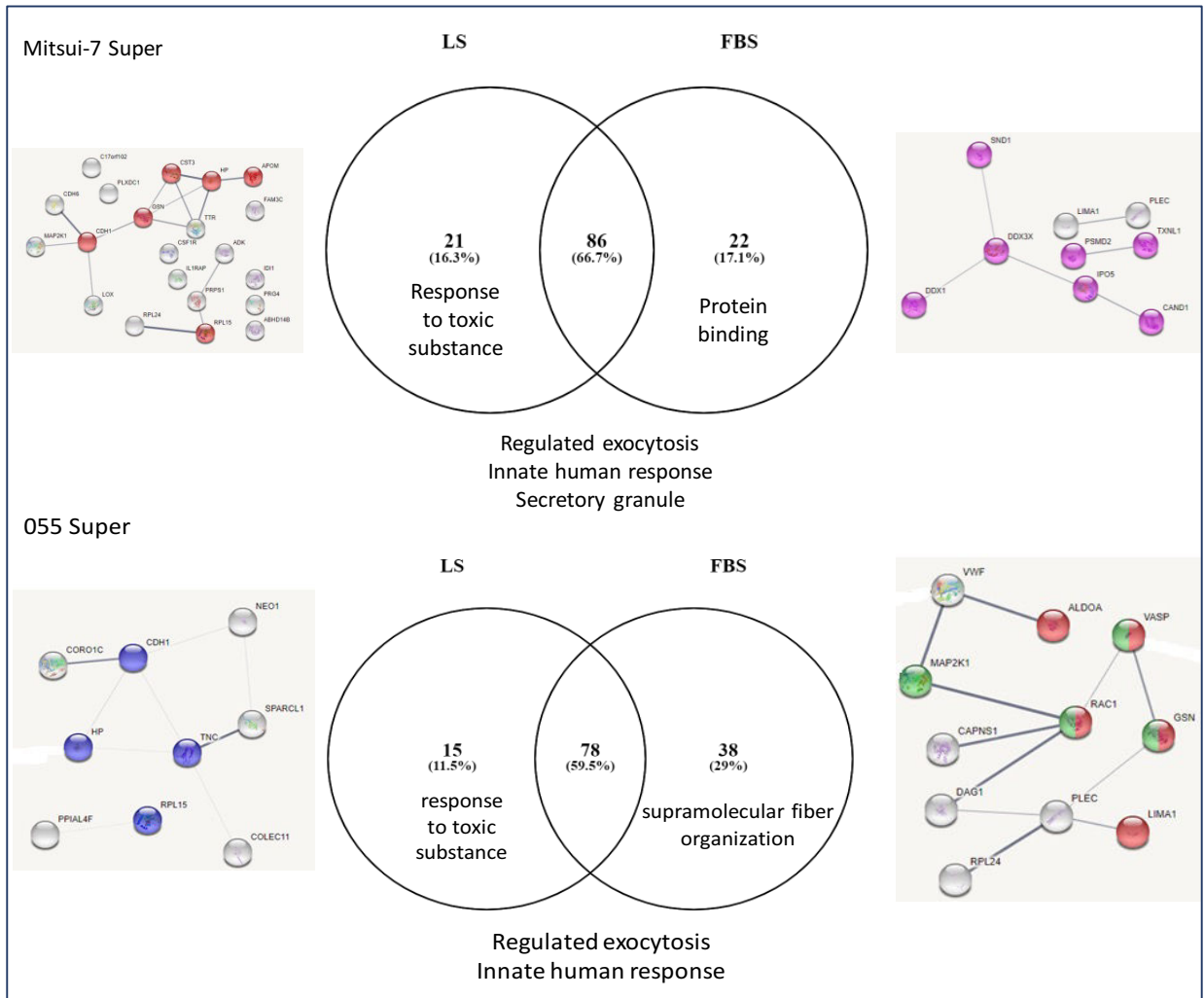
Suppl.2- Main clusters of DEP not found at gene expression level related to lipid metabolism in WCL of differentiated THP-1 cells after exposure to MWCNT for 24h.



Suppl.3- Main clusters of common DEP related to regulated exocytosis and immune cell response in supernatants of differentiated THP-1 cells after exposure to MWCNT or SWCNT for 24h.



**Suppl.4- Main clusters of common and distinctive DEP between WCL of THP-1 exposed to CNT dispersed in FBS and WCL of those exposed to CNT dispersed in HS.**



**Suppl.5- Main clusters of common and distinctive DEP between supernatant of THP-1 exposed to CNT dispersed in FBS and WCL of those exposed to CNT dispersed in HS.**

## References

- [1] “Applications of Carbon Nanotubes in Biotechnology and Biomedicine.” [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2745127/>. [Accessed: 13-Jul-2019].
- [2] “The application of carbon nanotubes in target drug delivery systems for cancer therapies.” [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3210734/>. [Accessed: 13-Jul-2019].
- [3] A. Bianco, K. Kostarelos, and M. Prato, “Applications of carbon nanotubes in drug delivery,” *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 9, no. 6, pp. 674–679, Dec. 2005.
- [4] “Mitochondria targeting nano agents in cancer therapeutics.” [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5228584/>. [Accessed: 13-Jul-2019].
- [5] “Carbon nanotubes as cancer therapeutic carriers and mediators.” [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5066859/>. [Accessed: 13-Jul-2019].
- [6] “NIOSH: Occupational Exposure to Carbon Nanotubes and Nanofibers | Nano.” [Online]. Available: <https://www.nano.gov/node/1007>. [Accessed: 11-Jul-2019].
- [7] Y. Qin *et al.*, “Long-term intravenous administration of carboxylated single-walled carbon nanotubes induces persistent accumulation in the lungs and pulmonary fibrosis via the nuclear factor-kappa B pathway,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 12, pp. 263–277, 2017.
- [8] L. Rahman *et al.*, “Multi-walled carbon nanotube-induced genotoxic, inflammatory and profibrotic responses in mice: Investigating the mechanisms of pulmonary carcinogenesis,” *Mutat. Res.*, vol. 823, pp. 28–44, Nov. 2017.
- [9] A. A. Shvedova *et al.*, “Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice,” *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 289, no. 5, pp. L698-708, Nov. 2005.
- [10] A. A. Shvedova *et al.*, “Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis,” *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 295, no. 4, pp. L552–L565, Oct. 2008.
- [11] R. Girardello, N. Baranzini, G. Tettamanti, M. de Eguileor, and A. Grimaldi, “Cellular responses induced by multi-walled carbon nanotubes: in vivo and in vitro studies on the medicinal leech macrophages,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 8871, Dec. 2017.
- [12] “The toxic effects of single-walled carbon nanotubes are linked to the phagocytic ability of cells - Toxicology Research (RSC Publishing).” [Online]. Available: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/tx/c3tx50099c#!divAbstract>. [Accessed: 13-Jul-2019].
- [13] “Mechanisms of lung fibrosis induced by carbon nanotubes: towards an Adverse Outcome Pathway (AOP).” [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4772332/>. [Accessed: 13-Jul-2019].
- [14] K. Fujita *et al.*, “Size effects of single-walled carbon nanotubes on in vivo and in vitro pulmonary toxicity,” *Inhal. Toxicol.*, vol. 27, no. 4, pp. 207–223, Mar. 2015.
- [15] “Multi-walled carbon nanotubes induce stronger migration of inflammatory cells in vitro than asbestos or granular particles but a similar pattern of inflammatory mediators - ScienceDirect.”



- [16] S. Nahle *et al.*, “Single wall and multiwall carbon nanotubes induce different toxicological responses in rat alveolar macrophages,” *J. Appl. Toxicol.*, vol. 0, no. 0.
- [17] “Elucidation mechanism of different biological responses to multi-walled carbon nanotubes using four cell lines.” [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3260041/>. [Accessed: 13-Jul-2019].
- [18] “Biological effects of double-walled carbon nanotubes on the innate immune system: An in vitro study on THP-1 human monocytes. - PubMed - NCBI.” [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27475286>. [Accessed: 13-Jul-2019].
- [19] J. Long, W. Ma, Z. Yu, H. Liu, and Y. Cao, “Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) promoted lipid accumulation in THP-1 macrophages through modulation of endoplasmic reticulum (ER) stress,” *Nanotoxicology*, pp. 1–14, Apr. 2019.
- [20] M. Allegri *et al.*, “Toxicity determinants of multi-walled carbon nanotubes: The relationship between functionalization and agglomeration,” *Toxicol. Rep.*, vol. 3, pp. 230–243, 2016.
- [21] “Complex organic corona formation on carbon nanotubes reduces microbial toxicity by suppressing reactive oxygen species production - Environmental Science: Nano (RSC Publishing).” [Online]. Available: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/en/c5en00229j#!divAbstract>. [Accessed: 13-Jul-2019].
- [22] A. A. Shvedova, A. Pietroiusti, B. Fadeel, and V. E. Kagan, “Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: Focus on oxidative stress,” *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 261, no. 2, pp. 121–133, Jun. 2012.
- [23] “Macrophage sensing of single-walled carbon nanotubes via Toll-like receptors | Scientific Reports.” [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-19521-9>. [Accessed: 10-Jul-2019].
- [24] “Effect of Reconstituted Pulmonary Surfactant Containing the 6000-Dalton Hydrophobic Protein on Lung Compliance of Prematurely Delivered Rabbit Fetuses | Pediatric Research.” [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/pr19886>. [Accessed: 13-Jul-2019].
- [25] “Barrier or carrier? Pulmonary surfactant and drug delivery. - PubMed - NCBI.” [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25709061>. [Accessed: 13-Jul-2019].
- [26] “Pulmonary surfactant and nanocarriers: Toxicity versus combined nanomedical applications. - PubMed - NCBI.” [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28450046>. [Accessed: 13-Jul-2019].
- [27] R. Safar *et al.*, “Cytotoxicity and global transcriptional responses induced by zinc oxide nanoparticles NM 110 in PMA-differentiated THP-1 cells,” *Toxicol. Lett.*, Nov. 2018.
- [28] W. Chanput, J. J. Mes, and H. J. Wichers, “THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach,” *Int. Immunopharmacol.*, vol. 23, no. 1, pp. 37–45, Nov. 2014.
- [29] “SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS<sup>12</sup> | American Journal of Epidemiology | Oxford Academic.” [Online]. Available: <https://academic.oup.com/aje/article-abstract/27/3/493/99616>. [Accessed: 19-Jul-2019].

- [30] G. Jia *et al.*, “Cytotoxicity of Carbon Nanomaterials: Single-Wall Nanotube, Multi-Wall Nanotube, and Fullerene,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, no. 5, pp. 1378–1383, Mar. 2005.
- [31] P. Kumarathanan *et al.*, “Cytotoxicity of carbon nanotube variants: A comparative *in vitro* exposure study with A549 epithelial and J774 macrophage cells,” *Nanotoxicology*, vol. 9, no. 2, pp. 148–161, Feb. 2015.
- [32] J. M. Wörle-Knirsch, K. Pulskamp, and H. F. Krug, “Oops They Did It Again! Carbon Nanotubes Hoax Scientists in Viability Assays,” *Nano Lett.*, vol. 6, no. 6, pp. 1261–1268, Jun. 2006.
- [33] J. S. Kim and I. J. Yu, “Single-Wall Carbon Nanotubes (SWCNT) Induce Cytotoxicity and Genotoxicity Produced by Reactive Oxygen Species (ROS) Generation in Phytohemagglutinin (PHA)-Stimulated Male Human Peripheral Blood Lymphocytes,” *J. Toxicol. Environ. Health A*, vol. 77, no. 19, pp. 1141–1153, Oct. 2014.
- [34] L. Wang *et al.*, “Dispersion of single-walled carbon nanotubes by a natural lung surfactant for pulmonary *in vitro* and *in vivo* toxicity studies,” *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 7, no. 1, p. 31, 2010.
- [35] M. N. Rosenblatt, J. R. Burns, V. E. Duncan, and J. A. Hughes, “Infection of the Macrophage Cell Line NR8383 with *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra) Leads to an Increase in Oligodeoxynucleotide Accumulation,” *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–9, Feb. 2000.
- [36] R. Weissleder, H.-C. Cheng, A. Bogdanova, and A. Bogdanov, “Magnetically labeled cells can be detected by MR imaging,” *J. Magn. Reson. Imaging*, vol. 7, no. 1, pp. 258–263, Jan. 1997.
- [37] J. E. Sylvester, N. Fischel-Ghodsian, E. B. Mougey, and T. W. O’Brien, “Mitochondrial ribosomal proteins: Candidate genes for mitochondrial disease,” *Genet. Med.*, vol. 6, no. 2, pp. 73–80, Apr. 2004.
- [38] Y. C. Tsai and A. M. Weissman, “Ubiquitylation in ERAD: reversing to go forward?,” *PLoS Biol.*, vol. 9, no. 3, p. e1001038, Mar. 2011.
- [39] J. B. DuRose, D. Scheuner, R. J. Kaufman, L. I. Rothblum, and M. Niwa, “Phosphorylation of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Coordinates rRNA Transcription and Translation Inhibition during Endoplasmic Reticulum Stress,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 29, no. 15, pp. 4295–4307, Aug. 2009.
- [40] X. Zhao, S. Chang, J. Long, J. Li, X. Li, and Y. Cao, “The toxicity of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) to human endothelial cells: The influence of diameters of MWCNTs,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 126, pp. 169–177, Apr. 2019.
- [41] L. Yvan-Charvet *et al.*, “Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice,” *J. Clin. Invest.*, p. JCI33372, Nov. 2007.
- [42] A. M. Allen and A. Graham, “Mitochondrial function is involved in regulation of cholesterol efflux to apolipoprotein (apo)A-I from murine RAW 264.7 macrophages,” *Lipids Health Dis.*, vol. 11, p. 169, Dec. 2012.
- [43] X. Ye, M. Li, T. Hou, T. Gao, W. Zhu, and Y. Yang, “Sirtuins in glucose and lipid metabolism,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 1, pp. 1845–1859, Sep. 2016.
- [44] S. Sheng, Y. Kang, Y. Guo, Q. Pu, M. Cai, and Z. Tu, “Overexpression of Sirt3 inhibits lipid accumulation in macrophages through mitochondrial IDH2 deacetylation,” *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, vol. 8, no. 8, pp. 9196–9201, Aug. 2015.

- [45] “Formation of Multinucleated Giant Cells In Vitro Is Dependent on the Stage of Monocyte to Macrophage Maturation | Blood Journal.” [Online]. Available: <http://www.bloodjournal.org/content/89/2/662?sso-checked=true>. [Accessed: 16-Jun-2019].
- [46] H. Takano, “Comparison of the activities of multinucleated bone-resorbing giant cells derived from CD14-positive cells in the synovial fluids of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients,” *Rheumatology*, vol. 43, no. 4, pp. 435–441, Jan. 2004.
- [47] A. McInnes, “Interleukin 4 induces cultured monocytes/macrophages to form giant multinucleated cells,” *J. Exp. Med.*, vol. 167, no. 2, pp. 598–611, Feb. 1988.
- [48] R. I. Endow, G. W. Sullivan, H. T. Carper, and G. L. Mandell, “Induction of Multinucleated Giant Cell Formation from *In Vitro* Culture of Human Monocytes with Interleukin-3 and Interferon- $\gamma$ : Comparison with Other Stimulating Factors,” *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 6, no. 1, pp. 57–62, Jan. 1992.
- [49] M. T. Quinn and I. A. Schepetkin, “Role of NADPH Oxidase in Formation and Function of Multinucleated Giant Cells,” *J. Innate Immun.*, vol. 1, no. 6, pp. 509–526, Oct. 2009.
- [50] C. M. McClean and D. M. Tobin, “Macrophage form, function, and phenotype in mycobacterial infection: lessons from tuberculosis and other diseases,” *Pathog. Dis.*, vol. 74, no. 7, p. ftw068, Oct. 2016.
- [51] “Foamy macrophages and the progression of the human TB granuloma.” [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2759071/>. [Accessed: 14-Jun-2019].
- [52] M.-P. Puissegur *et al.*, “Mycobacterial Lipomannan Induces Granuloma Macrophage Fusion via a TLR2-Dependent, ADAM9- and  $\beta$ 1 Integrin-Mediated Pathway,” *J. Immunol.*, vol. 178, no. 5, pp. 3161–3169, Mar. 2007.
- [53] “An Overview of the Derivation and Function of Multinucleated Giant Cells and Their Role in Pathologic Processes - The American Journal of Pathology.” [Online]. Available: [https://ajp.amjpathol.org/article/S0002-9440\(18\)30004-X/fulltext](https://ajp.amjpathol.org/article/S0002-9440(18)30004-X/fulltext). [Accessed: 20-Jul-2019].
- [54] I. Iavicoli, E. J. Calabrese, and M. A. Nascarella, “Exposure to Nanoparticles and Hormesis,” *Dose-Response*, vol. 8, no. 4, p. dose-response.1, Oct. 2010.
- [55] F. Huaux *et al.*, “IL-1 $\alpha$  induces CD11b<sup>low</sup> alveolar macrophage proliferation and maturation during granuloma formation: IL-1 $\alpha$  is crucial for macrophage proliferation,” *J. Pathol.*, vol. 235, no. 5, pp. 698–709, Apr. 2015.
- [56] “Alveolar macrophages and pulmonary surfactant more than just friendly neighbours.OA Biology.” [Online]. Available: <http://www.oapublishinglondon.com/article/1079>. [Accessed: 20-Jul-2019].
- [57] J. G. Kay, R. Z. Murray, J. K. Pagan, and J. L. Stow, “Cytokine Secretion via Cholesterol-rich Lipid Raft-associated SNAREs at the Phagocytic Cup,” *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 17, pp. 11949–11954, Apr. 2006.
- [58] B. N. Desai and N. Leitinger, “Purinergic and calcium signaling in macrophage function and plasticity,” *Front. Immunol.*, vol. 5, p. 580, 2014.

- [59] A. Ohradanova-Repic *et al.*, “Extracellular Purine Metabolism Is the Switchboard of Immunosuppressive Macrophages and a Novel Target to Treat Diseases With Macrophage Imbalances,” *Front. Immunol.*, vol. 9, Apr. 2018.
- [60] M. A. Samie and H. Xu, “Lysosomal exocytosis and lipid storage disorders,” *J. Lipid Res.*, vol. 55, no. 6, pp. 995–1009, Jun. 2014.
- [61] C. T. Esmon, “The interactions between inflammation and coagulation,” *Br. J. Haematol.*, vol. 131, no. 4, pp. 417–430, Nov. 2005.
- [62] Y.-H. Kang, L. A. Tan, M. V. Carroll, M. E. Gentle, and R. B. Sim, “Target pattern recognition by complement proteins of the classical and alternative pathways,” *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 653, pp. 117–128, 2009.
- [63] J. Meng, M. Yang, F. Jia, Z. Xu, H. Kong, and H. Xu, “Immune responses of BALB/c mice to subcutaneously injected multi-walled carbon nanotubes,” *Nanotoxicology*, vol. 5, no. 4, pp. 583–591, Dec. 2011.
- [64] J. D. T. Ndika, J. Sund, H. Alenius, and A. Puustinen, “Elucidating differential nano-bio interactions of multi-walled and single-walled carbon nanotubes using subcellular proteomics,” *Nanotoxicology*, vol. 12, no. 6, pp. 554–570, Jul. 2018.
- [65] S. E. Butcher, “The spliceosome and its metal ions,” *Met. Ions Life Sci.*, vol. 9, pp. 235–251, 2011.
- [66] A. J. Mouton *et al.*, “Mapping macrophage polarization over the myocardial infarction time continuum,” *Basic Res. Cardiol.*, vol. 113, no. 4, p. 26, Jul. 2018.
- [67] A. Berger, A. H. Tran, and C. J. Paige, “Co-regulated decrease of Neurokinin-1 receptor and Hemokinin-1 gene expression in monocytes and macrophages after activation with pro-inflammatory cytokines,” *J. Neuroimmunol.*, vol. 187, no. 1–2, pp. 83–93, Jul. 2007.
- [68] M. R. Bootcov *et al.*, “MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF- superfamily,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 94, no. 21, pp. 11514–11519, Oct. 1997.
- [69] M. Orecchioni, Y. Ghosheh, A. B. Pramod, and K. Ley, “Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages,” *Front. Immunol.*, vol. 10, p. 1084, May 2019.
- [70] M. F. Fontana, A. Baccarella, N. Pancholi, M. A. Pufall, D. R. Herbert, and C. C. Kim, “JUNB Is a Key Transcriptional Modulator of Macrophage Activation,” *J. Immunol.*, vol. 194, no. 1, pp. 177–186, Jan. 2015.
- [71] R. Shrivastava *et al.*, “M2 polarization of macrophages by Oncostatin M in hypoxic tumor microenvironment is mediated by mTORC2 and promotes tumor growth and metastasis,” *Cytokine*, p. S1043466618301182, Apr. 2018.
- [72] J. A. Hamerman *et al.*, “Serpin 2a Is Induced in Activated Macrophages and Conjugates to a Ubiquitin Homolog,” *J. Immunol.*, vol. 168, no. 5, pp. 2415–2423, Mar. 2002.

## 5 Etude comparative entre NP de carbone sphériques et NTC : effet forme

### 5.1 Introduction

Les NMC présentent des formes différentes, il existe des NP sphériques, des nanotubes sous forme droite, ondulée, enroulée et ramifiée [227]. Selon certaines études faites sur plusieurs formes de NMC, il a été distingué des différences dans la toxicité induite par chaque forme. Ces différents profils de toxicité seraient à imputer à des différences au niveau des mécanismes d'internalisation et de clairance de ces différentes formes de NM d'une part, mais également à des différences vis-à-vis de leur interaction avec les organites cellulaires et les molécules biologiques. Dans ce volet nous avons souhaité étudier l'effet de la forme dans la détermination de la toxicité des NM sur le modèle cellulaire NR8383. Nous avons retenu le NC (Printex-90) qui sont des NP sphériques pour le comparer aux nanotubes Mitsui-7 (Etude 3) qui est un NTC courbé. Les mêmes doses et le même temps d'exposition ont été utilisés dans les deux études en transcriptomique.

### 5.2 Matériels et Méthodes

#### 5.2.1 Caractérisation des NMC

Les NP sphériques ont été obtenues du Joint Research Centre (Printex-90) tandis que les nanotubes Mitsui-7 ont été fournies de la part de NanoAmor et caractérisé au National Research Centre of Work Environment-Danemark (NRCWE-006). Les deux NM sont suspendus dans du milieu DMEM high glucose, complété avec 2% du sérum du vœu fœtal, à une concentration égale à 2 mg/ml. Ensuite ils sont soniqués à l'aide d'un sonicateur plongeant (Vibracell 75022, Bioblock, Illkirch-graffenstaden, France) à 10% de magnitude pendant 6 minutes pour les NP sphériques et à 30% pendant 15 min pour les nanotubes, sous refroidissement continu à l'aide de glace pilée. Puis, ils ont été caractérisés par diffusion dynamique de la lumière (DLS, Zetasizer™3000E, Malvern Instruments Worcestershire, UK) afin de déterminer leur diamètre hydrodynamique et leur potentiel zêta. La morphologie de ces NM a été observée également par microscopie électronique de transmission (CM12 Microscope, Philips, The Netherlands).

## 5.2.2 Culture cellulaire

Les cellules NR8383 ont été obtenues auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, USA). Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM High glucose (Sigma Aldrich, Saint-Louis) complété avec 15% de sérum de vœu fœtal (Sigma Aldrich, Saint-Louis), 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine, 4 mM L-glutamine et 0.25 µg/ml d'amphotéricine. Les cellules sont cultivées à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub>.

## 5.2.3 Etude de la cytotoxicité *in vitro*

Les cellules NR8383 ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à une densité égale à  $5 \times 10^4$  cellules/ml pour 24h. Puis elles étaient exposées à chacun des deux NM pour 4 et 24 h à des concentrations comprises entre 0 et 200 µg/ml. Ensuite, les deux test WST-1 et Alamar Blue ont été réalisés conformément aux instructions du fabricant. Pour WST-1, l'absorbance a été mesurée à 450 nm avec 690 nm comme longueur d'onde de référence (iMark™, Bio-Rad, Japan). Et pour le test Alamar Blue, la fluorescence a été mesurée à 570 nm avec 600 nm comme longueur d'onde de référence (SPECTROFLUORIMETER FP-8300 Irm, JASCO, France). Chaque test comprenait six répliques techniques et 4 répliques biologiques. Les cellules non exposées ont été considérées comme contrôle et présentées ayant une viabilité de 100%. Les concentrations massiques ont été converties à des concentrations en fonction de surface spécifique (cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>) pour les représentations graphiques. La concentration inhibitrice (IC<sub>50</sub>) a été calculée en appliquant la formule de Reed et Muench en se basant sur les résultats du test WST-1. Le test LDH a été fait également, pour l'étude de l'intégrité membranaire, en suivant les mêmes conditions d'ensemencement et d'extraction que les deux autres tests et en respectant les instructions du fournisseur. Un puit contenant des cellules exposées au tampon de lyse pendant 15 min avant le test a servi comme contrôle positif pour ce test. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± erreur type de la moyenne (SE) des quatre répliques biologiques. Les différences statistiques ont été déterminés par une analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA) suivie par le test de Dunnett.

## 5.2.4 Etude transcriptomique

### 5.2.4.1 Extraction d'ARN total

Les cellules NR8383 ont été exposées à chacun des deux NM pour 4h à la même dose égale à 1 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>. L'ARN total a été extrait en utilisant un réactif d'extraction (Trizol Extraction Reagent, OMEGA Bio-TEK, Chine). La teneur en ARN a été déterminée en mesurant l'absorption à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre

(Bitech-Biospec-Nano, Shimadzu). L'intégrité de l'ARN a été confirmée avec les kits de bioanalyseur Agilent 2100 et RNA 6000 Pico Labchip (Agilent Biotechnologies, PaloAlto, CA).

#### **5.2.4.2 Hybridation sur puces**

Un aliquot (100 ng) d'ARN de chaque échantillon a été marqué avec de la Cyanine 3-CTP en utilisant le kit Low Input Quick Amp Labeling kits (Agilent technologies). Les ARN marqués ont été purifiés puis hybridés sur les puces Agilent G4853A Sure Print G3 Rat GE 8\*60k microarrays (Agilent technologies) qui couvrent la totalité du transcriptome du rat. Les lames ont ensuite été lavées puis scannées à l'aide d'un scanner de puces à ADN Agilent G2505C avec une résolution de 3 µm. Les données ont été extraites en utilisant le logiciel Fetaure Extraction version 11.0 (Agilent).

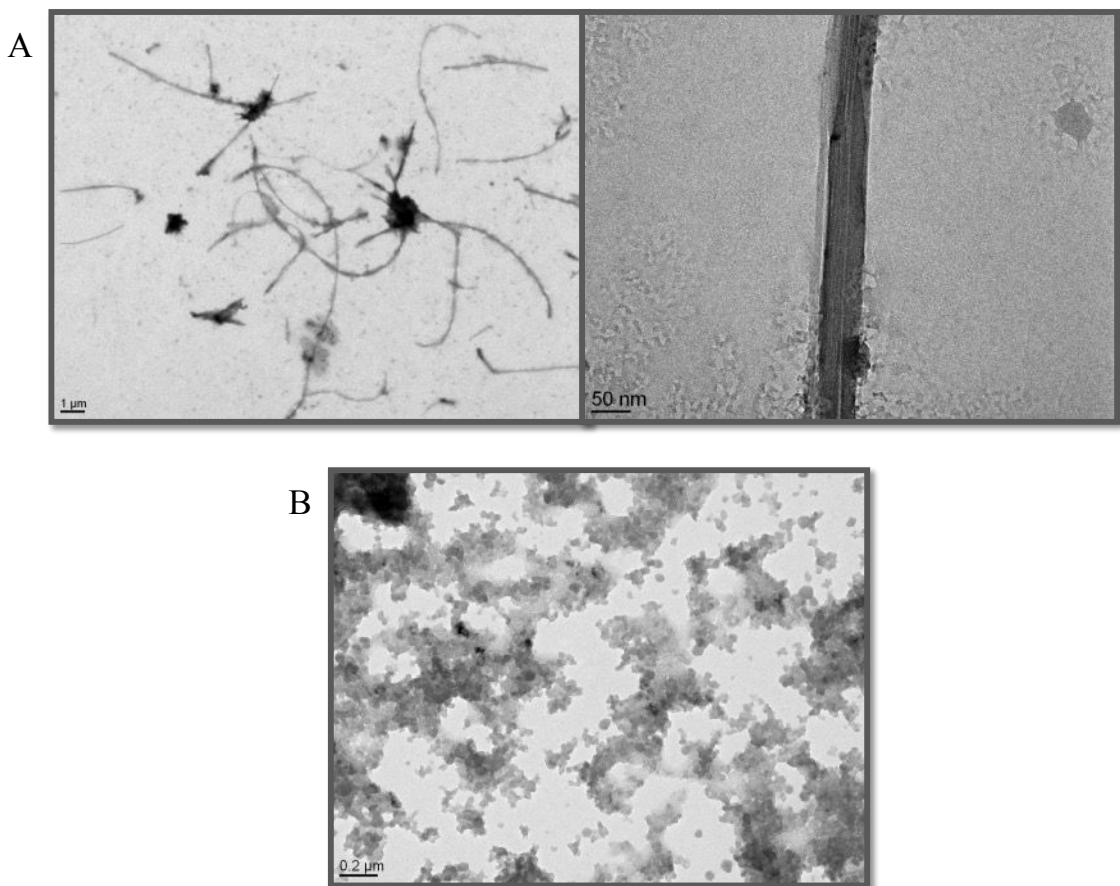
#### **5.2.4.3 Analyses bio-informatiques**

Avant de procéder aux analyses des résultats une étape de normalisation à été réalisée avec le logiciel GeneSpring. Un test Student suivi par la correction Benjamini-Hochberg et les critères de filtrage ont été appliqués afin de pouvoir filtrer les gènes qui ont considérablement varier. Les gènes présentant des changements d'expression à un fold change (FC)  $\geq |3|$  par rapport au contrôle avec  $p < 0.001$  ont été considérés comme significativement différentiellement exprimés. Ensuite, les gènes sélectionnés ont été analysés à l'aide de la base de données IPA (Inequity Pathway Analysis) et DAVID (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery version 6.8 ;[http //david.abcc.ncifcrf.gov](http://david.abcc.ncifcrf.gov)).

## 5.3 Résultats

### 5.3.1 Caractérisation des NMC

Selon les images prises par microscopie électronique à transmission (figure 41), le diamètre des NP sphériques est égal à 32 nm et celui des nanotubes est égal à 65 nm. La longueur de ces derniers est d'environ  $4 \pm \mu\text{m}$ . Concernant la caractérisation par DLS, le diamètre hydrodynamique est égal à 22 nm pour les NP sphériques et 400 nm pour les nanotubes. Le potentiel zêta était négatif pour les deux, égal à -12.3 pour les NP sphériques et à -13.63 pour les nanotubes. Les caractéristiques des deux NM obtenues du fournisseur aussi bien que leur surface spécifique sont représentés dans le tableau 5.



**Figure 41 : Images de microscopie électronique à transmission des NMC.  
(A) NTC/Mitsui-7 et (B) NP sphériques (Printex-90).**

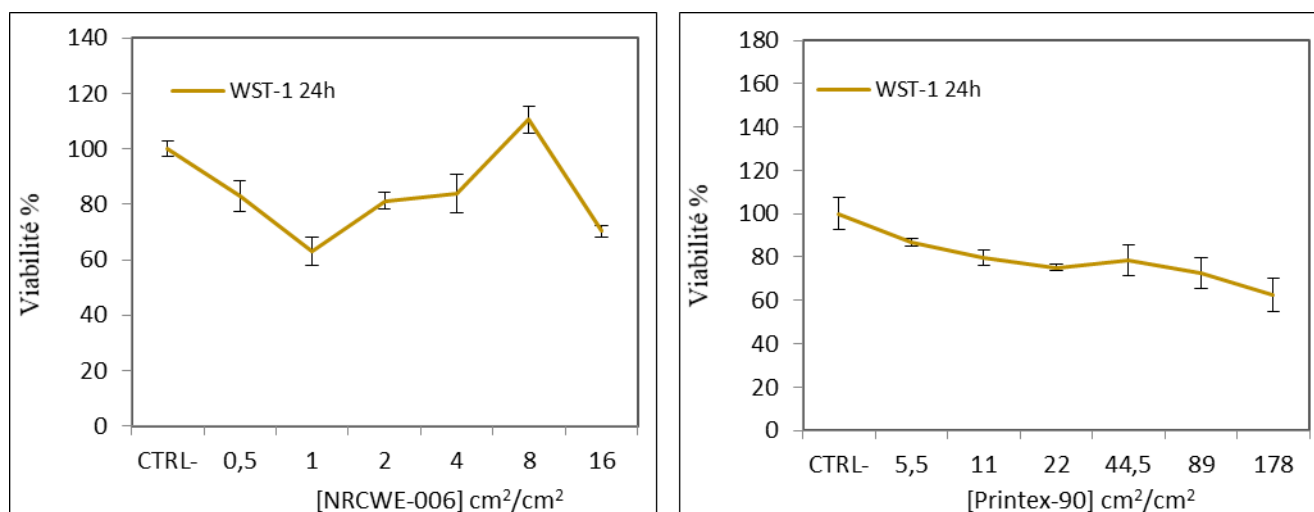


**Tableau 5 : caractérisation des NMC.**

NM	Forme	Diamètre (Fournisseur)	Longueur (Fournisseur)	Diamètre (TEM)	Longueur (TEM)	Taille (DLS)	Surface spécifique
NRCWE-006 (Mitsui-7)	Nanotube	74 nm	5 ± 1 µm	50 ± 2 nm	6 ± 3 µm	557 ± 63 nm	26 m <sup>2</sup> /g
Printex-90	Sphères	14 nm	–	50 ± 15 nm	–	165 ± 45 nm	295 m <sup>2</sup> /g

### 5.3.2 Le NC (Printex-90) et les nanotubes (Mitsui-7) ne produisent pas de cytotoxicité pour les cellules NR8383 aux doses testées.

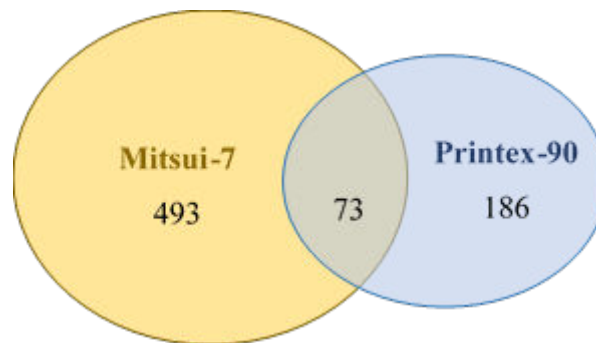
Les résultats du test de viabilité au WST-1, montrent qu'environ 60% des cellules NR8383 sont restées viables suite à leur exposition aux doses les plus élevées de nanotubes Mitsui-7 (16 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>) et NP Printex-90 (178 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>). C'est pourquoi on estime que la dose IC<sub>50</sub> n'est pas déterminable par ce test car elle est supérieure à la plus grande concentration utilisée au cours du test.



**Figure 42 : Variation de la viabilité (en %) des cellules NR8383 en fonction des concentrations des nanotubes Mitsui-7 et des NP Printex-90 (en cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>) par les deux tests WST-1 et Alamar Blue.**

### 5.3.3 Etude comparative du transcriptome des cellules NR8383 exposées aux NP Printex-90 et au nanotubes Mitsui-7.

L'étude transcriptomique réalisée après l'exposition des cellules NR8383 à ces deux NMC, pendant 4 heures, à la même dose  $1 \text{ cm}^2/\text{cm}^2$ , montre 73 gènes dérégulés en commun, 493 spécifiques à l'exposition aux nanotubes Mitsui-7 et 186 spécifiques à celle des NP Printex-90. P-valeur appliquée est inférieure à 0.001 et  $\|FC\| > 3$  (Figure 43).



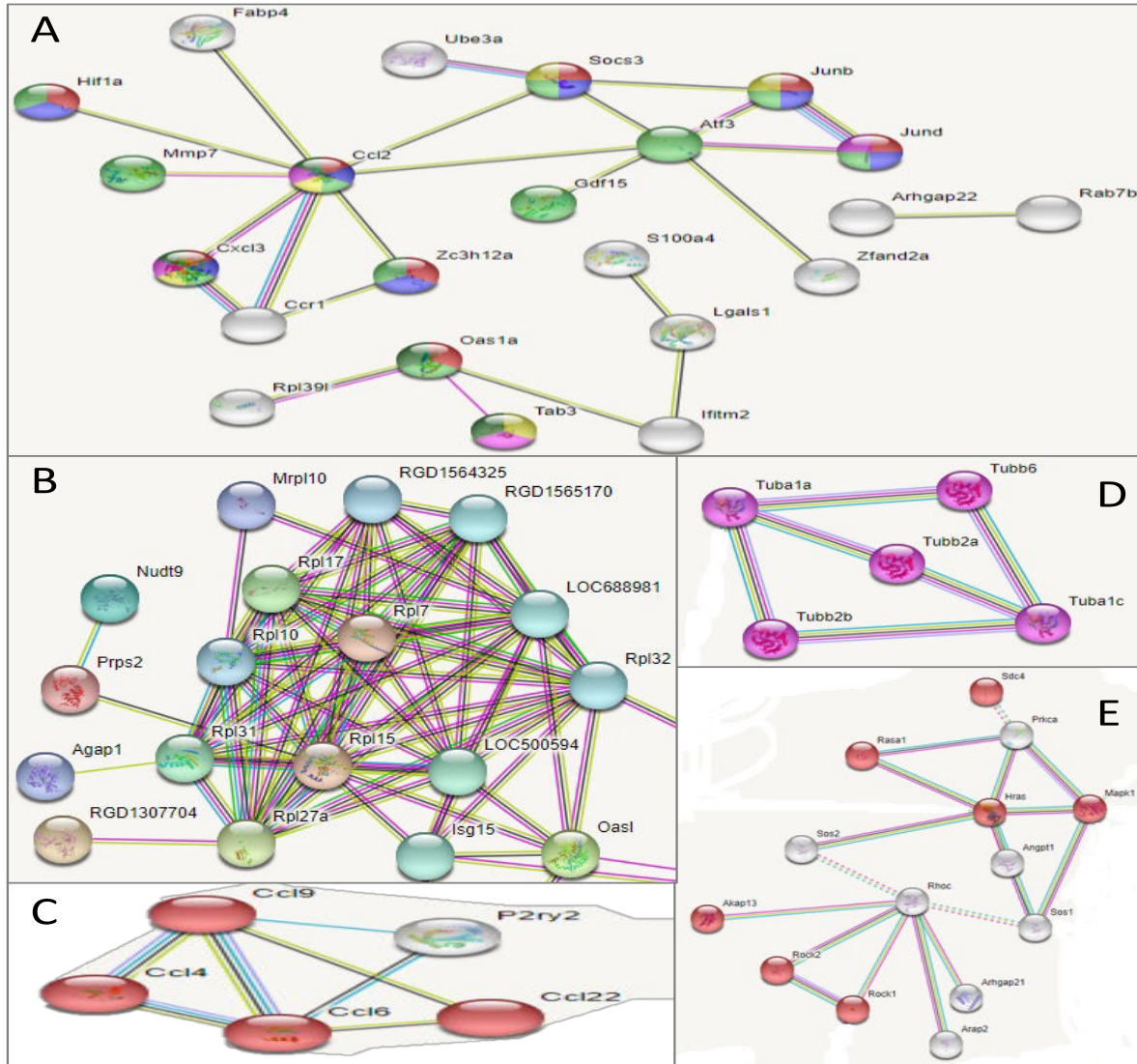
**Figure 43 :** *Diagram de Venn des gènes différentiellement exprimés dans les cellules NR8383 exposées aux NMC : Printex-90 et Mitsui-7.*

Ces listes de gènes ont été analysés en utilisant la base de données STRING. Le tableau 6 résume les principaux processus biologiques (GO) et les voies les plus significativement dérégulées (KEGG et Reactome pathways).

**Tableau 6 : Principaux processus biologiques (GO), voies KEGG et voies Reactome communes et spécifiques pour chacun des NMC étudiés selon STRING (Stringency = 0.04).**

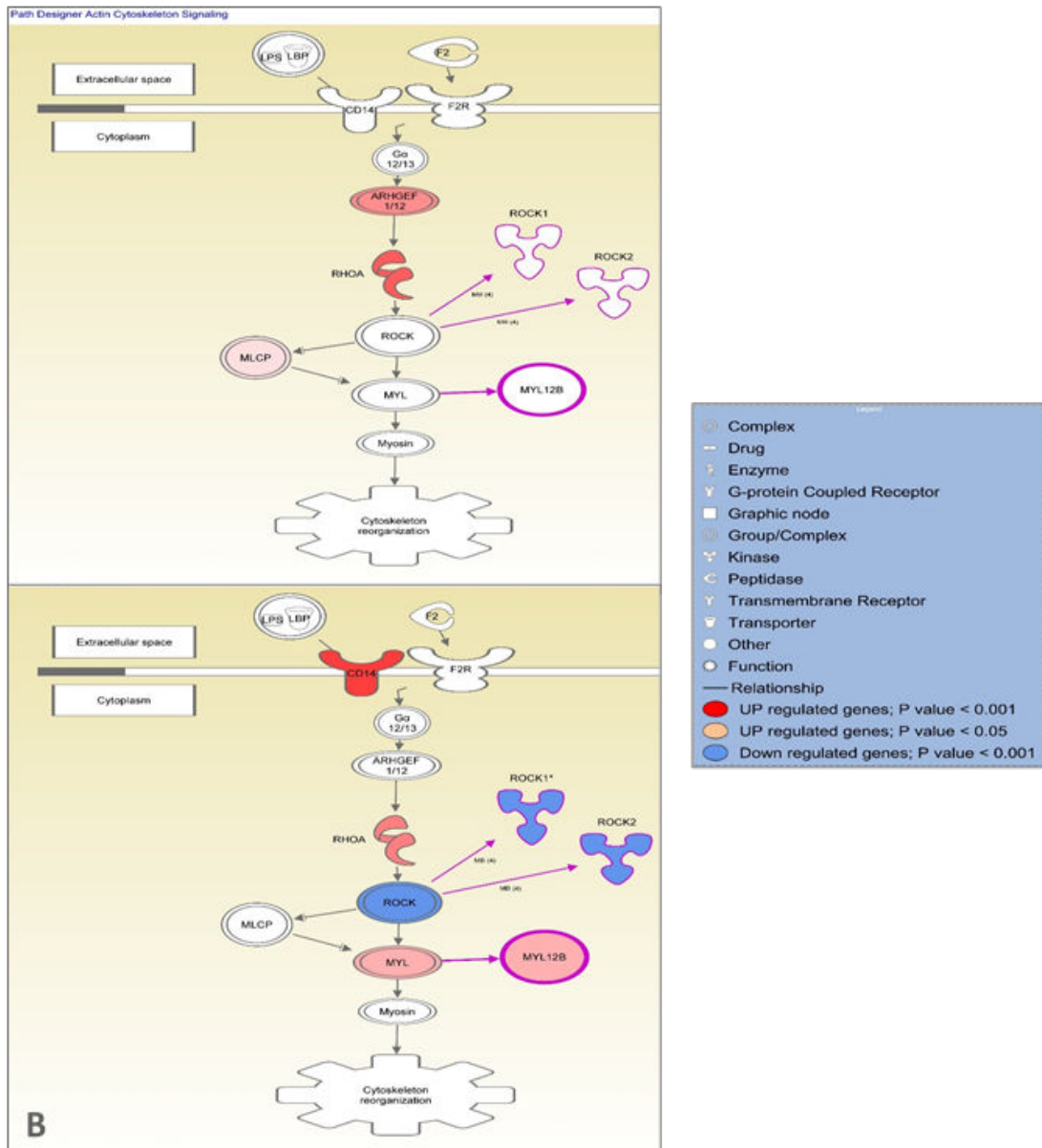
Gènes	Gene Ontology	KEGG pathways	Reactome pathways
<b>Communs entre Printex-90 et Mitsui-7</b>	Response to other organism	TNF signaling pathway	
	Response to lipopolysaccharide	Il-17 signaling pathway	
	Response to external stimulus	NOD-like receptor signaling pathway	
<b>Spécifiques à Printex-90</b>	Positive regulation of pri-miRNA	Chemokine signaling pathway	Immune system
	Organic substance biosynthetic process	Ribosome	Innate immune system
	Organic substance metabolic process	Insulin signaling pathway	Neutrophil degranulation
<b>Spécifiques à Mitsui-006</b>	Microtubule-dependent trafficking of connexons from Golgi to the plasma membrane	Gap junction	Organelle organization
	COPI-dependent Golgi-to-ER retrograde traffic	mTOR signaling pathway	Cellular component organization
	Transcription	FoxO signaling pathway	Regulation of cytoskeleton organization

Les deux NMC de formes différentes induisent une surexpression des gènes liés à la réponse pro-inflammatoire, comme *Cxcl3* et *Ccl2*. Les NP Printex-90 induisent l'expression des gènes codant des protéines ribosomales comme *Rpl7*, *Rpl10* et *Rpl15* alors que les nanotubes Mitsui-7, induisent l'expression des gènes intervenant dans l'organisation du cytosquelette comme *Tubb2a*, *Tubb6*, *Rock1* et *Rock2*.



**Figure 44 :** Clusters des gènes communs entre NP Printex-90 et nanotubes Mitsui-7 (A), spécifiques de l'exposition aux NP Printex-90 : codant des protéines ribosomales (B) et des protéines pro-inflammatoires (C), et spécifiques à celle des nanotubes Mitsui-7 : codant des protéines intervenant dans le transport, microtubules dépendants, vers l'appareil de Golgi (D) et des protéines intervenant dans l'organisation du cytosquelette (E).

Un effet sur le cytosquelette apparait suite à l'exposition aux nanotubes Mitsui-7 (Figure D et E) ce qui n'était pas obtenu avec le Printex-90. Ensuite, nous avons comparé à l'aide du logiciel IPA l'expression des gènes de la voie « Actin cytoskeleton signaling » après exposition à ces nanotubes et aux NP sphériques ( $p$  value < 0.05, IFCI >3). Comme on peut le voir dans la figure 45, il y a une différence entre les deux NM. Pour les nanotubes Mitsui-7, plus de gènes ont été dérégulés en comparant aux NP Printex-90 avec une surexpression du gène CD14 qui code un des récepteurs de la phagocytose.



**Figure 45:** Actin cytoskeleton signaling path, as represented using IPA software, after NR8383 cells exposure to the same dose ( $1 \text{ cm}^2 / \text{cm}^2$ ) for 4h (P value < 0.001 and FC  $\geq 1.5$ ).

## 5.4 Discussion

Le but de cette étude était de comparer l'effet de la forme différente des deux NMC sur le transcriptome des cellules NR8383. En effet il est intéressant de comprendre les signalisations induites par les macrophages, exposées à ces différentes formes. Le modèle NR8383 des macrophages alvéolaires du rat est pertinent pour la réalisation de cette étude car la forme pourrait jouer sur l'internalisation des NMC par ces cellules immunitaires et ainsi elle pourrait conduire à des réponses différentes résultant de l'activation d'une signalisation différente.

Nous remarquons que le profil de cytotoxicité diffère entre les deux NMC. Les NP Printex-90, n'induisent pas une cytotoxicité importante pour les cellules NR8383 selon les résultats du test WST-1. Ce résultat a été aussi trouvé dans une autre étude où des macrophages, RAW 264.7, et aussi les cellules épithéliales A549, ont été exposées au NC sans qu'il y ait une baisse importante de la viabilité dans les deux cas, quoique cette réduction était plus grande pour les RAW 264.7 que pour A549 ce qui pourrait être due à une internalisation de NMC dans les macrophages [228]. Contrairement à nos résultats, l'étude de Ma et al. montre aussi qu'il existe une cytotoxicité dose dépendante arrivant environ à 80% suite à une exposition de macrophages J774.A1 au Printex U ayant une taille similaire aux NP Printex-90 [229]. Pour les nanotubes Mitsui-7, il y a une baisse de viabilité aux faibles doses allant jusqu'à 60% environ à  $1 \text{ cm}^2/\text{cm}^2$ . Puis il y a une augmentation qui finit par revenir aux alentours de 60% à la plus grande dose. Donc les nanotubes Mitsui n'induisent pas une réduction importante de la viabilité aux doses étudiées ce qui est en accord avec les résultats d'une étude réalisée également sur des macrophages THP-1 [230]. Mais, il reste légèrement moins cytotoxique que les NP Printex-90 aux doses plus élevées. On peut suggérer que les NP sphériques peuvent être internalisés plus simplement que les nanotubes grâce à leur petite taille et leur forme, qui pourrait avoir un effet sur ce mécanisme [231], et ainsi induire des effets plus toxiques aux cellules.

Les macrophages, responsables de la réponse aux organismes étrangers et aux stimulus extérieurs, développent une réponse également contre les NMC. Cette réponse se caractérise par l'induction d'une réaction inflammatoire et la sécrétion des cytokines. Nos résultats montrent, qu'ils induisent une dérégulation des trois voies impliquées dans la réaction inflammatoire : TNF, IL-17 et NOD suite à l'exposition aux deux formes de NMC, et une surexpression des cytokines. Cette réaction inflammatoire a été déjà démontrée suite à l'exposition à ces deux NM. Les nanotubes Mitsui-7 ont induit une sécrétion de l'interleukin-1 $\beta$  par des macrophages THP-1 *in vitro* [230], et a favorisé l'infiltration des macrophages et a provoqué des lésions inflammatoires chez les rats exposés *in vivo* [232]. Il a aussi été à l'origine de l'induction précoce de cette

réaction inflammatoire selon les résultats de Poulsen et al., qui ont travaillé sur des souris [233]. Pareillement le NMC Printex-90, a induit une surexpression des gènes *Il-1 $\beta$* , *Il-6* and *TNF- $\alpha$*  et la production de ces cytokines pour les macrophages alvéolaires humaines [234]. Egalement in vivo, il a été démontré qu'il induit une réaction inflammatoire [201]. Aussi, nos résultats confirment les résultats de la littérature et insistent sur le fait que la réaction inflammatoire est une réponse principale qui se déclenche toujours suite à l'exposition aux NMC quelle que soient leur caractéristiques physiques et chimiques.

Printex-90 induit une production anormale des protéines ribosomales qui est un marqueur du stress du réticulum endoplasmique. Plusieurs études ont mis en évidence ce genre de perturbation lorsqu'il s'agit d'une exposition à des NP métalliques aussi bien qu'aux nanotubes mais à notre connaissance, ce résultat n'a jamais été trouvé pour les macrophages à une exposition au Printex-90 en particulier et les NP de carbone sphérique généralement. Une seule étude publiée montre l'induction du stress du réticulum endoplasmique par la mesure du NOX2 et NOX4 suite à l'exposition au Printex -90 mais pour une lignée neuronale PC12. Des NP d'argent ont induit un stress du réticulum pour les macrophages THP-1 qui a conduit à l'activation de l'inflamasome [235]. Ce mécanisme pourrait être suggéré avec Printex-90 sachant qu'il a induit une réaction inflammatoire et surtout la cytokine CCL4 dont l'expression est associée à ce stress[236], [237]. Rappelons que les gènes impliqués dans la voie de l'inflamasome sont dérégulés comme *Il-1 $\beta$* , *MyD88*, *NOD2*..

Pour le Mitsui, les gènes les plus dérégulés codent des protéines intervenant dans le transport, microtubules dépendants, vers l'appareil de Golgi et des protéines intervenant dans l'organisation du cytosquelette. Cet effet a déjà été vu suite à l'exposition aux nanotubes Mitsui-7 non seulement pour les macrophages mais aussi pour d'autres types cellulaires [238]. Chortarea et al., ont montré qu'il existe une sous expression évidente des filaments d'actine dans les macrophages THP-1, les fibroblastes MRC-5 et les cellules épithéliales A549 exposées aux nanotubes Mitsui-7. Aussi ils ont vérifié l'internalisation de ces nanotubes par les macrophages ce qui éclaircie leur effet sur la morphologie cellulaire [239]. Les nanotubes Mitsui-7 phagocytés par les macrophages désorganisent le cytosquelette et affectent le transport vers l'appareil de Golgi. Une absence de régulation du cytosquelette et surtout des tubulines favorise la réaction inflammatoire [240]. Il a été déterminé que les microtubules ont un rôle dans la régulation de la sécrétion d'*Il-1 $\beta$*  et l'activation de l'inflamasome [241]. Aussi une perturbation peut moduler le potentiel inflammatoire soit en le stimulant de façon qu'on arrive à une réaction inflammatoire « exagérée » soit en l'inhibant et ainsi les macrophages seront paralysés et la phagocytose sera frustrée et ne pourront pas exercer normalement leur fonction de défense contre le non soi [242]. Toutefois, Zhu et al., ont montré que les microtubules limitent la disponibilité des



granules d'insuline pour la sécrétion en formant un maillage au niveau de l'appareil de Golgi, alors qu'en cas de perturbation du transport sur microtubules, cette sécrétion d'insuline serait favorisée [243] ce qui pourrait être un mécanisme possible aussi dans le cas des cytokines, dans ce cas l'altération de ce transport suite à l'exposition aux nanotubes Mitsui-7 serai aussi en faveur de la réaction inflammatoire. D'après les clusters des gènes les plus enrichis (tableau 6) et les interactions protéiques (figure 44), nous avons remarqué que l'exposition aux nanotubes Mitsui-7 a un effet plus important sur le cytosquelette que dans le cas d'exposition aux NP sphériques sachant que d'après les études les deux sont phagocytés par les macrophages [231]. Aussi en se focalisant sur la voie de signalisation d'actine, on a pu avoir aussi une dérégulation de gènes plus importante avec les nanotubes Mitsui-7. Alors tous ces résultats confirment l'hypothèse disant que la forme des NMC détermine leur effet sur la structure du réseau macrophagique influencent ainsi le devenir de la cellule.

Autrement, d'après notre étude précédente, on a mis en évidence la formation de cellules spumeuses et des cellules multi noyaux suite à l'exposition aux nanotubes Mitsui-7 et on les a proposés comme évènements clés pour le développement de granulome *in vivo*. D'après nos résultat le gène *Cd14* qui est un récepteur de phagocytose est surexprimé donc on pourrait penser que cette fusion est survenu suite à une incapacité des macrophages à phagocyter ces nanotubes. Les études ont montré, comme déjà mentionné, leur internalisation mais la formation d'agrégats ou d'agglomérats dans le milieu peut créer des structures ce qui limitent le pouvoir des macrophages à les internaliser et conduit à la surexpression des récepteurs tel que *Cd14* et par la suite à la formation des syncytiums.

## 5.5 Conclusion

Cette étude a bien montré que les macrophages sont influencés différemment une fois elles sont exposées à des NMC de formes différentes surtout en ce qui concerne l'organisation de leur cytosquelette mais tous ont un potentiel inflammatoire pouvant conduire au développement des pathologies. Les NTC ont un effet plus important sur le cytosquelette que les NP sphériques. Aussi on a démontré que les NP sphériques induisent un stress du réticulum endoplasmique non seulement les nanotubes. La phagocytose frustrée due à la formation d'agrégats et/ou d'agglomérats importante des NTC pourrait conduire à une fusion des macrophages mais cela reste à prouver par des études ultérieures.



## CHAPITRE VI

---

### VI. Discussion générale

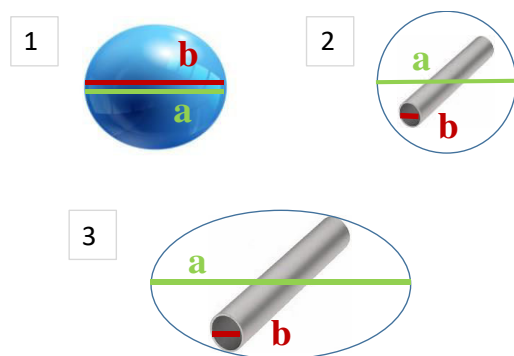
---

## Discussion générale

Les NMC, du fait de leurs nombreux domaines d'application, sont utilisés dans notre quotidien. Les plus exposés sont les travailleurs lors de la production et de leur manutention. Les consommateurs sont également exposés lors de leur utilisation, même si à un moindre degré. Il ne faut cependant pas négliger une pollution environnementale liée à l'usure des matériaux, ou aux émissions dans l'atmosphère lors de la production. L'exposition aux NMC est réalisée principalement par inhalation. Pour certains, la toxicité est connue, et d'autres sont classés comme cancérigènes possibles. Cependant les études de toxicité tant chez l'animal qu'*in vitro* sont souvent faites dans des conditions fort différentes d'une étude à l'autre et utilisent des NMC divers sans que des études comparatives soient systématiquement menées et si elles le sont, elles se limitent à un petit nombre de produits différents. C'est pourquoi au cours de ce travail il a été décidé d'étudier la toxicité de plusieurs NMC et d'étudier en parallèle la relation entre leurs caractéristiques physiques et chimiques, avec toxicité en se limitant autant que possible à une seule caractéristique (forme, longueur, diamètre, fonctionnalisation) et avec une seule lignée de macrophages de rat. Pour ce faire, le travail a porté surtout sur les études de transcriptomique. Notre objectif a été de déterminer les mécanismes moléculaires initiaux de la réponse après exposition des cellules à des concentrations sub-toxique de ces NMC. Nous avons pu alors tenter de déterminer l'effet des variations de leurs descripteurs sur ces mécanismes.

### 1 Caractérisation des NMC

Les NMC ont été tous caractérisés par DLS après optimisation des protocoles de dispersion (Ann.1). Bien que la DLS ne soit pas la technique la plus adaptée pour la caractérisation des NP non sphériques, elle reste, la méthode la plus utilisée [244],[245],[246]. Elle permet d'avoir des informations sur la dispersion des NM dans le milieu par simple mesure de la taille et de l'index de polydispersité (Pdi). Selon nos résultats, les SWCNT, particules longues et très fines, ont des diamètres hydrodynamiques (Z-average) très importants qui ne correspondent pas à leur faible diamètre réel. Mais, plus le nanotube est long, plus la différence entre le diamètre hydrodynamique (a) et son diamètre (b) est importante (Figure 41).

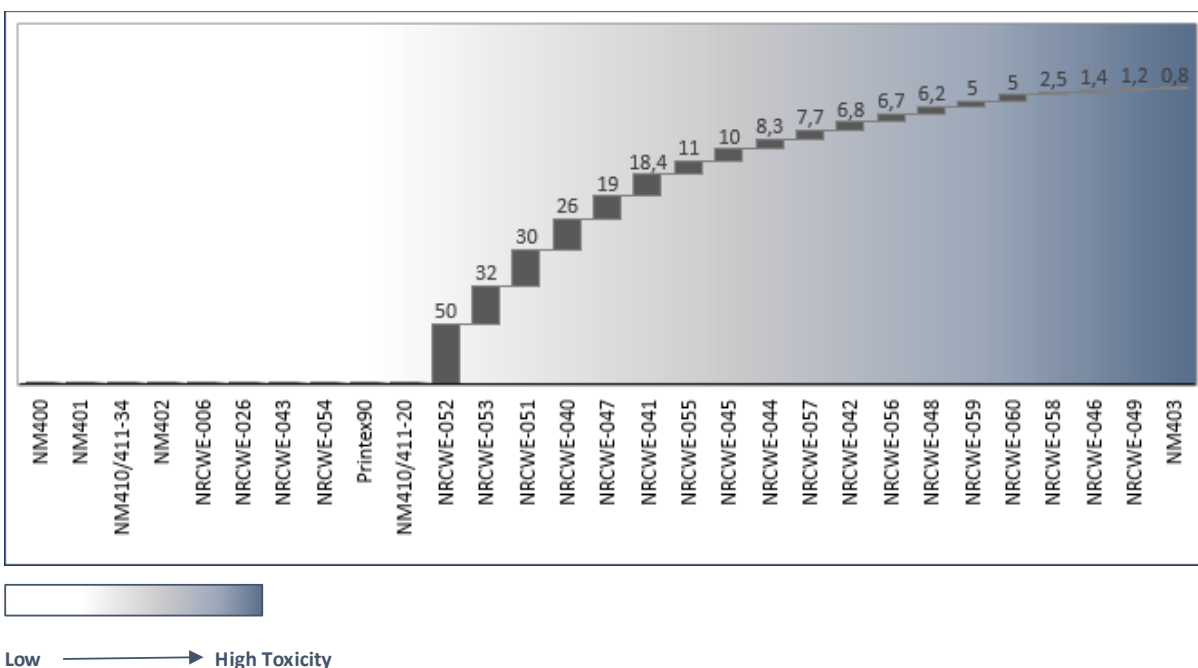


**Figure 46 :** Assimilation des nanotubes (2 et 3) à des NP sphériques (1) par DLS, a : diamètre hydrodynamique, b : rayon de la NP.

Cependant des tailles importantes peuvent être le résultat de la présence d'agrégat/ agglomérats, ce qui est confirmé par TEM. Selon nos résultats, les SWCNT forment plus d'agglomérats et d'agrégats car ils sont moins stables en suspension à la différence des MWCNT, du NC et de l'OG. Par contre, Fraczek *et al.*, ont montré que les MWCNT forment de plus larges agglomérats que des SWCNT mais ces derniers étaient fonctionnalisés [247]. L'OG et les NMC fonctionnalisés avec des groupements COOH et OH ont une meilleure dispersion que les autres NMC. En effet la présence des groupements oxygénés rend les NMC hydrophiles ce qui favorise leur dispersion [248] [249], [250].

## 1 Cytotoxicité

Selon nos résultats, certains NMC induisent une cytotoxicité importante pour les cellules NR8383 alors que d'autres non. En effet, cette cytotoxicité dépend de l'ensemble des caractéristiques physiques et chimiques des NMC [259],[157].



**Figure 47 :** Comparaison des quarts des IC<sub>50</sub> des différents NMC étudiés.

Toutefois, parmi les nanotubes déjà mentionnés, en comparant ceux ayant les surfaces spécifiques les plus proches, NRCWE-052/NRCWE-054, nous trouvons que NRCWE-054 qui possède un groupement carboxyle est moins toxique que NRCWE-052, non fonctionnalisé.

L'OG et l'OG réduit ont induit une cytotoxicité pour les cellules NR8383, celle de l'OG réduit est moins importante ce qui a été déjà trouvée par Kang et al. [260] pour la lignée PC12. Par contre, Wu et al., ont montré que l'OG réduit augmente le stress oxydant pour les macrophages ce qui contribue à une cytotoxicité plus grande pour les macrophages primaires de la moelle osseuse que pour la lignée macrophagique murine J774A.1 [261]. Donc en considérant tous les résultats et les interprétations correspondantes, certains NMC ont une cytotoxicité non négligeable pour les macrophages, ce qui indique leur potentiel toxique en cas d'exposition. Toutefois, les études *in vitro* utilisant le modèle immergé ne sont pas les plus pertinentes pour conclure vis-à-vis des doses induisant une toxicité. En effet, l'interprétation reste limitée du fait que la dose délivrée aux cellules lors de ces expositions n'est pas suffisamment bien appréciée ou mesurée, créant une incertitude. C'est pourquoi une approche ALI qui reproduit mieux les conditions d'exposition pourra être préférée.

## 2 Etude du transcriptome

L'exposition des macrophages NR8383 et des monocytes THP-1 différenciés en macrophages aux sept NMC étudiés (Ann. 2), de caractéristiques différentes, a essentiellement entraîné une induction de la réaction inflammatoire, ce qui a été largement discuté dans la littérature pour les différents NMC [262],[207],[263],[95],[200]. Cette réaction inflammatoire était plus importante dans le cas d'exposition à l'oxyde de graphène par comparaison à d'autres NTC (monofeuillets ou multifeuillets) ou aux nanoparticules sphériques. En suivant la même approche, nous avons pu déduire que les nanotubes fonctionnalisés avec un groupement amine ont un potentiel inflammatoire plus important que ceux qui ne sont pas fonctionnalisés ou ceux fonctionnalisés avec un groupe carboxyle. Nous avons postulé que cette réponse était à mettre en relation avec un effet éponge qui engendre une déstabilisation lysosomale et une activation de l'inflammasome. Cette activation de l'inflammasome pourrait à son tour conduire à une persistance de la réaction inflammatoire et être à la base d'une inflammation chronique ou d'un certains nombres de pathologies comme la fibrose ou le cancer de poumon. Nous avons également constaté en analysant les données de dosage de cytokines à la suite d'une exposition à un panel de NMC (données récentes du laboratoire) qu'il existe une corrélation positive entre la surface spécifique de ces NMC et leur capacité à induire la sécrétion de cytokines. Donc nous constatons que la réaction inflammatoire qui est un évènement clé pouvant être à la base de plusieurs AO, est dépendant des caractéristiques physiques et chimiques des NMC. En déterminant les propriétés des descripteurs favorisant cette réaction, nous pouvons envisager de ne pas entraîner ces effets néfastes, en contrôlant les propriétés de ces NMC lors de leur synthèse. En dehors de la réaction inflammatoire, la plupart des NMC étudiés ont induit un stress du RE y compris pour ceux qui sont sphériques (NC) ce qui n'a pas été retrouvé dans les travaux publiés par d'autres dans la littérature. Des études récentes dans le laboratoire ont mis en évidence l'induction de ce stress également par les oxydes métalliques [264], [265]. Aussi nous pouvons suggérer que tous les NM étudiés induisent une perturbation de la synthèse protéique, avec une dérégulation de la voie mTOR pour la plupart d'entre eux. La perturbation du RE se présente comme un évènement clé important sur lequel nous pouvons nous appuyer afin de prédire la toxicité de ces NM pour l'organisme. Nous avons pu prouver qu'un stress important au niveau du RE entraîne une perturbation du métabolisme lipidique. Il a été montré que cette perturbation accompagnée de la formation des syncytiums conduit à la formation de granulomes *in vivo* [206], [211]. C'est pourquoi nous avons développé un test basé sur une simple coloration GIEMSA, aux fins de trier Les NMC qui sont les plus susceptibles de provoquer la formation des granulomes. Cette coloration a été proposée dans le cadre du projet SmartNanotox comme test simple procurant une information sur le potentiel des NM à stimuler des



granulomes. Nous avons aussi corrélé l'importance du stress du RE à la taille du diamètre des NTC, ce qui confirme que l'identification des relations entre les caractéristiques physiques et chimiques des NMC et leurs mécanismes de toxicité orientera la manufacture vers une production de NM plus sûres.

La mitochondrie est également une cible pour ces différents NM. Les résultats associant la transcriptomique aux études de cytotoxicité montrent soit un dysfonctionnement mitochondrial accompagné d'une cytotoxicité soit une surexpression des enzymes mitochondriales accompagnée d'une prolifération. Ce résultat est attendu sachant que les NTC aussi bien que les oxydes métalliques interagissent avec les mitochondries [266], [267], [268]. Mais nous avons pu montrer que les nanotubes monofeuillets induisent un dysfonctionnement mitochondrial plus important que les nanotubes multifeuillets du fait de leur polarité qui leur permet de s'accumuler au niveau de la membrane mitochondriale. C'est ainsi que les dysfonctionnements mitochondriaux dans le cas de ces nanotubes sont liés à une cytotoxicité plutôt qu'une prolifération. Nous avons également été les premiers à mettre en évidence une augmentation des protéines ribosomales mitochondriales à la suite d'une exposition aux NMC. Cette réponse ainsi que la perturbation des sous unités de la chaîne respiratoire, [132], [139]. Toutefois notre modèle n'est pas adéquat pour tirer des conclusions *in vivo* et devra donc être complété par les résultats appropriés du consortium SmartNanoTox.

Concernant les voies impliquées dans la réponse macrophagique à ces NMC, celle des Sirtuines est commune à six des sept NMC étudiés (avec une exception pour NM403). Cette voie est celle qui est la plus dérégulée avec les NTC non fonctionnalisés ayant des tailles similaires : NRCWE-055, NRCWE-006 et NM401. Ce résultat présente une nouvelle cible, que nous sommes les premiers à imputer à l'exposition aux NMC. Considérant que cette voie est impliquée dans l'inflammation, le stress oxydant la fibrose et le renouvellement des macrophages [38], [43], il serait intéressant de comprendre son rôle dans la toxicité liée aux NMC. Et ce d'autant qu'il a été démontré qu'une dérégulation des histones désacétylases pourrait conduire à une prolifération *in vivo* à la suite d'une perturbation du mécanisme d'auto-renouvellement des macrophages [38]. D'autres voies en communs dérégulées à la suite de l'exposition aux différentes NP sont liées essentiellement à la synthèse protéique et le dysfonctionnement mitochondriale. De façon intéressante, pour le NTC NM403, les voies dérégulées sont différentes de celles des autres NMC. Elles impliquent un stress oxydant et des lésions au niveau de l'ADN. En fait, ce résultat est cohérent avec les données des autres partenaires qui montrent que ce NTC possède un potentiel de génération des ERO plus important que les autres NMC. Par ailleurs, nous pouvons également envisager un effet taille car ce NTC est plus court que les autres, avec une longueur de seulement 400 nm.

En ce qui concerne spécifiquement l'expression des gènes, 5 gènes ont leur expression dérégulée après exposition aux 7 NMC étudiées : *Akap13* (A-Kinase Anchoring Protein 13), *C12orf43* (Chromosome 12 Open Reading Frame 43), *Snrnp27* (Small Nuclear Ribonucleoprotein U4/U6. U5 Subunit 27), *Stambpl1* (STAM Binding Protein Like 1), *Zc3h12a* (Zinc Finger CCCH-Type Containing 12A). Ces gènes interviennent dans des processus biologiques divers : l'inflammation, l'épissage, le métabolisme protéique et dans des voies de signalisation différentes : Wnt intervenant dans la prolifération et le développement tumoral et RHOA qui intervient dans l'organisation du cytosquelette et le trafic intracellulaire [269], [270, p. 43], [271, p. 27], [272, p. 1], [273]. Tous les NMC ont induit une perturbation de la synthèse protéique, et dans la mesure où *Stambpl1* est impliqué dans la voie du métabolisme des protéines, nous suggérons que ce gène pourrait avoir un rôle important lié à l'exposition aux NMC et pourrait être un biomarqueur d'effet. Parmi les gènes qui ont été exprimés avec la plupart des NMC est le gène *Rab7*, qui code une Rho protéine, est liée à l'organisation du cytosquelette. *Rab7* est le seul gène qui a été dérégulé *in vivo* aussi aux différents temps d'exposition : 3 jours, 90 jours et 180 jours (data récentes des partenaires). Ce gène alors semble donc être un gène pivot et l'identification de son rôle en ce qui concerne la réponse à l'exposition aux NMC aussi bien que la détermination de ces gènes cibles et leur rôle pourrait faire avancer la compréhension de la réaction macrophagique à la suite de l'exposition aux NMC.

Parmi les 7 NMC étudiés, ceux non fonctionnalisés et qui possèdent des tailles du même ordre de grandeur (NM401, NRCWE-006, NRCWE-055) perturbent l'expression de 200 gènes en commun alors qu'ils ne n'ont que 5 gènes en communs de perturbés avec les NTC plus courts (NM403, NRCWE-042, NRCWE-049). C'est ce qui suggère que la longueur des NMC joue un rôle dans la détermination des mécanismes moléculaires induits après exposition aux NMC. Nous avons comparé les données de transcriptomiques obtenues après exposition à NM401, NRCWE-006, ou NRCWE-055 avec celles générées dans le laboratoire sur des nanotubes de titane avec le même modèle cellulaire NR8383 (données non encore publiées). Ces nanotubes de titane ont une longueur équivalente à celle des NTC cités. Nous avons pu identifier 152 gènes dérégulés en commun ce qui valide l'importance de l'effet longueur ces nanotubes dans la détermination de leur toxicité.

Par ailleurs, nous avons comparé les 2 NTC ayant un pourcentage d'impuretés important (environ 10%) : NM403 et NRCWE-055. Ces nanotubes perturbent comme les NP d'oxyde de zinc et d'oxyde de fer un certain nombre de gènes en communs égal à 15 gènes. Ces gènes dérégulés codent essentiellement des protéines impliquées dans l'inflammation comme *Ccl22*. C'est pourquoi nous supposons que les impuretés favorisent l'induction de la réaction inflammatoire par les NTC. Ceci pourrait être lié à leur capacité à augmenter la production des ERO comme cela a été démontré dans plusieurs études [274],[181].

Les résultats de l'étude transcriptomique et protéomique qui compare la réponse de deux lignées macrophagiques (NR83838 et THP-1) à deux NTC de taille similaire nous a montré qu'il y a un stress au niveau du RE et une perturbation du métabolisme lipidique chez les deux lignées. Mais seule la lignée NR8383 a montré une formation de macrophages spumeux et de syncytiums macrophagiques après exposition aux nanotubes Mitsui-7 (Etude 4) par l'intermédiaire d'une coloration GIEMSA. Sachant que la fusion cellulaire et la perturbation du métabolisme lipidique sont deux évènements clés du développement du granulome, ce résultat est cohérent avec les résultats de formation de granulomes *in vivo* chez les rats (SmartNanoTox, résultats d'un groupe partenaire non encore publiés). Toutefois ce résultat n'a pas été retrouvé chez les cellules humaines THP-1. Deux raisons pourraient expliquer cette différence : la première est liée au phénotype de chaque lignée. NR8383 est une lignée monocyttaire macrophagique avec 50% de cellules en suspension et 50% de cellules adhérentes alors que les THP-1 différenciés par du PMA comme dans notre cas sont tous des macrophages adhérents. Dans la mesure où la formation des syncytiums dépend du degré de maturation des monocytes et des macrophages [46], soit une fusion entre monocyte et macrophage est plus facile que celle entre deux populations de macrophages, nous pouvons déduire que la possibilité d'obtention de syncytiums dans le cas de la lignée NR383 est plus grande du fait de leur phénotype monocyttaire macrophagique. La deuxième hypothèse est la différence d'espèces. il reste pertinent de supposer que les mécanismes enclenchés dans la lignée d'origine humaine sont plus développés que dans la lignée d'origine murine. C'est pourquoi; alors que pour les cellules THP-1 il y a eu une régulation empêchant d'aboutir à la formation de cellules spumeuses et de syncytiums, en ce qui concerne les cellules NR8383 moins résistantes nous avons observé ces évènements clés

L'étude 5, a montré que le Mitsui-7 (NRCWE-006) a augmenté l'expression d'un récepteur CD14 impliqué dans la phagocytose. Aussi par imagerie par microscopie électronique à transmission (données du laboratoire) nous avons vu que l'exposition des macrophages à ces NTC Mitsui-7 ont modifié la polarité de la cellule qui est devenue plus allongée. Il est alors simple de supposer que les macrophages éprouvent des difficultés à phagocyter ces NTC et que cela provoque un effet sur leur cytosquelette. Cela a d'ailleurs été confirmé par la mise en évidence d'une dérégulation des gènes codant des tubulines (figure 44). Nous supposons que la formation d'agrégats ou d'agglomérats de NTC dans le milieu crée des structures qui bien que phagocytées par les macrophages, ne peuvent pas être digérées et induisent cette formation de syncytium. Celui-ci pourrait alors être considéré comme un mécanisme adaptatif mis en place par les macrophages pour renforcer leur potentiel phagocytaire.

Ces différentes études reprennent les différentes conclusions de la littérature disant que les caractéristiques physiques et chimiques des NMC contrôlent leur toxicité. Plus encore, elles mettent en évidence plusieurs événements clé intéressants à partir desquels il est possible de concevoir plusieurs regroupements de ces NMC afin d'en faire ressortir les liens entre leurs caractéristiques physiques et chimiques et leurs mécanismes de toxicité. Ce travail est donc parfaitement en phase avec les attentes et les objectifs du consortium SmartnanoTox, qui ambitionne de développer un QSAR intelligent pour permettre la prédiction de la toxicité de nanomatériaux en se basant sur leurs descripteurs et quelques tests simples.



VII. Conclusion et perspectives

---

Notre étude a apporté des connaissances sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse macrophagique aux NMC. Une nouvelle voie de signalisation, celle des sirtuines a été identifiée comme voie principale de réponse ce qui est un apport original aux connaissances concernant les effets des NMC.

Nous avons pu démontrer l'influence des caractéristiques physiques et chimiques sur les mécanismes de toxicité. Les études transcriptomiques réalisées nous ont permis d'identifier certains mécanismes moléculaires conduisant à la toxicité et d'expliquer les phénomènes observés. Cependant, la base de données transcriptomique et protéomique générée, ce qui présente un objectif principal du projet Smartnanotox, est volumineuse et était parfois difficile à décrypter. Les analyses seront plus affinées dans le cadre du projet Smartnanotox, après prise en compte de toutes les études notamment *in vivo*. Dans notre travail nous avons tenté d'établir des comparaisons monofactorielles. Dans la littérature, on peut regretter que les multiples travaux rapportés utilisent des NMC de structure et de composition variées, les conditions d'expositions sont très différentes, les cellules utilisées très diverses. Aussi les résultats sont parfois difficilement comparables et parfois contradictoires. Le projet SmartNanotox, en menant ces études standardisées, avec des NM bien caractérisés, suivant des protocoles bien déterminés et respectant les mêmes conditions d'exposition, entre les différents partenaires, permet de surmonter cette limite. Ainsi nous parvenons à proposer des recommandations pour les études de cytotoxicité. Cela pourra permettre de définir un algorithme indiquant les conditions optimales pour ces études et les tests (génomiques ou autres) les plus pertinents qui permettraient de préjuger d'une possible toxicité humaine de tout nano-objet en s'affranchissant de modèles animaux.

Plus particulièrement, en nous basant sur nos propres résultats, nous avons pu émettre plusieurs hypothèses. Afin de les affiner, l'étude de l'expression des sirtuines, *Sirt3*, *Sirt7* et *Sirt1*, et de certains gènes cibles impliqués dans l'inflammation, le stress oxydant et le renouvellement des macrophages après exposition de ces derniers à différentes doses de NMC et pour des temps d'exposition variés, permettra de comprendre son implication dans la toxicité des NMC. Une exposition utilisant le système interface air liquide, et la comparaison avec l'exposition en immergé et les données *in vivo* permettra de mieux explorer les différences entre les différents modèles, et de conclure vis-à-vis de leur pertinence. Il est avancé que la différence principale entre le modèle immergé et l'approche ALI est due à la différence des doses délivrées aux cellules d'où l'intérêt de la mesure de la quantité de NMC délivrée. Particulièrement, nous nous sommes intéressés par l'étude de l'effet longueur et l'effet agrégation sur l'expression des récepteurs de la phagocytose frustrée et la formation des syncytiums, ce qui sera complétée dans le cadre de l'étude cinq.

---

# Références

---

- [1] “Revised proposal for the revision of the statistical definitions of biotechnology and nanotechnology,” OECD Science, Technology and Industry Working Papers 2018/01, Jan. 2018.
- [2] “Définition des nanomatériaux : Recommandations de la Commission européenne - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé.” [Online]. Available: <https://www.ansm.sante.fr/L-ANSM/Nanotechnologies/Nanotechnologies-et-produits-de-sante/Definition-des-nanomateriaux-Recommandations-de-la-Commission-europeenne>. [Accessed: 10-Jan-2019].
- [3] “Les nanomatériaux manufacturés à l’horizon 2030 en France - Brochure - INRS.” [Online]. Available: <http://www.inrs.fr/media.html?refINRS=VEP%202>. [Accessed: 11-Jan-2019].
- [4] “Hood, E. (2004) Nanotechnology, Diving into the Unknown. Environmental Health Perspective, 112, A747-A749. - References - Scientific Research Publishing.” [Online]. Available: [http://www.scirp.org/\(S\(i43dyn45teexjx455q1t3d2q\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1261470](http://www.scirp.org/(S(i43dyn45teexjx455q1t3d2q))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1261470). [Accessed: 05-Jul-2019].
- [5] “Nanotechnology: A Realistic Market Assessment: NAN031F | BCC Research.” [Online]. Available: <https://www.bccresearch.com/market-research/nanotechnology/nanotechnology-market-assessment-report-nan031f.html>. [Accessed: 23-Jul-2019].
- [6] A. Baeza-Squiban, “Impacts physiopathologiques des nanoparticules inhalées,” *Biol. Aujourd’hui*, vol. 208, no. 2, pp. 151–158, 2014.
- [7] T. E. H. Allen, J. M. Goodman, S. Gutsell, and P. J. Russell, “Defining Molecular Initiating Events in the Adverse Outcome Pathway Framework for Risk Assessment,” *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 27, no. 12, pp. 2100–2112, Dec. 2014.
- [8] G. T. Ankley *et al.*, “Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment,” *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 29, no. 3, pp. 730–741, Mar. 2010.
- [9] “Lonsdaleite: Mineral information, data and localities.” [Online]. Available: <https://www.mindat.org/min-2431.html>. [Accessed: 05-Jul-2019].
- [10] “Carbon black vs. black carbon and other airborne materials containing elemental carbon: Physical and chemical distinctions - ScienceDirect.” [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749113003266>. [Accessed: 05-Jul-2019].
- [11] “orion-what-is-carbon-black.pdf.”
- [12] “Carbon Black Market | Growth, Trends, and Forecasts (2019 - 2024).” [Online]. Available: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/carbon-black-market>. [Accessed: 05-Jul-2019].
- [13] “Nouveau procédé d’élaboration à grande échelle de films d’oxyde de graphène réduit,” *IRAMIS*. [Online]. Available: [http://iramis.cea.fr/Phocea/Vie\\_des\\_labos/Ast/ast.php?t=fait\\_marquant&id\\_ast=2178](http://iramis.cea.fr/Phocea/Vie_des_labos/Ast/ast.php?t=fait_marquant&id_ast=2178). [Accessed: 29-May-2019].
- [14] C. Han *et al.*, “Hypericin-functionalized graphene oxide for enhanced mitochondria-targeting and synergistic anticancer effect,” *Acta Biomater.*, vol. 77, pp. 268–281, Sep. 2018.
- [15] S. Biswas and V. P. Torchilin, “Nanopreparations for organelle-specific delivery in cancer,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 66, pp. 26–41, Feb. 2014.



- [16] "Les nanotubes de carbone : quels risques, quelle prévention ? - Article de revue - INRS." [Online]. Available: <http://www.inrs.fr/media.html?refINRS=ND%202286>. [Accessed: 12-Feb-2019].
- [17] "Engineering of oriented carbon nanotubes in composite materials." [Online]. Available: <https://www.beilstein-journals.org/bjnano/articles/9/41>. [Accessed: 05-Jul-2019].
- [18] A. Eatemadi *et al.*, "Carbon nanotubes: properties, synthesis, purification, and medical applications," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 9, no. 1, p. 393, 2014.
- [19] M. Kaseem, K. Hamad, and Y. G. Ko, "Fabrication and materials properties of polystyrene/carbon nanotube (PS/CNT) composites: A review," *Eur. Polym. J.*, vol. 79, pp. 36–62, Jun. 2016.
- [20] "Synthesis of carbon nanostructures by arc evaporation of - Technische Informationsbibliothek (TIB)." [Online]. Available: <https://www.tib.eu/en/search/id/tema%3ATEMA20030608687/Synthesis-of-carbon-nanostructures-by-arc-evaporation/>. [Accessed: 05-Jul-2019].
- [21] "Mass production of single-wall carbon nanotubes by the arc plasma jet method - ScienceDirect." [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S000926140000556X>. [Accessed: 05-Jul-2019].
- [22] "Carbon Nanotubes: Applications in Pharmacy and Medicine." [Online]. Available: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/578290/>. [Accessed: 06-Jul-2019].
- [23] "Carbon Nanotubes for Sensing Applications - ScienceDirect." [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323414814000058>. [Accessed: 06-Jul-2019].
- [24] "Carbon nanotube membranes for water purification: Developments, challenges, and prospects for the future - ScienceDirect." [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586618312437>. [Accessed: 06-Jul-2019].
- [25] "(14) (PDF) Application potential of carbon nanotubes in water treatment: A review." [Online]. Available: [https://www.researchgate.net/publication/258500340\\_Application\\_potential\\_of\\_carbon\\_nanotubes\\_in\\_water\\_treatment\\_A\\_review](https://www.researchgate.net/publication/258500340_Application_potential_of_carbon_nanotubes_in_water_treatment_A_review). [Accessed: 06-Jul-2019].
- [26] L. Milane, M. Trivedi, A. Singh, M. Talekar, and M. Amiji, "Mitochondrial biology, targets, and drug delivery," *J. Controlled Release*, vol. 207, pp. 40–58, Jun. 2015.
- [27] "Detection of cancer cells using a peptide nanotube-folic acid modified graphene electrode. - PubMed - NCBI." [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23150875>. [Accessed: 06-Jul-2019].
- [28] "Collagen-carbon nanotube composite materials as scaffolds in tissue engineering. - PubMed - NCBI." [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15973695>. [Accessed: 06-Jul-2019].
- [29] "Carbon Nanotubes Market | Applications | Manufacturers | Size | Shares," *DataMIntelligence*. .
- [30] E. J. Petersen *et al.*, "Potential Release Pathways, Environmental Fate, And Ecological Risks of Carbon Nanotubes," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 45, no. 23, pp. 9837–9856, Dec. 2011.
- [31] V. L. Colvin, "The potential environmental impact of engineered nanomaterials," *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, no. 10, pp. 1166–1170, Oct. 2003.
- [32] X. Zhao and R. Liu, "Recent progress and perspectives on the toxicity of carbon nanotubes at organism, organ, cell, and biomacromolecule levels," *Environ. Int.*, vol. 40, pp. 244–255, Apr. 2012.
- [33] "Les nanomatériaux. Définitions, risques toxicologiques, caractérisation de l'exposition professionnelle et mesures de prévention - Brochure - INRS." [Online]. Available: <http://www.inrs.fr/media.html?refINRS=ED%206050>. [Accessed: 06-Jul-2019].
- [34] "À Paris, des nanotubes de carbone dans les poumons d'enfants asthmatiques," *Sciences et Avenir*. [Online]. Available: [https://www.sciencesetavenir.fr/sante/des-nanotubes-de-carbone-plein-les-poumons\\_14792](https://www.sciencesetavenir.fr/sante/des-nanotubes-de-carbone-plein-les-poumons_14792). [Accessed: 06-Jul-2019].
- [35] Z. Chen *et al.*, "Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo," *Toxicol. Lett.*, vol. 163, no. 2, pp. 109–120, May 2006.

- [36] Z. Li *et al.*, "Cardiovascular effects of pulmonary exposure to single-wall carbon nanotubes," *Environ. Health Perspect.*, vol. 115, no. 3, pp. 377–382, Mar. 2007.
- [37] L. Leclerc, "Internalisation cellulaire et activité biologique de mico et nano-particules fluorescentes de chimie de surface contrôlée.," Dec. 2011.
- [38] P. Jackson *et al.*, "Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes," *Chem. Cent. J.*, vol. 7, no. 1, p. 154, 2013.
- [39] B. A. Magnuson, T. S. Jonaitis, and J. W. Card, "A Brief Review of the Occurrence, Use, and Safety of Food-Related Nanomaterials," *J. Food Sci.*, vol. 76, no. 6, pp. R126–R133, Aug. 2011.
- [40] K. Kuche *et al.*, "Carbon nanotubes (CNTs) based advanced dermal therapeutics: current trends and future potential," *Nanoscale*, vol. 10, no. 19, pp. 8911–8937, 2018.
- [41] G. Liang *et al.*, "Effects of Subchronic Exposure to Multi-Walled Carbon Nanotubes on Mice," *J. Toxicol. Environ. Health A*, vol. 73, no. 7, pp. 463–470, Feb. 2010.
- [42] R. R. Mercer *et al.*, "Extrapulmonary transport of MWCNT following inhalation exposure," *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 10, no. 1, p. 38, 2013.
- [43] G. Oberdörster, V. Castranova, B. Asgharian, and P. Sayre, "Inhalation Exposure to Carbon Nanotubes (CNT) and Carbon Nanofibers (CNF): Methodology and Dosimetry," *J. Toxicol. Environ. Health Part B*, vol. 18, no. 3–4, pp. 121–212, May 2015.
- [44] A. Gajewicz *et al.*, "Advancing risk assessment of engineered nanomaterials: application of computational approaches," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, no. 15, pp. 1663–1693, Dec. 2012.
- [45] "AVIS de l'Anses en réponse à la 'Consultation publique de la commission européenne relatif à la modification des annexes de REACH en vue de la prise en compte des nanomatériaux' | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail." [Online]. Available: <https://www.anses.fr/fr/content/avis-de-lanses-en-r%C3%A9ponse-%C3%A0-la-consultation-publique-de-la-commission-europ%C3%A9enne-relatif-%C3%A0>. [Accessed: 06-Jul-2019].
- [46] X. Cui, B. Wan, Y. Yang, X. Ren, and L.-H. Guo, "Length effects on the dynamic process of cellular uptake and exocytosis of single-walled carbon nanotubes in murine macrophage cells," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 1518, May 2017.
- [47] M. Allegri *et al.*, "Toxicity determinants of multi-walled carbon nanotubes: The relationship between functionalization and agglomeration," *Toxicol. Rep.*, vol. 3, pp. 230–243, 2016.
- [48] R. Sturm, "Nanotubes in the human respiratory tract – Deposition modeling," *Z. Für Med. Phys.*, vol. 25, no. 2, pp. 135–145, Jun. 2015.
- [49] F. A. Murphy *et al.*, "Length-Dependent Retention of Carbon Nanotubes in the Pleural Space of Mice Initiates Sustained Inflammation and Progressive Fibrosis on the Parietal Pleura," *Am. J. Pathol.*, vol. 178, no. 6, pp. 2587–2600, Jun. 2011.
- [50] M. S. P. Boyles *et al.*, "Multi-walled carbon nanotube induced frustrated phagocytosis, cytotoxicity and pro-inflammatory conditions in macrophages are length dependent and greater than that of asbestos," *Toxicol. In Vitro*, vol. 29, no. 7, pp. 1513–1528, Oct. 2015.
- [51] D. Elgrabli, "Toxicité et clairance pulmonaires des nanotubes de carbone," Dec. 2008.
- [52] M. Dörger, S. Münzing, A.-M. Allmeling, K. Messmer, and F. Krombach, "Differential Responses of Rat Alveolar and Peritoneal Macrophages to Man-Made Vitreous Fibers in Vitro," *Environ. Res.*, vol. 85, no. 3, pp. 207–214, Mar. 2001.
- [53] X. Shi, A. von dem Bussche, R. H. Hurt, A. B. Kane, and H. Gao, "Cell entry of one-dimensional nanomaterials occurs by tip recognition and rotation," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 6, no. 11, pp. 714–719, Nov. 2011.
- [54] D. van Berlo *et al.*, "Apoptotic, inflammatory, and fibrogenic effects of two different types of multi-walled carbon nanotubes in mouse lung," *Arch. Toxicol.*, vol. 88, no. 9, pp. 1725–1737, Sep. 2014.

- [55] C. Bussy *et al.*, "Critical role of surface chemical modifications induced by length shortening on multi-walled carbon nanotubes-induced toxicity," *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 9, no. 1, p. 46, 2012.
- [56] A. Peigney, C. Laurent, E. Flahaut, R. R. Bacsa, and A. Rousset, "Specific surface area of carbon nanotubes and bundles of carbon nanotubes," *Carbon*, vol. 39, no. 4, pp. 507–514, Apr. 2001.
- [57] "Surface area is the biologically most effective dose metric for acute nanoparticle toxicity in the lung - ScienceDirect." [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021850215301166>. [Accessed: 28-Feb-2018].
- [58] A. Hirsch, "Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 41, no. 11, pp. 1853–1859, 2002.
- [59] T. Zhang *et al.*, "Surface modification of multiwall carbon nanotubes determines the pro-inflammatory outcome in macrophage," *J. Hazard. Mater.*, vol. 284, pp. 73–82, Mar. 2015.
- [60] R. F. Hamilton, Z. Wu, S. Mitra, and A. Holian, "The Effects of Varying Degree of MWCNT Carboxylation on Bioactivity in Various In Vivo and In Vitro Exposure Models," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 2, Jan. 2018.
- [61] M. Nicoletti, C. Capodanno, C. Gambarotti, and E. Fasoli, "Proteomic investigation on bio-corona of functionalized multi-walled carbon nanotubes," *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, vol. 1862, no. 10, pp. 2293–2303, 2018.
- [62] T. Zhang, M. Tang, Y. Yao, Y. Ma, and Y. Pu, "MWCNT interactions with protein: surface-induced changes in protein adsorption and the impact of protein corona on cellular uptake and cytotoxicity," *International Journal of Nanomedicine*, 07-Feb-2019. [Online]. Available: <https://www.dovepress.com/mwcnt-interactions-with-protein-surface-induced-changes-in-protein-ads-peer-reviewed-article-IJN>. [Accessed: 06-Jul-2019].
- [63] C. Kinnear, T. L. Moore, L. Rodriguez-Lorenzo, B. Rothen-Rutishauser, and A. Petri-Fink, "Form Follows Function: Nanoparticle Shape and Its Implications for Nanomedicine," *Chem. Rev.*, vol. 117, no. 17, pp. 11476–11521, Sep. 2017.
- [64] Z. Wang, F. Li, and A. Stein, "Direct Synthesis of Shaped Carbon Nanoparticles with Ordered Cubic Mesostructure," *Nano Lett.*, vol. 7, no. 10, pp. 3223–3226, Oct. 2007.
- [65] R. Bacchetta, N. Santo, I. Valenti, D. Maggioni, M. Longhi, and P. Tremolada, "Comparative toxicity of three differently shaped carbon nanomaterials on *Daphnia magna*: does a shape effect exist?," *Nanotoxicology*, vol. 12, no. 3, pp. 201–223, Mar. 2018.
- [66] S. E. A. Gratton *et al.*, "The effect of particle design on cellular internalization pathways," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, no. 33, pp. 11613–11618, Aug. 2008.
- [67] V. Cohignac *et al.*, "Carbon nanotubes, but not spherical nanoparticles, block autophagy by a shape-related targeting of lysosomes in murine macrophages," *Autophagy*, vol. 14, no. 8, pp. 1323–1334, Aug. 2018.
- [68] Z. Huang, N. Geyer, P. Werner, J. de Boor, and U. Gösele, "Metal-Assisted Chemical Etching of Silicon: A Review: In memory of Prof. Ulrich Gösele," *Adv. Mater.*, vol. 23, no. 2, pp. 285–308, Jan. 2011.
- [69] J. Hua, M. G. Vijver, M. K. Richardson, F. Ahmad, and W. J. G. M. Peijnenburg, "Particle-specific toxic effects of differently shaped zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryos (*Danio rerio*): Particle-specific toxicity of differently shaped ZnO NPs," *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 33, no. 12, pp. 2859–2868, Dec. 2014.
- [70] S. George *et al.*, "Surface Defects on Plate-Shaped Silver Nanoparticles Contribute to Its Hazard Potential in a Fish Gill Cell Line and Zebrafish Embryos," *ACS Nano*, vol. 6, no. 5, pp. 3745–3759, May 2012.
- [71] K. Pulskamp, S. Diabaté, and H. F. Krug, "Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants," *Toxicol. Lett.*, vol. 168, no. 1, pp. 58–74, Jan. 2007.

- [72] S. Y. Madani, A. Mandel, and A. M. Seifalian, "A concise review of carbon nanotube's toxicology," *Nano Rev.*, vol. 4, Dec. 2013.
- [73] V. E. Kagan *et al.*, "Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages: Role of iron," *Toxicol. Lett.*, vol. 165, no. 1, pp. 88–100, Aug. 2006.
- [74] D. B. Warheit, T. R. Webb, K. L. Reed, S. Frerichs, and C. M. Sayes, "Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO<sub>2</sub> particles: Differential responses related to surface properties," *Toxicology*, vol. 230, no. 1, pp. 90–104, Jan. 2007.
- [75] W. J. Sandberg *et al.*, "Comparison of non-crystalline silica nanoparticles in IL-1 $\beta$  release from macrophages," *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 9, no. 1, p. 32, 2012.
- [76] A. Figarol *et al.*, "In vitro toxicity of carbon nanotubes, nano-graphite and carbon black, similar impacts of acid functionalization," *Toxicol. In Vitro*, vol. 30, no. 1, pp. 476–485, Dec. 2015.
- [77] A. Figarol, "Toxicité in vitro et propriétés physico-chimiques de nanotubes de carbone," Thèse de doctorat, École nationale supérieure des mines, Saint-Etienne, France, 2014.
- [78] A. J. Raghavendra, K. Fritz, S. Fu, J. M. Brown, R. Podila, and J. H. Shannahan, "Variations in biocorona formation related to defects in the structure of single walled carbon nanotubes and the hyperlipidemic disease state," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 8382, Dec. 2017.
- [79] J. Muller *et al.*, "Structural Defects Play a Major Role in the Acute Lung Toxicity of Multiwall Carbon Nanotubes: Toxicological Aspects," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 21, no. 9, pp. 1698–1705, Sep. 2008.
- [80] I. Fenoglio *et al.*, "Structural Defects Play a Major Role in the Acute Lung Toxicity of Multiwall Carbon Nanotubes: Physicochemical Aspects," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 21, no. 9, pp. 1690–1697, Sep. 2008.
- [81] D. W. Porter *et al.*, "Mouse pulmonary dose- and time course-responses induced by exposure to multi-walled carbon nanotubes," *Toxicology*, vol. 269, no. 2–3, pp. 136–147, Mar. 2010.
- [82] J. R. Harkema, K. J. Nikula, and W. M. Haschek, "Respiratory System," in *Fundamentals of Toxicologic Pathology*, Elsevier, 2018, pp. 351–393.
- [83] J. G. Teeguarden, P. M. Hinderliter, G. Orr, B. D. Thrall, and J. G. Pounds, "Particokinetics In Vitro: Dosimetry Considerations for In Vitro Nanoparticle Toxicity Assessments," *Toxicol. Sci.*, vol. 95, no. 2, pp. 300–312, Feb. 2007.
- [84] A.-G. Lenz *et al.*, "Efficient Bioactive Delivery of Aerosolized Drugs to Human Pulmonary Epithelial Cells Cultured in Air-Liquid Interface Conditions," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 51, no. 4, pp. 526–535, Oct. 2014.
- [85] S. Beyeler *et al.*, "Acute effects of multi-walled carbon nanotubes on primary bronchial epithelial cells from COPD patients," *Nanotoxicology*, vol. 12, no. 7, pp. 699–711, Aug. 2018.
- [86] S. Chortarea, H. Barosova, M. J. D. Clift, P. Wick, A. Petri-Fink, and B. Rothen-Rutishauser, "Human Asthmatic Bronchial Cells Are More Susceptible to Subchronic Repeated Exposures of Aerosolized Carbon Nanotubes At Occupationally Relevant Doses Than Healthy Cells," *ACS Nano*, vol. 11, no. 8, pp. 7615–7625, Aug. 2017.
- [87] A. A. Kapralov *et al.*, "Adsorption of Surfactant Lipids by Single-Walled Carbon Nanotubes in Mouse Lung upon Pharyngeal Aspiration," *ACS Nano*, vol. 6, no. 5, pp. 4147–4156, May 2012.
- [88] L. Wang *et al.*, "Dispersion of single-walled carbon nanotubes by a natural lung surfactant for pulmonary in vitro and in vivo toxicity studies," *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 7, no. 1, p. 31, 2010.
- [89] R. D. Brohi *et al.*, "Toxicity of Nanoparticles on the Reproductive System in Animal Models: A Review," *Front. Pharmacol.*, vol. 8, p. 606, Sep. 2017.
- [90] A. Schaper *et al.*, "Countering health threats by chemicals with a potential terrorist background — creating a rapid alert system for Europe," *Eur. J. Intern. Med.*, vol. 23, no. 2, pp. e63–e66, Mar. 2012.
- [91] L. Chezeau, "Étude au niveau pulmonaire du profil d'expression de gènes et de protéines chez le rat exposé par inhalation à un aérosol de particules nanostructurées de dioxyde de titane," Oct. 2018.

- [92] E. Bermudez, "Long-Term Pulmonary Responses of Three Laboratory Rodent Species to Subchronic Inhalation of Pigmentary Titanium Dioxide Particles," *Toxicol. Sci.*, vol. 70, no. 1, pp. 86–97, Nov. 2002.
- [93] S. Bettini *et al.*, "Food-grade TiO<sub>2</sub> impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 40373, Dec. 2017.
- [94] A. P. Francis and T. Devasena, "Toxicity of carbon nanotubes: A review," *Toxicol. Ind. Health*, p. 748233717747472, Jan. 2018.
- [95] N. Kobayashi, H. Izumi, and Y. Morimoto, "Review of toxicity studies of carbon nanotubes," *J. Occup. Health*, vol. 59, no. 5, pp. 394–407, 2017.
- [96] A. Magrez *et al.*, "Cellular Toxicity of Carbon-Based Nanomaterials," *Nano Lett.*, vol. 6, no. 6, pp. 1121–1125, Jun. 2006.
- [97] "Toxicity of graphene-family nanoparticles: a general review of the origins and mechanisms | Partide and Fibre Toxicology | Full Text." [Online]. Available: <https://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12989-016-0168-y>. [Accessed: 07-Jul-2019].
- [98] "TEL - Thèses en ligne - Réponse macrophagique à des nanoparticules manufacturées : effets de leurs caractéristiques physico-chimiques sur l'autophagie." [Online]. Available: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01364910>. [Accessed: 07-Jul-2019].
- [99] R. Gref *et al.*, "'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption," *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 18, no. 3–4, pp. 301–313, Oct. 2000.
- [100] M. P. Monopoli, C. Åberg, A. Salvati, and K. A. Dawson, "Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 7, no. 12, pp. 779–786, Dec. 2012.
- [101] S. Wan *et al.*, "The 'Sweet' Side of the Protein Corona: Effects of Glycosylation on Nanoparticle–Cell Interactions," *ACS Nano*, vol. 9, no. 2, pp. 2157–2166, Feb. 2015.
- [102] X. Cai *et al.*, "Characterization of carbon nanotube protein corona by using quantitative proteomics," *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*, vol. 9, no. 5, pp. 583–593, Jul. 2013.
- [103] X. Zhao, D. Lu, F. Hao, and R. Liu, "Exploring the diameter and surface dependent conformational changes in carbon nanotube-protein corona and the related cytotoxicity," *J. Hazard. Mater.*, vol. 292, pp. 98–107, Jul. 2015.
- [104] D. Khang, Y. K. Lee, E.-J. Choi, T. J. Webster, and S.-H. Kim, "Effect of the protein corona on nanoparticles for modulating cytotoxicity and immunotoxicity," *Int. J. Nanomedicine*, p. 97, Dec. 2014.
- [105] "Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity | PNAS." [Online]. Available: <https://www.pnas.org/content/108/41/16968>. [Accessed: 07-Jul-2019].
- [106] "The effect of protein corona composition on the interaction of carbon nanotubes with human blood platelets. - PubMed - NCBI." [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24831972>. [Accessed: 07-Jul-2019].
- [107] "Effects of serum proteins on intracellular uptake and cytotoxicity of carbon nanoparticles - ScienceDirect." [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000862230900044X>. [Accessed: 07-Jul-2019].
- [108] "Protein Corona-Mediated Mitigation of Cytotoxicity of Graphene Oxide | ACS Nano." [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/nn200021j>. [Accessed: 07-Jul-2019].
- [109] "Hard corona composition and cellular toxicities of the graphene sheets - ScienceDirect." [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776513002361>. [Accessed: 07-Jul-2019].

- [110] R. H. Michell, "MEASUREMENT OF RATES OF PHAGOCYTOSIS: The Use of Cellular Monolayers," *J. Cell Biol.*, vol. 40, no. 1, pp. 216–224, Jan. 1969.
- [111] X. Cui, B. Wan, Y. Yang, X. Ren, and L.-H. Guo, "Length effects on the dynamic process of cellular uptake and exocytosis of single-walled carbon nanotubes in murine macrophage cells," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 1518, May 2017.
- [112] P. M. Costa, M. Bourgoignon, J. T.-W. Wang, and K. T. Al-Jamal, "Functionalised carbon nanotubes: From intracellular uptake and cell-related toxicity to systemic brain delivery," *J. Controlled Release*, vol. 241, pp. 200–219, Nov. 2016.
- [113] B. Yameen, W. I. Choi, C. Vilos, A. Swami, J. Shi, and O. C. Farokhzad, "Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting," *J. Controlled Release*, vol. 190, pp. 485–499, Sep. 2014.
- [114] H. H. Gustafson, D. Holt-Casper, D. W. Grainger, and H. Ghandehari, "Nanoparticle uptake: The phagocyte problem," *Nano Today*, vol. 10, no. 4, pp. 487–510, Aug. 2015.
- [115] A. Schinwald and K. Donaldson, "Use of back-scatter electron signals to visualise cell/nanowires interactions in vitro and in vivo; frustrated phagocytosis of long fibres in macrophages and compartmentalisation in mesothelial cells in vivo," *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 9, no. 1, p. 34, 2012.
- [116] F. A. Murphy, A. Schinwald, C. A. Poland, and K. Donaldson, "The mechanism of pleural inflammation by long carbon nanotubes: interaction of long fibres with macrophages stimulates them to amplify pro-inflammatory responses in mesothelial cells," *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 9, no. 1, p. 8, 2012.
- [117] Y. Li and J. Cao, "The impact of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) on macrophages: contribution of MWCNT characteristics," *Sci. China Life Sci.*, vol. 61, no. 11, pp. 1333–1351, Nov. 2018.
- [118] S. Baoukina, L. Monticelli, and D. P. Tieleman, "Interaction of Pristine and Functionalized Carbon Nanotubes with Lipid Membranes," *J. Phys. Chem. B*, vol. 117, no. 40, pp. 12113–12123, Oct. 2013.
- [119] M. S. Lord, M. Foss, and F. Besenbacher, "Influence of nanoscale surface topography on protein adsorption and cellular response," *Nano Today*, vol. 5, no. 1, pp. 66–78, Feb. 2010.
- [120] "Alveolar macrophage priming by intravenous administration of chitin particles, polymers of N-acetyl-D-glucosamine, in mice. - PubMed - NCBI." [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9125555>. [Accessed: 07-Jul-2019].
- [121] J. Liu and A. J. Hopfinger, "Identification of Possible Sources of Nanotoxicity from Carbon Nanotubes Inserted into Membrane Bilayers Using Membrane Interaction Quantitative Structure–Activity Relationship Analysis," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 21, no. 2, pp. 459–466, Feb. 2008.
- [122] M. L. Di Giorgio, S. D. Bucchianico, A. M. Ragnelli, P. Aimola, S. Santucci, and A. Poma, "Effects of single and multi walled carbon nanotubes on macrophages: Cyto and genotoxicity and electron microscopy," *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 722, no. 1, pp. 20–31, May 2011.
- [123] L. Lacerda *et al.*, "How do functionalized carbon nanotubes land on, bind to and pierce through model and plasma membranes," *Nanoscale*, vol. 5, no. 21, p. 10242, 2013.
- [124] "Graphene-Induced Pore Formation on Cell Membranes. - PubMed - NCBI." [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28218295>. [Accessed: 07-Jul-2019].
- [125] "Interactions of Graphene Oxide with Model Cell Membranes: Probing Nanoparticle Attachment and Lipid Bilayer Disruption | Langmuir." [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.langmuir.5b02414>. [Accessed: 07-Jul-2019].
- [126] X. Ma *et al.*, "Single-Walled Carbon Nanotubes Alter Cytochrome c Electron Transfer and Modulate Mitochondrial Function," *ACS Nano*, vol. 6, no. 12, pp. 10486–10496, Dec. 2012.
- [127] N. Gao *et al.*, "Steering Carbon Nanotubes to Scavenger Receptor Recognition by Nanotube Surface Chemistry Modification Partially Alleviates NFκB Activation and Reduces Its Immunotoxicity," *ACS Nano*, vol. 5, no. 6, pp. 4581–4591, Jun. 2011.
- [128] B. L. Allen *et al.*, "Mechanistic Investigations of Horseradish Peroxidase-Catalyzed Degradation of Single-Walled Carbon Nanotubes," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, no. 47, pp. 17194–17205, Dec. 2009.

- [129] "Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. - PubMed - NCBI." [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12527753>. [Accessed: 07-Jul-2019].
- [130] "Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. - PubMed - NCBI." [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12509422>. [Accessed: 07-Jul-2019].
- [131] "Cytotoxicité de nanoparticules polymériques, vecteurs de médicaments | cithefor.univ-lorraine.fr." [Online]. Available: <https://cithefor.univ-lorraine.fr/fr/content/cytotoxicite-de-nanoparticules-polymeriques-vecteurs-de-medicaments>. [Accessed: 07-Jul-2019].
- [132] "Mitochondrial dysfunction, perturbations of mitochondrial dynamics and biogenesis involved in endothelial injury induced by silica nanoparticles - ScienceDirect." [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749117320584?via%3Dihub>. [Accessed: 07-Jul-2019].
- [133] "Titanium Dioxide Nanoparticles Induce Mitochondrial Dynamic Imbalance and Damage in HT22 Cells." [Online]. Available: <https://www.hindawi.com/journals/jnm/2019/4607531/>. [Accessed: 07-Jul-2019].
- [134] D. Chen, T. A. Stueckle, S. Luanpitpong, Y. Rojanasakul, Y. Lu, and L. Wang, "Gene expression profile of human lung epithelial cells chronically exposed to single-walled carbon nanotubes," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 10, no. 1, p. 12, Dec. 2015.
- [135] C. Xu, Q. Liu, H. Liu, C. Zhang, W. Shao, and A. Gu, "Toxicological assessment of multi-walled carbon nanotubes *in vitro*: potential mitochondria effects on male reproductive cells," *Oncotarget*, vol. 7, no. 26, Jun. 2016.
- [136] H. A. Zeinabad, A. Zarrabian, A. A. Saboury, A. M. Alizadeh, and M. Falahati, "Interaction of single and multi wall carbon nanotubes with the biological systems: tau protein and PC12 cells as targets," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 26508, May 2016.
- [137] A. Burman, H. Tanjore, and T. S. Blackwell, "Endoplasmic reticulum stress in pulmonary fibrosis," *Matrix Biol.*, vol. 68–69, pp. 355–365, Aug. 2018.
- [138] J. Long, W. Ma, Z. Yu, H. Liu, and Y. Cao, "Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) promoted lipid accumulation in THP-1 macrophages through modulation of endoplasmic reticulum (ER) stress," *Nanotoxicology*, pp. 1–14, Apr. 2019.
- [139] J. Yuan, H. Gao, J. Sui, H. Duan, W. N. Chen, and C. B. Ching, "Cytotoxicity Evaluation of Oxidized Single-Walled Carbon Nanotubes and Graphene Oxide on Human Hepatoma HepG2 cells: An iTRAQ-Coupled 2D LC-MS/MS Proteome Analysis," *Toxicol. Sci.*, vol. 126, no. 1, pp. 149–161, Mar. 2012.
- [140] X. Zhao, S. Chang, J. Long, J. Li, X. Li, and Y. Cao, "The toxicity of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) to human endothelial cells: The influence of diameters of MWCNTs," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 126, pp. 169–177, Apr. 2019.
- [141] J. Long, Y. Xiao, L. Liu, and Y. Cao, "The adverse vascular effects of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) to human vein endothelial cells (HUVECs) in vitro: role of length of MWCNTs," *J. Nanobiotechnology*, vol. 15, no. 1, p. 80, Dec. 2017.
- [142] M. Orecchioni, D. Bedognetti, F. Sgarrella, F. M. Marincola, A. Bianco, and L. Delogu, "Impact of carbon nanotubes and graphene on immune cells," *J. Transl. Med.*, vol. 12, no. 1, p. 138, 2014.
- [143] M. Pescatori *et al.*, "Functionalized carbon nanotubes as immunomodulator systems," *Biomaterials*, vol. 34, no. 18, pp. 4395–4403, Jun. 2013.
- [144] X. Yang *et al.*, "Proteomic profiling of RAW264.7 macrophage cells exposed to graphene oxide: insights into acute cellular responses," *Nanotoxicology*, vol. 13, no. 1, pp. 35–49, Jan. 2019.
- [145] G. M. Hilton *et al.*, "Mapping differential cellular protein response of mouse alveolar epithelial cells to multi-walled carbon nanotubes as a function of atomic layer deposition coating," *Nanotoxicology*, vol. 11, no. 3, pp. 313–326, Mar. 2017.

- [146] "MTOR Gene - GeneCards | MTOR Protein | MTOR Antibody." [Online]. Available: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MTOR&keywords=MTORC1>. [Accessed: 07-Jul-2019].
- [147] S. K. Sohaebuddin, P. T. Thevenot, D. Baker, J. W. Eaton, and L. Tang, "Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent," *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 7, no. 1, p. 22, 2010.
- [148] T. Xia, M. Kovochich, M. Liong, J. I. Zink, and A. E. Nel, "Cationic Polystyrene Nanosphere Toxicity Depends on Cell-Specific Endocytic and Mitochondrial Injury Pathways," *ACS Nano*, vol. 2, no. 1, pp. 85–96, Jan. 2008.
- [149] B. Wan *et al.*, "Single-walled carbon nanotubes and graphene oxides induce autophagosome accumulation and lysosome impairment in primarily cultured murine peritoneal macrophages," *Toxicol. Lett.*, vol. 221, no. 2, pp. 118–127, Aug. 2013.
- [150] "(15) Nanoparticles and Viruses as Mitophagy Inducers in Immune Cells | Housam Eidi | Request PDF." [Online]. Available: [https://www.researchgate.net/publication/320247149\\_Nanoparticles\\_and\\_Viruses\\_as\\_Mitophagy\\_Inducers\\_in\\_Immune\\_Cells](https://www.researchgate.net/publication/320247149_Nanoparticles_and_Viruses_as_Mitophagy_Inducers_in_Immune_Cells). [Accessed: 07-Jul-2019].
- [151] V. Cohignac *et al.*, "Carbon nanotubes, but not spherical nanoparticles, block autophagy by a shape-related targeting of lysosomes in murine macrophages," *Autophagy*, vol. 14, no. 8, pp. 1323–1334, Aug. 2018.
- [152] W. Zhu *et al.*, "Nanomechanical mechanism for lipid bilayer damage induced by carbon nanotubes confined in intracellular vesicles," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 113, no. 44, pp. 12374–12379, Nov. 2016.
- [153] C. Bussy *et al.*, "Intracellular fate of carbon nanotubes inside murine macrophages: pH-dependent detachment of iron catalyst nanoparticles," *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 10, no. 1, p. 24, 2013.
- [154] J. S. Kim, K. S. Song, and I. J. Yu, "Multiwall Carbon Nanotube-Induced DNA Damage and Cytotoxicity in Male Human Peripheral Blood Lymphocytes," *Int. J. Toxicol.*, vol. 35, no. 1, pp. 27–37, Feb. 2016.
- [155] L. Migliore *et al.*, "Carbon nanotubes induce oxidative DNA damage in RAW 264.7 cells," *Environ. Mol. Mutagen.*, p. NA-NA, 2010.
- [156] L. Zhu, D. W. Chang, L. Dai, and Y. Hong, "DNA Damage Induced by Multiwalled Carbon Nanotubes in Mouse Embryonic Stem Cells," *Nano Lett.*, vol. 7, no. 12, pp. 3592–3597, Dec. 2007.
- [157] K. Yamashita *et al.*, "Carbon Nanotubes Elicit DNA Damage and Inflammatory Response Relative to Their Size and Shape," *Inflammation*, vol. 33, no. 4, pp. 276–280, Aug. 2010.
- [158] C.-J. Lu *et al.*, "Graphene oxide nanosheets induce DNA damage and activate the base excision repair (BER) signaling pathway both in vitro and in vivo," *Chemosphere*, vol. 184, pp. 795–805, Oct. 2017.
- [159] "Sci-Hub | Comparative protein profile of human hepatoma HepG2 cells treated with graphene and single-walled carbon nanotubes: An iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS proteome analysis. *Toxicology Letters*, 207(3), 213–221 | 10.1016/j.toxlet.2011.09.014." [Online]. Available: <https://sci-hub.tw/10.1016/j.toxlet.2011.09.014>. [Accessed: 07-Jul-2019].
- [160] "Assessment of the toxic potential of graphene family nanomaterials." [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6350507/#R56>. [Accessed: 07-Jul-2019].
- [161] B. D. Holt *et al.*, "Altered Cell Mechanics from the Inside: Dispersed Single Wall Carbon Nanotubes Integrate with and Restructure Actin," *J. Funct. Biomater.*, vol. 3, no. 2, pp. 398–417, May 2012.
- [162] B. D. Holt, P. A. Short, A. D. Rape, Y. Wang, M. F. Islam, and K. N. Dahl, "Carbon Nanotubes Reorganize Actin Structures in Cells and *ex Vivo*," *ACS Nano*, vol. 4, no. 8, pp. 4872–4878, Aug. 2010.
- [163] E. Witasz, A. A. Shvedova, V. E. Kagan, and B. Fadeel, "Single-walled carbon nanotubes impair human macrophage engulfment of apoptotic cell corpses," *Inhal. Toxicol.*, vol. 21, no. sup1, pp. 131–136, Jul. 2009.
- [164] W. Moller, "Ultrafine Particles Cause Cytoskeletal Dysfunctions in Macrophages," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 182, no. 3, pp. 197–207, Aug. 2002.



- [165] H. Moche, "Utilisation du carbure de tungstène-cobalt (WC-Co) comme témoin positif génotoxique nanoparticulaire et étude de la génotoxicité de candidats nanovecteurs de médicaments," Sep. 2014.
- [166] Z. Magdolenova, A. Collins, A. Kumar, A. Dhawan, V. Stone, and M. Dusinska, "Mechanisms of genotoxicity. A review of *in vitro* and *in vivo* studies with engineered nanoparticles," *Nanotoxicology*, vol. 8, no. 3, pp. 233–278, May 2014.
- [167] M. Pelin *et al.*, "Graphene and graphene oxide induce ROS production in human HaCaT skin keratinocytes: the role of xanthine oxidase and NADH dehydrogenase," *Nanoscale*, vol. 10, no. 25, pp. 11820–11830, 2018.
- [168] A. A. Shvedova, A. Pietroiusti, B. Fadeel, and V. E. Kagan, "Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: Focus on oxidative stress," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 261, no. 2, pp. 121–133, Jun. 2012.
- [169] A. Manke, L. Wang, and Y. Rojanasakul, "Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity," *BioMed Res. Int.*, vol. 2013, pp. 1–15, 2013.
- [170] C. S. Sharma *et al.*, "Single-Walled Carbon Nanotubes Induces Oxidative Stress in Rat Lung Epithelial Cells," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 7, no. 7, pp. 2466–2472, Jul. 2007.
- [171] R. K. Srivastava *et al.*, "Multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress and apoptosis in human lung cancer cell line-A549," *Nanotoxicology*, vol. 5, no. 2, pp. 195–207, Jun. 2011.
- [172] K. Pulskamp, S. Diabate, and H. Krug, "Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants," *Toxicol. Lett.*, vol. 168, no. 1, pp. 58–74, Jan. 2007.
- [173] V. E. Kagan *et al.*, "Carbon nanotubes degraded by neutrophil myeloperoxidase induce less pulmonary inflammation," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 5, no. 5, pp. 354–359, May 2010.
- [174] M. Pacurari *et al.*, "Raw Single-Wall Carbon Nanotubes Induce Oxidative Stress and Activate MAPKs, AP-1, NF- $\kappa$ B, and Akt in Normal and Malignant Human Mesothelial Cells," *Environ. Health Perspect.*, vol. 116, no. 9, pp. 1211–1217, Sep. 2008.
- [175] L. Zhou, H. J. Forman, Y. Ge, and J. Lunec, "Multi-walled carbon nanotubes: A cytotoxicity study in relation to functionalization, dose and dispersion," *Toxicol. In Vitro*, vol. 42, no. Supplement C, pp. 292–298, Aug. 2017.
- [176] Z. Tang *et al.*, "Mechanisms of oxidative stress, apoptosis, and autophagy involved in graphene oxide nanomaterial anti-osteosarcoma effect," *Int. J. Nanomedicine*, vol. Volume 13, pp. 2907–2919, May 2018.
- [177] G. Qu *et al.*, "Graphene Oxide Induces Toll-like Receptor 4 (TLR4)-Dependent Necrosis in Macrophages," *ACS Nano*, vol. 7, no. 7, pp. 5732–5745, Jul. 2013.
- [178] A. C. Reissetter *et al.*, "Induction of Inflammasome-dependent Pyroptosis by Carbon Black Nanoparticles," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 24, pp. 21844–21852, Jun. 2011.
- [179] S. Hussain *et al.*, "Inflammasome activation in airway epithelial cells after multi-walled carbon nanotube exposure mediates a profibrotic response in lung fibroblasts," *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 11, no. 1, p. 28, 2014.
- [180] V. Pongrakhananon, S. Luanpitpong, T. A. Stueckle, L. Wang, U. Nimmannit, and Y. Rojanasakul, "Carbon Nanotubes Induce Apoptosis Resistance of Human Lung Epithelial Cells Through FLICE-Inhibitory Protein," *Toxicol. Sci.*, vol. 143, no. 2, pp. 499–511, Feb. 2015.
- [181] J. Dong and Q. Ma, "Advances in mechanisms and signaling pathways of carbon nanotube toxicity," *Nanotoxicology*, vol. 9, no. 5, pp. 658–676, 2015.
- [182] K. Lategan, H. Alghadi, M. Bayati, M. de Cortalezzi, and E. Pool, "Effects of Graphene Oxide Nanoparticles on the Immune System Biomarkers Produced by RAW 264.7 and Human Whole Blood Cell Cultures," *Nanomaterials*, vol. 8, no. 2, p. 125, Feb. 2018.
- [183] A. C. Reissetter *et al.*, "Induction of Inflammasome-dependent Pyroptosis by Carbon Black Nanoparticles," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 24, pp. 21844–21852, Jun. 2011.

- [184] I. Fenoglio *et al.*, "Thickness of Multiwalled Carbon Nanotubes Affects Their Lung Toxicity," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 25, no. 1, pp. 74–82, Jan. 2012.
- [185] S. Sweeney, D. Berhanu, S. K. Misra, A. J. Thorley, E. Valsami-Jones, and T. D. Tetley, "Multi-walled carbon nanotube length as a critical determinant of bioreactivity with primary human pulmonary alveolar cells," *Carbon*, vol. 78, pp. 26–37, Nov. 2014.
- [186] J. Palomäki *et al.*, "A secretomics analysis reveals major differences in the macrophage responses towards different types of carbon nanotubes," *Nanotoxicology*, vol. 9, no. 6, pp. 719–728, Aug. 2015.
- [187] E. M. Rydman *et al.*, "Inhalation of rod-like carbon nanotubes causes unconventional allergic airway inflammation," *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 11, p. 48, Oct. 2014.
- [188] A. C. P. Grecco *et al.*, "Up-regulation of T lymphocyte and antibody production by inflammatory cytokines released by macrophage exposure to multi-walled carbon nanotubes," *Nanotechnology*, vol. 22, no. 26, p. 265103, Jul. 2011.
- [189] S. Chen *et al.*, "No involvement of alveolar macrophages in the initiation of carbon nanoparticle induced acute lung inflammation in mice," *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 13, no. 1, p. 33, Dec. 2015.
- [190] C. Pavan and B. Fubini, "Unveiling the Variability of 'Quartz Hazard' in Light of Recent Toxicological Findings," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 30, no. 1, pp. 469–485, Jan. 2017.
- [191] B. Sun *et al.*, "NADPH Oxidase-Dependent NLRP3 Inflammasome Activation and its Important Role in Lung Fibrosis by Multiwalled Carbon Nanotubes," *Small*, vol. 11, no. 17, pp. 2087–2097, May 2015.
- [192] R. F. Hamilton, Z. Wu, S. Mitra, P. K. Shaw, and A. Holian, "Effect of MWCNT size, carboxylation, and purification on in vitro and in vivo toxicity, inflammation and lung pathology," *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 10, no. 1, p. 57, 2013.
- [193] S. P. Mukherjee, K. Kostarelos, and B. Fadeel, "Cytokine Profiling of Primary Human Macrophages Exposed to Endotoxin-Free Graphene Oxide: Size-Independent NLRP3 Inflammasome Activation," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 7, no. 4, p. 1700815, Feb. 2018.
- [194] M. Matsumoto *et al.*, "No toxicological effects on acute and repeated oral gavage doses of single-wall or multi-wall carbon nanotube in rats," *J. Toxicol. Sci.*, vol. 37, no. 3, pp. 463–474, 2012.
- [195] G. Gerencsér, T. Varjas, K. Szendi, and C. Varga, "In Vivo Induction of Primary DNA Lesions upon Subchronic Oral Exposure to Multi-walled Carbon Nanotubes," *In Vivo*, vol. 30, no. 6, pp. 863–868, Nov. 2016.
- [196] "Myofibroblasts and lung fibrosis induced by carbon nanotube exposure | Particle and Fibre Toxicology | Full Text." [Online]. Available: <https://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12989-016-0172-2>. [Accessed: 11-Jul-2019].
- [197] "Induction of cancer-associated fibroblast-like cells by carbon nanotubes dictates its tumorigenicity | Scientific Reports." [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/srep39558>. [Accessed: 11-Jul-2019].
- [198] "Inflammation in the pleural cavity following injection of multi-walled carbon nanotubes is dependent on their characteristics and the presence of IL-1 genes: Nanotoxicology: Vol 12, No 6." [Online]. Available: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17435390.2018.1465139>. [Accessed: 11-Jul-2019].
- [199] M. M. Cartwright *et al.*, "The pulmonary inflammatory response to multiwalled carbon nanotubes is influenced by gender and glutathione synthesis," *Redox Biol.*, vol. 9, pp. 264–275, Oct. 2016.
- [200] "Fibers | Free Full-Text | The Significance and Insignificance of Carbon Nanotube-Induced Inflammation | HTML." [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/2079-6439/2/1/45/htm>. [Accessed: 10-Jul-2019].
- [201] J. A. Bourdon *et al.*, "Carbon black nanoparticle instillation induces sustained inflammation and genotoxicity in mouse lung and liver," *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 9, no. 1, p. 5, 2012.

- [202] "SAA3P Gene - GeneCards | SAA3P Pseudogene." [Online]. Available: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SAA3P>. [Accessed: 11-Jul-2019].
- [203] D. Anthony *et al.*, "SAA drives proinflammatory heterotypic macrophage differentiation in the lung via CSF-1R-dependent signaling," *FASEB J.*, vol. 28, no. 9, pp. 3867–3877, Sep. 2014.
- [204] R. D. Ye and L. Sun, "Emerging functions of serum amyloid A in inflammation," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 98, no. 6, pp. 923–929, Dec. 2015.
- [205] J. Dong and Q. Ma, "Type 2 Immune Mechanisms in Carbon Nanotube-Induced Lung Fibrosis," *Front. Immunol.*, vol. 9, p. 1120, May 2018.
- [206] A. A. Shvedova *et al.*, "Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice," *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 289, no. 5, pp. L698–L708, Nov. 2005.
- [207] J. Dong and Q. Ma, "Macrophage polarization and activation at the interface of multi-walled carbon nanotube-induced pulmonary inflammation and fibrosis," *Nanotoxicology*, vol. 12, no. 2, pp. 153–168, Feb. 2018.
- [208] K. Otsuka *et al.*, "Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes," *PLOS ONE*, vol. 13, no. 10, p. e0205702, Oct. 2018.
- [209] M. F. Cesta *et al.*, "Bacterial Lipopolysaccharide Enhances PDGF Signaling and Pulmonary Fibrosis in Rats Exposed to Carbon Nanotubes," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 43, no. 2, pp. 142–151, Aug. 2010.
- [210] J. Dong and Q. Ma, "Advances in mechanisms and signaling pathways of carbon nanotube toxicity," *Nanotoxicology*, vol. 9, no. 5, pp. 658–676, Jul. 2015.
- [211] H. Nagai *et al.*, "Diameter and rigidity of multiwalled carbon nanotubes are critical factors in mesothelial injury and carcinogenesis," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no. 49, pp. E1330–E1338, Dec. 2011.
- [212] K. Donaldson, F. A. Murphy, R. Duffin, and C. A. Poland, "Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review and the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma," *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 7, no. 1, p. 5, 2010.
- [213] S. Rittinghausen *et al.*, "The carcinogenic effect of various multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) after intraperitoneal injection in rats," *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 11, no. 1, p. 59, Dec. 2014.
- [214] "Évaluation des risques liés aux nanomatériaux | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail." [Online]. Available: <https://www.anses.fr/fr/content/%C3%A9valuation-des-risques-li%C3%A9s-aux-nanomater%C3%A9riaux>. [Accessed: 11-Jul-2019].
- [215] "theses.fr – Dalel Askri, Etude de la biodistribution et de la toxicité des Nanoparticules de Fer chez le rat et sur une lignée de neuroblastome." [Online]. Available: <http://www.theses.fr/s129137>. [Accessed: 11-Jul-2019].
- [216] "Toxicité des nanoparticules et des nanotubes | Sciences et Démocratie." [Online]. Available: <http://www.sciences-et-democratie.net/dossiers-et-debats/les-nanotechnologies/toxicite-des-nanoparticules-et-des-nanotubes>. [Accessed: 11-Jul-2019].
- [217] "Nanomaterials in REACH and CLP - Environment - European Commission." [Online]. Available: [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/reach-clp/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/reach-clp/index_en.htm). [Accessed: 11-Jul-2019].
- [218] "REACH et les nanomatériaux | REACH INFO." [Online]. Available: <https://reach-info.ineris.fr/focus/reach-et-les-nanomater%C3%A9riaux>. [Accessed: 11-Jul-2019].
- [219] "NIOSH: Occupational Exposure to Carbon Nanotubes and Nanofibers | Nano." [Online]. Available: <https://www.nano.gov/node/1007>. [Accessed: 11-Jul-2019].

- [220] "Carbon Nanotubes Exposure Risk Assessment: From Toxicology to Epidemiologic Studies (Overview of the Current Problem)." [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4596778/>. [Accessed: 11-Jul-2019].
- [221] "NIOSH TIC-2 Publications Search - 20042517 - Current intelligence bulletin 65: occupational exposure to carbon nanotubes and nanofibers." [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/niosh/nioshtic-2/20042517.html>. [Accessed: 11-Jul-2019].
- [222] "Occupational Exposure Limits of lead, dimethylamine, n-butyl-2,3-epoxypropyl ether, and 2-ethyl-1-hexanol and carcinogenicity and occupational sensitizer classification." [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5356935/>. [Accessed: 11-Jul-2019].
- [223] "Long Term and Standard Incubations of WST-1 Reagent Reflect the Same Inhibitory Trend of Cell Viability in Rat Airway Smooth Muscle Cells." [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3534879/>. [Accessed: 11-Jul-2019].
- [224] "Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. - PubMed - NCBI." [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10951200>. [Accessed: 11-Jul-2019].
- [225] F. K.-M. Chan, K. Moriwaki, and M. J. De Rosa, "Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity," *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 979, pp. 65–70, 2013.
- [226] "Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation for proteomics experiments | Nature Protocols." [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/s41596-018-0082-x>. [Accessed: 11-Jul-2019].
- [227] M. Zhang and J. Li, "Carbon nanotube in different shapes," *Mater. Today*, vol. 12, no. 6, pp. 12–18, Jun. 2009.
- [228] Y. Hiraku *et al.*, "Nitritative DNA damage induced by carbon-black nanoparticles in macrophages and lung epithelial cells," *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 818, pp. 7–16, Jun. 2017.
- [229] J. Ma *et al.*, "From the lung to the knee joint: Toxicity evaluation of carbon black nanoparticles on macrophages and chondrocytes," *J. Hazard. Mater.*, vol. 353, pp. 329–339, Jul. 2018.
- [230] S. Chortarea *et al.*, "Profibrotic Activity of Multiwalled Carbon Nanotubes Upon Prolonged Exposures in Different Human Lung Cell Types," *Appl. Vitro Toxicol.*, vol. 5, no. 1, pp. 47–61, Mar. 2019.
- [231] R. Bacchetta, N. Santo, I. Valenti, D. Maggioni, M. Longhi, and P. Tremolada, "Comparative toxicity of three differently shaped carbon nanomaterials on *Daphnia magna*: does a shape effect exist?," *Nanotoxicology*, vol. 12, no. 3, pp. 201–223, Mar. 2018.
- [232] A. M. El-Gazzar *et al.*, "Comparative pulmonary toxicity of a DWCNT and MWCNT-7 in rats," *Arch. Toxicol.*, vol. 93, no. 1, pp. 49–59, Jan. 2019.
- [233] S. S. Poulsen *et al.*, "MWCNTs of different physicochemical properties cause similar inflammatory responses, but differences in transcriptional and histological markers of fibrosis in mouse lungs," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 284, no. 1, pp. 16–32, Apr. 2015.
- [234] "In vitro study of human alveolar macrophages inflammatory mediator transcriptions and releases induced by soot FR 101, Printex 90, titandioxide and... - PubMed - NCBI." [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9737890>. [Accessed: 16-Jun-2019].
- [235] J.-C. Simard, F. Vallieres, R. de Liz, V. Lavastre, and D. Girard, "Silver Nanoparticles Induce Degradation of the Endoplasmic Reticulum Stress Sensor Activating Transcription Factor-6 Leading to Activation of the NLRP-3 Inflammasome," *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 9, pp. 5926–5939, Feb. 2015.
- [236] A. Iracheta-Vellve *et al.*, "Endoplasmic Reticulum Stress-induced Hepatocellular Death Pathways Mediate Liver Injury and Fibrosis via Stimulator of Interferon Genes," *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 52, pp. 26794–26805, Dec. 2016.

- [237] E. Borkham-Kamphorst, E. Van de Leur, U. Haas, and R. Weiskirchen, "Liver parenchymal cells lacking Lipocalin 2 (LCN2) are prone to endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response," *Cell. Signal.*, vol. 55, pp. 90–99, Mar. 2019.
- [238] M. Polimeni *et al.*, "Multi-walled carbon nanotubes directly induce epithelial-mesenchymal transition in human bronchial epithelial cells via the TGF- $\beta$ -mediated Akt/GSK-3 $\beta$ /SNAIL-1 signalling pathway," *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 13, no. 1, p. 27, Dec. 2015.
- [239] S. Chortarea *et al.*, "Profibrotic Activity of Multiwalled Carbon Nanotubes Upon Prolonged Exposures in Different Human Lung Cell Types," *Appl. Vitro Toxicol.*, vol. 5, no. 1, pp. 47–61, Mar. 2019.
- [240] H. Bian *et al.*, "MAPK/p38 regulation of cytoskeleton rearrangement accelerates induction of macrophage activation by TLR4, but not TLR3," *Int. J. Mol. Med.*, vol. 40, no. 5, pp. 1495–1503, Nov. 2017.
- [241] P. T. Parthasarathy, Y. Cho, R. Lockey, and N. Kolliputi, "An Old Molecule with a New Role: Microtubules in Inflammasome Regulation," *Cell Biochem. Biophys.*, vol. 70, no. 1, pp. 697–698, Sep. 2014.
- [242] S. Carta, "Histone deacetylase inhibitors prevent exocytosis of interleukin-1 $\beta$ -containing secretory lysosomes: role of microtubules," *Blood*, vol. 108, no. 5, pp. 1618–1626, May 2006.
- [243] X. Zhu *et al.*, "Microtubules Negatively Regulate Insulin Secretion in Pancreatic  $\beta$  Cells," *Dev. Cell*, vol. 34, no. 6, pp. 656–668, Sep. 2015.
- [244] P. Arenas-Guerrero *et al.*, "Determination of the size distribution of non-spherical nanoparticles by electric birefringence-based methods," *Sci. Rep.*, vol. 8, Jun. 2018.
- [245] T. Liu and Z. Xiao, "Dynamic Light Scattering of Rigid Rods - A Universal Relationship on the Apparent Diffusion Coefficient as Revealed by Numerical Studies and Its Use for Rod Length Determination," *Macromol. Chem. Phys.*, vol. 213, no. 16, pp. 1697–1705, Aug. 2012.
- [246] B. N. Khlebtsov and N. G. Khlebtsov, "On the measurement of gold nanoparticle sizes by the dynamic light scattering method," *Colloid J.*, vol. 73, no. 1, pp. 118–127, Feb. 2011.
- [247] A. Fraczek, E. Menaszek, C. Paluszkiwicz, and M. Blazewicz, "Comparative in vivo biocompatibility study of single- and multi-wall carbon nanotubes," *Acta Biomater.*, vol. 4, no. 6, pp. 1593–1602, Nov. 2008.
- [248] C. Liné, C. Larue, and E. Flahaut, "Carbon nanotubes: Impacts and behaviour in the terrestrial ecosystem - A review," *Carbon*, vol. 123, pp. 767–785, Jul. 2017.
- [249] R. Liu, T. Gong, K. Zhang, and C. Lee, "Graphene oxide papers with high water adsorption capacity for air dehumidification," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 9761, Aug. 2017.
- [250] A. Liang, X. Jiang, X. Hong, Y. Jiang, Z. Shao, and D. Zhu, "Recent Developments Concerning the Dispersion Methods and Mechanisms of Graphene," *Coatings*, vol. 8, no. 1, p. 33, Jan. 2018.
- [251] "Different cellular response mechanisms contribute to the length-dependent cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes." [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3461426/>. [Accessed: 10-Jul-2019].
- [252] M. S. P. Boyles *et al.*, "Multi-walled carbon nanotube induced frustrated phagocytosis, cytotoxicity and pro-inflammatory conditions in macrophages are length dependent and greater than that of asbestos," *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA*, vol. 29, no. 7, pp. 1513–1528, Oct. 2015.
- [253] S. Lanone, P. Andujar, A. Kermanizadeh, and J. Boczkowski, "Determinants of carbon nanotube toxicity," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, no. 15, pp. 2063–2069, Dec. 2013.
- [254] M. Landry *et al.*, "Early signs of multi-walled carbon nanotubes degradation in macrophages, via an intracellular pH-dependent biological mechanism; importance of length and functionalization," *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 13, Nov. 2016.
- [255] V. E. Kagan *et al.*, "Lung Macrophages 'Digest' Carbon Nanotubes Using a Superoxide/Peroxynitrite Oxidative Pathway," *ACS Nano*, vol. 8, no. 6, pp. 5610–5621, Jun. 2014.

- [256] "Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity in vitro - ScienceDirect." [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427405002523?via%3Dihub>. [Accessed: 10-Jul-2019].
- [257] "In vitro toxicity of acid-functionalized single-walled carbon nanotubes: effects on murine macrophages and gene expression profiling. - PubMed - NCBI." [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21486190>. [Accessed: 10-Jul-2019].
- [258] S. Vardharajula *et al.*, "Functionalized carbon nanotubes: biomedical applications," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, pp. 5361–5374, 2012.
- [259] "Pulmonary effects induced by ultrafine PTFE particles. - PubMed - NCBI." [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11042093>. [Accessed: 10-Jul-2019].
- [260] "[Full text] Graphene oxide and reduced graphene oxide induced neural pheochromocyt | IJN." [Online]. Available: <https://www.dovepress.com/graphene-oxide-and-reduced-graphene-oxide-induced-neural-pheochromocyt-peer-reviewed-fulltext-article-IJN#ref3>. [Accessed: 10-Jul-2019].
- [261] "Reduction of graphene oxide alters its cyto-compatibility towards primary and immortalized macrophages - Nanoscale (RSC Publishing)." [Online]. Available: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/nr/c8nr02798f#!divAbstract>. [Accessed: 10-Jul-2019].
- [262] "Macrophage sensing of single-walled carbon nanotubes via Toll-like receptors | Scientific Reports." [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-19521-9>. [Accessed: 10-Jul-2019].
- [263] J. Meng, X. Li, C. Wang, H. Guo, J. Liu, and H. Xu, "Carbon nanotubes activate macrophages into a M1/M2 mixed status: recruiting naïve macrophages and supporting angiogenesis," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 7, no. 5, pp. 3180–3188, Feb. 2015.
- [264] "Disruption of protein homeostasis: a potential biomarker of exposure to three metal oxide nanoparticles - ScienceDirect." [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584918304556>. [Accessed: 10-Jul-2019].
- [265] R. Safar *et al.*, "Cytotoxicity and global transcriptional responses induced by zinc oxide nanoparticles NM 110 in PMA-differentiated THP-1 cells," *Toxicol. Lett.*, Nov. 2018.
- [266] C. Xu, Q. Liu, H. Liu, C. Zhang, W. Shao, and A. Gu, "Toxicological assessment of multi-walled carbon nanotubes in vitro: potential mitochondria effects on male reproductive cells," *Oncotarget*, vol. 7, no. 26, pp. 39270–39278, May 2016.
- [267] "Physical consequences of the mitochondrial targeting of single-walled carbon nanotubes probed computationally - ScienceDirect." [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386947715001046>. [Accessed: 10-Jul-2019].
- [268] "Toxicity of nano zinc oxide to mitochondria - Toxicology Research (RSC Publishing)." [Online]. Available: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/TX/C2TX20016C#!divAbstract>. [Accessed: 10-Jul-2019].
- [269] "AKAP13 Gene - GeneCards | AKP13 Protein | AKP13 Antibody." [Online]. Available: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=Akap13>. [Accessed: 10-Jul-2019].
- [270] "C12orf43 Gene - GeneCards | CSTOS Protein | CSTOS Antibody." [Online]. Available: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=C12orf43>. [Accessed: 10-Jul-2019].
- [271] "SNRNP27 Gene - GeneCards | SNR27 Protein | SNR27 Antibody." [Online]. Available: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=Snrnp27>. [Accessed: 10-Jul-2019].
- [272] "STAMBPL1 Gene - GeneCards | STALP Protein | STALP Antibody." [Online]. Available: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=Stambpl1>. [Accessed: 10-Jul-2019].
- [273] "ZC3H12A Gene - GeneCards | ZC12A Protein | ZC12A Antibody." [Online]. Available: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=Zc3h12a>. [Accessed: 10-Jul-2019].

[274] C. Ge *et al.*, "The contributions of metal impurities and tube structure to the toxicity of carbon nanotube materials," *NPG Asia Mater.*, vol. 4, no. 12, p. e32, Dec. 2012.

# Annexes

## Annexe 1. Tableau des NMC étudiés, conditions de dispersion, mesures DLS et ¼ IC50 déterminé par le test WST-1.

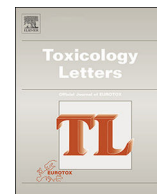
Name	NM		Length	Chartacteristics		Probe (nm)	Dispersion		DLS	Test Wst1 IC50/4 24h cm2/cm2
	ENM type	Nanomaterials		Diameter	Specific surface		Amplitude	Time (min)		
NM400	MWCNT	MWCNT	1500	10	254	11	10	10	—	low toxicity *
NM401	MWCNT	MWCNT	4000	67	18	11	10	10	775	low toxicity
NM10/411-34	SWCNT	SWCNT	1000	2	861	11	10	15	—	low toxicity
NM402	MWCNT	MWCNT	1400	11	226	11	10	10	—	low toxicity
NM403	MWCNT	MWCNT	400	12	135	11	10	15	217	0,8
NRCWE-006	MWCNT	Mitsui-7; MWCNT; lot #061220-24	5700	74	26	11	30	15	557	low toxicity
NRCWE-026	MWCNT	another batch of NM400	1500	10	254	11	10	15	—	low toxicity
NRCWE-040	MWCNT	Pristine	520	20	150	11	10	15	207	26
NRCWE-041	MWCNT	Functionalized -OH	1005	26	152	11	30	15	—	18.4
NRCWE-042	MWCNT	Functionalized -COOH	723	21	141	5	30	15	210	6.8
NRCWE-043	MWCNT	Pristine	771	27	82	11	30	15	254	low toxicity
NRCWE-044	MWCNT	Functionalized -OH	1330	33	74	11	30	15	—	8.3
NRCWE-045	MWCNT	Functionalized -COOH	1553	28	119	11	10	6	279	10
NRCWE-046	MWCNT	Pristine	717	17	223	11	10	6	—	1.4
NRCWE-047	MWCNT	Functionalized -OH	532	13	216	11	10	20	301	19
NRCWE-048	MWCNT	Functionalized -COOH	1604	15	185	11	10	20	264	6.2
NRCWE-049	MWCNT	Functionalized -NH2	731	14	199	5	30	20	282	1.2
NRCWE-051	SWCNT	Pristine >95 %, ultrapure	1-2 nm	5-20 µm	442,6	5	10	20	1959	30
NRCWE-052	SWCNT	Pristine >90%, pure	1-2 nm	5-30 µm	405,7	11	10	20	—	50
NRCWE-053	SWCNT	Functionalized -OH, 3.96wt%, pure:>90%	1-2 nm	5-30 µm	367,8	11	10	20	—	32
NRCWE-054	SWCNT	Functionalized -COOH, 2.73wt%, pure:>90%	1-2 nm	5-30 µm	370,8	11	30	10	—	low toxicity
NRCWE-055	SWCNT	Pristine >90%, pure; short	1-2 nm	1-3 µm	453,1	11	10	15	601	11
NRCWE-056	SWCNT	Functionalized -OH, 3.96wt%, pure:>90%, short	1-2 nm	1-3 µm	373,4	11	30	15	629	6.7
NRCWE-057	SWCNT	Functionalized -COOH, 2.73wt%, pure:>90%, short	1-2 nm	1-3 µm	281,6	11	30	15	—	7,7
NRCWE-058	Graphene	Graphene Oxide (4mg/ml, water dispersion 250 ml) GO-4-250	—	2-3 µm	—	5	30	6	401	2.5
NRCWE-059	Graphene	reduced Graphene Oxide GO-4-250	—	1-2 µm	411	5	30	15	—	5
NRCWE-060	Graphene	reduced Graphene Oxide GO-4-250	—	1-2 µm	335	11	30	25	465	5
Printex90	C	almost pure carbon, 14 nm diameter	14	—	295	11	10	6	164	low toxicity
NM10/411-20	SWCNT	SWCNT	1000	2	861	11	10	10	—	low toxicity
Printex90 orion	C	—	—	—	—	11	10	15	165	64 µg/ml * >200µg/ml

## Annexe 2. Core list des NMC étudiés en transcriptomique.

Name	NM		Length	Chartacteristics	
	ENM type	Nanomaterials		Diameter	Specific surface
NM401	MWCNT	MWCNT	4000	67	18
NM403	MWCNT	MWCNT	400	12	135
NRCWE-006	MWCNT	Mitsui-7; MWCNT; lot # 061220-24	5700	74	26
NRCWE-042	MWCNT	Functionalized -COOH	723	21	141
NRCWE-049	MWCNT	Functionalized -NH2	731	14	199
NRCWE-051	SWCNT	Pristine >95 %, ultrapure	1-2 nm	5-30 µm	442,6
NRCWE-055	SWCNT	Pristine >90%, pure; short	1-2 nm	1-3 µm	453,1
Printex90	C	almost pure carbon, 14 nm diameter	14	—	295



**Annexe 3. Cytotoxicity and global transcriptional responses induced by zinc oxide nanoparticles NM 110 in PMA-differentiated THP-1 cells. Ramia Safar, Zahra Doumandji, Timeh Saidou, Luc Ferrari, Sara Nahle, Bertrand Rihn, Olivier Joubert.**



## Cytotoxicity and global transcriptional responses induced by zinc oxide nanoparticles NM 110 in PMA-differentiated THP-1 cells

Ramia Safar<sup>a,1</sup>, Zahra Doumandji<sup>b,1</sup>, Timeh Saidou<sup>b</sup>, Luc Ferrari<sup>b</sup>, Sara Nahle<sup>b</sup>, Bertrand H. Rihn<sup>b</sup>, Olivier Joubert<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> INSERM UMRS 954 NGERE, Faculté de Médecine, Université de Lorraine, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

<sup>b</sup> Institut Jean Lamour, UMR CNRS 7198, Université de Lorraine, Nancy, France



### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Zinc oxide nanoparticle  
NM110  
PMA-differentiated THP-1 cells  
Transcriptome  
Cytotoxicity  
Metallothionein

### ABSTRACT

Despite a wide production and use of zinc oxide nanoparticles (ZnONP), their toxicological study is only of limited number and their impact at a molecular level is seldom addressed. Thus, we have used, as a model, zinc oxide nanoparticle NM110 (ZnO110NP) exposure to PMA-differentiated THP-1 macrophages. The cell viability was studied at the cellular level using WST-1, LDH and Alamar Blue® assays, as well as at the molecular level by transcriptomic analysis. Exposure of cells to ZnO110NP for 24 h decreased their viability in a dose-dependent manner with mean inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) of 8.1 µg/mL. Transcriptomic study of cells exposed to two concentrations of ZnO110NP: IC<sub>50</sub> and a quarter of it (IC<sub>50</sub>/4) for 4 h showed that the expressions of genes involved in metal metabolism are perturbed. In addition, expression of genes acting in transcription regulation and DNA binding, as well as clusters of genes related to protein synthesis and structure were altered. It has to be noted that the expressions of metallothioneins genes (*MT1*, *MT2*) and genes of heat-shock proteins genes (*HSP*) were strongly upregulated for both conditions. These genes might be used as an early marker of exposure to ZnONP. On the contrary, at IC<sub>50</sub> exposure, modifications of gene expression involved in inflammation, apoptosis and mitochondrial suffering were noted indicating a less specific cellular response. Overall, this study brings a resource of transcriptional data for ZnONP toxicity for further mechanistic studies.

### 1. Introduction

Nanoparticles (NP) of metal oxides are attracting more and more interest and are produced in large quantities. They are widely used in both industrial process and biomedical research (Girigoswami, 2018). Nevertheless, data on their potential toxicity on living organisms remain insufficient, particularly at the molecular level. Zinc oxide nanoparticles (ZnONP) have multiple industrial uses and commercial applications, and it is one of the main NP present in the market due to its many properties. According to the Project on Emerging Nanotechnologies Inventory of nanotechnology-based Consumer Products, ZnONP are present in at least 24 commercialized products, primarily sunscreen formulations, due to its UV-absorbing properties (Vance et al., 2015), with more than 33,000 tons of sunscreens produced containing up to 25% of ZnONP (Joo and Zhao, 2017). There are many other pharmaceutical and parapharmaceutical applications of ZnONP such as ointments, skin creams, toothpaste, deodorants and formulation of cosmetics. ZnONP have also found industrial applications in rubber,

ceramics, optical glasses, paints and plastics (Mishra et al., 2017).

As a result of this numerous applications, toxicity studies on ZnONP have already been investigated by different research groups. Majority of these studies are limited to qualitative data, demonstrating that ZnONP induce an increase in the cell death rate (Farcal et al., 2015), generally associated with inflammation (Sahu et al., 2014), DNA damage, and induction of oxidative stress (Senapati et al., 2015). However, the molecular mechanisms involved in these effects remains undefined. In addition, it has been shown that the importance of the toxic effects of ZnONP is inversely related to size, positive charge and solubility of nanoparticles (Prach et al., 2013; Buerki-Thurnherr et al., 2013). On the other hand, they vary with the cell line used and macrophages are said to be more sensible when contact with ZnONP than epithelial cells (Farcal et al., 2015), as well as cancer cells when compared to normal cells (Premanathan 2011 (op cit)).

The present study was performed with the objective to study the toxicity of NP on the respiratory system using *in vitro* models. Given that a human pulmonary macrophage cell line does not exist, the model

\* Corresponding author at: UMR CNRS 7198, Institut Jean Lamour, 2 Allée André Guinier, 54001 Nancy, France.

E-mail address: [olivier.joubert@univ-lorraine.fr](mailto:olivier.joubert@univ-lorraine.fr) (O. Joubert).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

used for this work was the monocytes THP-1 cell line which are differentiated into macrophages by treatment with PMA showing enhanced adherence and phagocytosis. In addition, the major role of macrophage in the innate defense of the body, especially their strong phagocytic capacity, and their presence in many tissues and organs make it a model of choice for many *in vitro* studies for toxicological impacts of NP (Jones and Grainger, 2009).

Then, this manuscript focuses on the toxicity of uncoated zinc oxide nanoparticles NM110 (ZnO110NP) in PMA-differentiated THP-1 macrophages. ZnO110NP is one of representative manufactured nanomaterials in the priority list (NM-Series) which has been established to be well characterized and tested by the European Commission's Joint Research Centre (JRC) in order to enable innovation and development of safe materials and products. Cell viability was assessed using usual tests of toxicology while the molecular response of these cells was established by transcriptomic analysis.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

DMEM medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium- high glucose, D1145), fetal bovine serum (F7524), L-glutamine [CAS No. 56-85-9], Penicillin [113-98-4], streptomycin [128-46-1], amphotericin B [1397-89-3], phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) [1656-9-8], Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) [16561-29-8], trypan blue solution [72-57-1], Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA) [6381-92-6], Bovine Serum Albumin (BSA) [9048-46-8], Diethyl pyrocarbonate (DEPC) [150-38-9] were purchased from Sigma-Aldrich® (Saint Quentin Fallavier, France). APC anti-human CD11c and IgG1-APC isotype control were purchased from (BD biosciences, Le Pont de Claix, France). 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate (WST-1) cell proliferation reagent [150849-52-8] and cytotoxicity detection Kit PLUS LDH, were from Roche® (Meylan, France). AlamarBlue® Cell Viability Reagent (DAL1025) was from Invitrogen (Villebon sur Yvette, France). RNA-Solv Reagent® (R6830) from Omega Bio-tek® (Norcross, Georgia). Éthanol 100% [75-17-5], chloroforme [67-66-3], isopropanol [67-68-0] from Carlo Erba Reagents® (Val de Rueil, France).

### 2.2. Preparation and characterization of nanoparticle suspension

ZnO110NP were obtained from the Joint Research Center (NM 110, JRC). They are suspended in ultrapure water (18 MΩ) at a concentration of 2.56 mg/mL (Phuyal et al., 2017), sonicated using a 3-mm probe (Vibracell 75022, Bioblock, Illkirch, France) at 30% magnitude for 6 min under continuous cooling with ice. Immediately after sonication, ZnO110NP suspension was physico-chemically characterized and working dilutions in the culture medium were prepared.

The hydrodynamic diameter and size distribution of ZnO110NP suspension, expressed as polydispersity index (PDI), were measured using dynamic light scattering (DLS, Zetasizer™ 3000E, Malvern Instruments Worcestershire, UK). Zeta potential was calculated using the Smoluchowski's equation (Sze et al., 2003). All measurements were performed in triplicate at 25 °C.

### 2.3. Cell culture

THP-1 human monocytic cell line was obtained from American Type Culture Collection (ATCC, TIB-202™, Manassas, VA, USA). Cells were cultured in DMEM medium supplemented with 15% of heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U/mL of penicillin, 100 µg/mL of streptomycin, 0.25 µg/mL of amphotericin and 2 mM of L-Glutamine in incubator at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. They were split every 2–3 days to prevent the cell density from exceeding one million per mL. For each experiment, cells were differentiated into macrophages by exposure to

10 ng/mL (16 nM) of PMA in a plate appropriate to the test for 24 h. The density of  $5 \times 10^4$  cells per mL was respected for all tests.

### 2.4. Cell phenotype study

After differentiation, cell phenotype was verified by flow cytometry. THP-1 cells were treated with and without PMA in 6 wells UpCell plate (Thermo-Fisher, Illkirch, France). After 24 h, cells were harvested using Versene solution (PBS and EDTA 0.1%). After 5 min of centrifugation at 400 x g, cell pellet was resuspended in PBS-BSA.  $4 \times 10^5$  cells were incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled monoclonal antibodies against CD11c for 30 min, then washed with PBS-BSA, and were analyzed by flow cytometry (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Non-differentiated unstained cells were used as control.

### 2.5. Cytotoxicity study

After treatment with PMA for 24 h, the medium was removed by aspiration and cells were incubated with 0 (control), two times dilution from 20 to 0.6 µg/mL of ZnO110NP in serum free medium for 24 h. The cell viability was checked using WST-1, LDH and AlamarBlue® assays. Unexposed cells were used as control and considered as having 100% of cell viability. Six wells and four test replicates were used per culture condition. The inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) was calculated with the Reed and Muench method (Reed and Muench, 1938).

#### 2.5.1. WST-1 assay

WST-1 (water soluble tetrazolium) assay was performed as previously described (Ronzani et al., 2014). Briefly, after 24 h of exposure to ZnO110NP, cells were incubated with 5% WST-1 reagent for 2 h at 37 °C. Then, the absorbance was read at 450 nm with 690 nm as reference (iMark™ Microplate Absorbance Reader, Bio-Rad).

#### 2.5.2. LDH assay

Lactate dehydrogenase (LDH) assay was performed according to manufacturer's instructions. Briefly, after 24 h of exposure to ZnO110NP, cells were incubated with 100 µL of (LDH reaction buffer + substrate) for 30 min at 25 °C. Then, 50 µL of stop solution was added and the absorbance was read at 490 nm (iMark™ Microplate Absorbance Reader, Bio-Rad). For the positive control, cells were exposed to lysis buffer for 15 min before the test.

#### 2.5.3. AlamarBlue® assay

AlamarBlue® assay was performed according to manufacturer's instructions. Briefly, cells were incubated with 10% of reagent for 3 h at 37 °C. Fluorescence was read at 590 nm after excitation at 560 nm using spectrofluorimetry (JASCO, FMP-825, Bouguenais, France)

## 2.6. Transcriptomic study

### 2.6.1. RNA extraction

$1 \times 10^6$  THP-1 cells were exposed, after differentiation, to ZnO110NP at concentrations of the IC<sub>50</sub> or one fourth of IC<sub>50</sub> (IC<sub>50</sub>/4) for 4 h using unexposed cells as control. As previously described (Eidi et al., 2012; Safar et al., 2015), total RNA was, then, extracted using RNA-Solv Reagent® according to manufacturer's protocols. The quality of the extracted RNA was assessed by spectrophotometry (BioSpec-nano, Shimadzu) and capillary electrophoresis using RNA 6000 Nano® (2100 Bioanalyzer™, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). All RNA samples showed a ratio  $A_{260nm}/A_{280nm} > 1.8$  with RNA integrity number (RIN) > 8.

### 2.6.2. Microarray hybridation

cDNA and Cy3-dye-labeled cRNA synthesis were carried out with 100 ng of total RNA according to the manufacturer protocol (One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis, version 6.6). Then, 600 ng

of labelled cRNA were hybridized using Microarray slides (SurePrint G3 Human GE v3 8 x 60 K, Agilent Technologies) at 65 °C during 17 h. After washing, the arrays were scanned by Agilent DNA microarray scanner (Agilent). Acquisition of images and quantification of fluorescence signal as well as primary data analysis were performed using the Agilent Feature Extraction Software version 11.0.1.1.

### 2.6.3. Bioinformatics analyses

Data were first normalized with Lowess' method using GeneSpring (version 13.0, Agilent Technologies Pty Ltd). Then, a principal component analysis (PCA), was performed using GeneSpring as a quality control step where the outlier's samples were removed. Student's *t*-test followed by Benjamini-Hochberg correction and filtering criteria were then applied to identify genes whose expression level was significantly modified. Genes showing expression changes of at least 1.5-fold change (FC) in either direction as compared to control with  $p \leq 0.05$  were considered significantly differentially expressed and were used in the following analysis.

The selected genes were analyzed using the Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery version 6.8 (DAVID; <http://david.abcc.ncifcrf.gov>). Indeed, genes were grouped among clusters according to different criteria such as Gene Ontology (GO) terms (GO BP: biological process, GO CC: cellular component, GO MF: molecular function) and pathways (KEGG and BIOCARTA). For the biological interpretation, we have considered GO biological process (GO BP) and pathways with  $p$ -value  $\leq 0.05$  within the cluster with Enrichment Score above to 1.3 (Huang da et al., 2009). All raw data of the microarrays are available on NCBI Gene Expression Omnibus database (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), using the GSE599435 accession number.

### 2.7. Statistical analysis

Cell viability data are presented as means  $\pm$  standard error of the mean (SE) of four biological replicates. Statistical differences were determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test using Prism software™.

## 3. Results

### 3.1. Nanoparticle characterization

The mean hydrodynamic diameter of ZnO110NP was  $261.5 \pm 4$  nm with a polydispersity index of  $0.170 \pm 0.017$  and the zeta potential was  $+21.6 \pm 1.8$  mV (Fig. 1). TEM images showed that each unit on NP have at least one dimension less than 100 nm (see Figure S2 in supplementary data). Size of particles was checked by DLS immediately and after 24 h in the medium of exposure, showing no aggregation nor changes in the size of particles (see Table S7 in supplementary data).

### 3.2. Cell phenotype study

The exposure to PMA increase the CD11c<sup>+</sup> cells number from 62.9% to 93.9% (Fig. 2) suggesting that, in our macrophage culture conditions, notable part of the cells was already at least partially differentiated. PMA pretreatment allows uniformity of the cell phenotype before the NP exposure.

### 3.3. Cytotoxicity study

Whatever the assays (Fig. 3), exposure of cells to ZnO110NP for 24 h decreased their viability in a dose-dependent manner. WST-1 (Fig. 3A) and AlamarBlue® (Fig. 3B) assays gave similar results with a viability of 9.6% and 7.5%, respectively at the higher concentration of ZnO110NP (20 µg/mL). In contrast, for LDH assay (Fig. 3C), the decrease of

viability with NP concentration was slow and a viability of 42% was solely reached at 20 µg/mL. However, there was no significant difference in IC<sub>50</sub> (Fig. 3) for the three tests and the mean of 8.1 µg/mL (which correspond to 2.1 µg/cm<sup>2</sup>), was considered and retain for the transcriptomic assay.

### 3.4. Transcriptomic study

Cells were exposed for 4 h to ZnO110NP at concentrations of 2.0 and 8.1 µg/mL: namely, IC<sub>50</sub>/4 and IC<sub>50</sub> corresponding to 0.5 and 2.1 µg/cm<sup>2</sup>, respectively. PCA analysis showed a clear segregation of results for the three groups corresponding to the three conditions (control, cells exposed to IC<sub>50</sub>/4, or to IC<sub>50</sub>) (Figure S1 in supplementary informations). As compared to control, 360 significantly differentially expressed genes were identified following exposure to 2.0 µg/mL of ZnO110NP, a non-cytotoxic concentration. Among them, 33 were up-regulated and 327 were down-regulated. Not surprisingly, the exposure to 8.1 µg/mL of ZnO110NP induced the modification of a far greater number of genes, 3202 genes were differentially expressed with 872 and 2330 up and down-regulated respectively (Table 1). All these genes are listed in the supplementary information Table S1, S2 for 2.0 µg/mL concentration and S3, S4 for 8.1 µg/mL concentration.

Functional Gene Ontology (GO) analysis revealed similar clusters of genes in both exposed cell populations. In fact, cluster containing genes involved in or related to ZnO metabolism was found for both conditions with three identical GO BP, namely “cellular response to zinc ion”, “cellular response to cadmium ion” and “negative regulation of growth” and one KEGG pathway “Mineral absorption”. Other clusters of genes with modified responses were also common to both conditions: clusters related to virus, perturbation of gene transcription regulation and to protein synthesis and structure (Fig. 4). The lower dose (2.0 µg/mL) of ZnO110NP induced modification gene expression belonging to the clusters related to transduction mechanism, i.e “lipid phosphorylation” cluster. On the contrary, at 8.1 µg/mL, modifications of expression of genes involved in inflammation, apoptosis and mitochondrial suffering were noted indicating a less specific cellular response. The analyzed transcriptomic results are summarized and illustrated in Fig. 4. Biological process (GOTERM\_BP) and pathways (KEGG, BIOCARTA) of each cluster were presented in supplementary information table S5 for 2.0 µg/mL concentration and table S6 for 8.1 µg/mL concentration.

Moreover, there were 27 genes whose expression was increased after exposition of cells to both concentrations (Fig. 5A). The FC values for majority of these genes vary in dose-dependent manner (Table 2). The STRING 10.5 (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes; <http://string-db.org/>) database (Szklarczyk et al., 2015) analysis shows that they belong to two families of genes: metallothioneins and heat shock proteins (HSP) (Fig. 5B).

## 4. Discussion

The present study was performed with the objective of studying the toxicity of ZnO110NP on the respiratory system using an *in vitro* macrophage model, the PMA-differentiated THP-1 monocytic cell line monocytes. The use of PMA allowed us to uniformize the cell phenotype before NP exposure.

When exposed to ZnO110NP, the viability of THP-1 cells decreased in a dose-dependent manner. Calculated IC<sub>50</sub> was assessed to 8.1 µg/mL using the three tests. In the same way, Farcial and collaborators (2015) studied ZnO110NP toxicity on nine different cellular types which includes primary human macrophages (HMDM), murine peritoneal macrophage-like cells (RAW264.7) and murine alveolar macrophage-like cells (MH-S). ZnO110NP was highly toxic to all the cellular lines tested. However, the IC<sub>50</sub> value was  $> 100$  µg/mL for HMDM, 18.40 µg/mL for RAW264.7 and 19.68 µg/mL for MH-S cells using different tests. In our study, PMA-differentiated THP-1 macrophages were more sensitive to ZnO110NP as IC<sub>50</sub> was found to be 8.1 µg/mL.

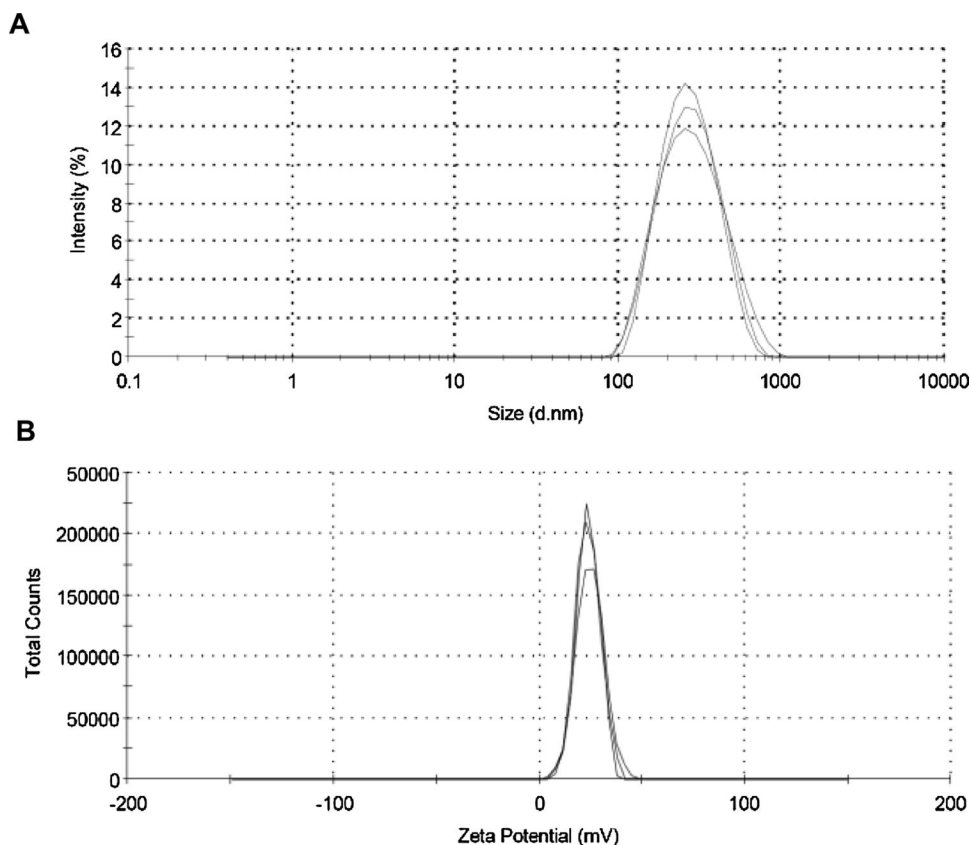


Fig. 1. Zinc oxide nanoparticles NM110 (ZnO110NP) characterization. (A): size and (B): zeta potential as measured by DLS.

This difference between  $IC_{50}$  values is probably due to the fact that Farcail et al resuspended the NP in water with ethanol and BSA versus water alone in our study. Although ZnO110NP have the same size and charge in both studies, a plasma protein corona formation around nanoparticles could probably impair their bioactivity and make them less toxic (Hussien et al., 2013; Rihn and Joubert, 2015; Hongying et al., 2018) by limiting their uptake by cells. In addition, in our study, cell exposition to ZnO110NP was performed in serum free medium which would allow the nanoparticles to freely exert their cytotoxicity. Finally, THP-1 is a cancerous cell line, and according to a previous study, ZnONP exhibited much higher cytotoxic effects on malignant cells than on normal cells (Premanathan et al., 2011). Furthermore, Liang et al. (2018) studied the cytotoxicity of ZnO110NP on THP-1 macrophages, their observations are generally in agreement with our results. Other forms of ZnONP exists and are also considered as toxic,

this toxicity may differ depending on their physicochemical properties as well as the cellular model being used (Yin et al., 2015; Hanley et al., 2009; 2008).

Several studies have proposed different mechanisms to explain the toxicity of ZnONP based on oxidative stress and inflammatory response induction (Roy et al., 2014; De Berardis et al., 2010; Moos et al., 2011). Thus, we decided to study the global transcriptional responses following 4 h exposure to low ( $IC_{50}/4 = 2.0 \mu\text{g/mL}$  or  $0.5 \mu\text{g/cm}^2$ ) or high ( $IC_{50} = 8.1 \mu\text{g/mL}$  or  $2.1 \mu\text{g/cm}^2$ ) concentrations in order to identify early adverse effects of ZnO110NP. The zinc concentration was measured in the cells after  $IC_{50}/4$  exposure by ICP-AES (see Table S8). Indeed, a non-cytotoxic low concentration of ZnO110NP allows us to study the adaptive response, while the cytotoxic high concentration gives a hint of the causes of toxicity and cellular death as shown in Fig. 4. After exposure to the high concentration, the number of genes

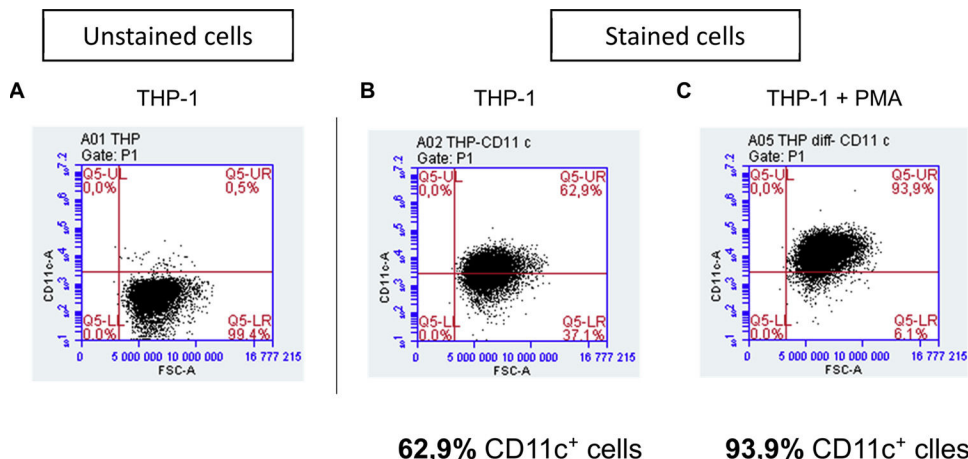
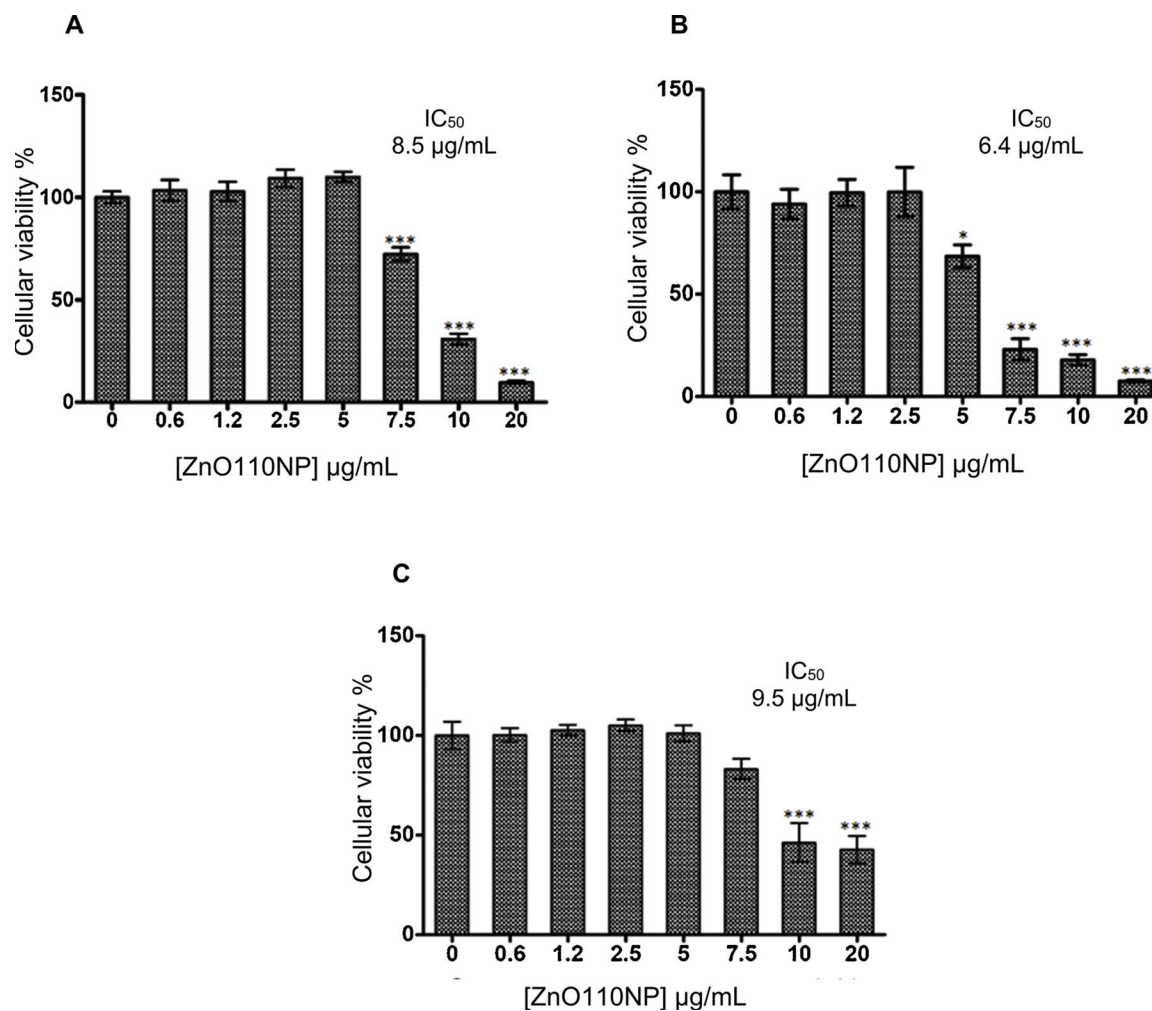


Fig. 2. Cell phenotype study of THP-1 cells differentiated into macrophages by incubation for 24 h with (10 ng/mL = 16 nM) of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Cell differentiation was confirmed by flow cytometry using CD11c antibody. (A): Control, non-differentiated unstained cells (B): Cells not treated with PMA. (C): PMA treated cells.



**Fig. 3.** Cytotoxic study of PMA treated THP-1 cells exposed to ZnO110NP as assessed by (A) WST-1 assay, (B) LDH assay, (C) AlamarBlue<sup>®</sup> assay. Un-exposed cells are considered as negative control, 100% of cell viability. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E of four biological replicates. \*\*\*  $p < 0.001$  et \*  $p < 0.05$ .

**Table 1**

Numbers of PMA-differentiated THP-1 genes having at least 1.5 fold change up or down regulated ( $p \leq 0.05$ ) after exposure to both high and low concentrations of ZnO110NP, namely,  $8.1 \mu\text{g/mL} = 2.1 \mu\text{g/cm}^2$  ( $\text{IC}_{50}$ ) and  $2.0 \mu\text{g/mL} = 0.5 \mu\text{g/cm}^2$  ( $\text{IC}_{50}/4$ ). Data from three independent experiments was normalized using GeneSpring and submitted to a *t*.test student following Benjamini-Hochberg correction.

	$\text{IC}_{50}/4$	$\text{IC}_{50}$
All genes	360	3202
Up-regulated genes	33	872
Down-regulated genes	327	2330

whose expression significantly changed were much higher than the one observed for the lower one (nearly 10 times). However, in both conditions, we observed clusters of genes associated with “cellular response to zinc and cadmium ions” and “mineral absorption pathway” as also described by Moos et al (2011) using four human cell lines: CaCo-2, RKO, HaCaT, SK Mel-28 following a 4 h-exposure period with 1 and  $5 \mu\text{g/cm}^2$  of ZnONP. This response was observed regardless of cellular model indicating that these gene clusters could be considered as a specific response to ZnO. Among these genes, we noticed that a Zn efflux transporter gene (*SLC30A1*) and metallothioneins genes (*MT1*, *MT2*) were strongly activated. So, this response of cells is early and is a sensitive exposure biomarker of ZnONP that has been also observed by Tuomela et al (2013) with three immune cell lines: human monocyte-

derived macrophages (HMDM), monocyte-derived dendritic cells (MDDC), and Jurkat T cell leukemia-derived cell line. In addition, Moos et al demonstrated that this family of genes was also up-regulated following their exposure to soluble  $\text{Zn}^{2+}$  ( $\text{ZnCl}_2$ ). This suggested that this response is related to a liberation of  $\text{Zn}^{2+}$  by degradation of ZnONP. This might occur in the intracellular compartment, an acidic environment created by the lysosomes (Gwak et al., 2015). These results, corresponding to intracellular mechanism of defense against to  $\text{Zn}^{2+}$  are in favor of the hypothesis that states that ZnONP dissolution occurs inside the endosomes (Senapati et al., 2015) and less likely in the extracellular compartment (Buerki-Thurnherr et al., 2013). This intracellular hypothesis, is reinforced by the non-specific response, namely, over expression of heat shock proteins (*HSPA6*, *HSPA1A*, and *HSPA1B*) genes at 6912, 1586, 461 times respectively, which was observed after exposure to both Zn110ONP concentrations representing a well-known stress response to metal toxicity (Bauman et al., 1993).

Beside the induction of metal responsive genes, the most characteristic clusters influenced by high and low concentrations of ZnO110NP were related to regulation of gene transcription and DNA binding. This may be not surprising as  $\text{Zn}^{2+}$  ion is a cofactor in the structure of many zinc finger motif proteins that are transcription factors and of DNA binding proteins. This effect was limited for the lower concentration, but more visible for higher one such as clusters of “DNA damage recognition” and “RNA splicing”. However, for this latter, it is possible that these proteins are subject to disruption by a high concentration of  $\text{Zn}^{2+}$  (Hartwig, 2001).

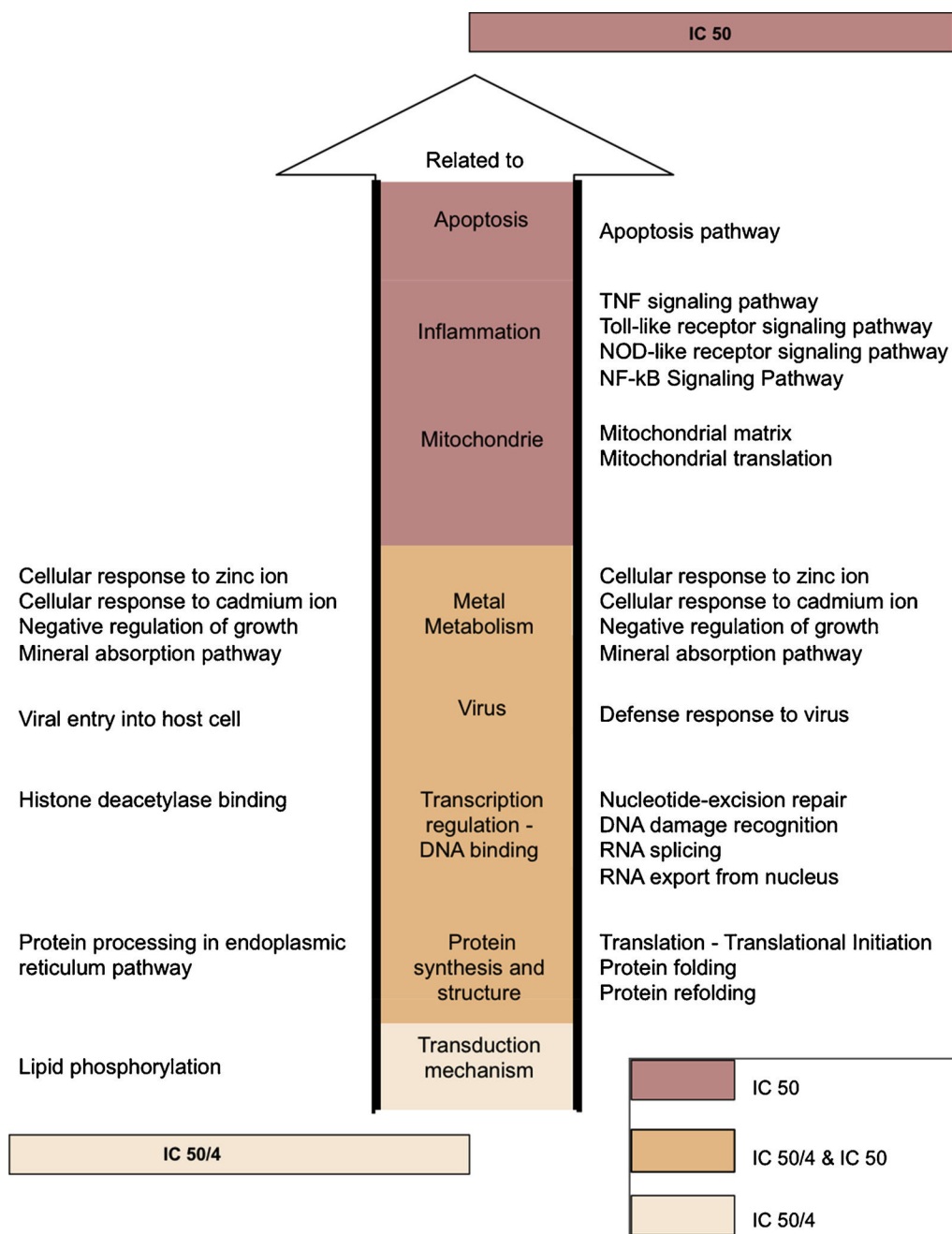


Fig. 4. Functional annotations of significantly up- and down-regulated genes of PMA-differentiated THP-1 cells exposed to both high and low concentrations of ZnO110NP, namely, 8.1 µg/mL = 2.1 µg/cm<sup>2</sup> (IC<sub>50</sub>) and 2.0 µg/mL = 0.5 µg/cm<sup>2</sup> (IC<sub>50/4</sub>). On the left, the functional annotations (Biological process (GOTERM\_BP) and pathways (KEGG, BIOCARTEA)) obtained for IC<sub>50/4</sub> concentration, on the right the annotations obtained for IC<sub>50</sub> concentration.

In addition, it is only at high concentration that, inflammation and mitochondrial dysfunctions, as well as apoptosis pathway, could be identified indicating a non-specific mechanism of toxicity as shown in several studies using different cellular models (Gao et al., 2016; Wang et al., 2018; Wilhelmi et al., 2013; Chevallet et al., 2016).

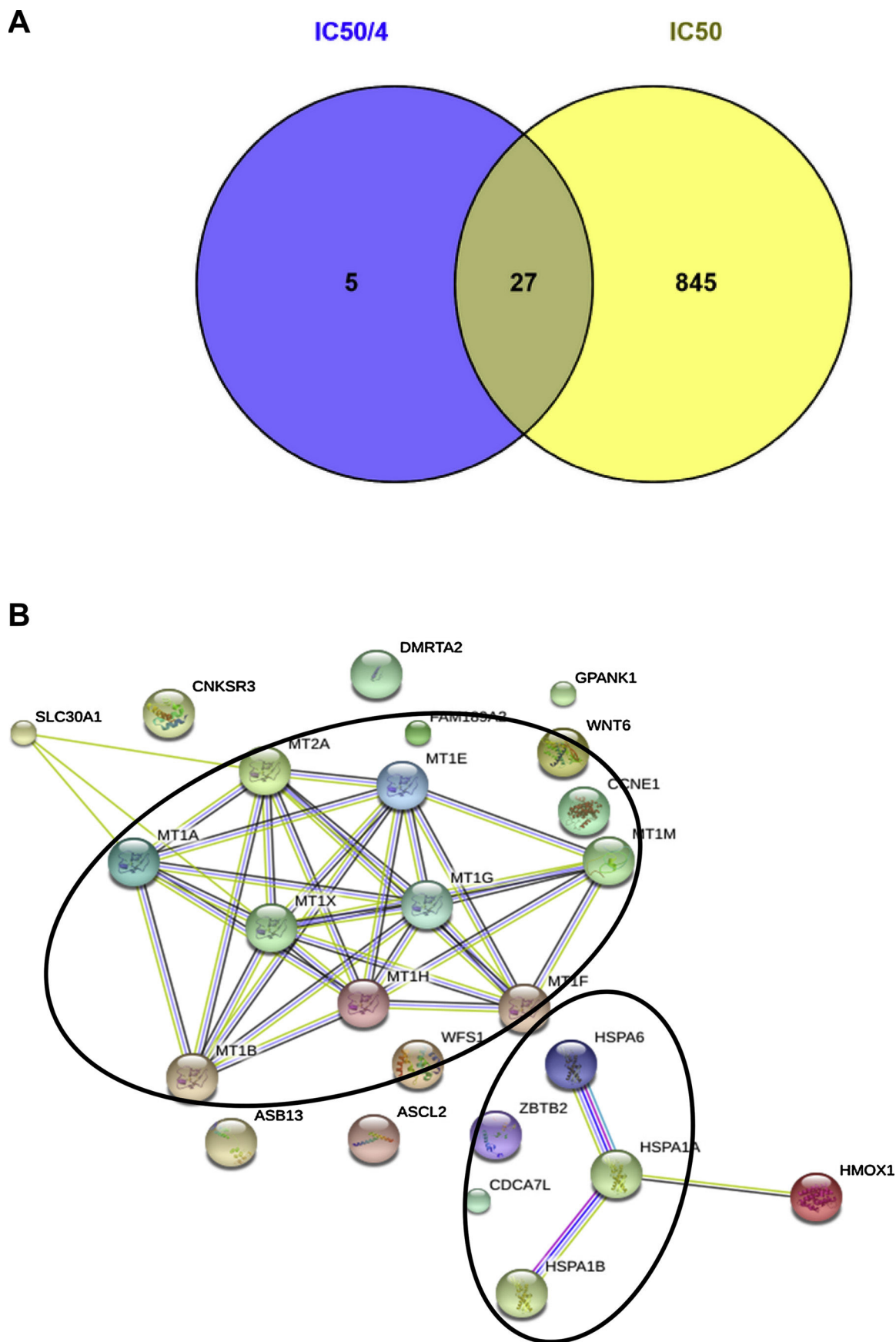
### 5. Conclusion

In summary, this study brings additional sources of transcriptional data for ZnONP toxicity for further mechanistic studies. Indeed, exposure of PMA-differentiated THP-1 cells to a low non-cytotoxic ZnONP concentration (IC<sub>50/4</sub>) has shown that they have a cellular metabolic alteration giving specific sensitive markers of exposition related to Zn metabolism. At the high cytotoxic concentration (IC<sub>50</sub>), markers of

cytotoxicity and cell death are not specific but the markers of exposition to Zn are still present. The metallothioneins genes family (*MT1*, *MT2*) was strongly upregulated in both conditions. The proteins encoded by these genes are known to participate in the metabolism of Zn and Cu and in the detoxification of heavy metals (e.g. Cd). Thus, the genes coding these proteins might be used as an early marker of exposition to metallic NP.

### Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicting interests.



**Fig. 5.** Significant upregulated genes of PMA-differentiated THP-1 cells exposed to both high and low concentrations of ZnO110NP, namely, 8.1  $\mu\text{g}/\text{mL} = 2.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $\text{IC}_{50}$ ) and 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL} = 0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $\text{IC}_{50}/4$ ) for 4 h. (A) Venn diagram of the number of common and unique up-regulated genes (at least 1.5-fold change and  $p \leq 0.05$ ). (B) Interactions between the 27 common up-regulated genes as retrieved from the STRING database. Among them, we identified genes belong to families: metallothioneins (*MT1*, *MT2*) and heat shock protein (*HSP*).



**Table 2**

Common significant ( $p \leq 0.05$ ) up-regulated genes with their Fold Change following exposure of PMA-differentiated THP-1 cells to both high and low concentrations of ZnO110NP.

Gene Symbol	Gene Name	Fold Change	
		IC <sub>50</sub> /4	IC <sub>50</sub>
HSPA6	Heat shock 70 kDa protein 6	81.53	6912.33
MT1M	Metallothionein 1M	56.88	57.64
MT1E	Metallothionein 1E	34.34	44.76
MT1H	Metallothionein 1H	28.91	83.36
MT1X	Metallothionein 1X	28.40	44.55
MT1G	Metallothionein 1G	26.15	57.57
MT1L	Metallothionein 1L	23.55	29.40
MT1B	Metallothionein 1B	22.87	73.67
MT1HL1	Metallothionein 1H-like 1	17.37	69.38
HSPA1A	Heat shock 70 kDa protein 1A	16.73	1586.45
MT1A	Metallothionein 1A	12.21	33.17
MT2A	Metallothionein 2A	12.16	7.24
FAM189A2	Family with sequence similarity 189, member A2	9.68	4.45
HSPA1B	Heat shock 70 kDa protein 1B	9.42	461.72
WNT6	Wingless-type MMTV integration site family, member 6	7.27	20.87
ASCL2	Achaete-scute family bHLH transcription factor 2	6.08	4.93
ZBTB2	Zinc finger and BTB domain containing 2	5.60	2.97
ASB13	Ankyrin repeat and SOCS box containing 13	5.58	4.37
MT1F	Metallothionein 1F	4.63	3.45
SLC30A1	Solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1	4.44	5.71
HMOX1	Heme oxygenase (decycling) 1	2.86	2.76
CDC47L	Cell division cycle associated 7-like	2.61	3.04
CNKSR3	CNKSR family member 3	2.17	1.92
WFS1	Wolfram syndrome 1 (wolframin)	2.06	2.71
DMRTA2	DMRT-like family A2	1.91	1.58
GPANK1	G patch domain and ankyrin repeats 1	1.74	2.17
CCNE1	Cyclin E1	1.56	2.26

## Transparency document

The [Transparency document](#) associated with this article can be found in the online version.

## Acknowledgements

This work was conducted within Smartnanotox frame, a European Union's Horizon 2020 research and innovation program, grant agreement No. 686098. Authors would like to thank Dr Céline Bonnet for giving access to its microarray scanner.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.11.003>.

## References

- Bauman, J.W., Liu, J., Klaassen, C.D., 1993. Production of metallothionein and heat-shock proteins in response to metals. *Fundam. Appl. Toxicol.* 21 (1), 15–22.
- Buerki-Thurnherr, T., Xiao, L., Diener, L., Arslan, O., Hirsch, C., Maeder-Althaus, X., Grieder, K., Wampfler, B., Mathur, S., Wick, P., Krug, H.F., 2013. In vitro mechanistic study towards a better understanding of ZnO nanoparticle toxicity. *Nanotoxicology* 7 (4), 402–416. <https://doi.org/10.3109/17435390.2012.666575>.
- Chevallet, M., Gallet, B., Fuchs, A., Jouneau, P.H., Um, K., Mintz, E., Michaud-Soret, I., 2016. Metal homeostasis disruption and mitochondrial dysfunction in hepatocytes exposed to sub-toxic doses of zinc oxide nanoparticles. *Nanoscale* 8 (43), 18495–18506. <https://doi.org/10.1039/c6nr05306h>.
- De Berardis, B., Civitelli, G., Condello, M., Lista, P., Pozzi, R., Arancia, G., Meschini, S., 2010. Exposure to ZnO nanoparticles induces oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 246 (3), 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.04.012>.
- Eidi, H., Joubert, O., Némós, C., Grandemange, S., Mograbi, B., Foliguet, B., Tournebize,

- J., Maincent, P., Le Faou, A., Aboukhamis, I., Rihn, B.H., 2012. Drug delivery by polymeric nanoparticles induces autophagy in macrophages. *Int. J. Pharm.* 422 (1–2), 495–503. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.11.020>.
- Farcal, L., Torres Andón, F., Di Cristo, L., Rotoli, B.M., Bussolati, O., Bergamaschi, E., Mech, A., Hartmann, N.B., Rasmussen, K., Riego-Sintes, J., Ponti, J., Kinsner-Ovaskainen, A., Rossi, F., Oomen, A., Bos, P., Chen, R., Bai, R., Chen, C., Rocks, L., Fulton, N., Ross, B., Hutchison, G., Tran, L., Mues, S., Ossig, R., Schneckeburger, J., Campagnolo, L., Vecchione, L., Pietrouisti, A., Fadel, B., 2015. Comprehensive in vitro toxicity testing of a panel of representative oxide nanomaterials: first steps towards an intelligent testing strategy. *PLoS One* 10 (5), e0127174. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127174>. eCollection 2015.
- Gao, F., Ma, N., Zhou, H., Wang, Q., Zhang, H., Wang, P., Hou, H., Wen, H., Li, L., 2016. Zinc oxide nanoparticles-induced epigenetic change and G2/M arrest are associated with apoptosis in human epidermal keratinocytes. *Int. J. Nanomed.* 11, 3859–3874. <https://doi.org/10.2147/IJN.S107021>.
- Girigoswami, K., 2018. Toxicity of metal oxide nanoparticles. *Adv. Exp. Med. Biol.* 122, 1048–1099. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-72041-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-72041-8_7).
- Gwak, G.H., Lee, W.J., Paek, S.M., Oh, J.M., 2015. Physico-chemical changes of ZnO nanoparticles with different size and surface chemistry under physiological pH conditions. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 127, 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.01.021>.
- Hanley, C., Layne, J., Punnoose, A., Reddy, K.M., Coombs, I., Coombs, A., Feris, K., Wingett, D., 2008. Preferential killing of cancer cells and activated human T cells using ZnO nanoparticles. *Nanotechnology* 19 (29), 295103. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/29/295103>.
- Hanley, C., Thurber, A., Hanna, C., Punnoose, A., Zhang, J., Wingett, D.G., 2009. The influences of cell type and ZnO nanoparticle size on immune cell cytotoxicity and cytokine induction. *Nanoscale Res. Lett.* 4 (12), 1409–1420. <https://doi.org/10.1007/s11671-009-9413-8>.
- Hartwig, A., 2001. Zinc finger proteins as potential targets for toxic metal ions: differential effects on structure and function. *Antioxid. Redox Signal.* 3 (4), 625–634. <https://doi.org/10.1089/15230860152542970>.
- Huang da, W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A., 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 4 (1), 44–57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>.
- Hussien, R., Rihn, B.H., Eidi, H., Ronzani, C., Joubert, O., Ferrari, L., Vazquez, O., Kaufner, D., Brooks, G.A., 2013. Unique growth pattern of human mammary epithelial cells induced by polymeric nanoparticles. *Physiol. Rep.* 422 (1–2), 495–503. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.11.020>.
- Jones, C.F., Grainger, D.W., 2009. In vitro assessments of nanomaterial toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (6), 438–456. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.005>. Epub 2009.
- Joo, S.H., Zhao, D., 2017. Environmental dynamics of metal oxide nanoparticles in heterogeneous systems: a review. *J. Hazard. Mater.* 322 (Pt A), 29–47. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.02.068>.
- Liang, H., He, T., Long, J., Liu, L., Liao, G., Ding, Y., Cao, Y., 2018. Influence of bovine serum albumin pre-incubation on toxicity and ER stress-apoptosis gene expression in THP-1 macrophages exposed to ZnO nanoparticles. *Toxicol. Mech. Methods* 21, 1–12. <https://doi.org/10.1080/15376516.2018.1479907>.
- Mishra, P.K., Mishra, H., Ekielski, A., Talegaonkar, S., Vaidya, B., 2017. Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications. *Drug Discov. Today* 22 (12), 1825–1834. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.08.006>.
- Moos, P.J., Olszewski, K., Honegger, M., Cassidy, P., Leachman, S., Woessner, D., Cutler, N.S., Veranth, J.M., 2011. Responses of human cells to ZnO nanoparticles: a gene transcription study. *Metallomics* 3 (11), 1199–1211. <https://doi.org/10.1039/c1mt00061f>.
- Phuyal, S., Kasem, M., Rubio, L., Karlsson, H.L., Marcos, R., Skaug, V., Zienolddiny, S., 2017. Effects on human bronchial epithelial cells following low-dose chronic exposure to nanomaterials: a 6-month transformation study. *Toxicol. In Vitro* 44, 230–240. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.07.016>.
- Prach, M., Stone, V., Proudfoot, L., 2013. Zinc oxide nanoparticles and monocytes: impact of size, charge and solubility on activation status. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 266 (1), 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.10.020>.
- Premanathan, M., Karthikeyan, K., Jayasubramanian, K., Manivannan, G., 2011. Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation. *Nanomedicine* 7 (2), 184–192. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.10.001>.
- Reed, L.J., Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27, 493–497.
- Rihn, B.H., Joubert, O., 2015. Comment on "Protein corona fingerprinting predicts the cellular interaction of gold and silver nanoparticles. *ACS Nano* 9 (6), 5634–5635. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b00459>.
- Ronzani, C., Safar, R., Diab, R., Chevrier, J., Paoli, J., Abdel-Wahhab, M.A., Le Faou, A., Rihn, B.H., Joubert, O., 2014. Viability and gene expression responses to polymeric nanoparticles in human and rat cells. *Cell Biol. Toxicol.* 30 (3), 137–146. <https://doi.org/10.1007/s10565-014-9275-4>.
- Roy, R., Parashar, V., Chauhan, L.K., Shanker, R., Das, M., Tripathi, A., Dwivedi, P.D., 2014. Mechanism of uptake of ZnO nanoparticles and inflammatory responses in macrophages require PI3K mediated MAPKs signaling. *Toxicol. In Vitro* 28 (3), 457–467. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.12.004>.
- Safar, R., Ronzani, C., Diab, R., Chevrier, J., Bensoussan, D., Grandemange, S., Le Faou, A., Rihn, B.H., Joubert, O., 2015. Human monocyte response to S-nitrosothione-loaded nanoparticles: uptake, viability, and transcriptome. *Mol. Pharm.* 12 (2), 554–561. <https://doi.org/10.1021/mp5006382>.
- Sahu, D., Kannan, G.M., Vijayaraghavan, R., 2014. Size-dependent effect of zinc oxide on toxicity and inflammatory potential of human monocytes. *J. Toxicol. Environ. Health*

- A 77 (4), 177–191. <https://doi.org/10.1080/15287394.2013.853224>.
- Senapati, V.A., Kumar, A., Gupta, G.S., Pandey, A.K., Dhawan, A., 2015. ZnO nanoparticles induced inflammatory response and genotoxicity in human blood cells: a mechanistic approach. *Food Chem. Toxicol.* 85, 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.06.018>.
- Sze, A., Erickson, D., Ren, L., Li, D., 2003. Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current-time relationship in electro-osmotic flow. *J. Colloid Interface Sci.* 261 (May (2)), 402–410 PubMed PMID: 16256549.
- Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Roth, A., Santos, A., Tsafou, K.P., Kuhn, M., Bork, P., Jensen, L.J., von Mering, C., 2015. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* 43, D447–452. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1003>. (Database issue).
- Tuomela, S., Autio, R., Buerki-Thurnherr, T., Arslan, O., Kunzmann, A., Andersson-Willman, B., Wick, P., Mathur, S., Scheynius, A., Krug, H.F., Fadeel, B., Lahesmaa, R., 2013. Gene expression profiling of immune-competent human cells exposed to engineered zinc oxide or titanium dioxide nanoparticles. *PLoS One* 8 (7), e68415. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068415>.
- Vance, M.E., Kuiken, T., Vejerano, E.P., McGinnis, S.P., Hochella, M.F.Jr., Rejeski, D., Hull, M.S., 2015. Nanotechnology in the real world: redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J. Nanotechnol.* 21 (6), 1769–1780. <https://doi.org/10.3762/bjnano.6.181.eCollection2015>.
- Wang, B., Zhang, J., Chen, C., Xu, G., Qin, X., Hong, Y., Bose, D.D., Qiu, F., Zou, Z., 2018. The size of zinc oxide nanoparticles controls its toxicity through impairing autophagic flux in A549 lung epithelial cells. *Toxicol. Lett.* 285, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.12.025>.
- Wilhelmi, V., Fischer, U., Weighardt, H., Schulze-Osthoff, K., Nickel, C., Stahlmecke, B., Kuhlbusch, T.A., Scherbart, A.M., Esser, C., Schins, R.P., Albrecht, C., 2013. Zinc oxide nanoparticles induce necrosis and apoptosis in macrophages in a p47phox- and Nrf2-independent manner. *PLoS One* 8 (6), e65704. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065704>.
- Yin, H., Casey, P.S., McCall, M.J., Fenech, M., 2015. Size-dependent cytotoxicity and genotoxicity of ZnO particles to human lymphoblastoid (WIL2-NS) cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 56 (9), 767–776. <https://doi.org/10.1002/em.21962>.

**Annexe 4. Protein and lipid homeostasis altered in rat macrophages after exposure to metallic oxide nanoparticles. Zahra Doumandji, Safar Ramia, Lovera-Leroux Mélanie, Nahle Sara, Cassidy Hilary, Matallanas David, Rihn Bertrand, Ferrari Luc, Joubert Olivier.**

# Cell Biology and Toxicology

## Protein and lipid homeostasis altered in rat macrophages after exposure to metallic oxide nanoparticles --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	CBTO-D-19-00069R1	
<b>Full Title:</b>	Protein and lipid homeostasis altered in rat macrophages after exposure to metallic oxide nanoparticles	
<b>Article Type:</b>	Original Article	
<b>Order of Authors:</b>	Zahra Doumandji, PhD	
	Ramia Safar, PhD	
	Mélanie Lovera-Leroux, PhD	
	Sara Nahle, MSc	
	Hilary Cassidy, PhD	
	David Matallanas, PhD	
	Bertrand Rihn, MD, PhD	
	Luc Ferrari, PharmD, PhD	
	Olivier Joubert, PhD	
<b>Corresponding Author:</b>	Zahra Doumandji, MSc Institut Jean Lamour Nancy, FRANCE	
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>		
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Institut Jean Lamour	
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>		
<b>First Author:</b>	Zahra Doumandji, PhD	
<b>First Author Secondary Information:</b>		
<b>Keywords:</b>	zinc oxide nanoparticles; zinc iron oxide nanoparticles; iron oxide nanoparticles; transcriptomics; proteomics; NR8383	
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>		
<b>Funding Information:</b>	H2020 European Research Council (686098)	Not applicable
<b>Abstract:</b>	<p>Metal oxide nanoparticles (NP), such as ZnO, ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> are widely used in industry. However, little is known about the cellular pathways involved in their potential toxicity. Here, we particularly investigated the key molecular pathways that are switched on after exposure to sub-toxic doses of ZnO, ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in the in vitro rat alveolar macrophages (NR8383). As in our model, the calculated IC<sub>50</sub> were respectively 16, 68 and more than 200 µg/mL for ZnO, ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, global gene and protein expression profiles were only analyzed after exposure to ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP. Using a rat genome microarray technology, we found that 985 and 1209 genes were significantly differentially expressed in NR8383 upon 4 h exposure to ¼ IC<sub>50</sub> of ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP, respectively. It is noteworthy that metallothioneins were overexpressed genes following exposure to the both NP. Moreover, Ingenuity Pathway Analysis revealed that the top canonical pathway disturbed in NR8383 exposed to ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP was eIF2 signaling involved in protein homeostasis. Quantitative mass spectrometry approach performed from both NR8383 cell extracts and culture supernatant indicated that 348 and 795 proteins were differentially expressed upon 24 h exposure to ¼ IC<sub>50</sub> of ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP, respectively. Bioinformatics analysis</p>	

1 **Protein and lipid homeostasis altered in rat macrophages after exposure to**  
2 **metallic oxide nanoparticles**

3

4 Doumandji Zahra<sup>a</sup>; Safar Ramia<sup>b</sup>; Lovera-Leroux Mélanie<sup>a</sup>; Nahle Sara<sup>a</sup>;  
5 Cassidy Hilary<sup>c</sup>; Matallanas David<sup>c</sup>; Rihn Bertrand<sup>a</sup>; Ferrari Luc<sup>a</sup>; Joubert  
6 Olivier<sup>a\*</sup>.

7 <sup>a</sup> Institut Jean Lamour, UMR 7198, CNRS-Université de Lorraine, Nancy, France; <sup>b</sup>Faculté  
8 de Médecine, INSERM UMR\_S NGERE 954, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy,  
9 France; <sup>b</sup> Conway Institute of Biomolecular and Biomedical Research, University College  
10 Dublin, Dublin.

11

12 **Abstract**

13 Metal oxide nanoparticles (NP), such as ZnO, ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> are widely used in industry.  
14 However, little is known about the cellular pathways involved in their potential toxicity. Here, we  
15 particularly investigated the key molecular pathways that are switched on after exposure to sub-toxic  
16 doses of ZnO, ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in the *in vitro* rat alveolar macrophages (NR8383). As in our model,  
17 the calculated IC<sub>50</sub> were respectively 16, 68 and more than 200 µg/mL for ZnO, ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>,  
18 global gene and protein expression profiles were only analyzed after exposure to ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>  
19 NP. Using a rat genome microarray technology, we found that 985 and 1209 genes were significantly  
20 differentially expressed in NR8383 upon 4 h exposure to ¼ IC<sub>50</sub> of ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP, respectively.  
21 It is noteworthy that metallothioneins were overexpressed genes following exposure to the both NP.  
22 Moreover, Ingenuity Pathway Analysis revealed that the top canonical pathway disturbed in NR8383  
23 exposed to ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP was eIF2 signaling involved in protein homeostasis. Quantitative  
24 mass spectrometry approach performed from both NR8383 cell extracts and culture supernatant  
25 indicated that 348 and 795 proteins were differentially expressed upon 24 h exposure to ¼ IC<sub>50</sub> of ZnO

1 and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP, respectively. Bioinformatics analysis revealed that the top canonical pathways  
2 disturbed in NR8383 were involved in protein homeostasis and cholesterol biosynthesis for both  
3 exposure conditions. While, VEGF signaling was specific to ZnO exposure as iron homeostasis  
4 signaling pathway was specific to ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP. Overall, the study provides resource of transcriptional  
5 and proteomic markers of response to ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP-induced toxicity through a combined  
6 transcriptomics, proteomics and bioinformatics approaches.

7

8 **Keywords:** zinc oxide nanoparticles; zinc iron oxide nanoparticles; iron oxide nanoparticles;  
9 transcriptomics; proteomics; NR8383

10

## 1 **Figures**

2 **Figure 1.** Transmission electron microscopy images of zinc oxide NP (A, B), zinc iron oxide  
3 (C, D) and iron oxide (E, F).

4 **Figure 2.** Cytotoxicity of ZnO NP (A), ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (B) and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (C). Cytotoxicity was  
5 determined after 24 h exposure of NR8383 to the panel of studied nanoparticles. At the left,  
6 the induction of membrane damage after cell exposure to different studied nanoparticles by  
7 measuring the level of extracellular LDH. At the right, Action of ZnO, ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on  
8 NR8383 mitochondrial activity measured by WST1 assay. Calculated IC<sub>50</sub>, based on WST-1  
9 assay data, for ZnO, ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> were respectively 16, 68 and more than 200 µg/mL.

10 **Figure 3.** Differentially expressed genes (DEG) of NR8383 cells exposed to ¼ IC<sub>50</sub> of ZnO  
11 and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP during 4 h. Two cut-offs were applied : statistical test Benjamini-Hochberg  
12 corrected at *p*-value < 0,001 and fold changes > |1,5|. **A)** Representative volcano plots of  
13 differentially over-expressed (in red) and down-expressed (in blue) genes, for each exposure  
14 condition. Numbers of DEG are indicated. **B)** Venn diagram showing common differential  
15 genes expression between cells exposed to ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP.

16 **Figure 4.** Heatmap showing 14 deregulated canonical pathways after ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP  
17 exposures. Statistical test Benjamini-Hochberg corrected at *p*-value < 0,001 and fold changes  
18 = |1,5|. IPA software based on *p* < 0,05. Deregulated pathway more significant from left to  
19 right.

20 **Figure 5.** The main strongly deregulated genes in NR8383 cells exposed to ¼ IC<sub>50</sub> of ZnO NP  
21 (A) and ¼ IC<sub>50</sub> of ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP (B) during 4 h. Statistical test was Benjamini-Hochberg  
22 corrected at *p*-value < 0,001. Both blue (A) and pink (B) colors are representing the ZnO and  
23 ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP deregulated genes. The fold change values are in the gray circles linked to the  
24 corresponding genes. The red and blue arrows indicate overexpression and under-expression  
25 of linked genes, respectively. Finally, the functions involved are arranged in rectangles.

1 **Figure 6.** **A)** Histogram of proteomic data. Data for the total differentially produced proteins  
2 (DPP). **B)** Venn diagram showing common DPP between cells exposed to ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  
3 NP.  
4 **Figure 7.** The main strongly deregulated proteins in NR8383 cells exposed to both ¼ IC<sub>50</sub>  
5 doses of ZnO NP (**A**) and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP (**B**) during 24 h. **A)** Proteins ratio :  $16 \times 10^6 \leq R_{\text{ZnO}} \leq$   
6  $0.18$ ; **B)** Proteins ratio  $6 \times 10^6 \leq R_{\text{ZnFe}_2\text{O}_4} \leq 2.6 \times 10^{-7}$ .



## 1 **Tables**

2 **Table 1.** Physical-chemical properties of nanoparticles studied by Joint Research Center  
3 (JRC) or the National Research Centre for the Working Environment (NRCWE), in Denmark,  
4 Copenhagen.

5 **Table 2.** Hydrodynamic diameter ( $D_H$ ) and zeta-potential ( $\zeta$ ) of ZnO, ZnFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> by  
6 dynamic light scattering (DLS).

7 **Table 3.** Measure of zinc (Zn) and iron (Fe) in in/onto NR8383 cells by Inductively Coupled  
8 Plasma-Optical Emission Spectrometer.

9 **Table 4.** Ranking of selected canonical pathways and number of deregulated produced  
10 proteins involved in each condition.

# 1 **Introduction**

2           At the nanoscale, matter is governed by quantum mechanics and could have new  
3 chemical and physical properties, different from the molecular counterpart (Schins et al.,  
4 2004). When the tiny size allows the nanoparticles (NP) to be introduced into biological  
5 organisms by cellular internalization, the interaction NP-living takes place. This ability to  
6 interact makes NP a potent means of delivering and transporting substances at the cellular  
7 level to treat on a very small scale. In this way, industries tend to optimize new biological and  
8 biochemical applications. Contrariwise, the large specific surface area of NP could induce  
9 severe adverse effects on the living, compared to their homologous macroscopic materials.  
10 Therefore, a deep analysis of cellular responses to nanomaterials is necessary before they can  
11 be safely used. It is in this perspective that we have studied the cytotoxic potential of ZnO  
12 ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP.

13           Nanoparticles of metal oxides are expressed, used and consumed in large quantities in  
14 many countries. They are part of components of cosmetics, medical, electronics and food  
15 products. Consequently, humans are repeatedly exposed to various NP *via* inhalation  
16 (respiratory), ingestion (oral) or dermal (cutaneous) routes.

17           Their wide use must be challenged for the potential negative effects they can produce.  
18 Thus, it is urgent to assess the risk of different exposures to nanoparticles. Indeed, the  
19 nanoparticle-living interaction could result in biological damages (Alhadlaq et al., 2015; Eidi  
20 et al., 2012; Singh and Lillard, 2009; Yang et al., 2015).

21           Industry's reliance on nanotechnology involves the inhalation exposure of workers to  
22 multiple NP within their manufactures. Although the human body have several barriers  
23 against the penetration of foreign inhaled substances, such as the nose that acts as a filter,  
24 some nanoparticles could be trapped in the pulmonary alveolar region (Oberdörster et al.,  
25 2005; Pr sum  et al., 2016). Thus, an interaction between NP and pulmonary alveolar cells

1 could occur (Buzea et al., 2007). In this context, this study allows us to analyze the cellular  
2 and molecular responses linked to the exposure of rat pulmonary alveolar cells (NR8383) to  
3 both ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP. NR8383 cells are relevant due to their immune functions and  
4 their ability of contact with foreign bodies (Hussain et al., 2012). In addition, experimental rat  
5 or mice models have been validated by many studies as toxicity paradigm of airways  
6 (Ganguly et al., 2017; Gaté et al., 2017; Wallin et al., 2017). Moreover, in order to respect the  
7 three “R” of the ethical approach described by Russel and Burch in 1959 for reducing,  
8 replacing and refining the use of animal testing, it seems important to develop *in vitro* models  
9 (Tannenbaum and Bennett, 2015). *In vitro* study of different cell lines represents a promising  
10 tool for the implementing predictive devices of NP (Alhadlaq et al., 2015). The present  
11 cellular model will help to establish a correlation of deregulated genes, their associated  
12 molecular pathways and protein production to reveal the accentuated response biomarkers of  
13 ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP on that particular biological system.

14 The potential of the toxic effects of ZnO NP are known to be related to their solubility  
15 (Prach et al., 2013). Indeed, Zn ion could have negative impact to cellular homeostasis  
16 because there is a large panel of metalloproteins which are zinc dependent (Andreini et al.,  
17 2006), e.g. transcription factors. Studies have shown that Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP can induce cell death  
18 (Tobias J. Brunner et al., 2006) while other studies showed that Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> induce no cytotoxicity  
19 (Chusuei et al., 2013). The ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NPs were the least studied of the NP panel studied here.  
20 Thus, there is a lack in the literature on the potential toxic effects of ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. In this paper,  
21 this study provides information about the cytotoxic potential and for the first time the gene  
22 expression profile and proteome changes of cells exposed to ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP.

23 The aim of this study is: (i) to evaluate and compare the cytotoxicity of ZnO, ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>  
24 and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP in rat macrophage alveolar NR8383 cells, (ii) to measure the deliverable dose

1 of NP to NR8383 cells, (iii) to analyze in these cells, the consequence of sub-toxic NP  
2 exposure on transcriptome and proteome profiles.

3

#### 4 **Materials and Methods**

5 **Nanoparticles.** Uncoated zinc oxide (ZnO) NP were obtained from the Joint Research Center  
6 (JRCNM110). ZnO NP main physico-chemical characteristics were as follow: primary  
7 particle size of 158 nm; specific surface area of 12 m<sup>2</sup>/g (Table. 1). The Zinc Ferrite Oxide  
8 NP (NanoAmor<sup>®</sup> ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, NRCWE-021) were obtained from Dr. Ulla Vogel (National  
9 Research Center for the Working Environment, NRCWE, Copenhagen). The main physico-  
10 chemical characteristics of NanoAmor<sup>®</sup> ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP containing 5-10 wt. % ZnO and 10-15  
11 wt. % Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> were as follow: particle size of 15-30 nm and specific surface area of 87.7 m<sup>2</sup>/g  
12 (Table. 1). The iron oxide NP (NanoAmor Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, NRCWE-018) were also from NRCWE  
13 (Copenhagen) with the following main physico-chemical properties: particle size of 30-50  
14 nm; specific surface area of 27.7 m<sup>2</sup>/g (Table. 1).

15

16 **Characterization of ZnO, ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles.** Dry nanopowders are  
17 extemporaneously suspended in deionized water at 2.56 mg/mL and then directly sonicated  
18 (0.4 mm, *Hielscher Ultrasonics*) at 4°C for 6 min at 30 % of amplitude or 161 J/mL (Cohen et  
19 al., 2013). Then, NP were diluted to the desired concentrations in cell media (DMEM, Sigma-  
20 D1145) without fetal bovine serum (FBS). The average hydrodynamic size and the zeta  
21 potential of each NP were determined by dynamic light scattering (DLS) on a ZetaSizer<sup>™</sup>  
22 (Malvern instruments, Malvern, UK). The characterization on DLS were done directly after  
23 suspension in cell media at 6.25 µg/mL, 50 µg/mL and 200 µg/mL.

1 The shape of the NP was characterized by transmission electron microscopy (TEM). A drop  
2 of aqueous suspension of each NP was poured onto carbo-coated copper grid air dried for  
3 transmission electron microscopy observations (ARM 200F microscope operating at 200 kV).

4  
5 ***Cell culture and exposure.*** NR8383 alveolar rat macrophages cell line was obtained from the  
6 American Type Culture Collection (ATCC, USA) and were grown in DMEM supplemented  
7 with 15 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 4 mM L-glutamine (SIGMA-G7513)  
8 and a mixture of antibiotic/antimycotic composed of 100 U/mL of penicillin, 100 µg/mL of  
9 streptomycin (SIGMA-P0781) and 0.25 µg/mL of amphotericin B (SIGMA-A2942), at 37°C  
10 in a humidified mixture of air (95%) and CO<sub>2</sub> (5%).

11 For all experiments, cells were seeded 24 h before exposure to NP at a density of 5 x 10<sup>4</sup>  
12 cells/mL. Cells were exposed to NP in cell media without FBS. The different concentrations  
13 of NP were mixed at room temperature to ensure homogeneity of the samples before exposure  
14 to cells. Cells not exposed to NP were served as controls in each experiment.

15 ***Cell viability.***

16 ***Lactate dehydrogenase (LDH) leakage*** was analyzed using the LDH assay (Roche-  
17 4744934001, Germany) following the manufacturer's instruction. Briefly, NR8383 cells were  
18 seeded at 5 x 10<sup>4</sup> cells/mL in 96-well plates and exposed to different concentrations ranging  
19 0.2 and 7.2 cm<sup>2</sup> of ZnO NP per cm<sup>2</sup> of cells (cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>), 1.7 and 53.1 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup> of ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and  
20 0.5 and 16.8 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup> of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP. These specific surface concentrations are equivalent of  
21 mass concentration of 6.25 and 200 µg/mL. After 24 h of exposure, plates were centrifuged at  
22 800 xg for 10 min and 100 µl of each supernatant were transferred to a new 96-well plate with  
23 black bottom that already prefilled with 100 µL of the LDH reaction mixture. Extracellular  
24 media was incubated for 30 min at room temperature, then, 50 µL of a stop solution was  
25 added and the absorbance was measured at 490 nm on a microplate reader. NR8383 cells

1 treated with 5 % Triton was considered as positive control. Unexposed NR8383 cells were  
2 considered as negative control. NP cytotoxicity was expressed as the percent of LDH leakage  
3 measured in positive control cells. Dose-effect relationships were assessed by ANOVA and  
4 Dunett's test.  $p$  values  $< 0.05$  were considered significant.

5 ***Mitochondrial activity*** was assessed using the WST-1 assay (MV Berridge, AS Tan, KD  
6 McCoy, 1996) (Roche, 11644807001, USA), according to manufacturer's protocol. NR8383  
7 cells were seeded at  $5 \times 10^4$  cells/mL in 96-well plates and exposed to different concentrations  
8 (6,25 to 200  $\mu\text{g/mL}$ ) of ZnO, ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP. After 24 h of exposure, WST-1 reagent was  
9 added to each well. Cells were incubated at 37 °C for 2 h. The absorbance of the solution was  
10 determined at 480 nm on microreader (BioRad-iMARK). IC<sub>50</sub> was measured for each NP  
11 according to Reed-Muench method (Reed et al., 1938) from WST-1 results.

12  
13 ***Measure of internal dosimetry by ICP-OES.*** Experiments were conducted on NR8383 cells  
14 to determine the amount of cytotoxic NP in contact with the cell layers, whether inside or on  
15 the cells, after 24 h of exposure. In order to obtain the amount of material for reliable  
16 elementary determinations, the experiment was carried out on  $1 \times 10^6$  of cells/ 5 mL in 6-well  
17 plates and exposed to both  $\frac{1}{4}$  IC<sub>50</sub> and IC<sub>50</sub> of ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. Knowing that the IC<sub>50</sub> of  
18 ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> on NR8383 were 0.51 (16  $\mu\text{g/mL}$ ) and 18.5  $\text{cm}^2/\text{cm}^2$  (68  $\mu\text{g/mL}$ ),  
19 respectively. After 24 h of exposure, cells were centrifuged at a low speed of 300  $\times g$  for 10  
20 min, washed with NaCl 0.9 % and resuspended in 500  $\mu\text{L}$  NaCl 0.9 %. After mineralization  
21 with 12 N HCl in microwaves from room temperature up to 180 °C, and then held at 180 °C  
22 for 15 min, Zn and Fe were directly measured by using the 720-ES Inductively Coupled  
23 Plasma Optical Emission Spectrometer (ICP-OES) (Varian, Belgium). Mass equivalent of  
24 ZnO (MW 81.38) and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (MW 241.07) in contact with cells have been calculated from  
25 the amount of Zn (MW 65.38) and Fe (MW 55.8) measured.

1

2 ***RNA isolation and quantification.*** To evaluate gene expression, total RNA was isolated from  
3 NR8383 cells exposed for 4 h to  $\frac{1}{4}$  IC<sub>50</sub> of each NP by using the RNA-Solv reagent (R6830-  
4 02, USA). Unexposed cells were used as control. RNA content was determined by measuring  
5 absorption at 260 nm using a spectrophotometer (Biotech-Biospec-Nano, Shimadzu). Optimal  
6 purity of RNA was ensured by determination of the 260/280 nm of an absorbance ratio  
7 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> > 1.8. RNA integrity was confirmed with the Agilent bioanalyzer 2100 and RNA  
8 6000 Pico Labchip kit (Agilent Biotechnologies, PaloAlto, CA). The RNA integrity number  
9 (RIN) score cut-off of 8 was used to determine whether the RNA integrity was qualified or  
10 not.

11

12 ***Microarray expression profiling.*** The microarray experiments were designed to perform four  
13 biological replicates for  $\frac{1}{4}$  IC<sub>50</sub> dose for each cytotoxic NP. The cRNA synthesis from cDNA  
14 and Cy3-dye labelling, hybridization and washing steps were carried out with 100 ng of total  
15 RNA following the manufacturer's specifications (One-Color Microarray-Based Gene  
16 Expression Analysis, version 6.6, Agilent Technologies Inc., USA, USA). Microarray slides  
17 were scanned by Agilent DNA microarray scanner (G2505C) by setting: (i) one color scan  
18 channel for 8 x 60 k array slides, (ii) scan area of 61x21.6 mm, (iii) scan resolution of 3  $\mu$ m,  
19 (iv) dye channel to Green, (v) Tiff file dynamic range of 20 bits and (vi) Green PMT to 100  
20 %. The TIFF images files and the quantification of fluorescence signal were obtained using  
21 Agilent Feature Extraction software version 11.0.1.1 to extract raw data and obtain QC  
22 reports.

23

24 ***Transcriptomics data analysis.*** Data of the samples that pass quality control parameters were  
25 after subject to percentile normalization using GeneSpring GX 13.0 software (Agilent

1 Technologies, UK). Genes were considered as differentially expressed with  $p$ -values  $< 0.001$   
2 and fold change values of  $> 1.5$ . Statistical analysis was performed using Benjamini  
3 Hochberg False Discovery Rate. Statistically significant gene changes in each NP group were  
4 analyzed in terms of their associated molecular/cellular functions and representation in  
5 canonical pathways using Ingenuity Pathway Analysis software (IPA, v.39480507, release  
6 date 09-2017, Qiagen Bioinformatics, Redwood City, USA).

7

8 ***SP3 cell Proteomics.*** Single-pot solid-phase-enhanced sample preparation (SP3), using  
9 commercially available carboxylate-modified magnetic beads, was employed to analyze the  
10 NR8383 cells global proteome (Hughes et al., 2014). Briefly, cells were exposed for 24 h to  $\frac{1}{4}$   
11  $IC_{50}$  of ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP. Thereafter, cells disruption was performed in 6 M urea, 2 M  
12 thiourea and 50 mM MOPS containing lysis buffer. Samples were then reduced and alkylated  
13 by DTT and iodoacetamide (IAA) respectively. Both hydrophobic and hydrophilic Sera-Mag  
14 SpeedBead carboxylate-modified magnetic particles (GE Healthcare, Cat # 65152105050250  
15 and 45152105050250) were mixed in a 1:1 ratio and were added to each sample. Once  
16 immobilized on the hydrophobic and hydrophilic carboxylate-modified magnetic beads,  
17 proteins and peptides were rinsed with a combination of ethanol and acetonitrile mixture to  
18 efficiently remove contaminating agents. After rinsing, proteins and peptides are eluted from  
19 the magnetic beads by adding a Mass Spectrometry (MS) solution (Fisher scientific, cat  
20 #12321D).

21

22 ***Mass Spectrometry and proteomic analysis.*** Each sample out the three biological replicates  
23 was run in triplicate on a Thermo Scientific Q Exactive mass spectrometer connected to a  
24 Dionex Ultimate 3000 (RSLCnano) chromatography system. Each sample was loaded onto a  
25 fused silica emitter (75  $\mu$ m ID), using a laser puller (Sutter Instruments P2000, Novato, CA,



1 USA), packed with Reprosil Pur (Dr Maisch, Ammerbuch-Entringen, Germany). Peptides  
2 were trapped on C18 columns (1.9  $\mu\text{m}$ ; 12 cm in length). Tryptic peptides elution was  
3 performed with a gradient of mobile phase media with 0,1 of formic acid and were separated  
4 by an increasing acetonitrile gradient over 60 min at a flow rate of 250 nL/min direct into a Q-  
5 Exactive MS. The MS was operated in positive ion mode with a capillary temperature of 320  
6  $^{\circ}\text{C}$ , and with a potential of 2300 V applied to the frit. All data was acquired while operating in  
7 automatic data dependent switching mode. A high resolution (70,000) MS scan (300-1600  
8 m/z) was performed using the Q Exactive to select the 12 most intense ions prior to MS/MS  
9 analysis using high-energy collision dissociation (HCD). Data acquisition for protein  
10 identification and quantification was done by MaxLFQ (Cox et al., 2014) searching with the  
11 MaxQuant version 1.5 reference proteome database (Uniprot). Modifications included C  
12 carbamylation (fixed) and M oxidation (variable). We used three biological replicate  
13 experiments per condition to ensure the quality of the quantification results. Two ratios of the  
14 intensities of the peptides with adjusted  $p$ -value less than 0.05 were used to determine the  
15 expression ratio for each protein between exposed and control samples. Ratios over than 1.5  
16 and less than 1 were selected.

17

## 18 **Results**

19 **Zinc, zinc iron and iron oxides nanoparticles properties.** To explore the effects of zinc and  
20 iron particles *in vitro*, the morphology of ZnO, ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP was assessed by TEM.  
21 Sample of ZnO particles (Fig. 1. A-B) exhibited as expected a diversity of forms such as  
22 rectangular, rod, spherical, and irregular shapes, whereas ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP displayed a  
23 combination of the spherical shape specific of the Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP and nanosheets specific of ZnO  
24 NP (Fig. 1. C-D). Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP revealed a spherical shape (Fig. 1. E-F). Characterization of NP  
25 in DMEM SVF-free was measured by DLS, that is widely used to determine the size of

1 Brownian NP in colloidal suspension (Lynch and Dawson, 2008). Indeed, measured  
2 secondary sizes represented by the hydrodynamic diameters ( $D_H$ ) (Table 2) were:  $296 \pm 4$ ,  
3  $283 \pm 36$  and  $357 \pm 8$  nm for the ZnO NP at respectively a concentration of 6.25, 50 and 200  
4  $\mu\text{g/mL}$ . At same increasing concentrations, i)  $\text{ZnFe}_2\text{O}_4$   $D_H$  were:  $71 \pm 18$ ,  $224 \pm 14$  and  $338 \pm$   
5  $23$  nm, ii)  $\text{Fe}_2\text{O}_3$   $D_H$  were  $133 \pm 3$ ,  $144 \pm 2$  and  $137 \pm 1$  nm. Furthermore, at the same  
6 concentrations, zeta-potential were i) for ZnO:  $-19 \pm 1$ ,  $-13$ ,  $-31$  mV; ii) for  $\text{ZnFe}_2\text{O}_4$ :  $-17$ ,  $-$   
7  $23$ ,  $-21$  mV; iii) for  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ :  $27 \pm 1$ ,  $6$ ,  $36$  mV. The results of  $D_H$  characterization by DLS, at  
8 the lowest concentration ( $6.25 \mu\text{g/mL}$ ), were the closest to the primary size characterization  
9 by TEM for all NP. Indeed, by increasing concentration, it is likely that agglomerates are  
10 formed. It is important to mention that the specific surface area of  $\text{ZnFe}_2\text{O}_4$  was 3.1 times  
11 higher than the one of  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  NP and 7.3 times higher than the one of ZnO NP (Table 1).

12  
13 ***ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles reduced the viability of NR8383 cells.*** The potential  
14 cytotoxicity of the three NP on NR8383 cells after 24 h of exposure was determined by  
15 measurements of LDH leakage and WST-1 assay. When the plasma membrane is impaired,  
16 LDH diffuses into extracellular media, and extracellular LDH increases with the extent of  
17 cytotoxicity of NP. In each experiment, the positive control was triton-exposed NR8383 cells.  
18 A dose-dependent LDH leakage was observed for NR8383 cells exposed to ZnO and  $\text{ZnFe}_2\text{O}_4$   
19 NP up to  $50 \mu\text{g/mL}$ . Cells respectively exposed to  $50 \mu\text{g/mL}$  of ZnO and  $\text{ZnFe}_2\text{O}_4$ , displayed  
20 respectively 75 and 50 % increase of extracellular LDH, a dose reaching a plateau. One  
21 should notice that only the highest dose of  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  induced a 30 % release of LDH (Fig. 2A). In  
22 conclusion, among the three NP, ZnO exhibited the highest cytotoxic effect on NR8383 cell  
23 membrane, thus conferring for ZnO the highest toxic potential despite the lowest specific  
24 surface area.

1 WST-1 assay measures the mitochondrial activity by giving different absorption spectra of  
2 formazan formed by reduction of tetrazolium by mitochondrial dehydrogenase. Our results  
3 showed that ZnO NP induced a strong decrease in cell viability as shown in Fig. 2B. As a  
4 matter of fact, at concentration of 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of ZnO NP, only 54 % of cells remained  
5 metabolically active, while a complete cytotoxicity was observed up to 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A decrease  
6 in the viability of cells exposed to  $\text{ZnFe}_2\text{O}_4$  NP was also observed. Indeed, after exposure of  
7 NR8383 to 50 and 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of  $\text{ZnFe}_2\text{O}_4$  NP, there remained 64 % and 10 % of metabolic  
8 active cells respectively. NR8383 cell viability was not affected by  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  NP up to a  
9 concentration of 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  but decreased continuously in a dose dependent manner (Fig. 2B).  
10 However,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  NP seemed to be less cytotoxic in our model compared to both other NP.  
11 Indeed, NR8383 cell viability decreased only to 30 % in the presence of the highest  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  NP  
12 (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) used in our study (Fig. 2B). Both in LDH and WST-1 assays results were  
13 concordant, demonstrating that presence of Zn in NP is the main factor of main toxicity (Fig.  
14 2A).

15 Based on the WST-1 assay data, the calculated  $\text{IC}_{50}$  was 16, 68 and  $> 200$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ , for  
16 respectively ZnO,  $\text{ZnFe}_2\text{O}_4$  and  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  NP. Allowing us to set up the optimal sub-toxic  
17 concentrations for each NP for the following experiments.

18  
19 ***Effective dosimetry for nano-bio interactions.*** Based on the dose-response toxicity results for  
20 NR8383 cells exposed to ZnO,  $\text{ZnFe}_2\text{O}_4$  and  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , we deliberately decided to deepen our  
21 study with NP whose  $\text{IC}_{50}$  were measurable, namely ZnO and  $\text{ZnFe}_2\text{O}_4$  NP. Therefore, we  
22 evaluated the amount of cytotoxic NP in contact with the cells by measuring the zinc (Zn) and  
23 iron (Fe) content in the cell layers by ICP-OES. This measurement was carried out on  
24 NR8383 cells exposed during 24 h to both  $\frac{1}{4}$   $\text{IC}_{50}$  (4 and 17  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and  $\text{IC}_{50}$  (16 and 68  
25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of ZnO and  $\text{ZnFe}_2\text{O}_4$ , respectively. Table 3 indicates that Zn concentration in/onto

1 NR8383-cell was respectively  $62.1 \pm 1.5$  and  $130.7 \pm 0.4$  ng/mL, for  $\frac{1}{4}$  IC<sub>50</sub> and IC<sub>50</sub> of ZnO.  
2 For ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP, Zn concentrations in/onto cells were  $16.1 \pm 0.3$  and  $18.2 \pm 0.1$  ng/mL, for  $\frac{1}{4}$   
3 IC<sub>50</sub> and IC<sub>50</sub> of ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, respectively. Also, Fe concentration was  $82.7 \pm 0.2$  and  $78.2 \pm 0.3$   
4 ng/mL for  $\frac{1}{4}$  IC<sub>50</sub> and IC<sub>50</sub> of ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, respectively. The results showed that free Zn in  
5 contact with cells was more abundant following exposure to ZnO NP than the exposure to  
6 ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP, conferring the primary role of free Zn in cell viability.

7  
8 **Action on transcriptome.** To identify key pathways linked to the response of NR8383 to sub-  
9 toxic doses of NP exposure, transcriptomics experiments were conducted by their exposure to  
10 ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> at  $\frac{1}{4}$  IC<sub>50</sub> dose for 4 h. Results showed 985 and 1209 DEG that were  
11 revealed after the exposure to ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP, respectively (Fig. 3A).

12 Following exposure to ZnO, the proportion of down-regulated genes was 100 and up-  
13 regulated genes was 885. Interestingly, exposure to ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> led to a higher fraction of down-  
14 regulated genes e.g.1191 *versus* only 18 up-regulated genes (Fig.3A). Our results highlighted  
15 118 common DEG to both exposure conditions, of which 867 DEG were specific to ZnO and  
16 1091 DEG were specific to ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (Fig. 3B). To determine the main affected pathways, all  
17 DEG were further analyzed using IPA software®. The heatmap showed 14 deregulated  
18 canonical pathways of which were activated. Indeed, eIF2, both eIF4/p70S6K and mTOR  
19 signaling pathways were predicted to be activated in cells exposed to ZnO but not following  
20 exposure to ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. On the contrary, eIF2, both eIF4/p70S6K, PDGF and integrin signaling  
21 were predicted to be inhibited in cells exposed to ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

22 Finally, the most significant deregulated common pathways in  $\frac{1}{4}$  IC<sub>50</sub> exposure to ZnO and  
23 ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP were those involved in the homeostasis of cellular protein  
24 production/degradation. What differs, is the predictive trend of activation or inhibition of  
25 these pathways calculated by IPA.

1 To go further and to delineate a potential gene signature, we focused on the most up- and  
2 most down-regulated genes in NR8383 exposed to ZnO NP (Fig. 5A) and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP (Fig.  
3 5B). Not surprisingly, *Mt1a* and *Mt2A*, both metallothioneins involved in metal homeostasis,  
4 were among the most upregulated genes in both conditions (FC respectively +28 and +130 for  
5 ZnO; FC respectively +7 and +78, for ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>). *Slc30a1* (FC + 4) and *Wdr45* (FC +5), also  
6 involved in metal homeostasis were also highly upregulated, but only after exposure to ZnO  
7 or to ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, respectively. ZnO specific gene signature further englobed the overexpression  
8 of *Pla2g16* (FC +7) a membrane damage sensor, *S100a4* (FC +7) involved in macrophage-  
9 induced lung fibrosis (Li et al., 2018; Zhang et al., 2018), *Rps14* (FC +6), *Rps27* (FC +5) and  
10 *Mrps15* (FC +5), three protein synthesis regulators. Besides, ZnO exposure signature was also  
11 characterized by a downregulation of *Tp53inp* (FC -31), a stress response mediator, *Sln3* (FC  
12 -23), *Akap9* (FC -16) and *Rock1* (FC - 24), three cell cycle/cytoskeleton regulators, and *Zeb2*  
13 (FC -14), *Smarca5* (FC -6), *Smarcad1* (FC -11) and *Med13* (FC -10), four transcriptional  
14 regulators. NR8383 cells specific gene signature following exposure to a sublethal dose of  
15 ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> was marked by the deregulation of genes involved in protein synthesis such as  
16 *Eef1a2* (FC +2), *Atf3* (FC +6), *Cyp4a8* (FC -45) and *Rpl1* (FC -34), as well as both zinc  
17 fingerproteins *Zfand2a* (FC +12) and *Znrf4* (FC +7), in membrane damage sensing, such as  
18 *Sdpr* (FC -46), and in cell cycle/cytoskeleton regulation such as *Mki67* (FC -23) and *Snta1*  
19 (FC -30). Genes encoded for transcriptional regulators such as *Smarca5* (FC -12) and *Hipk2*  
20 (FC -47), immune response effectors, such as *CD68* (FC -29), *Ccl22* (FC -29) and *Gdf15* (FC  
21 +4) were also deregulated. The exposure of NR8383 to ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP further showed an  
22 overexpression of *Alas1* (FC +4) involved in heme biosynthesis (Fig.5).

23

24 **Effect on proteome.** Differential protein expression from NR8383 cells exposed during 24 h  
25 to ¼ IC<sub>50</sub> of ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP was further investigated by using mass spectrometry-based

1 proteomics approach. Mass spectrometry protein identification and quantification indicated  
2 348 differentially expressed proteins (DEP) in exposed cells to ZnO compared to unexposed  
3 ones with  $p$ -value  $< 0.05$  and  $1.5 < \text{ratio} < 1$  (Fig. 6). Cells exposed to  $\frac{1}{4}$  IC<sub>50</sub> ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP  
4 showed total 795 DEP (Fig. 6). Furthermore, 211 DEP were common to the both exposure  
5 conditions. NR8383 exposed to ZnO NP showed 137 specific DEP while ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP  
6 exposure led to 584 specific DEP (Fig. 6B). Both gene and protein expressions were more  
7 abundant after ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> exposure and displayed more underexpressed elements than  
8 overexpressed ones (Fig. 3A; Fig. 6A).

9 To assess the molecular pathways, we also analyzed DEP by using IPA software. Table 4  
10 indicates the final ranking of the selected canonical pathways ( $p$ -value  $\leq 0.05$ ) together with  
11 the number of deregulated proteins involved for each condition, and the enrichment score for  
12 each significantly deregulated pathway. Indeed, protein synthesis with the eIF2 signaling  
13 pathway, stress response with mitochondrial dysfunction and sirtuin signaling were the most  
14 affected functions. Indeed, 16 and 30 DEP were found to be linked to eIF2 signaling  
15 following exposure to NP ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, respectively.

16 Interestingly, IPA analysis revealed a trend toward activation of the eIF2 pathway following  
17 both exposures, in the protein synthesis cluster. Similarly, in the stress response cluster 15 and  
18 24 of DEP were linked to sirtuin signaling and 13 and 24 of DEP were ranked in  
19 mitochondrial dysfunction in cells exposed to ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP, respectively.

20 The superpathway of cholesterol biosynthesis in lipid biosynthesis cluster revealed a positive  
21 enrichment score with following exposure to ZnO NP namely a predicted activation, as  
22 sirtuin pathway. As well as deregulation of VEGF signaling that was specific to ZnO  
23 exposure. On the other hand, this pathway was not suggested as activated following exposure  
24 to ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP. In addition, the metal exposure response included the iron homeostasis

1 signaling pathway was deregulated only after exposure to ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP, not after exposure to  
2 ZnO NP, confirming a role of iron at an ionic level.

3 Moreover, the most deregulated proteins, namely 23 after ZnO exposure and 28 after ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>  
4 exposure, have been analyzed on STRING 10.5 version (<http://string-db.org/>). Overexpressed  
5 (in red) and underexpressed (in blue) proteins revealed six common clusters following ZnO  
6 (Fig. 7A) and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> exposures (Fig. 7B). Those clusters referred to ‘cytoskeleton  
7 modeling’ with 2 proteins that were identically deregulated after both exposure, ‘oxidative  
8 stress’, ‘protein synthesis’ with mainly under-expressed proteins, ‘immune response’ and  
9 ‘zinc-related proteins’.

10 From the list of these deregulated proteins, eight proteins were common following the both  
11 exposures studied, namely; Il1rap, Gpx4, Lss, Mmp9, Pum1, Rpa2, Tubg1 and Map1lc3b  
12 (circled in yellow in Fig. 7). Also, comparison of both DEP (Figure 7) and DEG (Figure 5)  
13 showed that Slc30a1 and Mt1a were overexpressed at transcriptional and protein levels in  
14 cells exposed to ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP, respectively.

## 15 **Discussion**

16 The cellular response to exposure to sub-toxic doses of nanoparticles of metal oxides has been  
17 investigated using a rat alveolar pulmonary NR8383 macrophages model. The aim was to  
18 decipher transcriptional and proteomic signatures in cells.

19 Cell viability analyses following exposure of NR8383 macrophages to increasing doses of  
20 ZnO, ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> clearly highlight the higher cytotoxic potential of ZnO, followed by  
21 ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and thereafter Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

22 Physicochemical properties of NP, especially size and specific surface area, have been  
23 reported to affect cell viability. Indeed, nanoscaled particles are known to be significantly  
24 more toxic than microscaled particles (Li et al., 2018; Zhang et al., 2018). Here, in our  
25 experimental conditions, we showed that ZnO NP display the larger primary size and the

1 lower specific area, suggesting that ZnO toxicity in this model could be attributed to other  
2 properties such as their solubility, morphology or presence of Zn. Our data are in agreement  
3 with the reported toxicity of ZnO in a rat epithelial and pulmonary cell models as well as in  
4 in PMA-differentiated THP-1 monocytic cells to a macrophage-like phenotype (Safar et al.,  
5 2018; Wiemann et al., 2016). Moreover, the ZnO NP toxicity potential seems to be cell-type  
6 dependent as similar concentrations of ZnO NP do not lead to any cytotoxicity in exposed  
7 human monocytes THP1 cells and in human umbilical vein endothelial cells (Chen et al.,  
8 2017; Gong et al., 2017). However, this cell-type dependent toxicity of ZnO needs to be  
9 confirmed on a larger panel of cells and tissues. This would be a unique opportunity to better  
10 define the mechanism of adverse health effects exposure to ZnO. In our model, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP  
11 affect NR8383 macrophages viability only at the highest dose used (200 µg/mL), supporting  
12 the anterior finding that Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> is rather a ‘passive’ NP (Wiemann et al., 2016). Besides,  
13 ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP demonstrate an intermediate dose-dependent effect on NR8383 cells, between  
14 those of ZnO and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP. As ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP are composed of 5-10wt% of ZnO and 10-  
15 15wt% Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> we could postulate that ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> toxicity rely mainly on the toxic potential of  
16 ZnO.

17 Following exposure to sub-toxic concentrations of NP ( $\frac{1}{4}$ IC<sub>50</sub>), molecular pathways are  
18 supposed to produce an adaptive response in order to maintain the cellular homeostasis in  
19 front of the induced disturbances and may confer a resistance or an adaptation following the  
20 aggression of the toxic (Jennings, 2013). Therefore, the pathways of both toxicity and  
21 adaptive responses are important to explore, in order to understand the exact cellular reaction  
22 to NP exposure. So, we realized a transcriptome and a proteome exploration after 4 h and 24 h  
23 of exposure of NR8383 cells to the  $\frac{1}{4}$ IC<sub>50</sub> of ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP, respectively. As far as we  
24 know, this is the first transcriptome and proteome study for ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP reported.



1 One of the aim of the work was to decipher key molecular pathways and/or functions  
2 associated with NR8383 cell response to sub-toxic doses of ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP. Therefore,  
3 the most deregulated genes were involved in metal homeostasis. Indeed, the metallothioneins  
4 *Mt1a* and *Mt2a* were commonly overexpressed at the transcriptional level. Exposure to ZnO  
5 and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP leads also to specific deregulation of other effectors involved in metal  
6 homeostasis. Indeed, *Slc30a1* and *Wdr45* were respectively increased following exposure to  
7 ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP. Noteworthy, the up-regulation of Zn transporter *Slc30a1* after exposure  
8 to Zn element has already been observed following an *in vivo* exposure of Zn to piglets (Chai  
9 et al., 2014).

10 A metal exposure response was also evidenced following the analysis of proteomic data with  
11 IPA<sup>™</sup> software, *Mmp9* were highly downregulated for both studied exposures. The iron  
12 homeostasis signaling pathway was only deregulated after exposure to ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. Our results  
13 are in agreement with those of Tuomela et al. (2013) who demonstrated an overexpression of  
14 different metallothioneins as a gene signature of three different immune cell lines after the  
15 exposure to ZnO NP. Other recent studies revealed, as well, the expression of MTs after  
16 exposure to Zn, nano-ZnO or micro-ZnO (Chai et al., 2014; Safar et al., 2018; Yang et al.,  
17 2017).

18 The overexpression of metallothioneins is an indicator of an adaptive response that plays a  
19 role in defense mechanisms against oxidative stress. Indeed, they are known to efficiently trap  
20 oxygen species (ROS) as well as Zn ions (Vallee, 1995; Sato et al., 2002; Vašák, 2005;  
21 Lindeque et al., 2010). In this study, metallothioneins were not the only indicator of oxidative  
22 stress. After 24 hours of exposure to NP ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, deregulated proteins were mainly  
23 involved in mitochondrial dysfunction, oxidative phosphorylation and sirtuin pathways. Our  
24 data are in agreement with previous studies (Chevallet et al., 2016; George and Ahmad, 2016;  
25 Niska et al., 2015). Altogether, these findings suggest that the regulation of these pathways

1 might help cells to capture and fix  $Zn^{2+}$  and to reduce the oxidative effect induced by ZnO and  
2  $ZnFe_2O_4$  NP.

3 One of the consequences of oxidative stress is the accumulation of cholesterol (Gesquière et  
4 al., 1999). Indeed, overexpression of proteins involved in cholesterol synthesis has been  
5 revealed in both studied exposures. At sub-toxic doses of exposure to ZnO and  $ZnFe_2O_4$  NP  
6 for 24 h, the overexpression of the Gpx4 protein could be a response to cholesterol synthesis.  
7 The Gpx4 enzyme has important biological functions, it is particularly known for its action  
8 against lipid peroxidation of cells and its inhibition induces cell death by ferroptosis  
9 (Maiorino et al., 2018). All these results suggest that the induction of oxidative stress would  
10 cause lipid accumulation and drop anti-peroxidative capacity of the cells, which could justify  
11 the overexpression of the Gpx4 enzyme.

12 Moreover, cholesterol production control occurs in the endoplasmic reticulum (ER). Thus,  
13 when the mechanism of cholesterol production is altered, it induces ER stress (Sozen and  
14 Ozer, 2017).

15 In this present study, we revealed the significant deregulation of different pathways related to  
16 protein homeostasis namely eIF2, eIf4/p70S6K and unfolded protein response signaling. As  
17 anterior proteomic studies that showed that ZnO NP induce disturbance of proteins involved  
18 in protein synthesis by deregulating structural constituent of ribosome in Human Monocyte-  
19 Derived Macrophage but not in Jurkat cells (Tuomela et al., 2013). The fundamental  
20 difference between these findings concerns the cell line type used. In our study, the main  
21 altered gene expression were involved in the ribosome biogenesis and several translation  
22 initiation factors such as *eIF3k* and *eIF2 $\beta$* , as well as 40S and 60S ribosomal subunits as  
23 *Rpl36a*, *Rpl9* or *Rpl14* genes, and transcription factor as *Atf7* and *Atf3* . It should be noticed  
24 that the latest one, *Atf3*, has a binding site on the promoter sequence of the two up-regulated  
25 genes that code for zinc-finger proteins *Zfand2A* and *Znrf4* after  $ZnFe_2O_4$  exposure. These

1 zinc-finger proteins are also involved in the protein synthesis cluster (LifeMap sciences,  
2 GeneCards Suite® Knowledgebase, version 4.9).

3 It is also important to note that the proteomics results revealed a specific and  
4 significant deregulation of the VEGF pathway following exposure of cells to ZnO NP through  
5 inhibition of Acta1 and Actn1, among others. This pathway was predicted to be inhibited in  
6 NR8383 cells following exposure to ZnO NP during 24 h. Coherently, Tada-Oikawa et al.,  
7 (2015) described the vascular endothelial growth factor pathway to be negatively regulated by  
8 ZnO NP on human endothelial cells suggesting that these effects are based on the  
9 concentration of released Zn<sup>2+</sup>. In contrast, other studies have demonstrated activation of the  
10 VEGF pathway following exposure of human dermal fibroblasts to ZnO NP (ref). These  
11 differences could be due to the nature of exposed cell lines that are from two different  
12 embryonic origins. Therefore, inhibition of the VEGF pathway in NR8383 cells suggests a  
13 cytoskeleton defect and may be a migration defect induced by ZnO NP. As far as we know,  
14 no previous study has shown a disturbance of the VEGF pathway by ZnO NP in  
15 macrophages.

16

## 17 **Conclusion**

18 Altogether, our results along with previous reports clearly demonstrate the hazard  
19 effects associated to the exposure of ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP. These compounds are already  
20 used in several products, from toothpaste to antibacterial gels and food, without a deep  
21 knowledge of how the human body could respond to exposure, whether short or long term.  
22 From the results obtained, ZnO NP are by far the most cytotoxic NP of the three NP studied  
23 on NR8383, followed by ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP and then Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP. Cytotoxicity is related to the  
24 presence of the Zn element.

1           Also, based on this study, we suggest the metallothioneins *Mt1a* and *Mt2A* as exposure  
2   biomarkers of both NP ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, biomarkers that were validated by Figueira et al.,  
3   (2012). Moreover, according to the transcriptome and proteome profiles, ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>  
4   NP induce ER stress that could be a molecular initiating event. This is highlighted by the  
5   deregulation of eIF2 pathway and dysfunction of cholesterol biosynthesis. Both NP also  
6   induce oxidative stress by dysregulation of genes and proteins involved in mitochondrial  
7   functions, oxidative phosphorylation and sirtuin homeostasis. However, the VEGF pathway  
8   was specific to ZnO exposure and iron homeostasis pathway specific to ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> exposure.

9           Finally, it is obvious that further studies under realistic biological conditions rather  
10   than artificial environment of culture cells should be done, to elucidate the mechanism of  
11   action of these nanometric structures.

12

### 13   **Acknowledgement**

14   This work has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and  
15   innovation program under grant agreement N° 686098.

16

### 17   **Conflict of interest**

18   The authors declare that they have no conflicting interests.

19

20

21

22

### 23   **References**

24   Alhadlaq, H.A., Akhtar, M.J., Ahamed, M., 2015. Zinc ferrite nanoparticle-induced

1 cytotoxicity and oxidative stress in different human cells. *Cell Biosci.* 5, 55.  
2 <https://doi.org/10.1186/s13578-015-0046-6>

3 Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., Rosato, A., 2006. Counting the zinc-proteins encoded in  
4 the human genome. *J. Proteome Res.* 5, 196–201. <https://doi.org/10.1021/pr050361j>

5 Buzea, C., Pacheco, I.I., Robbie, K., 2007. Nanomaterials and nanoparticles: sources and  
6 toxicity. *Biointerphases* 2, MR17-R71. <https://doi.org/10.1116/1.2815690>

7 Chai, W., Zakrzewski, S.S., Günzel, D., Pieper, R., Wang, Z., Twardziok, S., Janczyk, P.,  
8 Osterrieder, N., Burwinkel, M., 2014. High-dose dietary zinc oxide mitigates infection  
9 with transmissible gastroenteritis virus in piglets. *BMC Vet. Res.* 10, 75.  
10 <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-75>

11 Chen, G., Shen, Y., Li, X., Jiang, Q., Cheng, S., Gu, Y., Liu, L., Cao, Y., 2017. The  
12 endoplasmic reticulum stress inducer thapsigargin enhances the toxicity of ZnO  
13 nanoparticles to macrophages and macrophage-endothelial co-culture. *Environ. Toxicol.*  
14 *Pharmacol.* 50, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.01.020>

15 Chevallet, M., Gallet, B., Fuchs, A., Jouneau, P.H., Um, K., Mintz, E., Michaud-Soret, I.,  
16 2016. Metal homeostasis disruption and mitochondrial dysfunction in hepatocytes  
17 exposed to sub-toxic doses of zinc oxide nanoparticles. *Nanoscale* 8, 18495–18506.  
18 <https://doi.org/10.1039/c6nr05306h>

19 Chusuei, C.C., Wu, C.-H., Mallavarapu, S., Hou, F.Y.S., Hsu, C.-M., Winiarz, J.G.,  
20 Aronstam, R.S., Huang, Y.-W., 2013. Cytotoxicity in the age of nano: The role of fourth  
21 period transition metal oxide nanoparticle physicochemical properties. *Chem. Biol.*  
22 *Interact.* 206, 319–326. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.09.020>

23 Cohen, J., Deloid, G., Pyrgiotakis, G., Demokritou, P., 2013. Interactions of engineered  
24 nanomaterials in physiological media and implications for in vitro dosimetry.  
25 *Nanotoxicology* 7, 417–31. <https://doi.org/10.3109/17435390.2012.666576>

1 Cox, J., Hein, M.Y., Lubner, C.A., Paron, I., Nagaraj, N., Mann, M., 2014. Accurate Proteome-  
2 wide Label-free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio  
3 Extraction, Termed MaxLFQ. *Mol. Cell. Proteomics* 13, 2513–2526.  
4 <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.031591>

5 Eidi, H., Joubert, O., N?mos, C., Grandemange, S., Mograbi, B., Foliguet, B., Tournebize, J.,  
6 Maincent, P., Le Faou, A., Aboukhamis, I., Rihn, B.H., 2012. Drug delivery by  
7 polymeric nanoparticles induces autophagy in macrophages. *Int. J. Pharm.* 422, 495–503.  
8 <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.11.020>

9 Figueira, E., Branco, D., Antunes, S.C., Gonçalves, F., Freitas, R., 2012. Are metallothioneins  
10 equally good biomarkers of metal and oxidative stress? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 84,  
11 185–190. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.07.012>

12 Ganguly, K., Ettehadieh, D., Upadhyay, S., Takenaka, S., Adler, T., Karg, E., Krombach, F.,  
13 Kreyling, W.G., Schulz, H., Schmid, O., Stoeger, T., 2017. Early pulmonary response is  
14 critical for extra-pulmonary carbon nanoparticle mediated effects: comparison of  
15 inhalation versus intra-arterial infusion exposures in mice. *Part. Fibre Toxicol.* 14, 19.  
16 <https://doi.org/10.1186/s12989-017-0200-x>

17 Gaté, L., Disdier, C., Cosnier, F., Gagnaire, F., Devoy, J., Saba, W., Brun, E., Chalansonnet,  
18 M., Mabondzo, A., 2017. Biopersistence and translocation to extrapulmonary organs of  
19 titanium dioxide nanoparticles after subacute inhalation exposure to aerosol in adult and  
20 elderly rats. *Toxicol. Lett.* 265, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.11.009>

21 George, J., Ahmad, N., 2016. Mitochondrial Sirtuins in Cancer: Emerging Roles and  
22 Therapeutic Potential. *Cancer Res.* 76, 2500–6. [https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2733)  
23 [15-2733](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2733)

24 Gesquière, L., Loreau, N., Minnich, A., Davignon, J., Blache, D., 1999. Oxidative stress leads  
25 to cholesterol accumulation in vascular smooth muscle cells. *Free Radic. Biol. Med.* 27,

1 134–45.

2 Gong, Y., Ji, Y., Liu, F., Li, J., Cao, Y., 2017. Cytotoxicity, oxidative stress and inflammation  
3 induced by ZnO nanoparticles in endothelial cells: interaction with palmitate or  
4 lipopolysaccharide. *J. Appl. Toxicol.* 37, 895–901. <https://doi.org/10.1002/jat.3415>

5 Hughes, C.S., Foehr, S., Garfield, D.A., Furlong, E.E., Steinmetz, L.M., Krijgsveld, J., 2014.  
6 Ultrasensitive proteome analysis using paramagnetic bead technology. *Mol. Syst. Biol.*  
7 10, 757.

8 Hussain, S., Vanoirbeek, J.A.J., Hoet, P.H.M., 2012. Interactions of nanomaterials with the  
9 immune system. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* 4, 169–183.  
10 <https://doi.org/10.1002/wnan.166>

11 Jennings, P., 2013. Stress response pathways, toxicity pathways and adverse outcome  
12 pathways. *Arch. Toxicol.* 87, 13–4. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0974-4>

13 Li, Y., Bao, J., Bian, Y., Erben, U., Wang, P., Song, K., Liu, S., Li, Z., Gao, Z., Qin, Z., 2018.  
14 S100A4+ Macrophages Are Necessary for Pulmonary Fibrosis by Activating Lung  
15 Fibroblasts. *Front. Immunol.* 9, 1776. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01776>

16 Lindeque, J.Z., Levanets, O., Louw, R., van der Westhuizen, F.H., 2010. The involvement of  
17 metallothioneins in mitochondrial function and disease. *Curr. Protein Pept. Sci.* 11, 292–  
18 309.

19 Lynch, I., Dawson, K.A., 2008. Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today* 3, 40–47.  
20 [https://doi.org/10.1016/S1748-0132\(08\)70014-8](https://doi.org/10.1016/S1748-0132(08)70014-8)

21 Maiorino, M., Conrad, M., Ursini, F., 2018. GPx4, Lipid Peroxidation, and Cell Death:  
22 Discoveries, Rediscoveries, and Open Issues. *Antioxid. Redox Signal.* 29, 61–74.  
23 <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7115>

24 MV Berridge, AS Tan, KD McCoy, R.W., 1996. The biochemical and cellular basis of cell  
25 proliferation assays that use tetrazolium salts. - *Biochem.* - 4, 15–19.

1 Niska, K., Pyszka, K., Tukaj, C., Wozniak, M., Radomski, M.W., Inkielewicz-Stepniak, I.,  
2 2015. Titanium dioxide nanoparticles enhance production of superoxide anion and alter  
3 the antioxidant system in human osteoblast cells. *Int. J. Nanomedicine* 10, 1095–107.  
4 <https://doi.org/10.2147/IJN.S73557>

5 Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J., 2005. Nanotoxicology: An Emerging  
6 Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environ. Health Perspect.* 113,  
7 823–839. <https://doi.org/10.1289/ehp.7339>

8 Prach, M., Stone, V., Proudfoot, L., 2013. Zinc oxide nanoparticles and monocytes: impact of  
9 size, charge and solubility on activation status. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 266, 19–26.  
10 <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.10.020>

11 Prénomé, M., Simon-Deckers, A., Tomkiewicz-Raulet, C., Le Grand, B., Tran Van Nhieu, J.,  
12 Beaune, G., Duruphty, O., Doucet, J., Coumoul, X., Paireon, J.-C., Boczkowski, J.,  
13 Lanone, S., Andujar, P., 2016. Exposure to metal oxide nanoparticles administered at  
14 occupationally relevant doses induces pulmonary effects in mice. *Nanotoxicology* 10,  
15 1535–1544. <https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1242797>

16 REED, L.J., MUENCH, H., 1938. A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER  
17 CENT ENDPOINTS<sup>12</sup>. *Am. J. Epidemiol.* 27, 493–497.  
18 <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>

19 Safar, R., Doumandji, Z., Saidou, T., Ferrari, L., Nahle, S., Rihn, B.H., Joubert, O., 2018.  
20 Cytotoxicity and global transcriptional responses induced by zinc oxide nanoparticles  
21 NM 110 in PMA-differentiated THP-1 cells. *Toxicol. Lett.*  
22 <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.11.003>

23 SATO, M., KONDOH, M., 2002. Recent Studies on Metallothionein: Protection Against  
24 Toxicity of Heavy Metals and Oxygen Free Radicals. *Tohoku J. Exp. Med.* 196, 9–22.  
25 <https://doi.org/10.1620/tjem.196.9>



1 Schins, R.P.F., Lightbody, J.H., Borm, P.J.A., Shi, T., Donaldson, K., Stone, V., 2004.  
2 Inflammatory effects of coarse and fine particulate matter in relation to chemical and  
3 biological constituents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 195, 1–11.  
4 <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.10.002>

5 Singh, R., Lillard, J.W., 2009. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp. Mol. Pathol.*  
6 86, 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.12.004>

7 Sozen, E., Ozer, N.K., 2017. Impact of high cholesterol and endoplasmic reticulum stress on  
8 metabolic diseases: An updated mini-review. *Redox Biol.* 12, 456–461.  
9 <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.02.025>

10 Tada-Oikawa, S., Ichihara, G., Suzuki, Y., Izuoka, K., Wu, W., Yamada, Y., Mishima, T.,  
11 Ichihara, S., 2015. Zn(II) released from zinc oxide nano/micro particles suppresses  
12 vasculogenesis in human endothelial colony-forming cells. *Toxicol. Reports* 2, 692–701.  
13 <https://doi.org/10.1016/J.TOXREP.2015.04.003>

14 Tannenbaum, J., Bennett, B.T., 2015. Russell and Burch’s 3Rs then and now: the need for  
15 clarity in definition and purpose. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 54, 120–32.

16 Tobias J. Brunner, ‡, Peter Wick, §, Pius Manser, §, Philipp Spohn, §, Robert N. Grass, ‡,  
17 Ludwig K. Limbach, ‡, Arie Bruinink, § and, Wendelin J. Stark\*, ‡, 2006. In Vitro  
18 Cytotoxicity of Oxide Nanoparticles: Comparison to Asbestos, Silica, and the Effect of  
19 Particle Solubility†. <https://doi.org/10.1021/ES052069I>

20 Tuomela, S., Autio, R., Buerki-Thurnherr, T., Arslan, O., Kunzmann, A., Andersson-  
21 Willman, B., Wick, P., Mathur, S., Scheynius, A., Krug, H.F., Fadeel, B., Lahesmaa, R.,  
22 2013. Gene Expression Profiling of Immune-Competent Human Cells Exposed to  
23 Engineered Zinc Oxide or Titanium Dioxide Nanoparticles. *PLoS One* 8, e68415.  
24 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068415>

25 Vallee, B.L., 1995. The function of metallothionein. *Neurochem. Int.* 27, 23–33.

1 Vašák, M., 2005. Advances in metallothionein structure and functions. *J. Trace Elem. Med.*  
2 *Biol.* 19, 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.03.003>

3 Wallin, H., Kyjovska, Z.O., Poulsen, S.S., Jacobsen, N.R., Saber, A.T., Bengtson, S., Jackson,  
4 P., Vogel, U., 2017. Surface modification does not influence the genotoxic and  
5 inflammatory effects of TiO<sub>2</sub> nanoparticles after pulmonary exposure by instillation in  
6 mice. *Mutagenesis* 32, 47–57. <https://doi.org/10.1093/mutage/gew046>

7 Wiemann, M., Vennemann, A., Sauer, U.G., Wiench, K., Ma-Hock, L., Landsiedel, R., 2016.  
8 An in vitro alveolar macrophage assay for predicting the short-term inhalation toxicity of  
9 nanomaterials. *J. Nanobiotechnology* 14, 16. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0164-2>

10 Yang, P., Hong, W., Zhou, P., Chen, B., Xu, H., 2017. Nano and bulk ZnO trigger diverse Zn-  
11 transport-related gene transcription in distinct regions of the small intestine in mice after  
12 oral exposure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 493, 1364–1369.  
13 <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.09.165>

14 Yang, X., Shao, H., Liu, W., Gu, W., Shu, X., Mo, Y., Chen, X., Zhang, Q., Jiang, M., 2015.  
15 Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress are involved in ZnO nanoparticle-  
16 induced hepatotoxicity. *Toxicol. Lett.* 234, 40–49.  
17 <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.02.004>

18 Zhang, W., Ohno, S., Steer, B., Klee, S., Staab-Weijnitz, C.A., Wagner, D., Lehmann, M.,  
19 Stoeger, T., Königshoff, M., Adler, H., 2018. S100a4 Is Secreted by Alternatively  
20 Activated Alveolar Macrophages and Promotes Activation of Lung Fibroblasts in  
21 Pulmonary Fibrosis. *Front. Immunol.* 9, 1216.  
22 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01216>

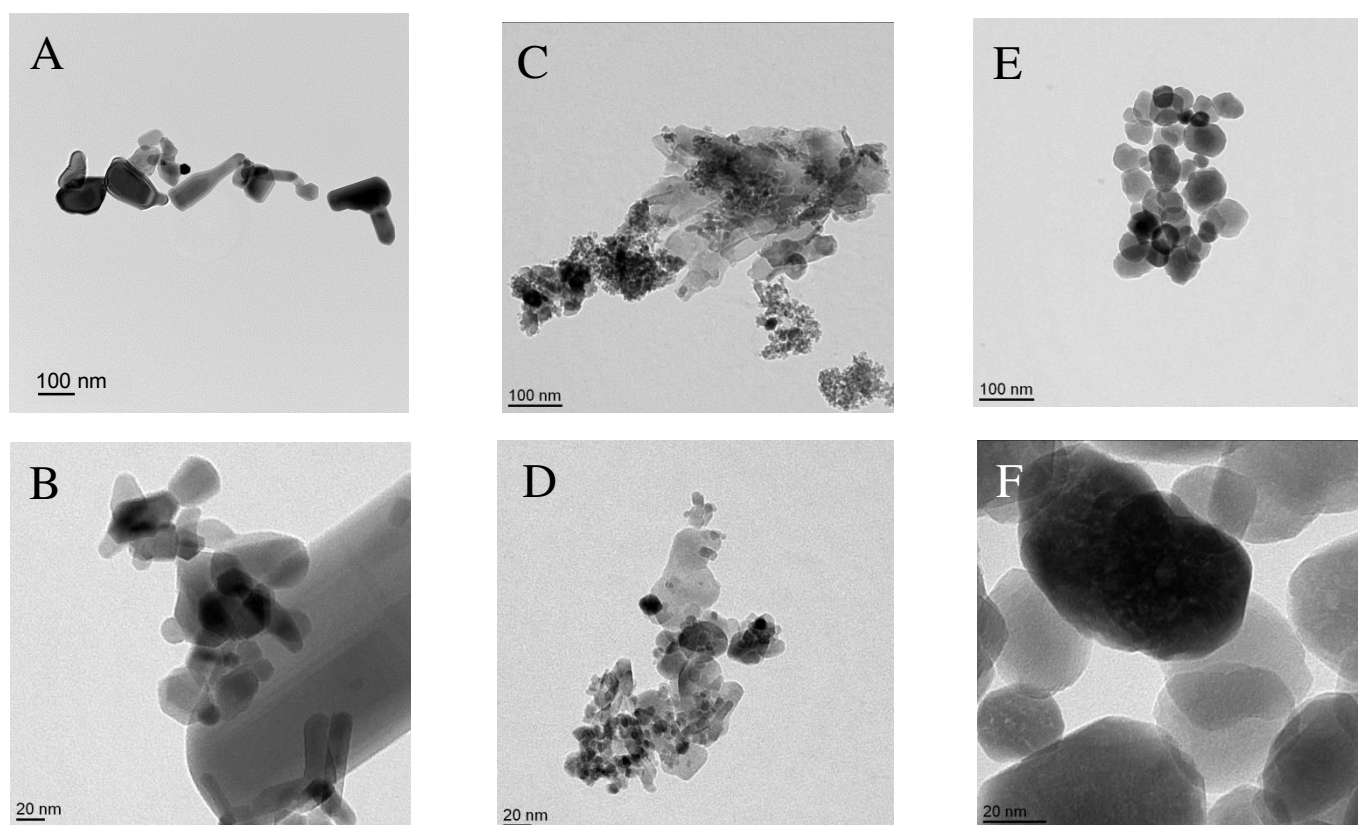
23

**Table. 1.** Physical-chemical properties of nanoparticles studied by Joint Research Center (JRC) or the National Research Centre for the Working Environment (NRCWE), in Denmark, Copenhagen.

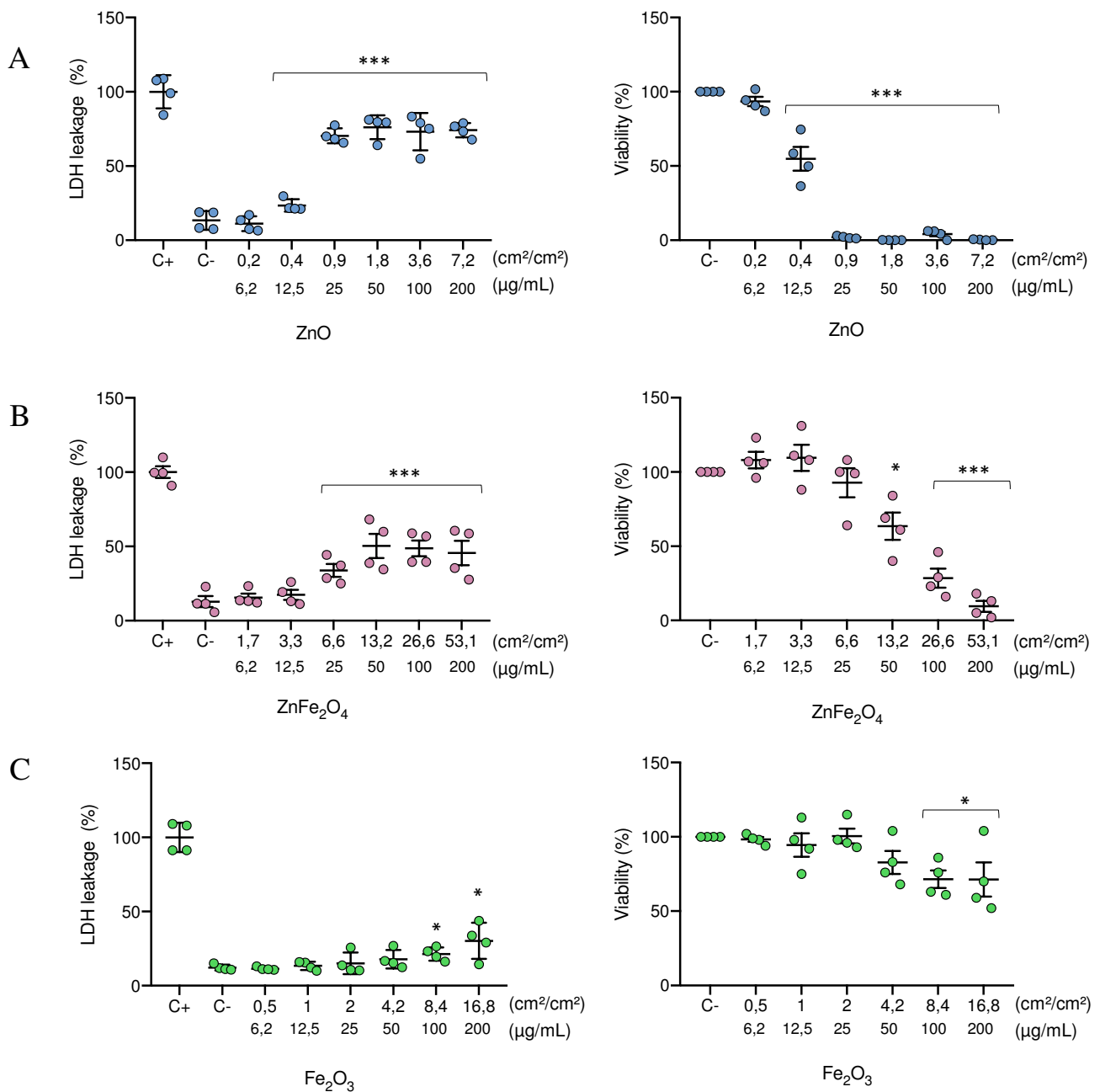
	ZnO	ZnFe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
NM-Code	NM-110	NRCWE-021	NRCWE-018
Manufacturer	JRC	NanoAmor	NanoAmor
Cat. Num.	JRCNM01100a	5710FY	2520ZH
Surface area (m <sup>2</sup> /g)	12	87.7	27.7
Purity (%)	Low impurities	98,50 %	99 %
Crystal form	Zincite	Cubic	Alpha

**Table. 2.** Hydrodynamic diameter ( $D_H$ ) and zeta-potential ( $\zeta$ ) of ZnO, ZnFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> by dynamic light scattering (DLS).

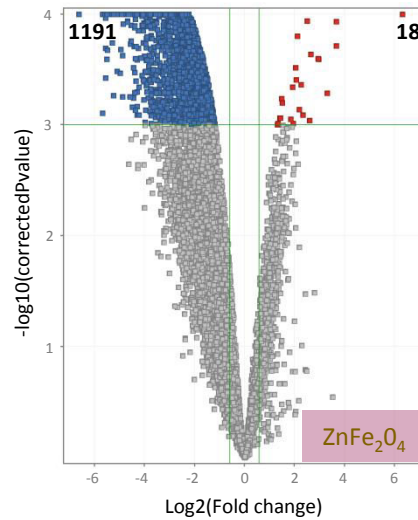
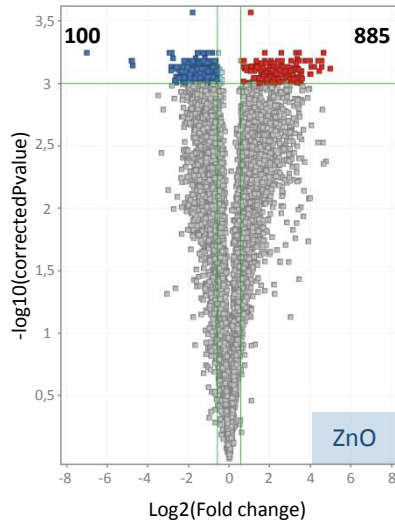
	ZnO	ZnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
6,25 µg/mL NP in cell medium			
$D_H$ (nm)	296 ± 4	71 ± 18	133 ± 3
$\zeta$ (mV)	-19 ± 1	-17	27 ± 1
50 µg/mL NPs in cell medium			
$D_H$ (nm)	283 ± 36	224 ± 14	144 ± 2
$\zeta$ (mV)	-13	-23	6
200 µg/mL NPs in cell medium			
$D_H$ (nm)	357 ± 8	338 ± 23	137 ± 1
$\zeta$ (mV)	-31	-21	36



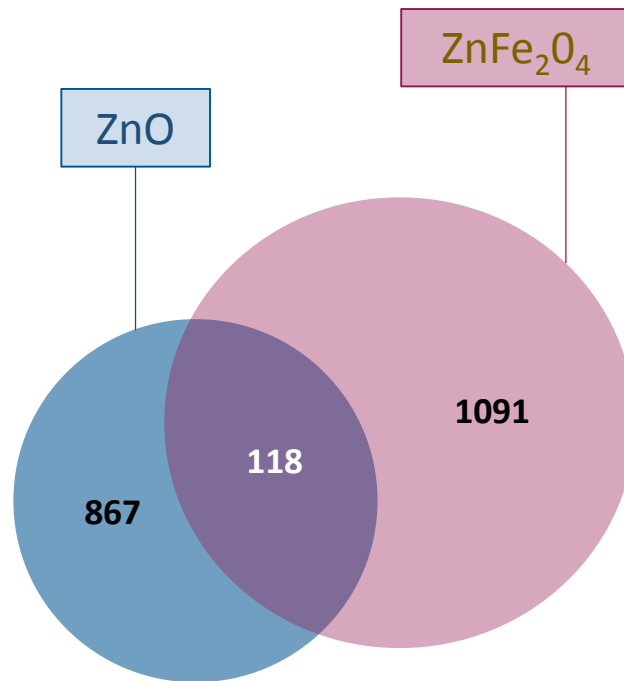
**Fig 1.** Transmission electron microscopy images of zinc oxide NP (A, B), zinc iron oxide 3 (C, D) and iron oxide (E, F).



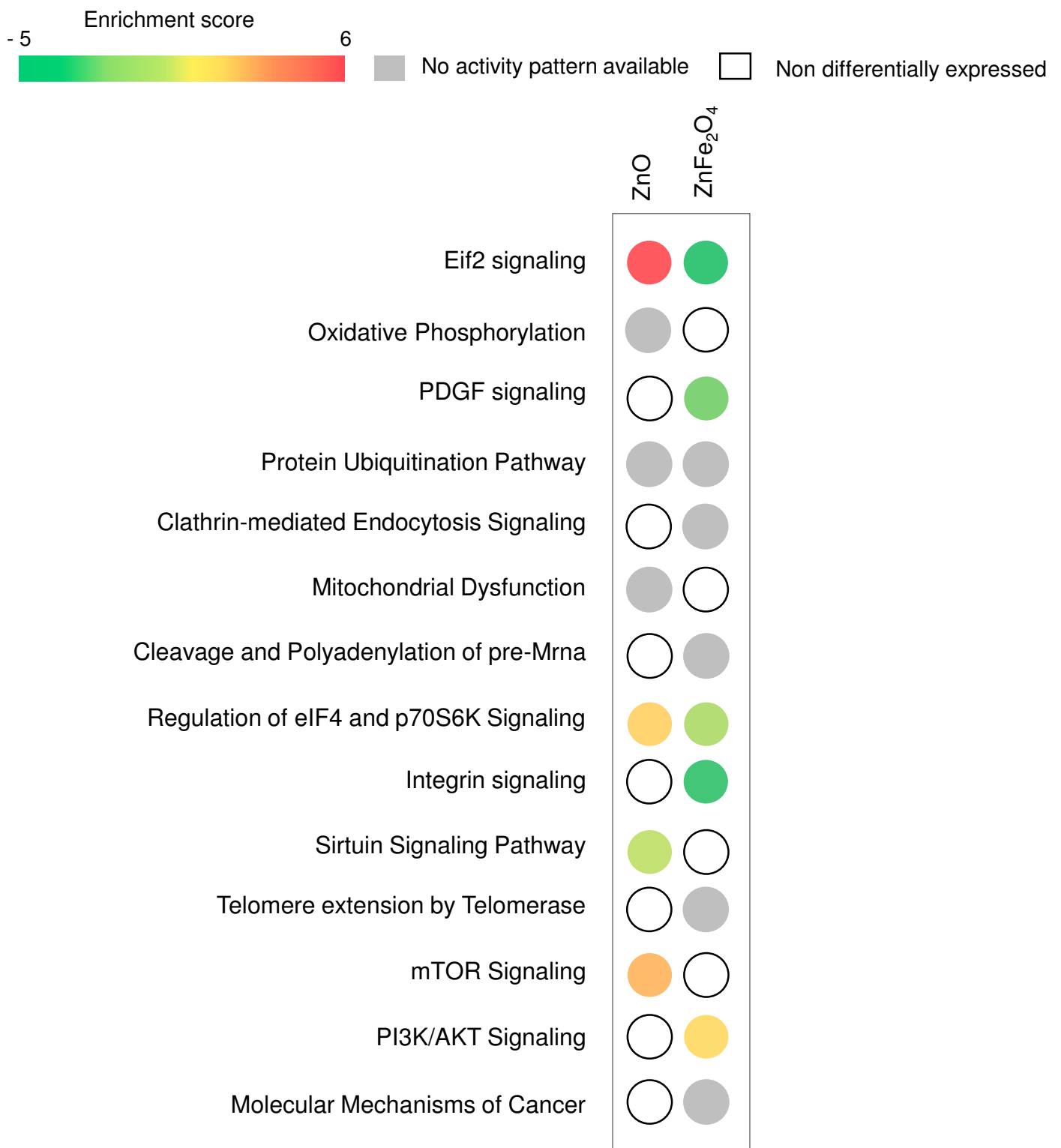
**Fig. 2.** Cytotoxicity of ZnO NP (A), ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (B) and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (C). Cytotoxicity was determined after 24 h exposure of NR8383 to the panel of studied nanoparticles. At the left, the induction of membrane damage after cell exposure to different studied nanoparticles by measuring the level of extracellular LDH. At the right, Action of ZnO, ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on NR8383 mitochondrial activity measured by WST1 assay. Calculated IC<sub>50</sub>, based on WST-1 assay data, for ZnO, ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> were respectively 16, 68 and more than 200 µg/mL.

**A**

■ Failed to pass both of the cut-offs    ■ Passed both cut-offs and up-regulated    ■ Passed both cut-offs and down-regulated

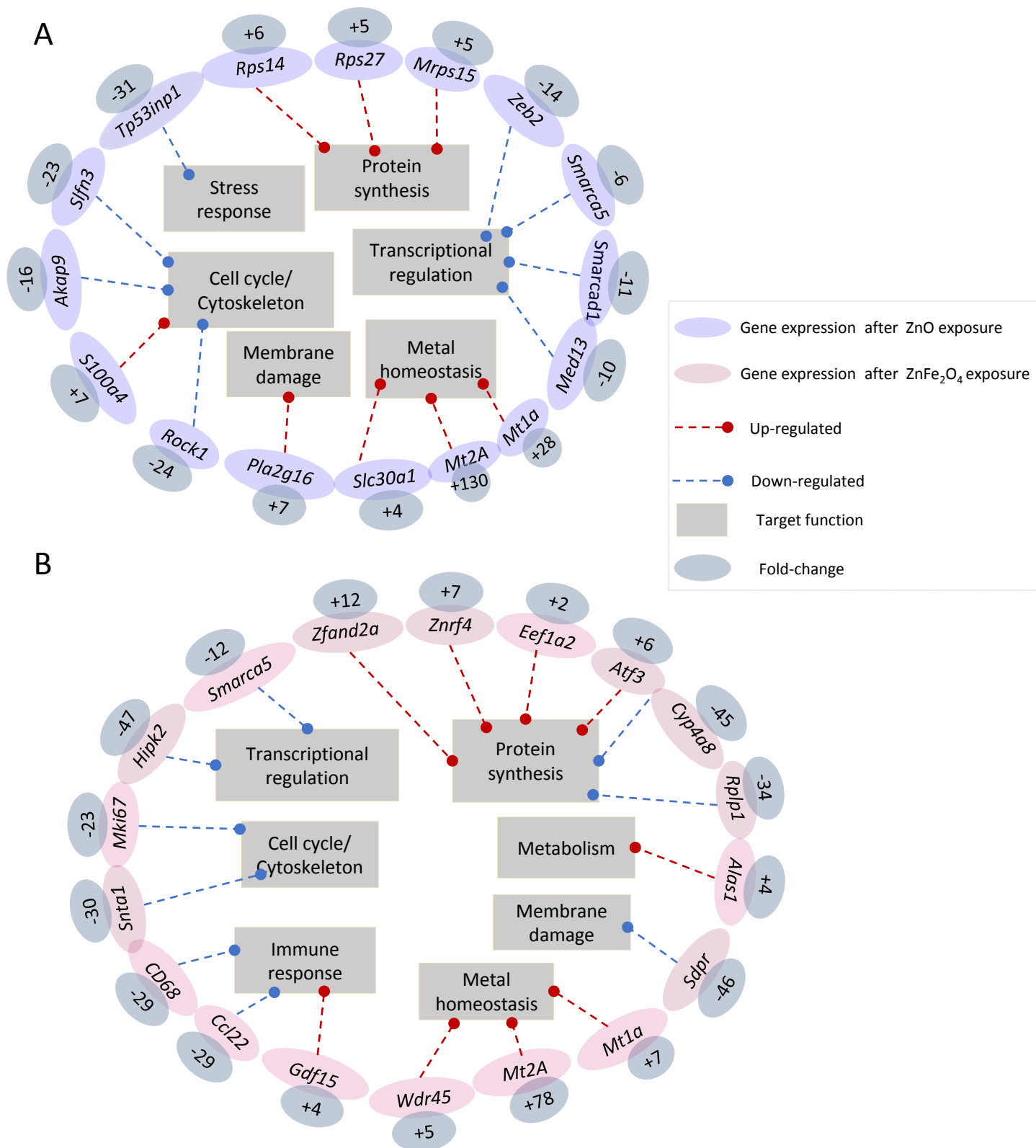
**B**

**Fig. 3.** Differentially expressed genes (DEG) of NR8383 cells exposed to  $\frac{1}{4}$  IC<sub>50</sub> of ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP during 4 h. Two cut-offs were applied : statistical test Benjamini-Hochberg corrected at  $p$ -value  $< 0,001$  and fold changes  $> |1,5|$ . **A)** Representative volcano plots of differentially over-expressed (in red) and down-expressed (in blue) genes, for each exposure condition. Numbers of DEG are indicated. **B)** Venn diagram showing common differential genes expression between cells exposed to ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP.

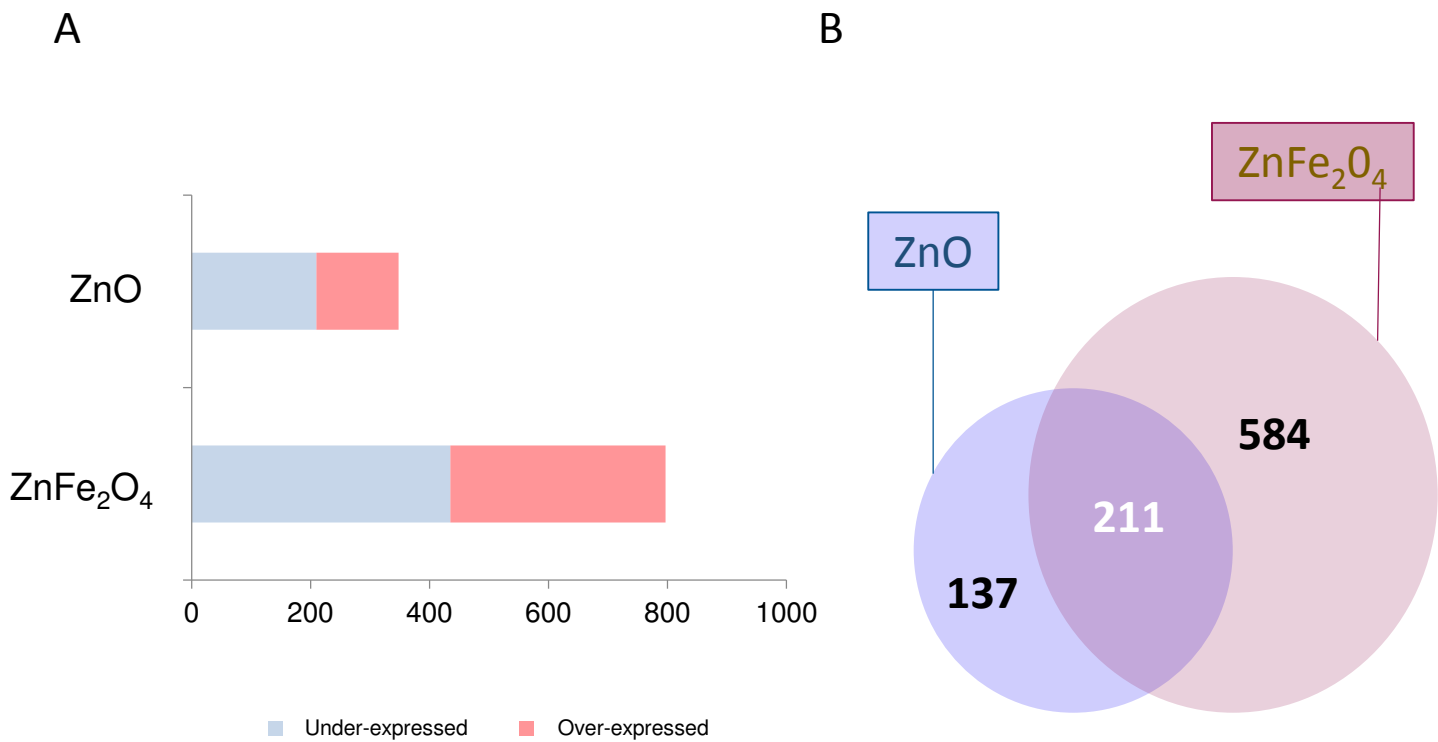


**Fig. 4.** Heatmap showing 14 deregulated canonical pathways after ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP exposures. Statistical test Benjamini-Hochberg corrected at  $p$ -value < 0,001 and fold changes = |1,5|. IPA software based on  $p$  < 0,05. Deregulated pathway more significant from left to right.

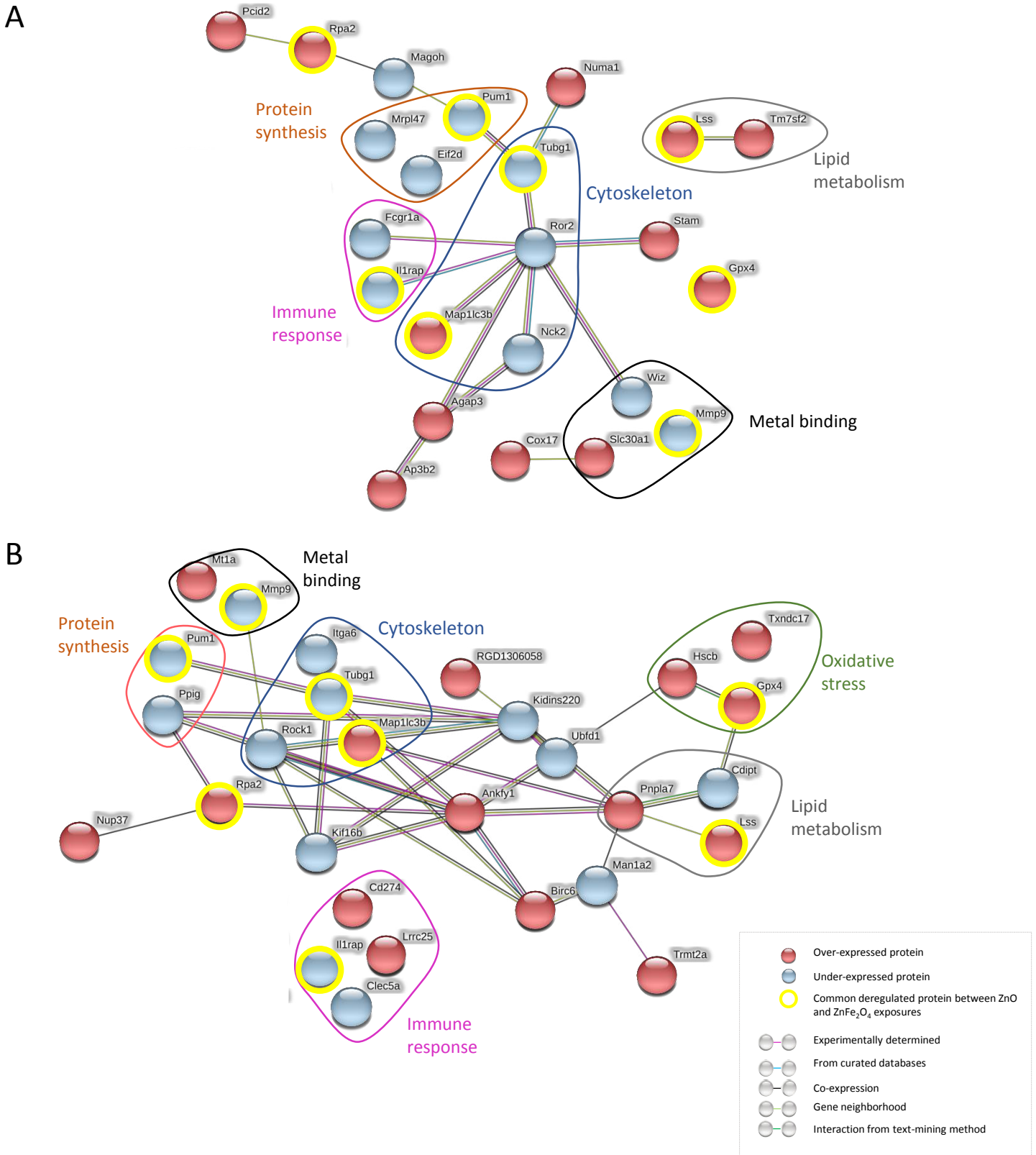




**Fig. 5.** The main strongly deregulated genes in NR8383 cells exposed to  $\frac{1}{4}$  IC<sub>50</sub> of ZnO NP (**A**) and  $\frac{1}{4}$  IC<sub>50</sub> of ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP (**B**) during 4 h. Statistical test was Benjamini-Hochberg corrected at  $p$ -value < 0,001. Both blue (A) and pink (B) colors are representing the ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP deregulated genes. The fold change values are in the gray circles linked to the corresponding genes. The red and blue arrows indicate overexpression and under-expression of linked genes, respectively. Finally, the functions involved are arranged in rectangles.

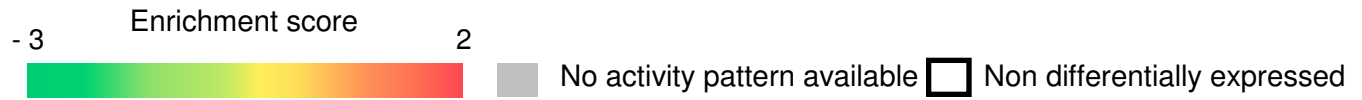




































**Fig. 6. A)** Histogram of proteomic data. Data for the total differentially produced proteins (DPP). **B)** Venn diagram showing common DPP between cells exposed to ZnO and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NP.



**Fig. 7.** The main strongly deregulated proteins in NR8383 cells exposed to both  $\frac{1}{4}$  IC<sub>50</sub> doses of ZnO NP **(A)** and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP **(B)** during 24 h. **A)** Proteins ratio :  $16 \times 10^6 \leq R_{ZnO} \leq 0.18$ ; **B)** Proteins ratio  $6 \times 10^6 \leq R_{ZnFe_2O_4} \leq 2.6 \times 10^{-7}$ .

**Table 4.** Ranking of selected canonical pathways and number of deregulated produced proteins involved in each condition.



Response		Ranking of canonical pathways		Number of deregulated proteins		Enrichment score	
		ZnO	ZnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	ZnO	ZnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	ZnO	ZnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
Stress response	• Mitochondrial dysfunction	2	3	13	24		
	• Oxidative phosphorylation	8	59	8	10		
	• mTOR signaling	49	8	9	22		
	• NRF2-mediated oxidative stress response	24	6	10	24		
	• Sirtuin signaling	5	4	15	24		
Cell cycle/proliferation	• PI3K/AKT signalling	45	9	7	16		
	• VEGF signaling	12	-	8	-		
Protein synthesis/modification	• EIF2 signaling	1	1	16	30		
	• Regulation of eIF4 and P70S6K signaling	7	2	10	24		
	• Protein ubiquitination pathway	39	5	11	26		
	• Unfolded protein response	3	30	7	8		
Cell mobility	• Paxillin signaling	5	39	9	12		
	• Integrin signaling	8	16	12	21		
Lipid homeostasis	• Superpathway of cholesterol biosynthesis	9	88	4	3		
Cell modelling	• Actin cytoskeleton signaling	46	7	10	24		
Cancer	• Cancer drug resistance by drug efflux	9	109	6	6		
Metal exposure response	• Iron homeostasis signaling pathway	-	12	-	16		

**Table. 3.** Measure of zinc (Zn) and iron (Fe) in in/onto NR8383 cells by Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometer.

	ZnO		ZnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	
	¼ IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>	¼ IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>
Theoretical NP concentration (µg/mL)	4	16	17	68
Measured Zn concentration (ng/mL) in cell phase	62.1 ± 1.5	130.7 ± 0.4	16.1 ± 0.3	18.2 ± 0.1
Measured Fe concentration (ng/mL) in cell phase	n.d	n.d	82.7 ± 0.2	78.2 ± 0.3